



# TMC 2020

25-27 Aralık 2020

Çevrim İçi Mikrobiyoloji Sempozyumu

## Tam Metin Bildiri Kitabı



[www.tmcvirtual2020.org](http://www.tmcvirtual2020.org)





# SEMPOZYUM DÜZENLEME KURULU

## Sempozyum Başkanı

Bariş OTLU

## Sempozyum Sekreteri

Mustafa ÖZYURT

## Sempozyum Saymanı

Serap SÜZÜK YILDIZ

## Üyeler

F. Yüce AYHAN

Osman Sezer CİRİT

Candan ÇİÇEK

Nilay ÇÖPLÜ

Gül ERDEM

M.Selda ERENŞOY

Çağrı ERGİN

Alper ERGİN

Özgen ESER

Gülşen HASÇELİK

Z.Ceren KARAHAN

Ayşe KALKANCI

A.Esra KARAKOÇ

Özgür KURT

Aydan ÖZKÜTÜK

Fadile YILDIZ ZEYREK





# TAM METİN SEMPOZYUM KONUŞMALARI



# Türkiye’de Salgının Tanısal Stratejisinde Yapılanlar, Yapılması Gerekenler

Alper Akçali

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale

[aakcali@com.edu.tr](mailto:aakcali@com.edu.tr)

Tüm dünyayı yoğun şekilde etkilemiş olan SARS-CoV-2 virüsü kaynaklı salgın sebebi ile laboratuvar testlerinin doğru ve etkili kullanımı gündeme gelmiştir. Salgının pandemi şekline gelmesi sebebi ile testlerin kullanımı değerlendirilirken herkesi test edebilir miyiz, semptomu olmayanları test etmeli miyiz, PCR testi ile topluluk taraması yapabilir miyiz, hiç bir test mükemmel değildir öyleyse yanlış pozitifler sorun mudur gibi sorular yanıt beklemektedir.

Ülkemizde salgının başlanıcı itibarı ile hızla laboratuvar altyapı kapasitesi artırılmış, PCR yöntemi ile her ilde test yapan merkezlere işlerlik kazandırılmıştır. Başlangıçta semptomu ve epidemiyolojik ilişkisi olanların test edilmesi sağlanmıştır. Sonrasında riskli ve takibi önemli görülen bazı alanlarda tarama amaçlı test politikası da yürürlüğe girmiştir.

Ülkemizdeki güncel test sisteminde Aralık 2020 itibarıyla kliniği olanlar, kliniği olan temaslılar, izolasyonu erken bitirmek için PCR testi ile kontrol, askeralma, yaşlı bakımevleri, ceza ve tutukevi taramaları ve sağlık çalışanı taramaları, otopsi öncesi PCR testleri çalışılmaktadır. Bunun yanında özel şirketler, organize sanayi bölgeleri gibi alanlarda kişisel kaynaklarla tarama amaçlı testler de çalışılmaktadır. Kliniği olmayan temaslılara da test yapılabilmesi gündemdedir, ancak bu kişilerde negatif sonuç geldiğinde ne yapılacağı netleşmemiştir, bu bireylerin bir başka gündeki testinin pozitif çıkma olasılığı elbet akıldaki tutulmalıdır, ayrıca negatif sonuç kişinin bireysel izolasyon kurallarını gevşetmesine de sebep olabilecektir.

Dünya Sağlık Örgütü, covid-19 tanısı ve izleminde kesin vaka olarak nükleik asit amplifikasyon (NAA) yöntemleri ile klinik numunede virüse özgül RNA’nın saptanmasını şart koşturmaktadır. Ancak tekrarlayan NAA testi negatif sonuçları elde edilen bunun yanında kliniği uyan kişilerde antikör testlerinde serokonversiyonun gösterilmesinin de kesin/doğrulanmış vaka olarak kabul edileceği DSÖ tarafından bildirilmektedir.

Pandemi durumunda kimlere testin uygulanacağı kaynakların sınırlı olması sebebi ile tartışma konusu olmaktadır. Yayılımın engellenmesi için mümkün olduğu kadar test yapılması önerilmiş olmakla birlikte laboratuvar kapasiteleri buna yeterli olmadığı gibi, bir toplumda herkesin test edilmesi mümkün görünmemektedir. Bunun yanında hiçbir testin mükemmel olamayacağı düşünülürse tarama ve toplu testlerde yanlış pozitif ve yanlış negatif

sonuçların elde edileceği zaten beklenmelidir. Yi G. ve ark. nın yaptığı modellemede yanlış negatif sonuçların hastalık prevalansı ile büyük oranda değişmekle birlikte, prevalansın %10 olduğu 10000 kişilik bir toplulukta bir anda yapılacak taramada kullanılan kitin duyarlılığı %90 olduğunda ortalama 100 yanlış negatiflik elde edilecektir. Bunun yanında kitin özgüllüğü %90 olduğunda aynı toplulukta 1000 civarında yanlış pozitiflik saptanacaktır. Bu rakamlar geniş taramalardaki sonuçların dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Kullanılan kitlerin duyarlılık ve özgüllük sorunları dışında üretim hatlarında kontaminasyon sorunu da gündeme gelmektedir. Wang ve ark. ile Huggett ve ark. üretici kaynaklı kontaminasyonlara dikkat çeken bildirimlerde bulunmuşlar ve kullanıcıların beklenmedik sonuçları dikkatle değerlendirmelerini önermişlerdir.

Pandemi sürecinde sahadaki ihtiyaca hızla cevap vermek için SARS-CoV-2 nükleik asit testlerinin Amerika’da kullanımına Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) dosya incelemesi ile hızlı kullanım izni vermişti. Kasım 2020 tarihinde bu izni verdiği üreticilere gönderdiği paneller ile kitlerin alt saptama limitlerinin hesaplanmasını sağlamış ve web listesinde bu veriyi ilan etmiştir. Bu sonuçlara göre alt sapama limiti (LOD) en düşük olan kit 180 birim LOD iken en yüksek kit 60000 birim LOD görünmektedir. Sistem içerisinde 3333 kat analitik duyarlılık farkı olan kit mevcut olması şaşırtıcıdır.

Ülkemizde salgın döneminde hızla cevap verilerek, ulusal çaplı bir dış kalite kontrol programı Mayıs 2020 son haftası itibarıyla yürütülmeye başlanmıştır. Halk sağlığı genel müdürlüğü ve Moleküler Tanıda Kalite Kontrol (MOTAKK) işbirliği ile ilk başlangıçta her hafta olmak üzere yürütülmüş programda ülke çapındaki tüm yetkili laboratuvarlar hedeflenmiştir. On haftalık ilk dönemin değerlendirmesinde sonuç gönderen laboratuvarlar arasında doğru raporlama oranı %90.95 olarak bildirilmiştir. Kalite kontrol programı Aralık 2020 itibarıyla aylık olarak devam ettirilmektedir.

Laboratuvar kapasitesinin artırılması ve test raporlama sürelerinin azaltılması için, ekstraksiyon basamağının uygulanmayacağı protokoller de denenmektedir. Smyrlaki I ve ark. larının çalışmasında olduğu gibi uygun koşullar sağlanarak direkt PCR olarak adlandırılan protokoller oluşturulabilmektedir. Ülkemizde de örneklerden doğrudan PCR testleri politikası benimsenmiş durumdadır.

Test kapasitesinin ülke genelinde genişletilmesi planlamalarında Sağlık Bakanlığı, 14.08.2020 tarihinde 95966346-449-E.851 sayılı yazısı ile Genetik Hastalıklar Tanı/Değerlendirme Merkezleri'ne, 28.10.2020 tarihinde 95966346-449-E.1155 sayılı yazısı ile de ek olarak Tıbbi Biyokimya laboratuvarlarında da SARS-CoV-2 pcr testlerinin yapılması iznini vermiştir.

İnternet üzerinden gördüğümüz üzere bazı özel hastaneler kişinin evinde kendi alacağı örnekleri kargolaması ile testleri çalışabileceklerini duyurmuş, ayrıca yoğun kullanılan internet satış kanallarında da immünokromatografik temelli antikor saptama kitlerinin pazarlandığı görülmüştür. Bu tip kullanımlar ile sonuçların doğruluğu ve sağlıklı değerlendirilmesi tartışmalıdır.

Salgında etkili bir PCR test altyapısının kurulması ve devam ettirilmesi gereklidir. Artan test sayıları sebebi ile laboratuvarlar sonuçları gününde raporlayamaz hale gelebilmektedir. Kapasite artırımında insan kaynaklı iş gücü eksikleri ve hataların azaltılabilmesi için örnek ve pcr mikslerinin dağıtımının otomatik robotik sistemle yapıldığı cihaz yatırımları önceliklenmelidir. Bunun dışında kit bağımsız tamamen açık sistem olan baştan sona testlerin el değmeden tamamlandığı real-time PCR platformları da yüksek kapasitenin gerektiği alanlarda tercih edilebilir. Açık platform cihazlarda 96 kuyucuklu sistemlerin yanında 384 kuyucuklu cihazlara yatırımın tercih edilmesi hem pcr kimyasallarının sarfının azaltılmasına hem de bir cihazdan hızlıca sonuç üretilmesine katkı sağlayabilecektir.

Bu pandemide ayrıca PCR sonuçlarında Cq (Ct) değerlerinin kullanımı hakkında yoğun bir çaba gözlenmektedir. Rhoads D. ve ark.'nın CAP (College of American Pathologists) mikrobiyoloji komitesi görüşünde gördüğümüz üzere, analizlerde elde edilecek Cq/Ct değerleri pek çok faktöre bağlıdır. CAP tarafından yürütülen kalite kontrol çalışmalarında aynı örneklerin aynı üreticinin kitleriyle çalışılmasında dahi laboratuvarlar arası 12 birim Ct/Cq raporlama farklılığı görüldüğü bildirilmektedir. Ülkemizde son dönemlerde virüse ait iki farklı gen bölgesinin tek renk sonda (prob) ile değerlendirilmesi göz önüne alınırsa ülkemizdeki Ct/Cq yorumlamalarının çok daha büyük farklara yol açabilmesi mümkündür.

Bundan sonrasında yapılması gerekenler öneri olarak aşağıdaki başlıklarda sıralanabilir;

1. Etkili laboratuvar ağı iletişimi ve koordinasyonu
2. Akılcı kapasite kullanımı
3. Akılcı kapasite artırımı
4. Vaka testini önceleyen saha uygulamaları
5. Numune alım merkezlerini çoğaltıp-yaymak

6. PCR testi dışındaki testlerin uygun zamanda ve amaçla kullanımı
7. Mutasyon izlemi için ulusal çok merkezli planlama
8. Bölgesel prevalansın şeffaf paylaşımı – test stratejisi kararında kullanımı
9. Kullanılan kitlerin saha performanslarının izlemi – iyileştirici faaliyetlerin yürütülmesi
10. Yetkili laboratuvarların izlenmesi - desteklenmesi
11. Testlerin değerlendirilmesinin Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanı yetkinliği olduğunun netleştirilmesi
12. Kimyasal ve plastik sarf malzemelerinin ulusal üretimini teşvik edici stratejilerin geliştirilmesi

KLİMUD bu süreçte yoğun eğitim faaliyetleri yürütmüş ve ülkemizdeki uzman ve teknik personelin bilgi düzeyinin artırılması ve uygulamalarda ortak sonuçların elde edilmesi için düzenli bilgilendirmelerde bulunmuştur.

Sonuç olarak, tanıda kullanılacak yöntemlerin doğru grupta kullanımı en önemli basamaktır. Yeterli duyarlılıkta kit seçimi ve uygun kalite kontrol izlemlerinin yapılarak takip edilmesi ve laboratuvarların kısa sürede sonuç verebilir olması için düzenlemelerin yapılması gereklidir. Sahadaki tanı kapasitesinin izlenmesi ve mutlaka tüm imkanlarla desteklenmesi de çok önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** COVID-19 pandemisi, tanısal testler

#### Kaynaklar

1. <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
2. Yi G, He W, Lin DKJ, Yu CM. COVID-19: Should we test everyone? arXiv.org > stat > arXiv:2004.01252
3. Wang CYT, Buckley C, Bletchly C, Harris P, Whiley D. Contamination of SARS-CoV-2 RT-PCR probes at the oligonucleotide manufacturer. Pathology. 2020;52(7):814-6. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.08.002>
4. Huggett JF, Benes V, Bustin SA, et al. Cautionary note on contamination of reagents used for molecular detection of SARS-CoV-2. Clin Chem. 2020;66(11):1369-72. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa214>
5. [www.motakk.org](http://www.motakk.org)
6. Smyrlaki I, Ekman M, Lentini A, et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. Nat Commun. 2020;11(1):4812. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5>
7. Rhoads D, Peaper DR, She RC, et al. College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee Perspective: Caution must be used in interpreting the Cycle Threshold (Ct) value. Clin Infect Dis. 2020;ciaa1199. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1199>

# İnsanlardaki SARS COV-2 Virüs Enfeksiyonunu Taklit Eden En iyi Hayvan Modeli

Osman Yılmaz<sup>1</sup>, Canberk Yılmaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Merkezi, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir

✉ osman.yilmaz@deu.edu.tr

COVID-19, koronavirüs ailesinin bir üyesi olan SARS-CoV-2'nin neden olduğu bilinen ilk pandemidir<sup>(1)</sup>. Koronavirüsler (CoV'ler), Coronaviridae ailesine aittir. Pandeminin nedeni olan virüsü yarasa kaynaklı olduğu bildirilmiştir. Ancak henüz virüsün yarasadan hangi ara konakçı hayvan ile insana geçtiğini tespit edilememiştir. Yarasalar ve kuşlar koronavirüsler için başlıca rezervuarlardır<sup>(2)</sup>.

Koronavirüslerin sınıflandırılmasında filogenetik ilişki, dizi analizi ve serolojik inceleme sonucunda alfa, beta, gama ve delta CoV'den ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ -CoV) olmak üzere 4 alt grubu vardır<sup>(3)</sup>. SARS-CoV-2 virüsü zarflı bir RNA virüsüdür. Koronavirüsler, dar konakçı aralığı olan vahşi hayvanlarında bulunan bir virüstür. Koronavirüslerin, alphacoronavirus (yarasalarda), betacoronavirus (yarasa, murin, insan koronavirüsü (SARS CoV-1, MERS ve SARS CoV-2)) alt grupları sadece memelilerde enfeksiyon yaparken, gammacoronavirus ve deltacoronavirus alt grupları memeli ve kuşlarda hastalık yapmaktadır<sup>(4)</sup>. Tablo 1'de Koronavirüslerin alt grupları ve konakçıları verilmiştir.

## SARS-CoV-2 Preklinik Araştırmalarında Uygun Hayvan Modelleri

İnsan koronavirüsleri (HCoV'ler), solunum yolu

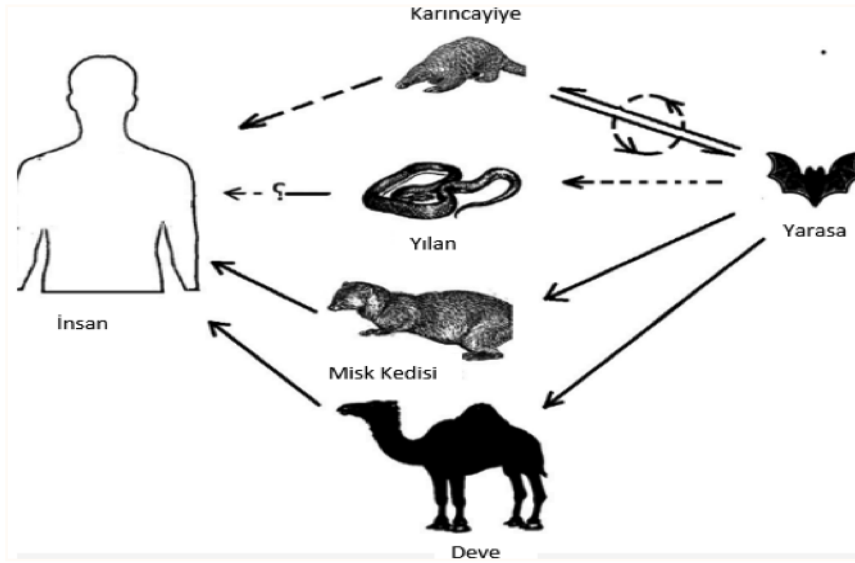
patojenleridir<sup>(4)</sup>. İnsanlarda son yirmi yılda tekrarlayan şiddetli hayvan koronavirüsleri ile enfekte olmaktadır. Bu virüs ailesinin salgınlarına karşı korunma ve tedavi için aşılarda ve antiviraller geliştirmeye acil ihtiyaç vardır. Şu anda, SARS-CoV-2'ye karşı birkaç potansiyel aşı ve antiviral vardır ve bunların bazıları şu anda klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir<sup>(1)</sup>.

Son 20 yılda kendi konakçısı dışına çıkan SARS ve MERS koronavirüsler çok ciddi salgınlara neden olmuştur. SARS CoV-1 virüsünde arakonakçı misk kedisi, MERS CoV virüsünde deve ve SARS-CoV-2 virüsünde kesin olmamakla birlikte pangolin<sup>(6)</sup> veya yılan ara konakçıları olarak göstermektedir. Farklı virüslerin rezervuarı konumundaki yarasalardan insanlara geçiş yapması için başka bir ara konakçı memeliye geçmesi gerekir. İnsanların önemli viral hastalıklarının çoğu, evcil veya vahşi hayvan rezervuar hayvanlardan bulaşmaktadır. Şekil 1'de Koronavirüs rezervuarı ve arakonakçıları verilmiştir. Mevcut bilgilerimize göre, SARS-CoV-2'nin hayvandan insana doğal bulaşma veya hayvandan hayvana sürekli bulaşma olduğuna dair güçlü bir kanıt yoktur. Virüs bir hayvan rezervuarından, olasılıkla yarasalardan veya pangolinlerden geçiş yaptığı düşünülmektedir<sup>(1)</sup>.

Tablo 1. Koronavirüslerin Konakçı ve Alt Grupları<sup>(5)</sup>.

| Konakçısı                                   | Alfa                                                                              | Beta                                                                     | Gama                                         | Delta                 |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|
| İnsan                                       | İnsan CoV-229E,<br>İnsan CoV-NL63                                                 | İnsan CoV OC43,<br>İnsan CoV HKU1                                        |                                              |                       |
| Yarasa kökenli<br>(insanlarda<br>salgınlar) |                                                                                   | SARS-CoV-2,<br>SARS-CoV,<br>Orta Doğu Solunum<br>Sendromu ile ilgili CoV |                                              |                       |
| Kedigiller                                  | Kedi CoV                                                                          |                                                                          |                                              |                       |
| Köpek                                       | Köpek enterik CoV                                                                 | Köpek solunum CoV                                                        |                                              |                       |
| Domuzlar                                    | Domuz epidemik diyaire,<br>Domuz solunum CoV,<br>Bulaşıcı gastroenterit<br>virüsü | Domuz hemagglütinasyon<br>ensefalomyelit virüsü                          |                                              | Domuz<br>CoV<br>HKU15 |
| Geviş getirenler                            |                                                                                   | Sığır CoV,<br>Antilop CoV,<br>Zürafa CoV                                 |                                              |                       |
| Tek tırnaklılarda                           |                                                                                   | At CoV                                                                   |                                              |                       |
| Yarasa                                      | Çeşitli yarasa CoV'leri                                                           | Üç yarasa CoV                                                            |                                              |                       |
| Kuş                                         |                                                                                   |                                                                          | Türkiye CoV,<br>Enfeksiyöz<br>bronşit virüsü | Dokuz kuş<br>CoV'si   |
| Kemirgenler                                 |                                                                                   | Murine CoV, Sıçan CoV                                                    |                                              |                       |
| Diğer                                       |                                                                                   | Kirpi CoV HKU31,<br>Pangolin CoV                                         | Beluga balinası<br>CoV-SW1                   |                       |

<sup>(5)</sup> Hosie MJ et al. SARS-Coronavirus (CoV)-2 and cats, European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD) kaynağından alınmıştır.



Şekil 1. Koronavirüs rezervuarı ve arakonakçıları<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> Abdel-Moneim AS et al. Evidence for SARS-CoV-2 infection of animal hosts. *Pathogens* 2020;9(7):529. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070529> kaynağından alınmıştır.

Son yirmi yılda SARS-CoV ve MERS-CoV virüsleri insanları enfekte etmek için kendi tür engelini aşarak insanlara bulaşmış ve insanda şiddetli solunum yolu hastalığına neden olmuştur. COVID 19 salgınına neden olan SARS-CoV-2 virüsünde genetik olarak %94 SARS CoV 1'e benzerken %4 oranında genomunda mutasyona uğramıştır. SARS-CoV ve MERS-CoV'nin viral S proteininin konakçıya giriş reseptör bağlanma alanı, insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (hACE2) aracılığı ile olmaktadır<sup>(7)</sup>. SARS-CoV-2 virüsünü ile enfekte olan insanların bazıları hastalığı asemptomatik olarak atlarken bazıları şiddetli pnömoni ya da ölümle sonuçlanabilmektedir. SARS-CoV-2 virüs hayvan modellerinde insanlardaki hastalığın hangi belirtilerini taklit eden hayvan ideal hayvan modelidir sorusunu cevap aramaktadır. Uygun hayvan modeli bulunursa, virüse karşı aşı ve ilaç çalışmalarını yürütmek daha da kolaylaşacaktır.

SARS-CoV-2 virüsünün, hayvan modelinde başarılı bir enfeksiyon oluşturmaları için virüsün konakçı hücreye girmesi ve virüsün hücre içi replikasyonu gibi iki temel adım başarılı olarak tamamlaması gerekir. Virüsün hücreyi enfekte etmesi için, hücre zarında spesifik reseptör proteinleri viral girişe aracılık etmesi gerekir. COVID 19 salgınında aşı ve ilaç geliştirmede farklı hayvan türü modelleri kullanılmıştır.

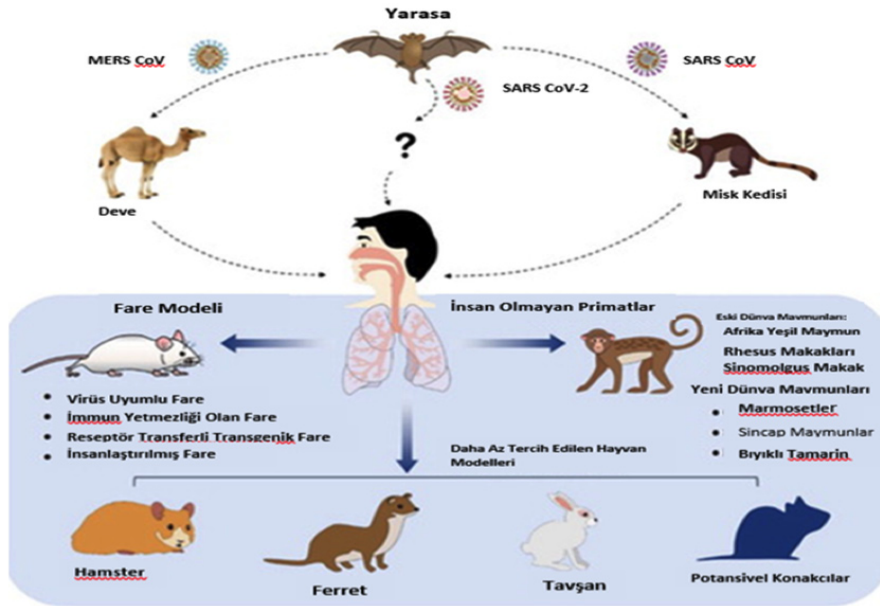
SARS-CoV-1 ve MERS-CoV hayvan modelleri olarak fareler, hamsterlar, yaban gelinciği, maymunlar ve develeri kullanılmıştır.

Shi ve ark.<sup>(8)</sup> SARS-CoV-2 virüsün bulaşma, üreme ve patogenezi için yaban gelinciği, kediler, köpekler, domuzlar, tavuklar ve ördeklerin burun içine virüs uygulanmıştır. Enfekte edilen kedilerin ve gelinciklerin üst solunum yollarında virüsün tutunduğu ve ürettiği tespit edilirken solunum sisteminde hastalığın ciddi klinik belirtiler gözlenmemiştir. Domuz, tavuk ve ördeklerde virüsün bulaşmasına izin vermemiştir.

Yuan ve ark.<sup>(7)</sup> koronavirüs maymun modeli için farklı maymun türlerini, rhesus makakları (*Macaca mulatta*), cynomolgus makakları (*Macaca fascicularis*), yeşil maymunları (*Chlorocebus sabaeus*), marmosetler (*Callithrix jacchus*), sincap maymunları (saimiri) ve bıyıklı tamarinleri (*Saguinus mystic*) koronavirüs çalışmalarında kullanılmıştır. Maymunlara intranazal ve intratrakeal uygulanan SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş cynomolgus makaklarının hafif klinik belirtiler göstermiştir. Rhesus makaklarının, cynomolgus makakları ve marmosetlere kıyasla SARS-CoV2 bulaşmasına daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Rockx B et al.<sup>(9)</sup> rhesus makaklarında inaktive bir aşının etkinliğini test etmek için kullanmışlardır. Bu çalışmada, inaktive edilmiş SARS-CoV-2 ile aşılama, makaklarda viral proteini ve nükleoproteine karşı antikorlar ürettiği gösterilmiştir. SARS CoV-2 immünize edilen maymunların SARS-CoV-2 virüsü ile enfekte edilemediği ve maymunlarda farens ve akciğerlerde virüs saptanmamıştır. Sonuç olarak fare ve insan olmayan primatlar ve fareler, aşı ve antiviral etkinliği değerlendirmek için en uygun modeli olabileceği belirtilmiştir<sup>(10)</sup>.

SARS CoV 2 fare modeli, düşük maliyeti, kolay nakilleri, küçük boyutu, kolay kullanımı ve yüksek tekrar edilebilir sonuçlar alınması nedeniyle birçok farklı virüs çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Normal fareler SARS-CoV-2 virüsüne dirençlidir. SARS CoV 2 virüsün yüksek patojenitesi nedeniyle yüksek biyogüvenlik düzeydeki bir laboratuvar da çalışmak uygundur. Bu yüzden model hayvanın küçük olması bir avantajdır. SARS-CoV veya MERS-CoV virüsünün türe özgü direnci kırmak için farede bir insan reseptör genini transfer ederek daha duyarlı hale getirilmiştir<sup>(11)</sup>. SARS-CoV-2 virüsü, insanları enfekte ederken hedef hücrelerine girmek için bir reseptör anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE 2) kullanır. Bunu artırmak için normal fareler yerine ACE 2 reseptörü bulunan transgenik fareler kullanılması fareleri virüse daha duyarlı hale getirmiştir. Bu nedenle transgenik fareler modeli, COVID 19 virüsüne karşı antiviral terapötik





Şekil 2. Koronavirüslerin arakonakçı ve hayvan modelleri<sup>(7)</sup>.

<sup>(7)</sup> Yuan L et al. Animal models for emerging coronavirus: progress and new insights, *Emerg Microb Infect.* 2020;9(1):949-61. kaynağından alınmıştır.

ajanların ve aşılarda test edilmesinde kullanılabilir.

Yuan L et al.<sup>(7)</sup>, gelincik (ferret) model hayvan olarak, influenza virüsü (IFV), respiratuar sinsitiyal virüs (RSV), adenovirüs ve koronavirus dâhil olmak üzere solunum patojenlerinin çalışmalarında model hayvan olarak kullanılmıştır. SARS-CoV-2 gelincik hayvan modelinde üst solunum yollarında viral yoğunluğa ulaştığı, ateş, hışırtı, pnömoni ve ölümler gözlenmiştir. Başka bir çalışmada gelinciklerde virüs ile bulaşmanın hem direk hem de indirek olabildiği gösterilmiştir. Gelinciklerde SARS-CoV-2 virüsü, akciğerlerde akut bronşite, burun, trakea, akciğerler ve bağırsakta virüs tespit edildi<sup>(12)</sup>. Gelincik ve kedilerin SARS-CoV-2'ye oldukça duyarlıdır; köpekler düşük duyarlılık; domuzlar, tavuklar ve ördekler virüse duyarlı olmadığı göstermiştir.

SARS-CoV-2 virüsü, yaban gelinciği ve hamsterlarda hafif ve şiddetli akciğer histopatolojik değişiklikler yapar. Bu viral salgının hastalık semptomunun şiddeti viral suşlara bağlı olabilir<sup>(7)</sup>. SARS-CoV-2 virüsü, maske kullanan hamsterlerde yapılan araştırmalar, maskelerin bulaşma riskini azalttığını gösterilmiştir. Hamsterler doğal olarak SARS-CoV-2'ye duyarlıdır ve yüz maskelerinin yaygın kullanımının ölümcül koronavirusun bulaşmasını azalttığını ortaya koyulmuştur.

SARS-CoV-2 virüsünün ideal hayvan modeli, insandaki bulaşma, yerleşim yeri, hastalık belirtileri en iyi taklit eden modeldir. SARS-CoV ve MERS-CoV prelinik araştırmalarında tek bir hayvan türü tüm koronaviruslar için hayvan model oluşturmayacağını göstermiştir<sup>(13)</sup>. Araştırma amaç ve hedefleri doğrultusunda uygun model seçmek daha iyi sonuç vermektedir. Hastalığın klinik belirtileri, viral replikasyonu ve organ ve doku patolojisi hayvanın türüne

bağlı olarak değişmektedir. Bununla beraber virüsün genç hayvanlarda sınırlı klinik belirtileri oluşturur iken, yaşlı hayvanlarda daha belirgin değişiklikler göstermiştir. Dolayısı yaşlanmayla bağışıklık azalması ile virüs daha etkin enfeksiyon oluşturabilir bu durumun aşı ve ilaç etkinlik çalışmalarında göz önünde tutulmalıdır<sup>(14)</sup>.

## Sonuç

COVID-19 pandemisine sebep olan SARS-CoV-2 virüsüne prelinik araştırmalarında çalışmanın niteliğine ve hedeflerine göre transgenik fare (ACE-2), insan olmayan primatlar ideal hayvan modeli olarak kabul edilirken, hamster, yaban gelinciği ve kediler hayvan modelleri olarak tercih edilebilir. Fakat köpekler, domuzlar ve kümes hayvanları SARS-CoV-2 dirençli olduğunu göstermiştir. SARS-CoV-2 aşılı ve antiviraller geliştirilmesinde transgenik farelerde ve insan olmayan primat kullanımını azaltmak için kritik bir yerde olup diğer modellerden öndedir.

## Kaynaklar

1. Abdel-Moneim AS, Abdelwhab EM. Evidence for SARS-CoV-2 Infection of animal hosts. *Pathogens*. 2020;9(7):529. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070529>
2. Banerjee A, Kulcsar K, Misra V, Frieman M, Mossman K. Bats and coronaviruses. *Viruses*. 2019;11(1):41. <https://doi.org/10.3390/v11010041>
3. ICTV. Coronaviridae. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/222/coronaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae) (Erişim: 22June 2020).
4. Lim YX, Ng YL, Tam JP, Liu DX. Human coronaviruses: A review of virus-host interactions. *Diseases*. 2016;4(3):26. <https://doi.org/10.3390/diseases4030026>

5. Hosie MJ, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, et al. SARS-Coronavirus (CoV)-2 and Cats, European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD Europe); <http://www.abcdcatsvets.org/sars-coronavirus-2-and-cats/>
6. Boni MF, Lemey P, Jiang X, et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat Microbiol.* 2020;5(11):1408-17. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0771-4>
7. Yuan L, Tang Q, Cheng T, Xia N. Animal models for emerging coronavirus: progress and new insights. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):949-61. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1764871>
8. Shi J, Wen Z, Zhong G, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science.* 2020;368(6494):1016-20. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
9. Rockx B, Kuiken T, Herfst S, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science.* 2020;368(6494):1012-5. <https://doi.org/10.1126/science.abb7314>
10. Gao Q, Bao L, Mao H, et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science.* 2020;369(6499):77-81. <https://doi.org/10.1126/science.abc1932>
11. Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature.* 2020;583(7818):830-3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>
12. Kim YI, Kim SG, Kim SM, et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe.* 2020;27(5):704-9. e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>
13. Lakdawala SS, Menachery VD. The search for a COVID-19 animal model. *Science.* 2020;368(6494):942-3. <https://doi.org/10.1126/science.abc6141>
14. Gretebeck LM, Subbarao K. Animal models for SARS and MERS coronaviruses. *Curr Opin Virol.* 2015;13:123-9. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.009>

# COVID-19 Pandemisinde DAS Uygulamaları: Eğrisi-Doğrusu

Duygu Perçin Renders<sup>1</sup>, Dilek Yeşim Metin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kütahya

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

✉ dilekyesimb@yahoo.com

Sağlık çalışanlarının enfeksiyon hastalıklarından korunmasında el hijyeni ile kişisel koruyucu ekipmanların doğru ve yerinde kullanılması önemlidir, burada yapılan yanlış uygulamalar çapraz kontaminasyona neden olarak yarardan çok zarar oluşturmaktadır, enfeksiyonun yayılmasına neden olmaktadır. Yaşanılan pandemi ile beraber rutin kullanıma giren hatta zorunlu hale gelen maske kullanımı sağlık çalışanlarında en önemli koruyucu bariyerlerden biridir. Tıbbi maskelerin TS EN 14683+AC standartlarına uygun olarak üretilmesi ve CE belgesinin olması gerekmektedir. Bunlar biyolojik sıvıların sıçramalarından kişiyi korur. Bu özelliği nedeni ile öksürme, hapşırma ile saçılan ve içinde mikroorganizma da bulundurabilecek büyük partiküller için mekanik bariyer özelliği gösterir.

Respiratuvarlar, partikül filtreli respiratörler “Filtering FacePiece” olarak da adlandırılır ve “Filtering FacePiece” sözcüklerinden türetilen FFP ve buna eklenen sayılarla (FFP1, FFP2 ya da FFP3) üç kategoriye ayrılır. Avrupa Birliği tarafından benimsenen bu kategorizasyon filtrelerin aerosol bulaşma riskini kaç kat azalttığı ile ilişkilidir. EN149 ve EN 143 standartlarının gerekliliklerine uygun olarak üretilmektedir.

Solunum maskeleri tek kullanımlık olarak üretilirler. Bunların herhangi bir sterilizasyon ve dezenfeksiyon yöntemi ile yeniden kullanımı söz konusu değildir. Ancak kullanım süresini uzatacak önlemler Dezenfeksiyon Antisepsi Sterilizasyon Derneği ve European Centre for Disease Prevention and Control tarafından önerilmektedir. Virüsün bulaşma yollarından birinin damlacıkların çıktığı yüzeylere temas sonucu olduğu ileri sürülmektedir. Ancak yüzeylerde bulunan virüsün kişiye bulaşma ve enfeksiyon oluşturması el hijyeni uygulandığı sürece çok da kolay değildir. Almanya’da yapılan bir çalışmada virüsün cansız yüzeylerde çok uzun süre canlı kalamadığı gösterilmiştir. Ayrıca virüs zarflı bir virüs olup deterjan ve dezenfektanların çoğuna duyarlıdır. Bu nedenle sık dokunulan yüzeylerin

etkili bir temizlik sonrası yüzey dezenfektanları ile dekontamine edilmesi yüzeylerden bulaşmayı azaltacaktır. Sodyum hipoklorid (1000 ppm), %70’lik alkol, kuaterner amonyum bileşikler sıklıkla kullanılan bileşiklerdir.

Ortam havasının ve yüzeylerin dezenfeksiyonu için UVC lambalar ve çeşitli kimyasal gazlarla foglama uygulamaları da gündeme gelmiştir. Her iki uygulama ön temizlik olmaksızın yapılmamalıdır. UVC lambaların kullanılan dalga boyu, istenilen ortamda yerleştirildiği mesafeler önemlidir. Canlı dokulara zararlıdır. Ortam dezenfeksiyonu için kimyasal gazların kullanılması da canlı dokulara zarar verebilmesi, yarar ve zararına ilişkin kanıt değeri barındırmaması nedeni ile şu anki bilgilerimize göre önerilmemektedir.

**Anahtar kelimeler:** Covid 19, korunma, KKE, dezenfeksiyon, UVC

## Kaynaklar

1. Türk Standartları Enstitüsü, TS EN 14683`+AC; Eylül 2019 ICS 11.140 TS EN 14683:2019 yerine, Tıbbi yüz maskeleri – Gereklilikler ve deney yöntemleri.
2. Türk Standartı, TS EN 149 +A1; Temmuz 2010; Solunumla İlgili Koruyucu Cihazlar - Parçacıklara Karşı Koruma Amaçlı Filtreli Yarım Maskeler - Özellikler, Deneyler Ve İşaretleme. 2010.
3. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/cloth-face-cover-guidance.html>
4. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-to-wear-cloth-face-coverings.html>
5. Block MS, Rowan BG. Hypochlorous acid: A review. J Oral Maxillofac Surg. 2020;78(9):1461-6. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2020.06.029>
6. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.28.20114041v1>
7. <https://www.das.org.tr/index.php/das-duyurular/153-covid-19-ve-uv-c-hakinda-das-dernegi-gorusu>
8. <https://www.das.org.tr/index.php/das-duyurular/150-halka-acik-alanlarda-dezenfeksiyon-konusunda-das-dernegi-gorusu>

# Tüberkülozun Tanı, Tedavi ve Takibinde Pandeminin Etkisi

Suha Özkan

Ankara Yenimahalle Çamlıca Aile Sağlığı Merkezi, Ankara

✉ suozkan@gmail.com

Dünyada ilk olarak Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinden bildirilen ve hızla yayılmaya başlayan COVID-19 için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tüm ülkelere acil uyarılarda bulunmuş ve bunu pandemi olarak ilan etmiştir. Ülkeler pandemiye önem ve hazırlık olarak bazı kararlar almış ve uygulamaya başlamıştır.

DSÖ, COVID-19 pandemisi ve buna karşı ülkelerin uygulamalarının halen tüm dünyada yürütülmeye devam eden öldürücü ve kronik hastalıklara karşı programları olumsuz etkileyebileceğini öngörmüştür. Tüberküloz (TB) kontrol programlarını ne ölçüde etkileyeceğini hesaplamak için modelleme çalışmaları yaptırmıştır. Bazı araştırmacılar da benzer şekilde pandeminin olası etkilerini hesaplamıştır. 2020 yılı Mayıs ayında DSÖ, modelleme çalışmaları sonuçlarından hareketle pandeminin yıkıcı etkisiyle tüberkülozdan milyonlarca kişinin daha ölebileceğini duyurmuştur. TB vaka tespitinde ciddi bir aksamanın ilave 400.000 can kaybına neden olacağı, pandemi şartlarında olursa da öldürücü diğer hastalıkların önlenmesi ve tedavisine devam edilmesi gerektiğini duyurmuştur<sup>(1)</sup>.

Modelleme çalışmasında, Hindistan'da pandemi nedeniyle sıkı kapanma uygulamasını takip eden dönemde TB vaka bildirimlerinde %75, Endonezya'da vaka raporlamasında %68 azalma olduğu bulunmuştur<sup>(2)</sup>. Olası nedenler; vakaların ulusal sisteme bildirilmesinde gecikme, sağlık hizmetlerine başvurunun azalması, sağlık personelinin yer değiştirilmesi ve TB için test-tanı işlemlerinin azalması olarak değerlendirilmiştir. Şekil 1'deki grafikte bulunan logaritmik eğrilerden hareketle;

- Eğer küresel TB vaka tespiti 3 aylık sürede pandemi öncesine göre ortalama %25 azalırsa, 2020 yılında ölümlerde %13 ek artışla, ilave olarak 190.000 TB ölümü tahmin edilmektedir. Bu olduğunda 1,66 milyon TB ölümüne yol açarak, Stop TB stratejisinin hedeflerine doğru ilerlemede ciddi gerileme anlamına gelmektedir.
- Eğer vaka tespiti 3 aylık süre içinde %50 düşerse, ölümlerde %26 artışla 1.85 milyon TB ölümü tahmin edilmektedir. Ölümlerde ek artış 400.000 olabilecektir. Bu ölüm sayısı küresel olarak 2012 seviyesine geri dönme anlamındadır.

Sonuçta, pandemiye karşı geliştirilen politikalar, özellikle kısıtlama ve kapanmalar ile sağlıkta önceliklerin, personelin dağılımının değişmesi TB kontrol programlarını olumsuz etkilemektedir.

StopTB ortaklığının Imperial College London epidemiyologlarıyla birlikte yaptığı, 2019 Lancet TB Komisyonu için ya-

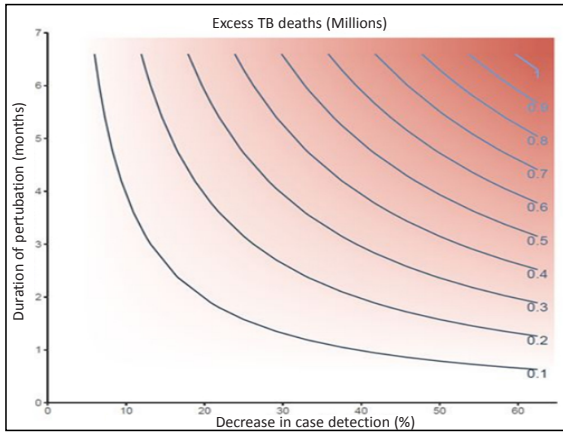
pılan çalışmaya dayanan bir başka modelleme araştırması aşağıdaki sorulara cevap aramıştır<sup>(3)</sup>:

- Yüksek yüklü ülkelerde, kısa vadeli kapanmaların önümüzdeki 5 yıl içinde TB vakası ve ölüm oranı üzerindeki potansiyel etkisi nedir?
- Kapanmanın ardından ülkeler, TB yükünü tekrar kontrol altına almak için TB kontrol uygulamalarının eski haline getirilmesini en iyi nasıl hızlandırabilir?

Bu çalışmada yüksek yüklü ülke olarak Hindistan, Kenya ve Ukrayna seçildi. Bu ülkelerden elde edilen tahminler COVID-19'un TB üzerindeki etkisinde küresel tahminler oluşturmak için uyarlandı. Sıkı COVID-19 uygulamaları sadece aylar sürebilirken, TB tanısı ve tedavisi üzerinde, yüksek yüklü ortamlarda kalıcı bir etkiye sahip olacaktır. Küresel olarak, 3 aylık bir kapanma ve uzatılmış 10 aylık restorasyon, 2020 ile 2025 arasında 6,3 milyon TB vakasına ve bu süre içinde ilave 1,4 milyon TB ölümüne yol açabilir. COVID-19, küresel TB vakası ve ölümlerinde en az 5 ile 8 yıllık gerileme nedeni olabilecektir. Uzun vadeli sonuçlar, kısa vadeli toparlanma hızından büyük ölçüde etkilenebilir. TB kontrol uygulamalarının eski haline dönmesi için; ek kaynak ve finans gereksinimi, dijital teknoloji gibi yeni yöntemlerin kullanılması, normalleşme sonrası temaslı muayenesi ve aktif vaka bulma çalışmalarının hızlandırılması, farkındalığın sürdürülmesi gibi hususlar vurgulanmıştır.

DSÖ'nün altı bölgesinde 100 ülkeyle yapılan bir çalışmada ölümlere TB kontrol hizmetlerinin ne düzeyde etkilendikleri sorulmuş<sup>(4)</sup>. 79 ülkede ilaca duyarlı, 61 ülkede ilaca dirençli TB hastalarında ayaktan başvuru azalmış. 64 ülkede hastaların ilaçları en az bir ay yetecek kadar evlerinde kullanmaları için veriliyormuş, 38 ülkede ilaçlar evlerine götürülüyormuş. 24 ülkede moleküler tanı araçları hem TB hem de COVID-19 için kullanılıyor, 42 ülkede TB çalışanları COVID-19'a kaydırılmış, 33 ülkede pandemi müdahalelerine TB için tahsisli kaynaklar kullanılmış. Ayaktan ve yatarak TB tedavi tesislerinde azalmalar bildirilmiş. Ayrıca bazı ülkelerde tanı ve tedaviyle ilgili malzeme ve ilaç sıkıntıları, gerçek zamanlı surveysans verilerinde eksiklik, TB vaka bildirimlerinde azalma ve tüm bölgelerde rutin TB tanı ve tedavi hizmetlerinde düşüş bildirilmiş.

StopTB ortaklığının önderliğinde 10 küresel TB mücadelesi yapan kuruluş bir araştırma yapmış<sup>(5)</sup>. "COVID-19'un TB epidemisi üzerine etkisi: Bir topluluk görüşü" adlı araştırmada anket, 7 farklı dilde Mayıs-Temmuz ayları arasında internet üzerinden cevaplanmış. TB hastaları, TB için görev yapan sağlık çalışanları, TB program görevlileri, araştırmacılar ve TB savunucuları olarak beş farklı gruptan 870 kişi (89 ülke-



**Şekil 1.** Küresel düzeyde vaka bildirimindeki geçici düşüşe bağlı olarak tahmin edilen ek TB ölümlerinin (HIV-negatif ve HIV-pozitif bireylerde TB ölümleri dahil) sayısı.

den) anket sorularını yanıtlamış. Sonuçları 6 ana başlıkta özetlemişler:

1. Pandemi, TB için sağlık hizmet sunumuna ihtiyaç duyan ve hizmet alan insan sayısında çok büyük azalmaya neden oldu.
2. COVID-19, TB'li insanları yoksulluğa sürüklüyor. Sosyal izolasyon, TB hizmetlerinin önündeki engeller olan eşitsizlikleri artırıyor.
3. Eş zamanlı COVID-19 ve TB epidemilerine yanıt vermek için dünyanın her yerindeki sağlık sistemleri yeterli donanımına sahip değildir.
4. TB konusunda çalışanlar, çalışma ve araştırmalarında önemli kesinti ve COVID-19'a doğru sapmalar görüyor.
5. Pandemi başlangıcından itibaren TB finansmanı önemli ölçüde azaldı.
6. Birçok sağlık tesisi ve programın COVID-19 mücadelelerinde hizmet sunması, gelecekte TB korunma ve bakımında fırsat olabilir.

Çin'de yapılan ve COVID-19'un TB kontrolüne etkisini inceleyen bir araştırmada 2020 yılının verileri 2017-2019 yıllarındakilerle karşılaştırılmış<sup>(6)</sup>. Salgın, kapanma ve yeniden açılma olarak üç dönemde TB hasta bildirimlerindeki azalmalar gösterilmiştir. TB hastalarının %27'si kapanma veya korku nedeniyle kontrol muayenelerine gitmemişlerdir. Çalışmada, kapanma nedeniyle hane dışında olan temas azalması olumlu etkiyen, hane içindekilerle olan yoğun temas olumsuz etki olarak değerlendirilmektedir. Salgın sonrası bastırılmış talep nedeniyle TB için sağlık tesislerine fazla başvuru bekleneceğinden hazırlık yapılması öneriliyor.

Yine Çin'de yapılan hastane temelli bir anket çalışmasında, pandemi döneminde TB yatak sayısında %75, TB profesyoneli sağlık çalışanlarında %28, ayaktan hasta muayenesinde %34, tanı konulan TB hastalarında %25 azalma bulunmuş<sup>(7)</sup>.

Beş kıtadan 16 ülkedeki 33 merkezin katılım gösterdiği bir çalışmada 2020 yılının ilk dört ayı 2019'daki aynı dönemle karşılaştırılmış<sup>(8)</sup>. Merkezlerin; %84'ünde yeni aktif TB tanısı sayısı, %75'inde ayaktan TB hastası muayenesi, %82'sinde TB hastasının taburculuğu, %81'inde yeni latent

TB tanısı konulan kişi sayısı ve %95'inde latent TB muayenesi azalmış.

Paraguay'da pandeminin TB kontrolüne etkisi editöre mektup olarak yayınlanmış<sup>(9)</sup>. Mart-Ağustos 2019 ile 2020 yılları karşılaştırıldığında solunum yolu şikayeti başvurusunda %80,8 ve erişkinlerde akciğer TB tanılı olgularda %42,4 azalma bulunmuş. Pandeminin etkileri olarak; tedaviye uyumu aksatma, TB program ve hizmetlerinde önceliğin azalması, gelişmekte olan ülkelerde finans ve ilaçlara ulaşmada güçlük ve bu kişilerde damgalanma ve ayrımcılığın artması belirtilmiştir.

Güney Kore'de TB hasta bildirimleri üzerinden yapılan çalışmada 2020 yılı pandemi öncesi ve pandemi dönemi haftalık bildirim sayıları önceki beş yılın aynı haftalardaki ortalama bildirim sayılarıyla karşılaştırılmış<sup>(10)</sup>. Haftalık TB bildirimlerinde %24 azalma hesaplanmış. Yayınlanan bir editöre mektupta Japonya'da yeni tanı konulan TB hasta sayısındaki azalmanın nedeninin daha az test yapılmasına bağlı olduğu belirtilmektedir<sup>(11)</sup>. Pandeminin etkileri üzerine Hindistan'da yapılan çalışmada, hasta sayısında azalmaya bağlı olarak Eylül 2020'de yeni bir uygulamaya geçildiği bildirilmiştir<sup>(12)</sup>. Yeni uygulamada; TB ve COVID-19 taramalarının eş zamanlı yürütülmesi, aktif TB olgusu bulma çalışmalarında yoğunlaşma, yayma ile birlikte hızlı moleküler test yapılması, evlerden örnek alma ve ilaç dağıtım, DGT'de modifikasyon; dijital teknoloji kullanımı, çağrı merkezleri veya aile bireyleri takibiyle uyum izlenmesi bulunmaktadır.

DSÖ Avrupa Ofisi, pandemide, Avrupa ülkelerinde TB kontrolü uygulamalarında yaşanan deneyimi paylaşmıştır<sup>(13)</sup>. Hastaneler ve cezaevleri gibi toplu yaşam yerlerinde hastalık bulaşma riskindeki artışı, bazı ülkelerdeki sağlık tesislerinin COVID-19'a tahsis edilmesini, çalışanlardaki iş yükü artışını, yeni TB vakası tespitindeki azalmayı, tedavi takibi ve doğrudan gözetimli tedavideki aksamaları, laboratuvar hizmetleri, eğitimler ve hastalara verilen desteklerdeki azalmaları vurgulamaktadır. DSÖ, bu uyarıları aralıklarla yapmakta olup Ekim ayında, COVID-19 pandemisinin TB'ye karşı küresel ilerlemeyi tersine çevirecek bir tehdit olarak algılanması gerektiği uyarısında bulunmuştur<sup>(14)</sup>.

### COVID-19 Pandemisinin Türkiye Tüberküloz Kontrol Çalışmalarına Etkisi

Türkiye'de başarılı bir TB kontrol programı yürütülmektedir. 2005 yılında 20.535 olan toplam olgu sayısı, 2019 yılında 11.401 olarak bildirilmektedir<sup>(15)</sup>. Yıllar içinde nüfusun art-

**Tablo 1.** Türkiye'de son 5 yılda TB olgu sayıları ve hızları.

| Yıl  | Nüfus      | Toplam Olgu Sayısı | Toplam Olgu Hızı (Yüzbinde) | Yeni+Nüks Olgu Sayısı | İnsidans (Yüzbinde) |
|------|------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------|
| 2015 | 78.741.053 | 12.772             | 16,2                        | 12.550                | 15,9                |
| 2016 | 79.814.871 | 12.417             | 15,6                        | 12.186                | 15,3                |
| 2017 | 80.810.525 | 12.046             | 14,9                        | 11.821                | 14,6                |
| 2018 | 82.003.882 | 11.786             | 14,4                        | 11.576                | 14,1                |
| 2019 | 83.154.997 | 11.401             | 13,7                        | 11.247                | 13,5                |

\*S.B. HSGM Tüberküloz Daire Başkanlığı



masına rağmen hasta sayısı düşmüş, toplam olgu hızı yüz binde 29,8'den 13,7'ye gerilemiştir. Son beş yıldaki olgu sayıları ve hızları gösteren Tablo 1'de her yıl hasta sayısının %2-3 azaldığı görülmektedir.

Üç ilimizin 2020 ile 2019 yıllarının ilk 10 ayındaki çalışmalarını aylık raporlarından karşılaştırdığımızda; dispanserlerdeki muayene sayısında %36, temaslı muayenesinde %47, tedaviye alınan TB hasta sayısında %31 ve ilaçla korumaya alınan kişi sayısında %39'a varan oranlarda azalma olduğu görülmüştür.

Tüberküloz Dairesi Başkanlığı tarafından Aralık 2020'de bir ulusal kongrede pandeminin verem savaşına etkisiyle ilgili bazı bilgiler ham veri olarak sunulmuştur. Verem Savaş Dispanserleri aylık çalışma raporlarından 2020 yılı Mart-Ekim arasındaki 8 aylık dönem, 2019 yılının aynı dönemiyle karşılaştırılmıştır. Dispanserlerde yapılan muayene sayısında %42, korumaya alınan kişi sayısında %39, yapılan temaslı muayene sayısında %39, bakteriyolojik inceleme olarak direkt bakı sayısında %43 azalmanın olduğu görülmüştür. Her ay kaydedilen tüberkülozlu hasta sayısındaki azalışların ortalaması ise %25,9 bulunmuştur. Biz bunun, ülkemizde verem savaşının geleceği için ciddi bir sorun olabileceğini düşünüyoruz

#### Sonuç olarak:

- COVID-19 pandemisi sağlıkla ilgili tüm diğer hastalıklar ve sağlık hizmet sunucularıyla birlikte TB kontrolü çalışmalarını da etkilemiştir.
- Kapanma, kısıtlamalar, sağlık kuruluşlarının önceliğinin değişmesi, temas azaltıcı uygulamalar, sağlık kuruluşlarında bulaşma korkusu, ulaşım güçlükleri, sosyoekonomik sebepler, damgalanma vb. nedenlerle başvuru ve tanı alan hasta sayısı azalmıştır.
- Temaslı muayenelerinde ve ilaçla koruma tedavisi verilenlerde ciddi azalmalar mevcuttur.
- Her yıl düzenli yapılan risk grubu taramaları durdurulmuştur.
- Eğitimler ve izleme-değerlendirme çalışmaları yeterli yapılamamıştır.
- VSD'lerden COVID-19 ile ilgili görevlendirmeler yapılmıştır. Personel kaydırılması nedeniyle artan iş yükü yorgunluğa ve motivasyon azalmasına neden olmaktadır.
- İlaçlar ve tanı için lojistik destek kesintisiz sürmüştür. Hastalara ilaçları ulaştırılmaktadır.
- TB, solunum yoluyla bulaşan hastalık olduğundan kişisel koruyucu ekipman ve enfeksiyon kontrol deneyimi olarak VSD'ler COVID-19'a pek çok kuruluştan daha hazırlıklıdır.
- Aile, Çalışma ve Sosyal Hizmetler Bakanlığının tüberküloz hastalarına yönelik düzenli nakdi yardım programında aksama yaşanmamıştır.
- Tedavideki hastaların düzenli ilaç kullanmaları için VSD'lerde DGT uygulanmadığında VGT (video gözetimli tedavi, TeleDGT) yaygınlaşmıştır.
- Sahadan merkeze veri akışı normal şekilde devam etmektedir.
- Göğüs hastaneleri ve TB hasta yatak sayıları pandemi öncesinde azalmaya başlamıştı. Pandemiyle birlikte bazı hastanelerde TB hasta odası ve yatağında sıkıntılar görülmüştür.
- Pandeminin kontrol altına alınması sonrasında özellikle

risk gruplarına yönelik aktif vaka bulma çalışmaları yapılmalıdır.

- TB programlarında çalışan sağlık personeli tekrar görevlerine dönmeli, özlük hakları iyileştirilmelidir.
- Maske, mesafe, temizlik, evde kal, karantina, kapanma derken TB hastasıyla temas olasılığının azalması nasıl etkileyecek, bilinmiyor.
- TB'de yapılan müdahalelerin etkisi geç görüleceğinden ileride mutlaka araştırılmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** Tüberküloz, COVID-19, pandemi, hasta azalması, tehdit

#### Kaynaklar

1. World Health Organization. Infographic, COVID-19 and TB case detection. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/covid-19>. Erişim tarihi: 12/12/2020
2. Glaziou P. Predicted impact of the COVID-19 pandemic on global tuberculosis deaths in 2020. medRxiv preprint <https://doi.org/10.1101/2020.04.28.20079582>
3. Cilloni L, Fu H, Vesga JF, et al. The potential impact of the COVID-19 pandemic on the tuberculosis epidemic a modelling analysis. EclinicalMedicine. 2020;28:100603 <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100603>
4. COVID-19 and National TB Programmes: Summary of Findings across the Six WHO Regions. <https://www.who.int/news/item/12-05-2020-joining-forces-to-end-tb-and-covid-19>. Erişim tarihi:12/12/2020
5. The impact of COVID-19 on the TB epidemic: A Community Perspective. Results of a global civil society and TB affected community LED survey <http://www.stoptb.org/assets/documents/resources/publications/acsm> Erişim tarihi: 12/12/2020
6. Fei H, Yin X, Hui C, et al. The impact of the COVID-19 epidemic on tuberculosis control in China. The Lancet Regional Health - Western Pacific 3 (2020) 100032. <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2020.100032>
7. Shen X, Sha W, Yang C, et al. Continuity of TB services during the COVID-19 pandemic in China <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.20.0632>
8. Migliori GB, Thong PM, Akkerman O, et al. Worldwide effects of coronavirus disease pandemic on tuberculosis services, January–April 2020. Emerg Infect Dis. 2020;26(11):2709-12. <https://doi.org/10.3201/eid2611.203163>
9. Teixeira RC, Aguirre S, Bejarano DP. Thinking about tuberculosis in times of COVID-19 J Int Med. 2020. <https://doi.org/10.1111/joim.13192>
10. Kwak N, Hwang SS, Yim JJ. Effect of COVID-19 on tuberculosis notification, South Korea. Emerg Infect Dis. 2020;26(10):2506-8. <https://doi.org/10.3201/eid2610.20-2782>
11. Komiya K, Yamasue M, Takahashi O, et al. The COVID-19 pandemic and the true incidence of tuberculosis in Japan. J Infect. 2020;81:e24-5. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.07.004>
12. Shrinivasan R, Rane S, Pai M. India's syndemic of tuberculosis and COVID-19. BMJ Global Health. 2020;5:e003979. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2020-003979>
13. WHO EURO TB response to COVID-19 - Dr Askar Yedilbayev [https://www.who.int/docs/default-source/documents/tuberculosis/who-euro-response-to-covid-1901-05-2020-gtb-webinar.pdf?sfvrsn=5a876b9e\\_6](https://www.who.int/docs/default-source/documents/tuberculosis/who-euro-response-to-covid-1901-05-2020-gtb-webinar.pdf?sfvrsn=5a876b9e_6). Erişim tarihi:12/12/2020
14. Dall C. CIDRAP News. WHO warns of COVID 19 impact on TB services, Oct 14, 2020. <https://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2020/10/who-warns-covid-impact-tb-services>. Erişim tarihi:12/12/2020
15. Yenice M. Tüberküloz hizmetleri ve COVID-19 pandemisi. Ulusal Halk Sağlığı Kongresi 2020, 17 Aralık 2020 tarihli sunumu.

# Pandemiden Tüberküloz Laboratuvarları Nasıl Etkilendi?

Ahmet Arslantürk

TC Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı

✉ ahmetehcec@yahoo.com

İnsana özgü bir patojen olan *Mycobacterium tuberculosis*, binlerce yıldan beridir insanlık için önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Tüberküloz, dünyada ölüme neden olan bulaşıcı hastalıkların en üst sıralarda yer alıyordu. Ancak bu yıl, yeni bir patojen olan Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARSCoV-2)'nin neden olduğu COVID-19, ölüme neden olan bulaşıcı hastalıklar listesinin en üst sırasına yerleşti<sup>(1)</sup>.

COVID-19 salgını ve buna karşı alınan önlemler, şüphesiz dünya çapında sağlık hizmetleri üzerinde çok boyutlu dramatik bir etkiye sahipti ve birçok kronik ve bulaşıcı (özellikle tüberküloz (TB), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) / edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS) ve sıtma gibi)<sup>(2)</sup> hastalığa yönelik kontrol programını ciddi şekilde etkilemiştir<sup>(3, 4)</sup>. Tüberküloz gibi bulaşıcı hastalıklara doğrudan etkisi, özellikle gelişmekte olan ülkelerde henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak Ulusal TB Programlarını olumsuz yönde etkilemesi nedeniyle yakın gelecekte TB ölümlerinde artışa yol açması çok muhtemeldir<sup>(5, 6)</sup>. Öngörülen bu artış büyük ölçüde, yeni TB vakalarının tanı ve tedavisindeki gecikmeden kaynaklanacaktır<sup>(5,7,8)</sup>. Pandemi ilerledikçe ko-enfekte hastaların sayısının artması beklenmektedir.

Covid-19'la mücadele sırasında TB ile mücadeleye yönelik ulusal programlar dahil olmak üzere sağlık hizmetlerinin de kesintisiz olarak sürdürülmesi gerekmektedir. DSÖ Küresel TB Programı, DSÖ bölge ve ülke ofisleriyle birlikte ulusal sağlık otoritelerine Covid-19 ve TB ile mücadelelerinde yardımcı olmak için bir bilgi notu yayınladı. Buna göre;

**Önleme:** DSÖ yönergelerine göre toplu ortamlarda ve sağlık tesislerinde TB ve COVID-19 bulaşmasını sınırlandırmak için önlemler alınmalıdır. (örneğin, temel enfeksiyon önleme ve kontrolü, öksürük göğü kuralları, hasta triyajı).

**Teşhis:** TB ve COVID-9 için tanıda kullanılan testler farklıdır. Benzer solunum semptomları olan bireyler için hem TB hem de COVID-19'la ilgili teşhis testleri mevcut olmalıdır. Dünya Sağlık Örgütü ve uluslararası ortakların desteği ile ülkelerde TB laboratuvar ağları kurulmuştur. Bu TB laboratuvar ağları ve numune taşıma mekanizmaları COVID 19 teşhisi ve kontrolü için de kullanılmalıdır.

**Tedavi ve bakım:** Bulaşmayı azaltmak için tüberküloz hastalarının (hastaneye yatmayı gerektirmedikçe) hastanede tedavi yerine insan merkezli ayaktan tedavi ve toplum temelli bakım tercih edilmelidir. Ayrıca gelişmiş iletişim, danışma, bakım ve bilgi yönetimi yoluyla hastaları ve prog-

ramları desteklemek için dijital sağlık teknolojilerinin kullanımı artırılmalıdır<sup>(9)</sup>.

**Pekala, COVID-19 küresel olarak bu kadar öne çıkmışken, Tüberküloz sağlık sorunu olmaktan çıktı mı?**

Tüberküloz, küresel acil bir sağlık sorunu olmaya devam ediyor. Pandemi nedeniyle kaynakların büyük bölümü COVID-19 yönetimine yönlendirildiği göz önüne alındığında, Tüberküloz gibi toplum sağlığını ilgilendiren bir hastalığın kontrolüne verilen destek ve önem azaltılmamalıdır.

Tüberküloz'a gereken önem ve ilgi gösterilmez ise «Tüberküloz Kontrol Programı» kapsamında bugüne kadar ki kazanımlar ve gerçekleşen hedefler tehlikeye atılmış olacaktır<sup>(1)</sup>.

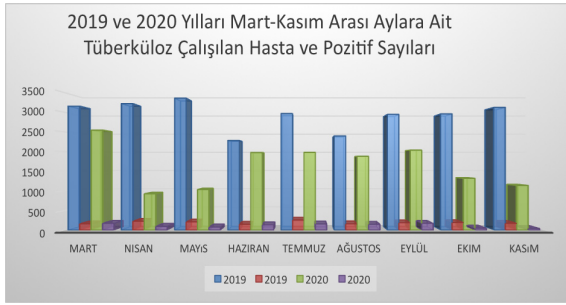
Hem tüberküloz hem de COVID-19, insanlar arasında yakın temas yoluyla yayılır. Tüberküloz basili, tüberküloz hastasının öksürmesi, hapşırması, yüksek sesle (bağırarak) konuşması veya şarkı söylemesiyle çevreye saçılan damlacıkların solunması sonucunda kişileri enfekte eder. Havalandırma ve doğrudan güneş ışığına maruz kalma ile konsantrasyonları azalır.

SARSCoV-2, öncelikle COVID-19 hastasının öksürmesi, hapşırması, yüksek sesle konuşması (bağırarak) veya şarkı söylemesi ile çevreye saçılan damlacıkların doğrudan solunması ve üretilen damlacıkların nesnelere ve yüzeylere yapışması sonrası o yüzeylere dokunmak suretiyle elimizi göz, burun veya ağıza götürülmesi sonucu kişileri enfekte eder. COVID-19'un kontrolünde solunum önlemlerine ek olarak ellerin yıkanması da önemlidir.

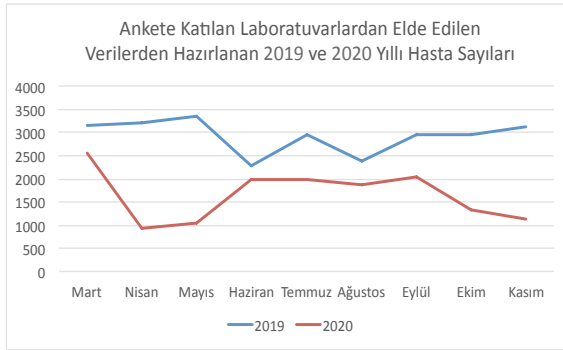
Hastaya COVID-19 teşhisinin konulması, altta yatan Tüberkülozu dışlamaz. Özellikle Tüberkülozun endemik olduğu bölgelerde bu hususta daha dikkatli olunmalıdır.

Personeli enfekte etme riskini en aza indirmek için COVID-19 salgını sırasında aşağıdaki ek, geçici önlemler dikkate alınmalıdır<sup>(10)</sup>:

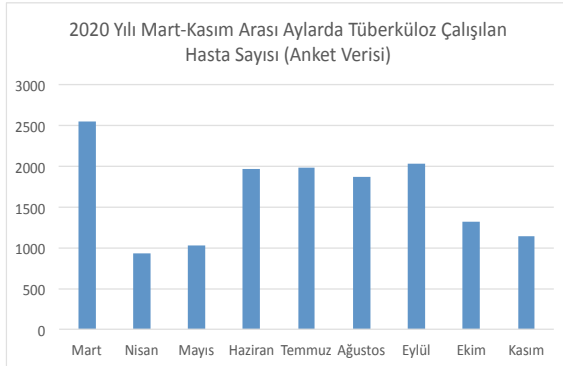
1. Yerel koşullara bağlı olarak, tüberküloz takibi için ziyaretleri azaltmakla ilgili düzenlemeler yapılmalıdır, örn. diğer klinik ve polikliniklere gelen hastalarla mümkün olduğunca karşılaşmayacağı belirli gün ve saatlerde randevuları oluşturmak, tedavi desteğini sürdürmek için yenilikçi iletişim teknolojileri kullanmak, takip testinin zamanlarını belirlemek ve sınırlandırmak.
2. Personelin, hastaların ve diğer kişilerin hem COVID-19 hem de TB'ye maruz kalmasını önlemek için, balgam örnekleri ve bronkoalveolar lavaj sıvısı alırken, taşı-



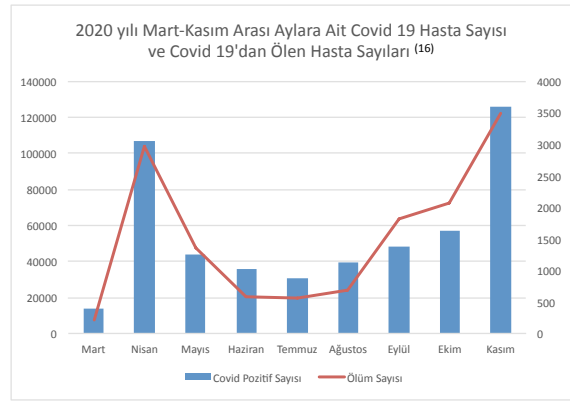
Grafik 1.



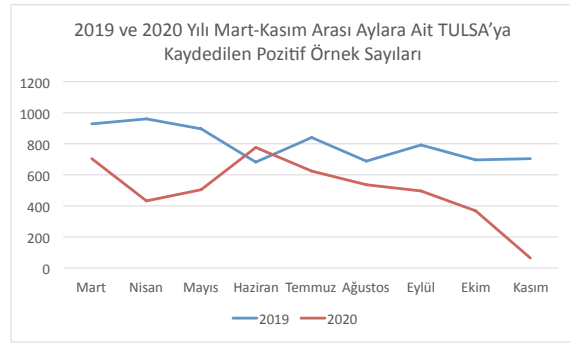
Grafik 2.



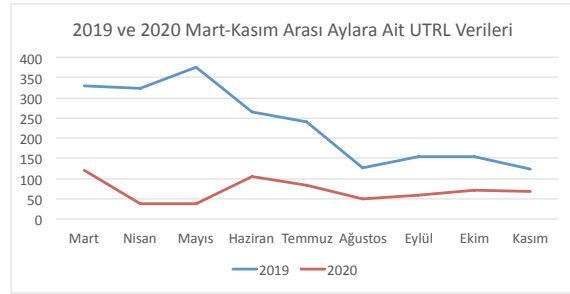
Grafik 3.



Grafik 4.



Grafik 5.



Grafik 6.

ken, ayrıca laboratuvarda alım ve taşıma kabını açarken özel önlemler alınmalıdır<sup>(11-13)</sup>. Evde balgam örneği toplaması için özel talimatlarla teşvik edilmelidir (örneğin, ev dışında ve başkalarının uzakta açık alanda yapılmalıdır)<sup>(14)</sup>.

3. Tüberküloz testi yapılırken, biyogüvenlik kabinlerinin kullanılması, kişisel koruyucu donanımın kullanılması, enfeksiyon önleme ve kontrol önlemlerinin uygulanması ve sorumlular tarafından takip edilmesi önemlidir. (el yıkama, eldiven kullanımı, gözlük veya koruyucu kalkan, su geçirmez önlükler, maske kullanımı, yüzeylerin düzenli olarak dekontaminasyonu ve laboratuvar personelinin çalışma saatlerinin ayarlanması gibi).
4. Havalandırılması yeterli çalışma ortamı ve güvenli ulaşım sağlanmalı. Numunelerin test sahasına taşınmasından sorumlu personel ile cihaz kullanıcıları COVID-19

numunelerini taşıırken ve işlerken gereksinimleri donanımına sahip olmalıdır.

Avrupa'daki Tüberküloz referans laboratuvarlarının pandemiye yaşadığı zorlukları daha iyi anlamak ve destek olabilmek için Avrupa Tüberküloz Referans Laboratuvarı Ağı (ERLTNet-2) beş bölümden oluşan bir anket düzenlemiştir<sup>(15)</sup>;

- Laboratuvar Bilgisi
- Operasyonel Etki
- İş Yükü
- Acil Durum Planı
- COVID-19 Yönetimine Doğrudan Katılım

Anketin kapsadığı dört ay içinde bildirilen sorunlar şöyledi;

- Laboratuvarların % 30 ila 40'da, fiziksel mesafe veya



uzaktan çalışma gibi yeni gereksinimlere uyum sağlama ile ilgili sorunlar bildirdi

- Malzemelerin ve reaktiflerin tedarik edilmesiyle ilgili sorunlar Nisan 2020'de zirveye ulaştı.
- Mart ve Nisan aylarında, COVID-19 ile ilgili hastalık veya izolasyon, sokağa çıkma kısıtlamaları ve COVID-19 laboratuvarlarının konuşlandırılması, Tüberküloz Laboratuvarların yaklaşık % 30'unun operasyonlarını etkiledi.
- Viroloji laboratuvar hizmetlerine tahsis edilen Tüberküloz Laboratuvar personelinin yeniden Tüberküloz Laboratuvarına yerleştirilmesi veya tedariki ile ilgili sorunlar Haziran 2020'de hala devam etmekteydi.
- Nisan ayında; Avrupa'da neredeyse tüm Ulusal Referans Laboratuvarlarında, İlaç Duyarlılık Testi (İDT) dahil olmak üzere, hem birincil hem de referans faaliyetlerde, iş yükünde keskin bir azalma yaşandı. {Gelen örnek sayısının% 25'ten fazla azalması (sırasıyla birincil ve referans hizmetlerinde % 59,3'ü ve % 41,4'ü)}
- İki laboratuvar, birincil ve referans hizmet iş yükü • Haziran ayına kadar normal seviyelere döndü ve / veya aştı, ancak laboratuvarların yarısından fazlasında durum tam olarak stabilize olmamıştı.
- Acil durum planları yalnızca altı laboratuvar etkinleştirilmiştir (% 19.4).
- Daha az sayıda laboratuvar (< 10), kişisel koruyucu ekipman, laboratuvar alanı kısıtlamaları ve zihinsel sağlık sorunları dahil olmak üzere personelin genel refahı konusunda sorunlar bildirdi.
- En ciddi şekilde kesintiye uğrayan, eğitim, araştırma ve geliştirme (Ar-Ge) faaliyetleriydi. (23 laboratuvarın 15'i tarafından rapor edildi)<sup>(15)</sup>.

#### **Avrupa'da Tüberküloz gerçekten %25-50 azaldı mı? Eğer azalmadı ise hastalar ve tüberküloz hasta örneklerine ne oldu? Azalmanın nedeni nedir?**

1. Hastaların sokağa çıkma kısıtlamaları ve Covid-19 korkusu nedeniyle sağlık kuruluşlarına gidememesi
2. Bazı tüberküloz laboratuvarlarının Covid laboratuvarına dönüştürülmüş olması
3. Sağlık kuruluşu ve Laboratuvar çalışanlarının Covid merkezlerinde görevlendirilmiş olmaları
4. Tüberküloz laboratuvarlarında kullanılan PCR cihazlarının Covid laboratuvarlarına gönderilmiş olması
5. Sağlık kuruluşuna ulaşanların örneklerinin çalışılacağı laboratuvar sorunu oluşması.

DSÖ tarafından yapılan modelleme çalışmasına göre; COVID-19 salgınının, 3 ay boyunca Tüberküloz tespitinde küresel olarak %25'lik bir azalmaya yol açması durumunda, Tüberküloz ölümlerinde %13'lük bir artışın olabileceği, 2020'de küresel ölüm oranının 1.66 (1.3 – 2.1) milyon olabileceği ve bunun da 2015 yılı Tüberküloz ölüm hızına yakın olabileceği belirtilmiştir.

DSÖ, 12 Mayıs 2020'de yayınladığı bilgi notunda; üye devletlere, COVID-19 salgını sırasında Tüberküloz hastalarının temel hizmetlerinin kesintisiz sürdürülmesi için çağrıda bulunmuştur.

#### **Türkiye'de durum**

Ülkemizdeki pandemi sürecinde tüberküloz laboratuvarlarının durumu ile ilgili bilgi edinmek için TULSA üzerinden 7 soruluk kısa bir anket düzenledik.

Anket;

- **Tüberküloz Laboratuvar Bilgileri**
- **Laboratuvar Tipi**
- **Laboratuvar Düzeyi**
- **Pandemi Sürecinde Tüberküloz Laboratuvarının Üstlendiği Görevler**
- **Pandemi Sürecinde Tüberküloz Laboratuvarının Yaşadığı Sorunlar**
- **Laboratuvarın 2019 ve 2020 Yılına Ait Hasta ve Pozitif Hasta Sayısı**
- **Covid 19 Pandemisinde Deneyimleriniz ve Önerileriniz**

Ankete, 13 laboratuvar katılım göstermiştir. Katılım sağlayan laboratuvarların, 7 tanesi Düzey-3, 6 tanesi ise Düzey-2 laboratuvarlardan oluşuyordu. İki laboratuvar, hem TB hem de Covid laboratuvarı olarak hizmet verirken 11 laboratuvar ise Tüberküloz laboratuvarı olarak hizmetine devam etmiştir.

#### **Pandemi Sürecinde Tüberküloz Laboratuvarının Yaşadığı Sorunlar:**

##### **1. Malzeme temininde Sorun:**

Tüberküloz örneklerinin taşınmasında kullanılan Örnek Taşıma kutularının Covid-19 örneklerinin taşınmasında da kullanılması nedeniyle taşıma kutularının temininde yaşanan sorunlar, tüberküloz örneklerinin kültüre alınmasında kullanılan besiyeri temininde yaşanan sorunlar ve temin edilen besiyerlerinin kalitesi ile ilgili sorunlar, kaliteli kişisel koruyucu donanım temini ve kit temini gibi sorunlarla karşı karşıya kalınmıştır.

##### **2. Örneklerin Transferinde Sorun:**

Tüberküloz örneklerinin çalışacak laboratuvara ulaştırılmasında ve üremiş kültür örneklerinin laboratuvarlardan Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarına ulaştırılmasında uygun olmayan örnek taşıma kutularının kullanılması ve Dispanser personelinin Covid-19 çalışmalarında görevlendirilmesi nedeniyle yetkin olmayan personellerin alıp gönderdiği hasta örneklerinin uygunsuz olması kalitesiz sonuçların oluşmasına neden olmuştur.

##### **3. Personel Sorunu:**

Tüberküloz örneklerinin alınmasında, taşınmasında Grafiklerin tümünden çıkarılacak sonuç, pandemi ile birlikte tüberküloz hasta sayısında ciddi bir düşüşün olduğunu görüyoruz. Ayrıca grafik-3 ve grafik-4'ü karşılaştırdığımızda, Covid-19 hasta sayısı ve ölüm oranında artış görülen aylarda tüberküloz test sayısı ve pozitif örnek sayısında ki düşüş dikkatleri çekmektedir.

#### **Pandemi Sürecinde Tüberküloz Laboratuvarları İçin Ne Yapılmalı?**

- Biyogüvenlik risklerinin azaltılması (Tüberküloz tanı laboratuvarlarının, birincil örnekleri işlerken, potansiyel COVID-19 maruziyeti)
- Tüberküloz laboratuvarlarının kapasitesini korumak ve çalışmalarının düzgün sürdürülebilmesi için deneyimli personelin devamlılığının sağlanması
- Tüberküloz laboratuvarlarına ait donanımların korunması
- COVID-19 pandemisinin Tüberküloz tanı kapasitesi üzerindeki orta ve uzun vadeli olumsuz etkilerini en aza indirilmesi ve bunun için daha fazla araştırma yapılması

- Laboratuvarların acil eylem planlarının hazır olması
- Çalışmaların sürdürülebilirliği açısından ulusal sağlık yetkililerinin ve uluslararası kuruluşların desteği önem arz etmektedir.

#### **Pandeminin kazanımları**

- Bulaşıcı hastalıkların daha ciddiye alınması, enfeksiyonların kontrolü ve ortadan kaldırılmasında, tüm dünyanın işbirliği içinde çalışmasının gerekliliğinin farkına varılması
- Toplumların bulaşıcı hastalıklar konusunda farkındalığının oluşması
- Sağlık profesyonelleri (Halk Sağlığı Uzmanları, Mikrobiyoloji Uzmanları, Enfeksiyon Uzmanları, Göğüs Hastalıkları Uzmanları vs), Sivil toplum örgütleri, Üretici firmalar ile Politikacıların birlikte çalışabilme ve bilgi paylaşımını yapabilmeleri

Sonuç olarak, tüberküloz laboratuvar kapasitesini korumak ve COVID-19 salgını nedeniyle pandeminin ilk aylarında ciddi şekilde kesintiye uğrayan laboratuvar hizmetlerinin üzerindeki olumsuz etkilerin giderilmesi ve laboratuvar hizmetinin sürdürülebilmesi için desteğe ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** Pandemi, tüberküloz laboratuvarları, etkileri, Türkiye

#### **Kaynaklar**

1. Toyin T, BK, Neil GS, Marc L. Anticipating the impact of the COVID-19 pandemic on TB patients and TB control programmes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2020;19(1):21 <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00363-1>
2. Floriano A, Ben L, Anthony M, Masahiro H. The potential impact of the COVID-19 pandemic on HIV, tuberculosis, and malaria control in Africa: a systematic review of modelling studies and population surveys. *Research Square.* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-103235/v1>
3. Chudasama YV, Gillies CL, Zaccardi F, et al. Impact of COVID-19 on routine care for chronic diseases: A global survey of views from healthcare professionals. *Diabetes. Metab Syndr.* 2020;14(5):965-7. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.06.042>
4. <https://www.who.int/news-room/detail/01-06-2020-covid-19-significantly-impacts-healthservices-for-noncommunicable-diseases> [press release].
5. McQuaid CF, McCreesh N, Read JM, et al. The potential impact of COVID-19-related disruption on tuberculosis burden. *Eur Respir J.* 2020;56(2):2001718. <https://doi.org/10.1183/13993003.01718-2020>
6. Buonsenso D, Iodice F, Sorba Biala J, Goletti D. COVID-19 effects on tuberculosis care in Sierra Leone. *Pulmonology.* 2021;27(1):67-9. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.05.013>
7. Hogan AB, Jewell BL, Sherrard-Smith E, et al. Potential impact of the COVID-19 pandemic on HIV, tuberculosis, and malaria in low-income and middle-income countries: a modelling study. *Lancet Glob Health.* 2020;8(9):e1132-e41. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30288-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30288-6)
8. Ong CWM, Migliori GB, Raviglione M, MacGregor-Skinner G, Sotgiu G, Alffenaar JW, et al. Epidemic and pandemic viral infections: impact on tuberculosis and the lung: A consensus by the World Association for Infectious Diseases and Immunological Disorders (WAidid), Global Tuberculosis Network (GTN), and members of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for Mycobacterial Infections (ESGMYC). *Eur Respir J.* 2020;56(4):2001727. <https://doi.org/10.1183/13993003.01727-2020>
9. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-tuberculosis>
10. World Health Organization (WHO) Information Note Tuberculosis and COVID-19. <https://www.who.int/docs/default-source/documents/tuberculosis/infonote-tb-covid-19.pdf>
11. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different types of clinical specimens. *JAMA.* 2020;323(18):1843-4. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>
12. World Health Organization (WHO). Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19). Interim guidance, Geneva, World Health Organization. 2020. [https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirusdisease-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirusdisease-(covid-19))
13. World Health Organization (WHO). Tuberculosis laboratory biosafety manual (WHO/HTM/ TB/2012.11) Geneva, World Health Organization, 2012. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638_eng.pdf)
14. UTTR. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi. Örnek Yönetimi. Onaylı Standart 1. baskı UTTR, Ankara, Türkiye: 2014.
15. Vlad N, Yen H, Dick VS, et al. Impact of COVID-19 pandemic on tuberculosis laboratory services in Europe. *Eur Respir J* 2020;57(1):2003890. <https://doi.org/10.1183/13993003.03890-2020>
16. <https://covid19.saglik.gov.tr/TR-66935/genel-koronavirus-tablosu.html>

# Karbapenem Antibiyotiklere Duyarlılığın Saptanmasında Otomatize Sistemlerin Kullanımı Kolaylık ve Sınırlamaları

Pınar Sağıroğlu

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

✉ drpinarsa@gmail.com

Karbapenem grubu antibiyotikler, 1985 yılında imipenemin onay almasından sonra hayatımıza girmişlerdir, bugün çoklu ilaç direncine (ÇİD) sahip mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak kullanılmaktadırlar. Ancak 1990 yılında ilk kez Japonya'da IMP tipi karbapenemazın *Pseudomonas aeruginosa*'da tespitiyle birlikte karbapenemaz çağı açılmıştır<sup>(1)</sup>. Günümüzde karbapenem direnci mikroorganizmalar Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) ve ABD Hastalık Kontrol Merkezi (CDC)'ne göre acil ve öncelikli müdahale edilmesi gereken ÇİD patojenler listesinde en üst sırada yer almaktadırlar<sup>(1,2)</sup>. Yapılan projeksiyonlarda ÇİD patojenlerle mücadelede küresel boyutta yetersiz kalınırsa 2050 yılında ÇİD'lerle her yıl 10 milyon insanın ölebileceği tahmin edilmektedir<sup>(2)</sup>. Antimikrobiyal ilaçlara dirençli mikroorganizmalar ile küresel bir savaş yürütülmek zorundadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları bu savaşta ön cephede yer almaktadırlar. Bu savaşı sürdürürken elimizi güçlendirilen en önemli silahlardan biride bugün ülkemizde ve dünyadaki birçok ülkede mikroorganizmaların tanımlanmasında (ID) ve antibiyotik duyarlılık testlerinin (ADT) yapılmasında kullanılan otomatize sistemlerdir. Otomatize sistemler hayatımıza 40 yıl önce Vitek sisteminin NASA için geliştirilmesiyle girmiştir. Bugün FDA tarafından onaylı Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile,FR), Phoenix (BD, Sparks, MD), MicroScan WalkAway (Beckman Coulter,CA), Sensititre ARIS 2X (Thermo Scientific, Lenexa, KS) sistemleri mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Bu sistemler beraberlerindeki uzman yazılımları [Vitek 2-Advanced Expert System (AES), Observa, Phoenix-BDXpert, BD EpiCenter, Microscan- LabPro, Sensititre ARIS 2X- SWIN) ile kullanıcılara güvenilir raporlar sunarlar. Genel olarak bu uzman yazılımlar kural tabanlı çalışırken, Vitek 2'nin AES'i yorumlayıcı okuma yaparak elde ettiği sonuçları veri tabanı ile karşılaştırarak sonuç üretmektedir<sup>(3)</sup>.

Karbapenem antibiyotikler otomatize sistemlerde üreticinin bölge ve ülke ihtiyaçlarına göre belirlediği farklı kart/panel içerikleri ile karşımıza çıkarlar. Bunlar arasında kartın eritapenem, meropenem, imipenem, doripenem'den hangisini içerdiği, kaç kuyucukta okuma yaptığı, değerlendirebileceği dilüsyon aralığı ve hangi rehber göre (EUCAST / CLSI / FDA) ADT sonuçlarını değerlendirdiği sayılabilir.

## Otomatize Sistemlerin Karbapenem Duyarlılığını Saptamada Bize Katkıları

### Hızlı sonuç verme

Bu sistemlerle karbapenem duyarlılık sonuçları minimum 2.5 saat ortalama 4-6 saat'de verilebilir. Karbapenemler genelde ciddi MDR enfeksiyonlarda, yoğun bakımlarda ve

sepsiste kullanılırlar. Sepsiste kaybedilen her saat yaşama şansı %7.6 düşmektedir<sup>(4)</sup>.

### Kantitatif sonuç üretme

Sistemler kullandıkları uzman yazılımlar sayesinde kantitatif sonuç (MİK veya Breakpoint) verirler. Karbapenem dirençli mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonların mortalitesi %50'nin üzerindedir. Yapılan yayınlarda meropenem MİK  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  ise mortalite oranının yükseldiği ve meropenem MİK  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$  ise tedavi yanıtının daha iyi olduğu bildirilmektedir<sup>(5)</sup>.

### Tekrarlanabilir, standart sonuçlar

Bu sistemlerde bütün ADT prosedürü standardize edilmiştir. Teknik personele ve malzemeye bağlı hatalar minimize edilmiştir. Yüksek örnek yüküne karşı tekrarlanabilirliği yüksek sonuçlar ile birlikte çok sayıda hastaya ait örnekten ADT yapma imkânı sunarlar. Uzman sistem yorumlarıyla kullanıcılardan dikkatini çeker ve raporlama hatalarını önlerler.

### Hastane bilgi sistemi (HIS) entegrasyonu

Sistemler HIS bağlanarak ADT raporlarının hatasız aktarımına olanak sağlarlar. Bu beraberinde epidemiyolojik verilerin saklanması ve analiz imkanını sunarken enfeksiyon kontrol ve süreyans verilerine, kümülatif antibiyogram ile tedavinin ADT sonuçlarına göre de-eskalasyonuna ve kurumların antibiyotik direnci ile mücadelesine aktif katkıda bulunarak antimikrobiyal yönetimde kilit rol oynarlar.

### Karbapenem direncini tespiti yönelik üretilen yeni paneller

BD firmasının kullanımda olan Phoenix CPO detect paneliyle karbapenem direncinin tespiti ve kökenlerin sahip olduğu karbapenemazın Enterobacterales, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* için Ambler sınıflandırmasının (A, B ve D) yapılması mümkündür. Ayrıca panellerle karbapenem dirençli mikororganizmaların tedavisinde kullanılan yeni nesil beta laktam inhibitör kombinasyonlarından seftazidim avibaktam ve seftolozan tazobaktam duyarlılığı tespit etmek mümkündür. Yapılan çalışmalarda karbapenem saptamada duyarlılık %89.4-100 ve özgüllük %55.3-100 olduğu, karbapenemaz sınıflandırmada ise A grubunda duyarlılık %43.3-100, B grubunda duyarlılık %71.8-100, D grubunda duyarlılık %82-100 olarak tespit edilmiştir<sup>(6)</sup>. Bizim çalışmamızda ise 136 *Klebsiella pneumoniae* (16 S, 120 R) duyarlılık 98.2 ve özgüllük %93.75 olarak bulunmuştur. B grubu karbapenemazları ayırmada duyarlılık %82.2 ve D grubunda ise duyarlılık %93.9 belirlenmiştir. A grubu yeterli köken olmadığı için yorum yapılamamıştır. İki karbapenemazın birlikte

olduğu (n=15) kökenlerde sistemin birini doğru olarak tanımladığı bulunmuştur.

Sonuç olarak otomatize sistemler karbapenemlere duyarlılıkta bize; Laboratuvar iş yükünü azaltarak, teknik ve malzemenin kaynaklı hata riskini minimize ederek, hızlı ve kantitatif, aynı anda birden çok karbapenem duyarlılık sonucunun yer aldığı, standart, ön yorumlamaları uzman sistemlerle yapılmış, HIS'e aktarılabilen oldukça güvenilir raporlar sunarlar.

#### Otomatize Sistemlerin Karbapenem Duyarlılığını Saptamada Sınırlamaları

Karbapenem duyarlılığını saptamada sistemlerin performansını; test edilen bakteri türü, karbapenem direncine sebep olan direnç mekanizması, kartlar/panellerde kullanılan antibiyotik türü, sayısı, karbapenem direncinde sürekli güncellenen rehberlere uyum, uzman sistemlerin performansı ve analitik süreçte yapılan hatalar doğrudan etkilemektedir.

#### Test edilen bakteri türü

Karbapenem direnci, fermenter (Karbapenem direnci *Enterobacterales*) ve nonfermenterler *Acinetobacter baumannii* ve *P. aeruginosa*) olmak üzere iki gruptaki bakterilerde karşımıza çıkar. Geçmiş yıllarda otomatize sistemlerin nonfermenterlerdeki ADT sonuçlarında çeşitli sıkıntılar varken, günümüzde özellikle karbapenemler için güvenle kullanılabileceğini söylemek mümkündür. Ancak *Enterobacterales* ailesinde bakteri türü sistemlerin performansını doğrudan etkilemektedir. *Klebsiella pneumoniae*'de sistemler karbapenem duyarlılığını saptamada daha başarılıyken, *Escherichia coli*'de kısmen başarısızdırlar ancak en problemli oldukları türler arasında *Enterobacter* spp. başta olmak üzere diğer *Enterobacterales* türlerini saymak mümkündür<sup>(7-10)</sup>.

#### Karbapenem direncine sebep olan direnç mekanizması

Karbapenem direnci bakterilerde karbapenamaz üretimi ve diğer mekanizmalarla (Effluks pompa değişimleri, porin mutasyonları ve AmpC ve ESBL gibi diğer beta laktamaz enzimleriyle) oluşabilir. Karbapenemaz üretiminde 5 büyüklük diye adlandırılan KPC (A grubu), NDM, IMP, VIM (B grubu metallobetalaktamazlar) ve OXA-48 benzeri (D grubu) karşımıza çıkmaktadır<sup>(1)</sup>. Otomatize sistemler karbapenem duyarlılığını doğru saptamada özellikle KPC tipi karbapenemaz üreten kökenler, IMP tipi başta olmak üzere bazı metallobetalaktamazlar ve daha az olmakla birlikte OXA-48 türlerinde problem yaşarlar. Sistemlerin en sıkıntılı sonuç verdikleri grup ise karbapenemaz üretmeyen karbapenem dirençli *Enterobacter* ve *E. coli* türlerinde AmpC (CMY-2) betalaktamaz üreten kökenlerdir<sup>(11,12)</sup>.

#### Kartlar/panellerde kullanılan antibiyotik türü, sayısı

Karbapenem direnci saptamada meropenem karbapenemaz duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi antibiyotiktir. Ertapenem duyarlılık açısından mükemmel, özgüllüğü düşük bir ajandır. Özellikle *Enterobacter* spp.'de porin mutasyonları, ESBL ve AmpC tipi β-laktamaz varlığında etkilenir. Otomatize sistemlerde tercih edilecek kartlarda üç karbapenemin [meropenem (MEM), imipenem (IMP) ve ertapenem (ETP)] birlikte olması istenir. Ancak ikili kombinasyon kullanılması gerekiyorsa kartta IMP ve MEM olması tercih edilmelidir. Özellikle CTX-M ve AmpC endemik bölgelerde (KPC saptama

mada çok iyi performansı olmasına rağmen) ertapenem tek başına olduğu kartlar kullanılmamalıdır. Bazı yayınlar da tek başına IMP olan kartlarda da yanlış sonuçlar elde edilebileceği bildirilmektedir<sup>(13,14)</sup>.

#### Karbapenem direncinde sürekli güncellenen rehberlere uyum

Antibiyotik duyarlılık testlerinin değerlendirilmesinde kullanılan rehberler (EUCAST, CLSI ve FDA) her yıl güncellenir. Ancak otomatize sistemler güncellemelere adaptasyonda zaman kaybederler. Bu süreler üretici firmadan firmaya değişmekle birlikte 6-8 ay sürmektedir. Bu adaptasyon sürecinde üreticilerin hızlarını belirleyen en büyük engel FDA'nın ADT güncellemelerini 2017 yılına kadar kabul etmekte ve onaylamakta yavaş kalmasıdır. Ancak 2017 yılından sonra yasalarla bu süre 6 ay ile sınırlandırılmıştır. Bu üretici firmaların elini güçlendirse de günümüzde en büyük problem sahadaki laboratuvarlarda çalışan cihazların geç güncellenmesidir. Yapılan bir yayında ABD'de de %23 laboratuvar da çalışan sistemlerin 2010 öncesi CLSI kurallarıyla çalıştığı bildirilmiştir<sup>(15,16)</sup>.

#### Uzman sistemlerin performansı

Otomatize sistemlerin sahip oldukları uzman sistem yazılımları karbapenem duyarlılığı saptamadaki başarılarını doğrudan etkiler. Genel olarak uzman sistemler karbapenemaz üreticilerini saptamada daha başarılıdırlar. Daha çok karbapenemaz dışı mekanizmalarla oluşan dirençte sıkıntılıdır. Özellikle kökenler ESBL ve AmpC beta laktamazlar üretiyorlarsa, uzman sistemler bunları karbapenem üreticisi olarak raporlamakta (yalancı pozitif) ya da tam tersi bunlarla birlikte olan karbapenem direncini (yalancı negatif) saptayamamaktadırlar. Vitek 2 AES performansının diğer uzman sistemlerden karbapenem direnci saptamada daha yüksek olduğu bildirilmektedir<sup>(7)</sup>.

#### Analitik süreçlerde yapılan hatalar

Analitik süreçte yapılan hataların tamamı otomatize sistemlerin ADT ve ID sonuçlarını doğrudan etkilemektedir. Burada en önemli problem inokulum hatalarıdır<sup>(5)</sup>. Yetersiz ya da fazla hazırlanan inokulumlar tutarsız sonuçlara neden olur. Sistemlerin hızlı sonuç vermeye odaklı kısa süreli inkübasyon yapmaları, yavaş üreme eğilimi olan mikroorganizmalarda yanlış sonuçlara sebep olmaktadır. Kartların dilüsyon aralıklarının karbapenem duyarlılığını saptamada yetersiz kalması, imipenem antibiyotiklerinin degradasyon problemleri ve yeni karbapenem antibiyotik kombinasyonların henüz sistemlerinde olmaması (meropenem/vaborbaktam, imipenem/relebaktam vb) diğer sınırlanmalarını oluşturmaktadır.

#### Otomatize Sistemlerde Karbapenem Duyarlılığında Akıl Notları

Karbapenem duyarlılığını saptamada otomatize sistemleri kullanırken sınırlamaları konusunda bazı noktaları iyi bilmekte fayda vardır;

- Karbapenem direnci *K. pneumoniae*'de karbapenemaz üretimiyle, *E. coli* ve *Enterobacter* spp. ve *Pseudomonas* spp. non-karbapenemaz mekanizmaları ve *A. baumannii*'de D grubu karbapenamazlarla (OXA-23) oluşmaktadır.
- KPC endemik bölgede yaşıyorsanız mutlak sonuçlarınızı bir fenotipik karbapenem testi ile doğrulamalısınız.



- Karbapenem dirençli *Enterobacter* türlerinde sonuçlarınızı bir fenotipik karbapenem testi ile doğrulamalısınız.
- *Pseudomonas* türlerinin mukoid kolonilerinde inokulum ayarlarken dikkat etmelisiniz.
- Kartlarınızın ve sisteminizi EUCAST/CLSI 'a göre sürekli güncel tutmalısınız.
- Kartların içerdiği karbapenem antibiyotik seçimlerinde bölgenizin karbapenem direnç oranlarını ve karbapenem direncinde baskın olan mekanizmaları iyi bilmelisiniz;
- Ülkemizde invazif örneklerden (kan, BOS) izole edilen *Acinetobacter* türlerinde %90, *K. pneumoniae*'de %39, *P. aeruginosa*'da %38 ve *E. coli*'de %3 karbapenem direnci olduğunu(17)
- Ülkemizin OXA-48 benzeri (D grubu) karbapenamazların doğduğu topraklar olduğunu
- Coğrafyamızda hakimiyetlerini halen koruduklarını
- OXA-48'de otomatize sistemlerin A, B, C'ye göre performanslarının daha iyi olduğunu
- D grubununun karbapenem direncini saptamada yaygın kullanılan fenotipik testlerde sınırlamalarının olduğunu (Carba NP, MALDI-TOF vb)
- NDM'lerin (B grubu) ülkemizde saptanma oranlarının hızla arttığını
- Şimdilik KPC (A grubu) ve diğer Metallo-Betalaktamazların (IMP, VIM) daha az görüldüğünü akılda tutmalısınız.

Sonuç olarak otomatize sistemlere karbapenem duyarlılığını saptamada bize hızlı, kantitatif, tekrarlanabilir sonuçlar sundukları, laboratuvarıda iş yükümüzü azalttıkları için özellikle duyarlı (hassas) sonuç verdiklerinde güvenelim. Ancak dirençli sonuç verdiklerinde açıklarını ve kısıtlamalarını aklımızda tutarak kullanalım. Kısıtlı kaldıkları durumlarda; karbapenem direncini saptamada güvenilir bir fenotipik test ile sonuçlarımızı doğrulayalım.

**Anahtar kelimeler:** Otomatize sistemler, Vitek 2, Phoenix, karbapenem, direnç

#### Kaynaklar

1. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and future of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Infections. *Antibiotics* (Basel). 2019;8(3):122. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030122>
2. De Kraker ME, Stewardson AJ, Harbarth S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med*. 2016;13(11): e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
3. Patel R, Carroll KC. Systems for Identification of Bacteria and Fungi. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition. American Society of Microbiology; 2015: 29-43.
4. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34(6):1589-96. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>
5. Reyes J, Aguilar AC, Caicedo A. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Microbiology key points for clinical practice. *Int J Gen Med*. 2019;12:437-46. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S214305>
6. Whitley V, Kircher S, Gill T, et al. Multicenter evaluation of the BD Phoenix CPO detect test for detection and classification of carbapenemase-producing organisms in clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2020;58(5):e01752-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01752-19>
7. He Q, Chen W, Huang L, et al. Performance evaluation of three automated identification systems in detecting carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15(1):40. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0154-0>
8. Kulah C, Aktas E, Comert F, Ozlu N, Akyar I, Ankarali H. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. *BMC Infect Dis*. 2009;9:30. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-30>
9. Bobenchik AM, Deak E, Hindler JA, Charlton CL, Humphries RM. Performance of Vitek 2 for antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia* with Vitek 2 (2009 FDA) and CLSI M100S 26th Edition Breakpoints. *J Clin Microbiol*. 2017;55(2):450-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01859-16>
10. Hong JS, Kim D, Kang DY, et al. Evaluation of the BD Phoenix M50 automated microbiology system for antimicrobial susceptibility testing with clinical isolates in Korea. *Microb Drug Resist*. 2019;25(8):1142-1148. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0370>
11. Haldorsen B, Giske CG, Hansen DS, et al. Performance of the EUCAST disc diffusion method and two MIC methods in detection of *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to meropenem: the NordicAST CPE study [published correction appears in *J Antimicrob Chemother*. 2018 1;73(10):2905]. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(10):2738-47. <https://doi.org/10.1093/jac/dky276>
12. Harino T, Kayama S, Kuwahara R, et al. Meropenem resistance in imipenem-susceptible meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates not detected by rapid automated testing systems. *J Clin Microbiol*. 2013;51(8):2735-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.02649-12>
13. Lee M, Chung HS. Different antimicrobial susceptibility testing methods to detect ertapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: VITEK2, MicroScan, Etest, disk diffusion, and broth microdilution. *J Microbiol Methods*. 2015;112:87-91. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.03.014>
14. Vading M, Samuelsen Ø, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:668-74. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03299.x>
15. Humphries RM, Ferraro MJ, Hindler JA. Impact of 21st century cures act on breakpoints and commercial antimicrobial susceptibility test systems: Progress and pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2018;56(5):e00139-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00139-18>
16. Shugart A, et al. Hospital microbiology laboratory practices for *Enterobacteriaceae*: Centers for Disease Control and Prevention National Healthcare Safety Network (NHSN) annual survey, 2015 and 2016. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018;39(9):1115-7. <https://doi.org/10.1017/ice.2018.153>
17. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance Annual report 2020 [<https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2020/central-asian-and-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2020>] Erişim tarihi: 02/01/2021

# COVID-19 Olgularında *Candida* Dışı Maya Enfeksiyonları

Ayşe Kalkancı

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

✉ aysekalkanci@email.com

Tıp tarihine 2019 yılının Aralık ayında giren yeni pnömoni, 11 Şubat 2020 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından “coronavirus disease 2019” (COVID-19) olarak isimlendirilmiştir. Uluslararası virüs sınıflandırma komisyonu bu hastalık etkenini de “severe acute respiratory syndrome coronavirus 2” (SARS-CoV-2) olarak isimlendirmiştir. Konak hücreye girmek için esas olarak “angiotensin converting enzyme 2” (ACE2) reseptörünü kullanan virüsün neden olduğu hastalığın çoklu sistem hastalığı olduğu ve karmaşık bir patogeneze sahip olduğu anlaşılmıştır. Özellikle ağır semptomlarla seyreden klinik hastalık tablosunda lenfopeni, T hücre aktivasyonu ve aynı zamanda T hücre fonksiyon bozukluğu görülmekte, nötrofiller başta olmak üzere tüm granülositlerde artış sonucunda aşırı sitokin üretimi ve antikor cevabı gelişmektedir. Sitokin fırtınası olarak tanımlanan tabloda kontrolsüz bir bağışık cevabın geliştiği görülmektedir.

Ağır COVID-19 olgularında, özellikle yoğun bakımda takip edilen hastalarda tüm fırsatçı enfeksiyonlara yatkınlık görülmektedir. Fıratçı mantar enfeksiyonlarının görülme sebebi yine COVID-19 patogenezi ile ilişkilidir. Pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-1, IL-2, IL-6, tümör nekroz-alfa artışı, aynı zamanda anti-inflamatuvar sitokinler olan IL-4, IL-10 artışı, CD4 T lenfosit kaynaklı interferon-gamma düşüklüğü, sayıca azalmış CD4 ve CD8 hücreler nedeniyle tüm hücrel cevap zayıflamaktadır.

Mantarlara karşı bağışık cevabın temel başlıkları doğal bağışıklık ve lizozim, antimikrobiyal peptidler gibi non-spesifik doğal direnç faktörleri, makrofaj, nötrofil, dendritik hücrelerden oluşan doğal bağışıklığın hücrel parçası ile kazanılmış bağışıklığın en temel elemanı olan T hücreleridir.

İnvaziv mantar enfeksiyonları endojen olarak hastanın normal florasından kaynaklanan veya daha az olarak ekzojen yoldan bulaşan enfeksiyonlardır. COVID-19 hastalarında görülen fırsatçı mantar enfeksiyonları başta invaziv aspergilloz olmak üzere, tüm küf enfeksiyonları, *Candida* ve *Candida* dışındaki tüm mayalar ile oluşan invaziv enfeksiyonlar ve belki de doğada bulunan tüm fırsatçı potansiyele sahip mantarların etken olabileceği enfeksiyonlardır. *Candida* cinsi dışında kalan mayalar diğer mantarlara göre çok nadir görülmektedir. *Candida* cinsi dışında kalan cinsler *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Saprochaete*, *Kodamaea*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Pseudozyma*, *Sporobolomyces*, *Exophiala*, *Lacazia*, *Emmonsia*, *Wickerhamomyces* (*Pichia*) cinsindeki mayalardır. COVID-19 hastalarında bu maya mantarları ile gelişen fırsatçı mantar enfeksiyonları konusunda çok sayıda bildirim

bulunmamaktadır. Henüz az sayıda olgu bildirimi yapılmıştır. Bu güne kadar *Candida* dışı maya enfeksiyonu olarak iki adet kriptokokoz olgusu ve iki olguyu içeren probiyotik ilişkili *Saccharomyces cerevisiae* fungemisi bildirimi yapılmıştır.

İlk olgu Brezilya'dan bildirilmiştir. 18 Mayıs 2020 tarihinde, 75-yaşında erkek hasta ani başlayan kuru öksürük şikayeti ile sağlık kurumuna başvurmuştur. Hastanın ateş ve başka bir bulgusu bulunmamaktadır. Hipertansiyon öyküsü olan hastaya 3 yıl önce böbrek transplantasyonu yapılmıştır. Böbrek nakli nedeniyle 4 mg takrolimus ve 5 mg prednizon ile immünsüpresif tedavi almakta olan hastada, 2 yıl önce siroz gelişmiştir. Başvurusunda çekilen akciğer tomografisinde çift taraflı buzlu cam opasiteleri ve konsolidasyon görülen hastanın, nazofarengeyal sürüntü örneği COVID-19 pozitif bulunmuştur. Hastada solunum sıkıntısı gelişmesi sebebiyle yoğun bakıma alınmış, burada asit sıvısı gelişmiş ve asit sıvısında da COVID-19 PCR pozitif bulunmuştur. Yatışının 12.günde sepsis ve septik şok gelişen hastadan kan kültürü alınmıştır. Alınan ardışık iki kan kültüründe pozitif üreme sinyali alınmıştır. Kültürde üreyen mikroorganizma bir maya olarak tanımlanmıştır. Tür tanımı devam ederken hasta yatışının 18. gününde kaybedilmiştir. Kan kültüründe üreyen maya *Cryptococcus neoformans* olarak tanımlanmıştır. Aynı gün alınan trakeal aspirat kültürleri bakteri, mantar ve *Mycobacteria* açısından negatif bulunmuştur. Hasta COVID-19 zemininde gelişen kriptokokkoz olarak tanımlanmıştır. Makrofajlar ACE2 reseptörü taşıdığı için virüsü her organa ve dokuya götürebildiği ve bu nedenle asit sıvısında izole edildiği yorumlanmıştır. Bu hastanın kriptokokoz için risk faktörleri; lenfopeni, T hücre bozukluğu ve T hücrelerin sayıca azalması, özellikle CD4 pozitif T hücre düşüklüğü olarak sıralanmıştır. Organ nakli alıcıları, siroz hastalarının risk grubunda olduğu belirtilmiştir. SARS-CoV-2'nin kendi başına ve neden olduğu bağışık sistem bozukluğu nedeniyle yaygın kriptokokkoz yapabileceği belirtilmiştir.

İkinci kriptokokoz olgusu tersten COVID-19 ile ilişkilidir. HIV pozitif ve santral sinir sistemi kriptokokkozu olan hastada gelişen hastane kaynaklı SARS-CoV-2 pnömonisi bildirilmiştir. Peru'da Lima şehrinde 38-yaşında bir erkek hasta 13 Şubat 2020 tarihinde ataksi, dismetri ve baş ağrısı ile sağlık kurumuna başvurmuştur. Peru'daki ilk SARS-CoV-2 olgusu 6 Mart 2020 tarihinde bildirilmiştir. Dolayısıyla bu olgu sağlık kurumuna başvurduğu dönemde henüz ülkede SARS-CoV-2 bulunmamaktadır. Hasta HIV tedavisi amacıyla, Anti Retroviral Tedavi; tenofovir-DF/ emtricitabine+atazanavir/ritonavir almaktadır. Başvuruda beyin magnetik rezonans (MRI) incelemesi obstrüktif hidrosefali ve 4. ventrükülde

nodül varlığını göstermiştir. Hastanın alınan BOS örneğinde “Lateral Flow Device” (LFD) ile *Cryptococcus* neoformans antijeni pozitif bulunmuştur. Intraventriküler kriptokokkoma tanısı alan HIV pozitif hastaya amfoterisin B deoksikolat ve flukonazol ile tedavi başlanmış ve ventriküloperitoneal şant uygulanması için hasta sağlık kurumunda takip edilmiştir. Hasta yattığı dönemde sadece sağlık personeli ile temas etmiş ve hastane dışına çıkmamıştır. 22 Mart 2020’de halsizlik, boğaz ağrısı, öksürük başlamıştır. Yedinci günde ateş, dispne, diyare, lenfopeni, trombositopeni eklenmiş, C-reaktif protein, üre, fibrinojen, laktat dehidrogenaz ve D-dimer düzeyleri artmıştır. Akciğer grafisinde ve tomografide bilateral buzlu cam opasiteleri ve yama şeklinde infiltrasyonlar görülmüş, 31 Mart’ta SARS-CoV2 PCR testleri pozitif bulunarak SARS-CoV2 pnömonisi tanısı konmuştur. Solunum fonksiyonları kötüleşen hastaya yüksek doz kortikosteroid eklenmiştir. Ancak, o dönemde hastanede uygun solunum cihazı bulunmadığı için hasta mekanik ventilasyona alınamamış ve 4 Nisan 2020’de kaybedilmiştir.

Probiyotik ilişkili *Saccharomyces cerevisiae* fungemisi gelişen iki hasta bildirilmiştir. Yunanistan’ın Selanik şehirlerinden yapılan bildirimde, 76 ve 73 yaşında iki erkek hasta bulunmaktadır. İlkinde Hipertansiyon ve diyabet, ikincisinde hipertansiyon ve eski sigara kullanımı öyküsü olan hastalar ateş, dispne, hipoksi ve öksürük şikayetleri ile doğrudan yoğun bakım ünitesine yatırılmıştır. Burada yapılan SARS-CoV-2 RT-PCR testleri pozitif bulunmuştur. Her iki hastada da YBÜ yatışları sırasında alınan kan kültürleri ve derin trakeal aspirat örneklerinden *Staphylococcus hominis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* izole edilmiştir. Her iki hastanın da böbrek fonksiyonları bozulmuş ve hemodiyaliz uygulanmıştır. Antimikrobiyaller ve COVID-19 nefrotoksitiden sorumlu kabul edilmiştir. Her ikisinde de diyare başlamıştır. Kurum protokolü olarak diyareli hastaya «Ultra-Levure» (*Saccharomyces cerevisiae* (boulardii) içeren probiyotik bileşikten 250-500 mg/gün başlanmıştır. İlk hastanın YBÜ’deki 35.ci gününde ateş gelişmiş ve (38-38.5°C) kan kültüründe *Saccharomyces cerevisiae* üremiştir. İkinci hastanın da YBÜ’deki 15. günde ateş ve kan kültüründe *Saccharomyces cerevisiae* üremesi olmuştur. Tür tanımı ve duyarlılık testine göre önce anidulafungin sonra flukonazol başlanmıştır. Ribozomal DNA’nın «Internal transcribed spacer 1 (ITS1)» dizi analizi sonucu (Gen Bank Accession Numbers: MT527544 and MT522376) «Ultra-Levure» kökeni ve klinik kökenlerin “eş” olduğunu göstermiştir. Duyarlılık testi ATB™ Fungus 3 (bioMérieux SA, Marcy l’Etoile, France) ile yapılmıştır. İlk izolat MiK değerleri; flusitozin 4, AmB 1.0, itrakonazol 0.5, flukonazole 4, vorikonazole 0.125, posakonazole 0.032, anidulafungin 0.047 µg/mL bulunmuştur. İkinci izolat MiK değerleri; flusitozin 4, AmB 0.5, itrakonazol 0.5, flukonazole 4, vorikonazole

0.125, posakonazole 0.064, anidulafungin 0.002 µg/mL bulunmuştur. Yazarlar tartışmada 4-6 yataklı YBÜ’lerinde son dört yıldır 320 olguyu takip ettiklerini, en az yarısına profilaktik *Saccharomyces* verildiğini ve bu iki olgunun ilk fungemi olguları olduğunu bildirmiş, olguları COVID-19 ile ilişkilendirilmiştir. Her iki olgu da YBÜ’den taburcu edilmiş, bir olgu tamamen iyileşmiş, ikinci olgu trakeostomi komplikasyonu nedeniyle bir süre daha başka bir merkezde takip edilmiştir.

Bu az sayıdaki olgudan elde edilen deneyime göre; SARS-CoV-2 kaynaklı COVID-19 enfeksiyonu ile birlikte tüm fırsatçı maya enfeksiyonlarının görülebildiği, endojen yoldan translokasyon ile dolaşıma geçerek invaziv enfeksiyon yaptıkları, ekzojen bulaş bildirilmediği ve COVID-19 ilişkili immüno-patogenезin fırsatçı enfeksiyon gelişiminde kolaylaştırıcı olduğu değerlendirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** COVID-19, fırsatçı enfeksiyonlar, *Candida* dışı mayalar, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*

#### Kaynaklar

1. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. J Pharm Anal. 2020;10(2):102-8. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>
2. Pemán J, Ruiz-Gaitán A, García-Vidal C, et al. Fungal co-infection in COVID-19 patients: Should we be concerned? Rev IberoMicol. 2020;37(2):41-6. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2020.07.001>
3. Lai CC, Wang CL, Hsueh PR. Co-infections among patients with COVID19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? J Microbiol Immunol Infect. 2020;53(4):505-12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.05.013>
4. Byrne DD, Reboli AC. Rare yeast infections: Risk factors, clinical manifestations, treatment, and special considerations. Curr Clin Micro Rpt. 2017;4:218-31. <https://doi.org/10.1007/s40588-017-0073-7>
5. Passarelli VC, Perosa AH, de Souza Luna LK, Conte DD, Nascimento OA, Ota-Arakaki J, Bellei N. Detected SARS-CoV-2 in ascitic fluid followed by cryptococcemia: a case report. SN Compr Clin Med. 2020. <https://doi.org/10.1007/s42399-020-00574-9>
6. Gonzales AJC, Montenegro-Idrogo JJ, Vadillo ARV, Torres MS, Matos IV, Resurrección Delgado CP. Hospital-acquired SARS-CoV-2 pneumonia in a person living with HIV. Int J STD & AIDS. 2020;31(13):1320-2. <https://doi.org/10.1177/0956462420957528>
7. Ventoulis I, Sarmourli T, Amoiridou P, et al. Bloodstream infection by *Saccharomyces cerevisiae* in two COVID-19 patients after receiving supplementation of *Saccharomyces* in the ICU. J Fungi (Basel). 2020;6(3):98. <https://doi.org/10.3390/jof6030098>



# Vektör Kaynaklı Enfeksiyonların Kontrolünde Yeni Gen Düzenleme Tekniği; “Crispr-Cas9”

Eylem Akdur Öztürk

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana

✉ eylem.akdur@ege.edu.tr

Vektör kaynaklı hastalıklar, dünya çapındaki tüm bulaşıcı hastalıkların yaklaşık % 17'sinden sorumlu olup özellikle az gelişmiş ülkelerde yılda 700.000'den fazla ölüme neden olduğu bildirilmiştir<sup>(1)</sup>. Küresel ısınma, insektisitlere karşı gelişen direnç ve mevcut kontrol yöntemlerinin yetersizliği nedeniyle vektör kaynaklı hastalıklarda artış gözlenmektedir<sup>(2,3)</sup>. Bu nedenle vektör kaynaklı hastalıkların kontrolünde yeni bir kontrol stratejisi geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır<sup>(4)</sup>.

Patojenlerin vektördeki gelişiminin çok sayıda konakçı faktöre (agonist) bağlı olduğu ve bunların inhibisyonu veya inaktivasyonu ile enfeksiyonun baskılanmasının mümkün olabileceği bildirilmiştir<sup>(5,6)</sup>. Son yıllarda bu amaçla yeni bir genom mühendisliği olan Gen Drive sistemleri üzerinde durulmaktadır<sup>(7)</sup>. Gene Drive sistemlerinde modifiye edilmiş genlerin yavruların tamamına aktarılması üzerine odaklanıldığı belirtilmiştir. Gene drive tasarımı iki yaklaşım üzerinde çalışılmaktadır. Bunlardan birincisi, patojenler için vektör yeterliliğini azaltmaya yönelik gen modifikasyonları ile bulaşın engellenmesini hedefleyen “popülasyon değişimi” yaklaşımıdır. Diğerinin ise vektörün hayatta kalmasından veya fertilitésinden sorumlu genlerin modifikasyonu ile vektör popülasyonunun azaltılması hedefleyen “popülasyon bastırma” yaklaşımı olduğu bildirilmiştir<sup>(4)</sup>.

Yakın zamanda geliştirilen Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / Cas9 tabanlı genom düzenleme yöntemi ve gen drive sistemlerinin birlikte kullanılmasının vektör kaynaklı hastalıkların kontrolünde yeni ve umut verici bir araç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir<sup>(5)</sup>.

CRISPR / Cas9 sistemi, rehber RNA ve cas9 enzim olmak üzere başlıca iki temel bileşenden oluşmaktadır. Rehber RNA (yaklaşık 20 baz büyüklüğünde), DNA dizisinde hedeflenen bölgeye bağlanması için tamamlayıcı RNA bazlarını içerecek şekilde tasarlanmıştır. Cas9 enzimi ise rehber RNA aracılığı ile DNA'yı hedeflenen bölgeden kesmektedir. Bu aşamada DNA onarım mekanizması kullanılarak hedef gen bölgesinde istenilen gen modifikasyonları yapılabilmektedir<sup>(8)</sup>.

CRISPR/ Cas9 sistemi ile vektör genomlarında istenen değişiklikler yapılarak vektör mikrobiyomunun manipülasyonu ve anti-parazitik bağışıklık efektör mekanizmalarının tetiklenmesi amaçlanmaktadır<sup>(4)</sup>.

Dong<sup>(5)</sup> ve arkadaşlarının CRISPR / Cas9 genom düzenleme

yoluyla yaptığı çalışmada, *Plasmodium* ookinetlerinin vektör bağırsak epitel hücrelerine invazyonunda önemli rol oynayan Fibrinogen-related protein 1 (FREP1) geninin inaktivasyonu hedeflenmiştir. Bu gen modifikasyonunun sivrisineğin *Plasmodium*'a olan duyarlılığı ve sivrisinek üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonunda FREP1 mutantlarının kontrol gruplarına oranla daha düşük oranda kan ile beslenme eğiliminde olduğu, fertilité ve yumurta çıkım oranlarında azalma, gecikmiş larva gelişimi ve kan emdikten sonra ömürlerinin kısaldığı görülmüştür.

CRISPR / Cas9 tabanlı gen drive yöntemi ile “popülasyon bastırma” yaklaşımının kullanıldığı başka çalışmada, *P. falciparum* ookinet protein Kitinaz 1 ve sirkumsporozoit proteinine karşı tek zincirli antikorları kodlayan iki antipatojen efektör transgeninin, *A. stephensi*’ n göz pigmentasyon gen lokusuna başarılı bir şekilde aktarıldığı bildirilmiştir. Efektör genlerin, kanla beslendikten sonra transkripsiyonel olarak uyarılabildiği ve transgenik soyların vahşi tipli sivrisinelere çaprazlaması sonucu transgenlerin yavruların % 99.5'ine aktarıldığı gösterilmiştir<sup>(9)</sup>.

CRISPR / Cas9 genom düzenleme yöntemi kullanılarak Malaria ve Leishmaniasis vektörlerinin farklı gen bölgelerinin hedeflendiği pek çok benzer çalışma bulunmaktadır (2, 10-13).

Crispr/Cas9-Gene drive sistemlerinin birlikte kullanılmasıyla oluşabilecek bir takım sorunlar üzerinde durulmaktadır. Bunlardan birinin, hedeflenen gen bölgesi ya da Cas9 sisteminden kaynaklı transgenik canlıların genel yaşam becerilerinde azalma ihtimali olduğu bildirilmiştir. Bu sorunun, daha spesifik olarak düzenlenmiş Cas9 veya rehber RNA kullanılarak çözülebileceği belirtilmiştir. Ayrıca DNA'nın çift zincir ayrılmalarının homolog olmayan uçların birleşmesi şeklinde onarılmasıyla Gene Drive tekniğine dirençli allellerin oluşması ihtimalinden bahsedilmiştir. Aynı anda birden fazla rehber RNA kullanımının, tek DNA zincirini kesen endonükleaz sistemlerinin geliştirilmesinin ve Homolog olmayan uçların birleşmesi yolunu baskılayan yöntemlerin kullanılmasının gene drive direnç allellerinin oluşmasını engelleyebileceği bildirilmiştir. Karşılaşılan teknik zorluklara ek olarak, CRISPR/ Cas9 -Gene Drive deneylerinin hedef dışı mutasyonlarla geri dönüşümü olmayan ekolojik değişimlere neden olma ihtimaliyle ekolojik ve etik kaygı oluşturduğu üzerinde durulmuştur<sup>(14)</sup>.

Gen drive sistemlerinin ekosistem üzerindeki geri dönüşümü olmayan sorunlara neden olabileceğini düşünen bir araştırma grubu “Kene Karşıtı Fareler” projeleri ile kene

kaynaklı hastalıklarda rezervuar olan beyaz ayaklı farelerin (*Peromyscus leucopus*) CRISPR yöntemiyle kalıtsal olarak aşıl原因arak kene kaynaklı hastalıkları gen drive yöntemi kullanmadan önlemeyi amaçladıklarını bildirmişlerdir. Projede hastalık etkeni ile aşıl原因an dirençli farelerden elde edilen B hücrelerden rekombinant antikorların üretilmesi ve en koruyucu özellikteki antikorları kodlayan allel genlerinin CRISPR/cas9 yöntemiyle yerel fare popülasyonuna dahil edilerek cisgenik canlıların elde edilmesi hedeflenmiştir. Böylece ekosistemlerin hala çözölemeyen karmaşıklığına gen drive sisteminin karmaşıklığı eklemeyen belirli bir değişkenin etkilerinin tek başına test edilebilme imkanı olabileceği bildirilmiştir<sup>(15)</sup>.

Koo ve ark.'nın<sup>(16)</sup> kene kaynaklı hastalıkların tanısı üzerine yaptığı çalışmada, CRISPR / deaktif (d)Cas9 yöntemi ve silicon microring resonator (SMR) biyosensöre dayalı bir izotermal tanı yaklaşımını birleştirerek yeni bir tanı aracı elde edilmesi amaçlanmış ve 3 Scrub Typhus (ST) ve 3 Severe Fever with Thrombocytopenia syndrome (SFTS) hastasında test edilmiştir. CRISPR / dCas sisteminde kullanılan deaktif enzim hedef DNA veya cDNA'yı tanıdığı ancak hedef dizileri kesemediği için biosensör yüzeyindeki kırılma indisi değişikliğini artırarak 20 dakika içinde numunenin okunmasına imkan sunduğu ve tanıda pratik ve faydalı olabileceği bildirilmiştir<sup>(16)</sup>.

CRISPR / Cas9 genom düzenleme yönteminin etik ve ekolojik açıdan sorunsuz bir şekilde nasıl kullanılabileceğine dair tartışmalar ve çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca; plazmitlerin, vektör veri tabanlarında kullanılabılır hale getirmenin, test edilen rehber RNA verimliliği hakkında gerçek zamanlı bilgi paylaşımının ve düzenli olarak CRISPR / Cas9'a özgü konferanslar düzenlemenin, bu tür çalışmaların yaygınlığını artıracakı bildirilmiştir<sup>(14)</sup>.

#### Kaynaklar

1. WHO. Vector-borne diseases. Fact sheets 2017; <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/vector-borne-diseases>. (Erişim 1. Aralık. 2019)
2. Reegan AD, Ceasar SA, Paulraj MA, Ignacimuthu S, Al-Dhabi NA. Current status of genome editing in vector mosquitoes: A review. *BioScience Trends*. 2016;10(6):424-32. <https://doi.org/10.5582/bst.2016.01180>
3. Gage KL, Burkot TR, Eisen RJ, Hayes EB. Climate and vectorborne diseases. *Am J Prev Med* 2008;35(5). <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2008.08.030>
4. Rostami MN. CRISPR/Cas9 gene drive technology to control transmission of vector-borne parasitic infections. *Parasite*

*Immunol*. 2020;42(9):e12762.

<https://doi.org/10.1111/pim.12762>

5. Dong Y, Simões ML, Marois E, Dimopoulos G. CRISPR/Cas9 mediated gene knockout of *Anopheles gambiae* FREP1 suppresses malaria parasite infection. *PLoS Pathog*. 2008;14(3):e1006898. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006898>
6. Perez FM. Factors affecting the emergence and prevalence of vector borne infections (VBI) and the role of vertical transmission (VT). *J Vect Borne Dis*. 2007;44(3):157-63.
7. James S, Tountas KH. Using gene drive technologies to control vector-borne infectious diseases. *Sustainability*. 2018;10:4789; <https://doi.org/10.3390/su10124789>
8. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 2017;46:505-29. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
9. Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(49):E6736-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521077112>
10. Martin-Martin I, Aryan A, Meneses C, Adelman ZN, Calvo E. Optimization of sand fly embryo microinjection for gene editing by CRISPR/Cas9. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(9):e0006769. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006769>
11. Jeffries CL, Rogers ME, Walker T. Establishment of a method for *Lutzomyia longipalpis* sand fly embryo microinjection: The first step towards potential novel control strategies for leishmaniasis. *Wellcome Open Res*. 2018;3:55. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14555.2>
12. Louradour I, Ghosh K, Inbar E, Sacks DL. CRISPR/Cas9 Mutagenesis in *Phlebotomus papatasi*: the immune deficiency pathway impacts vector competence for *Leishmania major*. *mBio*. 2019;10(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01941-19>
13. Shinzawa N, Nishi T, Hiyoshi F, Motooka D, Yuda M, Iwanaga S. Improvement of CRISPR/Cas9 system by transfecting Cas9-expressing *Plasmodium berghei* with linear donor template. *Commun Biol*. 2020;3(1):426. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01138-2>
14. Bryant JM, Baumgarten S, Glover L, Hutchinson S, Rachidi N. CRISPR in parasitology: Not exactly cut and dried! *Trend Parasitol*. 2019;35(6):409-22. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.03.004>
15. Buchthal J, Evans SW, Lunshof J, Telford III SR, Esvelt KM. Mice against ticks: an experimental community guided effort to prevent tick-borne disease by altering the shared environment. *Phil Trans R Soc B*. 2019;374: 20180105. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0105>
16. Koo B, Kimc D, Kweone J, et al. CRISPR/dCas9-mediated biosensor for detection of tick-borne diseases. *Sens Actuators B Chem*. 2018;273:316-21. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.069>

# Helmint Enfeksiyonlarının Kontrolünde ve Araştırmalarında Yeni Bir Araç: CRISPR/Cas9

Serra Örsten

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara

✉ serra.orsten@hacettepe.edu.tr

Parazitik helmintler, dünya çapında 1.5 milyar insanı etkilemekte ve her yıl Afrika, Asya ve Güney Amerika'da ortalama 150,000 kişi ortaya çıkan komplikasyonlar sonucu hayatını kaybetmektedir<sup>(1)</sup>. Günümüzde, paraziter helmintlerin neden olduğu hastalıklara karşı insanlar için kullanılabılır bir aşı bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra, tedavi için sınırlı anti-helmintik ilaç seçeneği bulunması, uzun vadede ilaç direnci gelişme riskini artırmaktadır<sup>(2)</sup>. Bu nedenle, yeni ilaç veya aşı müdahale hedeflerinin belirlenmesi, bu enfeksiyonların kontrol altına alınması konusunda kritik önem taşımaktadır<sup>(3)</sup>. CRISPR/Cas9 sistemi, bir genomik müdahale yöntemi olup, hedefli mutasyonlara neden olarak özellikle genomlarda kilit rol oynayan genlerin işlevini tanımlamak açısından yeni ve güçlü bir moleküler araç olarak kullanılmaktadır. Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrar kümeleri (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat - CRISPR), kısa tekrarlı baz dizileri içeren bakteri ve arke gibi prokaryot canlıların genomunda bulunan DNA dizi aileleridir. Cas9, arkelerde ve bazı bakterilerde bulunan bir endonükleaz olup, faj ve plazmidlere karşı nükleik asit tabanlı bağışıklıkta rol almaktadır<sup>(4)</sup>. Bugüne kadar CRISPR/Cas9 sistemi başarıyla uygulanan helmintler; serbest yaşayan nematodlardan *Caenorhabditis elegans*<sup>(5)</sup>, *Pristionchus pacificus*<sup>(6)</sup>, *Auanema rhodensis* ve *A. freiburgensis*<sup>(7)</sup>, parazitik nematodlardan *Strongyloides stercoralis*, *Brugia malayi* ve *Strongyloides ratt*<sup>(8-10)</sup>, parazitik trematodlardan ise *Opisthorchis viverrini* ve *Schistosoma mansoni*<sup>(11-14)</sup> olarak sıralanabilir.

Literatürde, *S. stercoralis* üzerinde CRISPR/Cas teknolojisi uygulanarak gerçekleştirilen tek bir çalışma bulunmaktadır<sup>(8)</sup>. Bu çalışmada, hareket ile ilişkili gen unc-22 hedeflenmiş olup, bu gen memelilerde çizgili kaslarda kasılmayı sağlayan titin proteinine homolog bir protein kodlamaktadır. Serbest yaşayan erişkin dişiler, kalıp DNA ile birlikte Cas9 ve rehber RNA (sgRNA) kodlayan plazmid ile gonodal olarak mikroenjeksiyon yoluyla transfeke edilmiştir. Mutant bireyler ile wild-type (WT) parazitlerin yüzme mesafesi ve ortalama hızları karşılaştırıldığında, mutant parazitlerin hareket kapasitesinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Ayrıca, yapılan genetik manipülasyonun parazitlerin konak pasajı sonrası diğer nesillerde de devam ettiği gösterilmiştir<sup>(8)</sup>. Trematodlarda yapılan çalışmalara O. viverrini ile yapılan çalışma öncülük etmektedir<sup>(11)</sup>. Hedeflenen gen Ov-grn-1 (granülün büyüme faktörü) olarak belirlenmiş ve elektroporasyon yoluyla transfeke edilen nakavt/knockout O. viverrini erişkin solucanları elde edilmiştir. Nakavt/knockout O. viverrini parazitleri ile enfekte edilen farelerde, WT parazitlerle enfekte edilmiş farelere göre daha ha-

fif semptomlar görülmüştür. Ayrıca, granülün üretemeyen parazitli hayvanların karaciğerinde kanserle ilişkili daha az değişiklik olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular ile granülünün enfeksiyonun ilerlemesi ve kanser gelişimini indüklemeye rolü olduğu doğrulanmıştır<sup>(11)</sup>. Trematodlarda yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak *S. mansoni* üzerinde gerçekleştirilmiştir. Şistozomiyaz, insanlarda morbidite ve mortalite açısından en virulan helmint enfeksiyonlarından biridir. CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak yapılan ilk çalışma, *S. mansoni* yumurtalarında omega-1 ribonükleazı ( $\omega 1$ ) kodlayan geni hedefleyerek gerçekleştirilmiştir<sup>(12)</sup>. Bu enzim, immün yanıtın Th2 yönünde gelişmesini ve granülom oluşumu indüklemekte ve sonucunda şiddetli doku hasarı ve hepatointestinal şistozomiyaz kliniğine yol açmaktadır. Enfekte fare karaciğerinden izole edilen *S. mansoni* yumurtaları, sgRNA ve Cas9 ile kalıp DNA sağlanarak ve sağlanmayarak lentivirüs ile hücrelere ayrı ayrı verilmiştir.  $\omega 1$  geni düzenlenmiş yumurtalar ile enfekte fareler, WT yumurtalarla enfekte edilenlere kıyasla önemli ölçüde azalmış patoloji sergilemiştir. Programlanan mutagenез sonucu,  $\omega 1$  mutant yumurtalarda, Th2 sitokin yanıtını oluşturma ve in vivo pulmoner granülom oluşumunu tetikleme kapasitesinde azalma tespit edilmiştir. Fonksiyon kaybı yaşamalarına rağmen yumurtaların canlı kalması ise kritik önem taşımaktadır. Çalışma ilk defa, CRISPR/Cas9 kullanılarak Schistosoma'da işlevsel genom tekniklerinin uygulanabilirliğini göstermiştir<sup>(12)</sup>. Yapılan bir diğer çalışmada, asetilkolinesterazı kodlayan gen (AChE) hedeflenerek *S. mansoni* yumurtaları CRISPR/Cas9 tekniği ile manipüle edilmiştir. Manipüle edilmiş yumurtalarda gözlenen azalmış AChE aktivitesi, bu yumurtalar ile enfekte edilen farelerde akciğer sirkumoral granülom boyutunun da azalmasıyla sonuçlanmıştır. Bu çalışmayla CRISPR/Cas9 genom düzenleme sisteminin, yeni anti-helmintik müdahale hedeflerini belirleme ve test etme açısından önemli bir platform sağladığı görülmektedir<sup>(13)</sup>. Güncel bir çalışmada ise CRISPR/Cas9 yöntemiyle, *S. mansoni*'de ilaç direnciyle ilişkili SULT-OR geni hedeflenerek nakavt/knockout bireyler elde edilmiştir<sup>(14)</sup>. Erişkin solucanlara, sporokistlere ve yumurtalara elektroporasyon yöntemiyle Cas9/sgRNA kompleksi verilerek, farklı yaşam formlarında değişken gen mutasyon verimliliği olduğu belirlenmiştir. SULT-OR modifikasyon etkinlikleri; erişkin solucanlarda %0,3 -%2, sporokistlerde % 0,1 -%0,2 aralıklarında iken yumurtalarda hiçbir mutagenез aracı değişikliği tespit edilmemiştir. Bu durum farklı genler için kullanılan farklı protokollerin ( $\omega 1$ , AChE ve SULT-OR vb.) değişken CRISPR/Cas9 düzenleme verimliliğiyle sonuçlanabileceği şeklinde yorumlanmıştır<sup>(14)</sup>.

Sonuç olarak, CRISPR/Cas9 sisteminin parazitik helmintlere başarılı bir şekilde uyarlanmış olması, bu solucanların neden olduğu hastalıkları önlemek ve biyolojilerini derinlemesine çalışarak, yeni ilaç hedeflerini veya aşı adaylarını belirlemek için CRISPR/Cas9 sisteminin güçlü bir genetik araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Helminth, CRISPR/Cas9, *Schistosoma mansoni*

#### Kaynaklar

1. Hotez P, Aksoy S. PLOS Neglected tropical diseases: Ten years of progress in neglected tropical disease control and elimination. More or less. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(4):e0005355. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005355>
2. Moguel B, Bobes RJ, Carrero JC, Laclette JP. Transfection of platyhelminthes. Biomed Res Int. 2015;2015:206161. <https://doi.org/10.1155/2015/206161>
3. Du X, McManus DP, French JD, Jones MK, You H. CRISPR/Cas9: A new tool for the study and control of helminth parasites. Bioessays. 2020:e2000185. <https://doi.org/10.1002/bies.202000185>
4. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 2014;157(6):1262-78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
5. Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiácovo MP, Church GM, Calarco JA. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. Nat Methods. 2013;10(8):741-9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2532>
6. Nakayama KI, Ishita Y, Chihara T, Okumura M. Screening for CRISPR/Cas9-induced mutations using a co-injection marker in the nematode *Pristionchus pacificus*. Dev Genes Evol. 2020;230(3):257-64. <https://doi.org/10.1007/s00427-020-00651-y>
7. Adams S, Pathak P, Shao H, Lok JB, Pires-da Silva A. Liposome-based transfection enhances RNAi and CRISPR-mediated mutagenesis in non-model nematode systems. Sci Rep. 2019;9(1):483. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37036-1>
8. Gang SS, Castelletto ML, Bryant AS et al. Targeted mutagenesis in a human parasitic nematode. PLoS Pathog. 2017;13(10):e1006675. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006675>
9. Bryant AS, Ruiz F, Gang SS, Castelletto ML, Lopez JB, Hallem EA. A critical role for thermosensation in host seeking by skin-penetrating nematodes. Curr Biol. 2018;28(14):2338-47. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.063>
10. Liu C, Grote A, Ghedin E, Unnasch TR. CRISPR mediated transfection of *Brugia malayi*. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(8):e0008627. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008627>
11. Arunsan P, Ittiprasert W, Smout MJ, et al. Programmed knockout mutation of liver fluke granulin attenuates virulence of infection-induced hepatobiliary morbidity. Elife. 2019;8:e41463. <https://doi.org/10.7554/eLife.41463>
12. Ittiprasert W, Mann VH, Karinshak SE, et al. Programmed genome editing of the omega-1 ribonuclease of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*. Elife. 2019;8:e41337. <https://doi.org/10.7554/eLife.41337>
13. You H, Mayer JU, Johnston RL, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *Schistosoma mansoni* acetylcholinesterase. bioRxiv. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.07.08.190694>
14. Sankaranarayanan G, Coghlan A, Driguez P, et al. Large CRISPR-Cas-induced deletions in the oxamniquine resistance locus of the human parasite *Schistosoma mansoni*. Wellcome Open Res. 2020;5:178. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16031.1>

# Sendrom Temelli Hızlı Nükleik Asit Testlerinin Mikrobiyolojik Tanı Laboratuvarında Akılcı Kullanımı

Melda Özdamar

Anadolu Sağlık Merkezi, Kocaeli

✉ melda.ozdamar@anadolusaglik.org

Klinisyenlerin ihtiyacı olan, hızlı ve doğru tanıda beklenmeyen etkenlerin tespiti ve etkili tedavi seçimi çok önemlidir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarının antibiyotik yönetim ekibi'ne (AMS) katkısı ile morbidite ve mortalitenin azaltılması ve artmış hasta memnuniyeti sağlamak temel hedeflerimizdendir.

Sağlık kurumlarının öncelik ve beklentileri ise daha iyi test yönetimi ile hasta odaklı ve kaliteli hizmet verebilmek, azalmış hasta yatış süresi, akılcı antibiyotik yönetimi ve enfeksiyon kontrolü olmaktadır. Daha iyi ve etkin test yönetimi ile ilaç direnci artışını düşürmeye yönelik eylemlere katkı artmaktadır.

Bu döngüde mikrobiyoloji laboratuvarlarının ihtiyaçları ise; hızlı ve kapsamlı sonuçlar geliştirilmiş iş akışı ile, laboratuvara güvenin yüksek olduğu, maliyet etkin, yüksek duyarlılıkta ve özgüllükte testlerin kullanılabilmesidir. Geniş test menüsü ve yöntem ve tekniklerin kolay kullanılması arzu edilen hedeflerdir.

Bu amaçlarla sendrom temelli hızlı nükleik asit testleri mikrobiyolojik tanı laboratuvarında hızla yer almaktadır. Sendromik test zamanında, kapsamlı ve hızlı testler olabilmek özelliğini içermelidir. Sendrom, birbirleriyle ve sıklıkla belirli bir hastalık ile ilişkili olan semptom ve belirti dizisidir. Belirti ve bulgular genellikle özgül olmamasına rağmen, çoğunlukla bunların bileşimi ile teşhisleri ortaya konulur. Sendromik panel testler, 2011 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı alarak kısa zamanda klinik laboratuvarlarımızda devrim yarattı. Klinik olarak önemli bir zaman diliminde, tanı konulması zor ve bir semptomu sebep olan muhtemel patojenlerden etken olanların hızla saptayan geniş bir test grubudur. Özel hasta gruplarında ve klinik tablolarda kullanım kolaylığı olabilen testlerdir.

Sendromik testlerde, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisi ile hedeflenen nükleik asitler izole edilir, çoğaltılır ve tespit edilir. Kapsamlı, hızlı, yüksek özgüllük ve duyarlılıkta, kolay kullanılabilir ve erişilebilir kapalı sistemlerdir. En yüksek olasılıkla doğru teşhis için özel hasta gruplarına yönelik çözüm odaklı panel testler hazırlanmıştır. Bu testlerin en önemli farkı da 7/24 yüksek duyarlılıkta testler olarak çalışmasıdır.

Geleneksel mikrobiyolojik tanı yöntemleri, testler arasında seçim yapılmasına neden olur. Özellikle kültürde üretilmeyen, geç ya da güç üretilen ve diğer konvansiyonel tanı yöntemleriyle saptanması zor olan mikroorganizmalara

rın hızlı tespiti sendrom temelli hızlı nükleik asit testleri ile sağlanabilmektedir. Entegre sistemlerle çeşitli bakteri, virüs, maya ve parazitler yanında antimikrobiyal direnç genlerinin eş zamanlı tespiti sağlayan paneller mevcuttur.

## Sendrom Temelli Hızlı Nükleik Asit Test Panelleri

Önemli sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilmiş çeşitli patojenler için sendromik yaklaşımla çeşitli çalışma panelleri oluşturulmuştur. En sık kullanılanlar; solunum panelleri, alt solunum yolu enfeksiyonları panelleri, menenjit/ensefalit panelleri, gastrointestinal paneller, kan kültürü tanımlama panelleridir. Bu panellerde 14-30 gibi değişen sayıda farklı etken tanımlanabilmekte ve ek olarak bazılarında ise çeşitli antimikrobiyal direnç genleri de test kapsamındadır.

Daha az oranda kullanılan; cinsel yolla bulaşan hastalıklar paneli, ateş ile seyreden döküntülü çocuk hastalıkları paneli, göz enfeksiyonları paneli, bağışıklık sistemi baskılanmış hasta enfeksiyonları paneli, tropikal hastalıklar ve hepatit panelleri sayılabilir. Testlerin çalışma süreleri yaklaşık 60-130 dakikadır.

## Gastrointestinal Enfeksiyon Panelleri

Akut gastroenterit, son 14 gün içinde başlayan gün içinde üç veya daha fazla yumuşak, sulu veya kanlı dışkılama ile tanımlanan bir hastalıktır. CDC FoodNet 2019 yılı ön raporuna göre Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda kaynaklı enfeksiyonlar nedeniyle 25,866 vakanın 6164 tanesinde hastaneye yatış ve 122 tanesinde ölüm gerçekleştiği bildirilmiştir<sup>(1)</sup>. Genellikle kendini sınırlayan hastalıklardır ancak bulantı, kusma, karın ağrısı, tenesmus, ateş ile kendini gösteren, dehidratasyon ve sepsise kadar gidebilen klinik tablolara da yol açabilir. İnflamatuvar etkenlerin yanı sıra kimyasal ve toksik maddeler de benzer tabloya neden olabilir. Bu olgulara sendromik yaklaşım ve tanının algoritmalar ile yönetilmesi önemlidir<sup>(2)</sup>.

Standart dışı örneği alınmasındaki zorluklar ve örnek transferi, saklanması için özel koşulların gerekliliği, olası etkenler için farklı test ve farklı kültür işlemlerinin istem dahilinde gerekliliği sebebi ile akut gastroenterit epizodlarının %80'inde patojen tanımlanmamıştır<sup>(3)</sup>. Tablo 1'de özetlendiği üzere etkenler farklı mikroorganizma grupları olarak oldukça fazla sayıdadır<sup>(4)</sup>.

Semptomlar benzerdir ancak etkene yönelik özgül değildir. Akut gastroenteritte sadece öykü ve klinik özelliklerle



Tablo 1. Gastroenterit etkenleri.

| Bakteri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Virüs                                                                                                                                                                                                                     | Parazit                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Salmonella</i> spp.</li><li>• <i>Shigella</i> spp.</li><li>• <i>Campylobacter</i> spp.</li><li>• ETEC, EPEC, EIEC, EHEC, EAEC, <i>Enterobacteriaceae</i> <i>E. coli</i></li><li>• <i>Clostridium difficile</i></li><li>• <i>Vibrio cholerae</i></li><li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li><li>• <i>Bacillus cereus</i></li><li>• <i>Clostridium perfringens</i></li><li>• <i>Yersinia enterocolitica</i></li><li>• <i>Plesiomonas shigelloides</i></li><li>• <i>Visrio parahaemolyticus</i></li><li>• <i>Aeromonas</i> spp.</li><li>• <i>Edwardsiella tarda</i></li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Rotavirus</li><li>• Calicivirus (Norovirus, Sapovirus)</li><li>• Adenovirus</li><li>• Astrovirus</li><li>• Togavirus</li><li>• Picobirnavirus</li><li>• Sitomegalovirus</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Entamoeba histolytica</i></li><li>• <i>Giardia intestinalis</i></li><li>• <i>Cryptosporidium</i> spp.</li><li>• <i>Cyclospora cayetanensis</i></li><li>• <i>Isospora belli</i></li><li>• <i>Balantidium coli</i></li><li>• <i>Enterocytozoon bienersi</i></li><li>• <i>Encephalitozoon</i> spp.</li><li>• <i>Ascaris lumbricoides</i></li><li>• <i>Enterobius vermicularis</i></li><li>• <i>Ancylostoma duodenale</i></li><li>• <i>Necator americanus</i></li><li>• <i>Strongyloides stercoralis</i></li><li>• <i>Trichuris trichiura</i></li><li>• <i>Hymenolepis nana</i> ve <i>Hymenolepis diminuta</i></li><li>• <i>Toenia solium</i> ve <i>Tenia saginata</i></li><li>• <i>Diphyllobothrium latum</i></li><li>• <i>Fasciolopsis buski</i></li><li>• <i>Metagonimus yokogawai</i></li><li>• <i>Heterophyes heterophyes</i></li></ul> |

etkenlerin bilinmesi her zaman mümkün olmadığından tanı laboratuvar testlerine ihtiyaç vardır. Bakteriyel, viral ve paraziter etkenlerin moleküler yöntemlerle tespit edilmesi deneyiminin paylaşılması ve etkenlerin epidemiyoloji ile ilgili güncel veri elde edilmesi, salgınlar ve bağışıklığı baskılanmış özel hastalar gibi olgu gruplarında oldukça önemlidir.

Bu amaçla geliştirilmiş, farklı firmalarda farklı paneller oluşturulmuştur. Tablo 2’de örnek verilmiştir<sup>(5)</sup>.

Sendromik panel testler ile birden fazla etken saptanması durumunda ko-enfeksiyonların önemini anlamak zor olabilir. Çalışmalarda değişen oranlarda (%17.9-30) ko-enfeksiyon bildirilmiştir<sup>(6-8)</sup>. Bu yaklaşımla avantajlar yanında bazı dezavantajlardan da bahsedilebilir. Bir çok ishal etkeni asemptomatik olarak veya semptomlar geçtikten sonra da uzun süreler dışkıda saptanabilir. Yalancı pozitiflik mi, kolonizasyon mu veya canlı mikroorganizma mı olduğunun değerlendirilmesi için diğer bulgu ve laboratuvar testlerine başvurulması uygundur. Örnek olarak çocuklarda Norovirus ve *Salmonella* spp. enfeksiyonları gibi. Kültür veya monopleks PCR ile doğrulanması gerekebilir. *Cryptosporidium parvum* veya *Giardia lamblia* asemptomatik enfeksiyonu nadirdir. *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis* ve *Isospora belli* için modifiye asit-fast boyama, DFA tercih edilir ama laboratuvarların deneyimi burada önem kazanır. İnflamatuvar bağırsak hastalığı olduğu bilinen bir hastanın dışkısında *E. histolytica* saptanması önemlidir, sendromik moleküler testlerde yalancı pozitiflik bildiren yayınlar vardır<sup>(9)</sup>. Modifiye trikrom boyama ise her laboratuvar rutin uygulanmamaktadır. Bağırsak biyopsi örneklerinde *E. histolytica* açısından moleküler testlerden faydalanılabilir. Bazı panellerde olmayan etkenler de ishale yol açabilir, mesela *Aeromonas* spp, *Dientamoeba fragilis* gibi. Çoğu panelde bu etkenler yoktur.

*Clostridioides difficile* tanısında nükleik asit amplifikasyon

testleri sadece akut hastalık evresinde kullanılmalıdır. Erişkinlerde nadiren normal florada bulunur ama yenidoğanların yaklaşık %50’sinde ilk aylarda ve 2 yaşına kadar kolonizasyon görülebilir. Ek örnek ve ek test gerekebilir.

Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) Kılavuzu’nda (2017) akut enfeksiyöz gastroenterit tanısı ve yönetimi için hızlı moleküler test panellerini hastalık tanısından çok, halk sağlığı alanında salgınların tespit edilmesi için tanımlandığı belirtilmiştir. Bu testlerin klinik kullanımı ile ilgili gelişmiş algoritmalar henüz bulunmamakla birlikte, antimikrobiyal yönetim programlarına katkıları ve yerleri bir çok farklı ülkeden yapılan çalışmalar ile kılavuzlarda tanımlanmaya başlanmış ve yayınlarla paylaşılmaktadır. Sürveyans açısından antibiyotik duyarlılık sonucu değerlendirilmesi için kültür yapılmaya devam edilmektedir.

Özet olarak gastrointestinal enfeksiyon panelleri; epidemiyolojik veriler ile ampirik antibiyotik kullanımına ve antibiyotik yönetim ekiplerine yol gösterici olmaktadır. Etkenlere yönelik belki “refleks kültür testi” (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. ve *Escherichia coli* O157:H7) düşünülebilir. Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanı konsultasyonu “sözlü ve/veya yazılı” gerçekleştirmemiz gereken hedeflerimiz arasında olmalıdır. Basamaklı veya maskelemeli sendromik testlerin oluşturulması ve raporlanması uygulanabilir. Rölatif olarak pahalı testler için sağlık merkezlerine özgü algoritmalar oluşuyor ve devamı gelmesi gerektiği izlenmektedir.

#### Sepsis Panelleri

Sepsis tanısında FDA onaylı kullanılabilecek testler bulunmaktadır. BioFire FilmArray BCID Panel, GenMark ePlex BCID-GP ve GN ve FP Panel, Luminex Verigene Gram Pozitif- Negatif Blood Culture Test (BC-GP), Accelerate Pheno (fenotipik duyarlılık testi çalışıyor) gibi ticari hazır paneller aşağıdaki şekilde Tablo 3 örnek verilebilir<sup>(10)</sup>.



**Tablo 2. FDA onaylı multipleks gastrointestinal paneller.**

| Parametre                                         | Verigene EP                  | Luminex GPP                                  | BioFire GIP                           |
|---------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------|
| Analiz platformu                                  | Verigene system              | Magpix veya Luminex 100/200 system           | FilmArray system veya FilmArray Torch |
| Uygun örnek tipi                                  | Cary-Blair besiyerinde dışkı | Taze dışkı veya Cary-Blair besiyerinde dışkı | Cary-Blair besiyerinde dışkı          |
| Hedef sayısı                                      | 9                            | 14                                           | 22                                    |
| Etkin patojenler                                  |                              |                                              |                                       |
| <b>Bakteri</b>                                    |                              |                                              |                                       |
| <i>Campylobacter</i> spp.                         | ✓                            | ✓                                            | ✓                                     |
| <i>Salmonella</i> spp.                            | ✓                            | ✓                                            | ✓                                     |
| <i>Shigella</i> spp./enteroinvasif <i>E. coli</i> | ✓                            | ✓                                            | ✓                                     |
| <i>Vibrio</i> spp.                                | ✓                            |                                              | ✓                                     |
| <i>Vibrio cholerae</i>                            |                              | ✓                                            | ✓                                     |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>                    | ✓                            |                                              | ✓                                     |
| <i>Escherichia coli</i> O157                      |                              | ✓                                            | ✓                                     |
| Enterotoksijenik <i>E. coli</i>                   |                              | ✓                                            | ✓                                     |
| Enteropatogenik <i>E. coli</i>                    |                              |                                              | ✓                                     |
| Enterogagregatif <i>E. coli</i>                   |                              |                                              | ✓                                     |
| <i>Plesiomonas shigelloides</i>                   |                              |                                              | ✓                                     |
| Shiga toksin üreten <i>E. coli</i> (stx1-stx2)    | ✓                            | ✓                                            | ✓                                     |
| <i>Clostridiodes difficile</i> (toxin A/B)        |                              | ✓                                            | ✓                                     |
| <b>Virüsler</b>                                   | ✓                            |                                              | ✓                                     |
| Norovirus GI/GII                                  | ✓                            | ✓                                            | ✓                                     |
| Rotavirus A                                       |                              | ✓                                            | ✓                                     |
| Astrovirus                                        |                              |                                              | ✓                                     |
| Adenovirus 40/41                                  |                              | ✓                                            | ✓                                     |
| Sapovirus                                         |                              |                                              |                                       |
| <b>Parazitler</b>                                 |                              |                                              |                                       |
| <i>Cryptosporidium</i> türleri                    |                              | ✓                                            | ✓                                     |
| <i>Entamoeba histolytica</i>                      |                              | ✓                                            | ✓                                     |
| <i>Giardia lamblia</i>                            |                              | ✓                                            | ✓                                     |
| <i>Cyclospora cayetanensis</i>                    | 1-32                         |                                              | ✓                                     |
| Örnek kapasitesi                                  | <2                           | 24                                           | 1-12                                  |
| Sonuç süresi (saat)                               |                              | ~5                                           | ~1                                    |

Accelerate PhenoTest BC dışında bu sistemler ile henüz antibiyotik duyarlılık sonucu alınamadığı için konvansiyonel kan kültürlerinin yerini almıyorlar aslında, hızlı bir tamamlayıcı test olarak kullanılabilirler. Sendromik paneller ile tedavi gerektirmeyen etkenler de saptanabileceği biliniyor. Ayrıca sadece panelde bulunan direnç genleri tespiti özellikle gram negatifler bakteriler için kısıtlı kalmakta, farklı direnç mekanizmalarının tespiti için üreyen bakterilerin ileri araştırmalar için de önemini korumaktadır. Canlı olmayan, DNA tespitine bağlı olabilen hatalı pozitiflik *Proteus* spp ve *Escherichia coli* bakterileri için bildirilmiştir<sup>(10)</sup>.

Ülkemizde olduğu gibi sağlık sigortası sistemlerinin hepsinde tam bir geri ödeme mümkün olmuyor. Kan kültürü için pahalı sistemler ancak pozitif sinyal veren seçilmiş kritik hastalarda göz ardı edilebilecek uzun vadede faydalarının ortaya konmasına ihtiyaç olduğu biliniyor<sup>(11)</sup>. Sepsis panelleri kullanımının en olumlu etkisinin ampirik tedaviye yanıt vermeyecek çoklu ilaca dirençli gram negatif bakteriler veya VRE enfeksiyonu gibi hızlı ve etkin tedavi gerektiren olgularda olduğu bildirilmiştir<sup>(10)</sup>. Antibiyotik

tedavisinin hızla eskalasyonu ile birlikte mortalite, hastanede yatış süresi ve maliyeti azaltığını gösteren çalışmalar mevcuttur<sup>(12)</sup>.

Tablo 3'te belirtilen sistemlerde kan kültürü pozitif sinyal verdikten sonra bu testler çalışılmaktadır. T2 Biosistemleri (Lexington, MA) ise, T2Candida and T2 Bacteria panelleri ile direkt kandan etkenleri saptamaktadır, ama geliştirilmesi gerekiyor. "Microbial cell-free DNA test"lerin şimdilik hasta yönetimine katkısı çok az ancak yakın bir zamanda teknolojinin hızla gelişmesi ile değişebilmesi olasıdır.

Sepsis panellerinin kullanımında hangi hastalar test edilmeli, hangi endikasyonlar ile ne sıklıkta yapılmalı sorularının cevabını veren kılavuz ve standart algoritmalar henüz bulunmamaktadır. Pozitif kan kültürü şişelerinden çalışılması ve alınacak kan miktarının ticari firma setlerinde farklı olması gibi sebeplerle verilerin birikmesi ve metaanalizlerin hazırlanmasına ihtiyaç vardır. Antimikrobiyal yönetim ekibi ile birlikte, çok sıkı iletişim ile sepsis yönetiminde bu testlerin kullanımına karar verilmelidir.

Tablo 3. FDA onaylı multipleks PCR kan kültürü panelleri örnekleri.

| Testler                             | Sonuç zamanı | İşlem hacmi                                                              | Hedef etkenler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Antimikrobiyal direnç                                                                     |
|-------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BioFire FilmArray BCID Panel</b> | 1 saat       | 1 test modülü<br>instrument (v2.0)<br>2-12 test modülü<br>(Torch cihazı) | Bakteri<br><i>Enterococcus</i> spp.<br><i>Listeria monocytogenes</i><br><i>Staphylococcus</i> spp.<br><i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Streptococcus</i> spp.<br><i>Streptococcus agalactiae</i><br><i>Streptococcus pyogenes</i><br><i>Streptococcus pneumoniae</i><br><i>Acinetobacter baumannii</i><br><i>Haemophilus influenzae</i><br><i>Neisseria meningitidis</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Enterobacteriaceae</i><br><i>Enterobacter cloacae</i> complex<br><i>Escherichia coli</i><br><i>Klebsiella oxytoca</i><br><i>Klebsiella pneumoniae</i><br><i>Proteus</i> spp.<br><i>Serratia marcescens</i><br>Mantar<br><i>Candida albicans</i><br><i>Candida glabrata</i><br><i>Candida krusei</i><br><i>Candida parapsilosis</i><br><i>Candida tropicalis</i> | MRSA<br><br>mecA<br>Vankomisin direnci<br><br>vanA<br>vanB<br>Karbapenemaz direnci<br>KPC |
| <b>GenMark ePlex BCID-GP Panel</b>  | 1.5 saat     | 3-24 test modülü                                                         | Bakteri<br><i>Bacillus cereus</i> group<br><i>Bacillus subtilis</i> group<br><i>Corynebacterium</i><br><i>Cutibacterium acnes</i> ( <i>Propionibacterium acnes</i> )<br><i>Enterococcus</i> spp.<br><i>Enterococcus faecalis</i><br><i>Enterococcus faecium</i><br><i>Lactobacillus</i> spp.<br><i>Listeria</i> spp.<br><i>L. monocytogenes</i><br><i>Micrococcus</i><br><i>Staphylococcus</i> spp.<br><i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Staphylococcus epidermidis</i><br><i>Staphylococcus lugdunensis</i><br><i>Streptococcus</i> spp.<br><i>Streptococcus agalactiae</i><br><i>Streptococcus anginosus</i> group<br><i>Streptococcus pneumoniae</i>                                                                                                                          | MRSA<br><br>mecA<br>VRE<br><br>vanA<br>vanB                                               |

Tablo 3. (devam)

|                                                           |                                                                                  |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                            |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| GenMark ePlex BCID-FP Panel                               | 1.5 saat                                                                         | 3–24 test modüllü                                       | <p><i>Streptococcus pyogenes</i></p> <p>Diğerleri</p> <p>Pan gram-negative</p> <p>Pan <i>Candida</i></p> <p>Mantar</p> <p><i>Candida albicans</i></p> <p><i>Candida auris</i></p> <p><i>Candida dubliniensis</i></p> <p><i>Candida famata</i></p> <p><i>Candida glabrata</i></p> <p><i>Candida guilliermondii</i></p> <p><i>Candida kefyr</i></p> <p><i>Candida krusei</i></p> <p><i>Candida lusitanae</i></p> <p><i>Candida parapsilosis</i></p> <p><i>Candida tropicalis</i></p> <p><i>Cryptococcus gattii</i></p> <p><i>Cryptococcus neoformans</i></p> <p><i>Fusarium</i></p> <p><i>Rhodotorula</i></p> | —                                                          |
| Luminex Verigene Gram-Positive Blood Culture Test (BC-GP) | 2 saat                                                                           | <p>1 test modülü (v1.0)</p> <p>6 test modülü (v2.0)</p> | <p>Bakteri</p> <p><i>S aureus</i></p> <p><i>Staphylococcus epidermidis</i></p> <p><i>Staphylococcus lugdunensis</i></p> <p><i>S agalactiae</i></p> <p><i>S pneumoniae</i></p> <p><i>S pyogenes</i></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <p>MRSA</p> <p>mecA</p> <p>VRE</p> <p>vanA</p> <p>vanB</p> |
| Accelerate Pheno                                          | <p>2 saat tanımlama</p> <p>7 saat fenotipik</p> <p>Antimikrobiyal duyarlılık</p> | 1 test                                                  | <p>Bakteri</p> <p><i>E faecium</i></p> <p><i>E faecalis</i></p> <p>Koagülaz-negatif</p> <p><i>Staphylococcus</i> spp.</p> <p><i>S aureus</i></p> <p><i>S lugdunensis</i></p> <p><i>Streptococcus</i> spp.</p> <p><i>E coli</i></p> <p><i>Klebsiella</i> spp.</p> <p><i>Enterobacter</i> spp.</p> <p><i>Proteus</i> spp.</p> <p><i>Citrobacter</i> spp.</p> <p><i>S marcescens</i></p> <p><i>P aeruginosa</i></p> <p><i>A baumannii</i></p> <p>Mantar</p> <p><i>C albicans</i></p> <p><i>C glabrata</i></p>                                                                                                  | Fenotipik duyarlılık sonuçları                             |

## Menenjit ve Ensefalit Panelleri

Menenjit ve ensefalit tanısında sendrom temelli hızlı nükleik asit testleri, uygun merkezlerde ve uygun hasta gruplarında klinik bulgularla birlikte değerlendirilerek kullanımı için güçlü testlerdir. Ancak sendromik testlerin sadece pozitif veya negatif sonuçlarına göre bir mikroorganizmanın etken ya da etken olmadığını düşünmenin doğru olmadığını göz ardı etmemelidir.

Direkt mikroskopik inceleme yöntemlerinden çini mürekkebi, gram boyama, aside dirençli boyama, hücre sayımı yöntemleri, konvansiyonel kültür yöntemleri, BOS biyokimyasal analizi ve/veya pnömokok ve kriptokok antijen testlerinin yerine göre önemi tanıda kullandığımız testlerdir. Bazı etkenlerde monopleks PCR testlerinin yeri hala önemini korumaktadır.

Vetter ve ark.'nın İsviçre'de yaptıkları çalışmada yerel algoritmaların etkin ve faydalı olabileceğini bildirdikleri gibi hastanın klinik bilgisi sendromik test yaklaşımında son derece önemlidir<sup>(13)</sup>. Hastanın yenidoğan, erişkin veya ileri yaşta olması, bağışıklık sistemini baskılayan tedavi alması, nötropenik durumu, AIDS hastalığı varlığı, döküntü, ciltte peteşi/purpura lezyonlarının (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae*) bulunmasına göre hızlı NAAT testlerinin kullanımı değerlendirilmelidir.

Bu amaçla Biofire Film Array menenjit-ensefalit (FA-ME) paneli 2015'ten beri FDA onaylı en yaygın kullanılan ticari panellerdir. Jennifer Dien Bard ve ark.'nın hazırladığı yayında bu testlerin en belirgin katkısının herpes simplex virus (HSV) test sonuçlanma zamanının hızlanması ile azalmış asiklovir kullanımı olduğunu bildirdiler<sup>(10)</sup>. Enterovirus veya parechovirus gibi etkenlerle aseptik menenjit tanısı konusunda antibiyotik kullanımının azalması ve olası hastaneye kabul ihtiyacını ortadan kaldırması, yatış gerektiren hastalarda da hastanede yatış süresini kısalttığı ve dolaylı maliyet azalması sağlaması da diğer olumlu etkiler olarak bildirildi. Sendromik panel ile HSV-1 negatif olgularda, monopleks doğrulama önerilmektedir. Kronik kriptokokkal menenjitde antifungal tedaviye bağlı olarak yalancı negatiflik etkenine yönelik olası bir dezavantajdır.

Human herpes virus 6 (HHV-6) pozitif saptanan hastalarda reaktivasyonu mu, kromozoma entegre HHV-6'yı mı veya gerçek HHV-6 enfeksiyonu mu olduğunu doğrulanması kolay değildir. Kanda kantitatif test olarak çalışan dijital PCR sistemleri her yerde ulaşılabilir olmasa da tekrarlayan örnekte test edilmesi; klinik, radyolojik bulgular ve biyokimyasal analizlere göre değerlendirmeye ihtiyaç vardır. FA-ME panelinin ventriküloperitoneal şant enfeksiyonlarında kullanımı kısıtlıdır, lomber ponksiyon ile alınan örneklerden çalışılması önerilmektedir.

Yukarıda kısaca en sık kullanılan panellere örnekler veremeye çalıştığım sendrom temelli hızlı nükleik asit testlerinin mikrobiyolojik tanı laboratuvarında akılcı kullanımı kaçınılmazdır. Her bir sendrom için ortak yerel algoritmalar oluşması yakındır ve muhtemeldir. Testler hangi hasta grubuna, nasıl çalışılacak yerel olarak belirlenmeli, herkese ve her zaman uygulanmamalıdır. Maliyet etkinlik değerlendirilmesi hastane yönetimi ve enfeksiyon hastalıkları kurulları ile birlikte yapılmalı; hastaların yararı göz ardı edilmeden has-

ta odaklı bakım hizmeti çerçevesinde kullanılmalıdır. Hızlı teknolojik gelişmeler ile ticari firmaların sağlık sistemlerine yanıtları da hızlı olacaktır. Testler basamaklandırılarak istenebilmeli ve tüm bu gelişmeler ile maliyetin de azalacağı düşünülmektedir.

Hasta yönetim algoritmalarında hedefli test yapma planlanmalı ve test istek endikasyonlarının belirlenmesi çok önemlidir. Bu testlerin yönetimi, akılcı kullanımı, klinisyenlere test isteminde ve sonuçları yorumlamada danışmanlık verilmesi veya gerektiğinde raporların yorumlu çıkarılması klinik mikrobiyologların hedefleri arasında olmalıdır. Bu testler kaliteli ve verimli klinisyen-klinik mikrobiyolog iletişimi ile kullanıldığında, antimikrobiyal yönetim programlarında hedeflenen "dolaylı" kazanım ortaya çıkmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** sendromik test, hızlı nükleik asit testleri (NAAT), mikrobiyolojik tanı

## Kaynaklar

1. Tack DM, Marder EP, Griffin PM, et al. Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US Sites, 2015–2018. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2019;68(16):465. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6820a5>
2. Flint JA, Van Duynhoven YT, Angulo FJ, et al. Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: An International review. Clin Infect Dis. 2005;41(5):698-704. <https://doi.org/10.1086/432064>
3. Scallan E, Griffin PM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States – unspecified agents. Emerg Infect Dis. 2011;17(1):16-22. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
4. KLİMUD. Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları İçin Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi, Gastrointestinal Sistem Örnekleri. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği Kaynak No: 12, Kasım 2017, Ankara.
5. Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, Pritt BS, Patel R. Syndromic panel-based testing in clinical microbiology. Clin Microbiol Rev. 2017;31(1):e00024-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-17>
6. Buss SN, Leber A, Chapin K, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. J Clin Microbiol. 2015;53(3):915-25. <https://doi.org/10.1128/JCM.02674-14>
7. Andersson M, Kabayiza JC, Elfving K, et al. Coinfection with enteric pathogens in East African children with acute gastroenteritis - Associations and interpretations. Am J Trop Med Hyg. 2018;98(6):1566-70. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0473>
8. Valentini D, Vittucci AC, Grandin A, et al. Coinfection in acute gastroenteritis predicts a more severe clinical course in children. Coinfection in acute gastroenteritis predicts a more severe clinical course in children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013;32(7):909-15. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1825-9>
9. Mhaissen MN, Rodriguez A, Gu Z, et al. Epidemiology of diarrheal illness in pediatric oncology patients. J Pediatric Infect Dis Soc. 2017;6(3):275-80. <https://doi.org/10.1093/jpids/piw050>
10. Dien Bard J, McElvania E. Panels and syndromic testing in clinical microbiology. Clin Lab Med. 2020;40(4):393-420. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2020.08.001>
11. She RC, Bender JM. Advances in rapid molecular blood culture

- diagnostics: healthcare impact, laboratory implications, and multiplex technologies. *J Appl Lab Med*. 2019;3(4):617-30. <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.027409>
12. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(9):1247-54.

- <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0651-OA>
13. Vetter P, Schibler M, Herrmann JL, Boutolleau D. Diagnostic challenges of central nervous system infection: extensive multiplex panels versus stepwise guided approach. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(6):706-12. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.12.013>

# TAM METİN SÖZEL SUNUMLAR



# Rektal Sürüntü Örneklerinden Karbapenem Dirençli *Enterobacterales* ve Vankomisin Dirençli Enterekokların Saptanmasında Multiplex PCR Platformunun Performansının Değerlendirilmesi

Pınar Sağıroğlu<sup>1</sup>, Fatimah Nameer Shaban<sup>2</sup>, Thowiba Yousif Jameel<sup>2</sup>, Mustafa Altay Atalay<sup>1</sup>,  
Abdurrahman Ayvaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kayseri

✉ drpinarsa@gmail.com

## Giriş

Dünyada ve ülkemizde karbapenem dirençli *Enterobacterales* (CRE) ve vankomisin dirençli Enterokok (VRE) türleri ciddi bir sağlık sorunudur. Günümüzde CRE ve VRE Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) ve ABD Hastalık Kontrol Merkezi (CDC)'ne göre acil ve öncelikli müdahale edilmesi gereken ÇİD patojenler listesinde en üst sırada yer almaktadırlar<sup>(1)</sup>. DSÖ'nün Orta Asya ve Avrupa Antimikrobiyal Direnç Süveyans 2020 yılı raporundaki ülkemiz verileri incelendiğinde invazif örneklerden (kan, BOS) izole edilen *Acinetobacter* türlerinde %90, *Klebsiella pneumoniae*'de %39, *Pseudomonas aeruginosa*'da %38 ve *Escherichia coli*'de %3 karbapenem direnci ve enterekok türlerinde %14 vankomisin direnci olduğu bildirilmektedir<sup>(2)</sup>. Bu bağlamda birçok sağlık kuruluşunda enfeksiyon kontrol önleme programlarının bir parçası olarak CRE ve VRE taramaları yapılmaktadır. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Bakterioloji birimine haftalık ortalama 350 CRE ve 300 VRE taraması için rektal sürüntü örneği gönderilmektedir. Örneklerde kromojenik agarla tarama işlemi yapıldıktan sonra pozitif üreme tespit edilen kökenlerin doğrulama işlemleri konvansiyonel yöntemlerle ve otomatize sistemlerle ile yapılmaktadır. Rutin uygulamada ortalama 4-5 günde sonuç verilebilmekte ve emek yoğun bir süreç yönetilmektedir. Bu çalışmada rektal sürüntü örneklerinden direkt tarama yapablen BD MAX multiplex PCR platformunun CRE ve VRE kitlerinin performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

2020 yılı şubat ayının ilk haftasında enfeksiyon kontrol kurulu ile iletişime geçilmiş ve CRE ve VRE taraması yapmak üzere gönderilecek olan rastgele 48 hastaya ait rektal sürüntü örneklerinin çift gönderilmesi istenmiştir. Laboratuvara gelen sürüntü örneğinin biriyle geleneksel yöntemlerle, biriyle ise BD MAX sistemi ile VRE ve CRE tarama işlemleri eş zamanlı olarak yapılmıştır. Deneyler sırasında Chromogenic VRE ve KPC Agar (RTA, Türkiye), Vankomisin, Teikoplanin, Meropenem, İmipenem, Ertapenem antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere), Phoenix M50 (Becton Dickson, ABD) otomatize sistemi ve BD MAX Checkpoint CPO assay (Becton Dickson, ABD), Biogx Vancomycin Resistance OSR (Biogx, ABD) kitleri kullanılmıştır.

Kromojenik KPC agarda yeşil renk veren koloniler karbapenem direnci şüphesiyle işleme alınmıştır. İlk olarak ertapenem, imipenem ve meropenem diskleri kullanılarak disk diffüzyon testi yapılmıştır. Ayrıca kökenlerin tanımlanmasında biyokimyasal özelliklerinden yararlanılmıştır. Disk diffüzyonla dirençli olduğu tespit edilen kökenler otomatize sistemle tanımlanmış ve diğer antibiyotik duyarlılık (ADT) testleri yapılmıştır.

Kromojenik VRE agarda pembe renk veren koloniler vankomisin direnci şüphesiyle işleme alınmıştır. Ardından vankomisin diski kullanılarak diskdiffüzyon testi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kökenlerin tanımlanmasına *Enterococcus* agar (BD, ABD) ve PYR testi gibi baz biyokimyasal özelliklerinden yararlanılmıştır. Disk diffüzyonla dirençli olduğu tespit edilen kökenler otomatize sistemle tanımlanmış ve diğer antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır. Bütün ADT'lerin değerlendirilmesin EUCAST kriterleri kullanılmıştır.

BD MAX multiplex PCR platformunda bütün işlemler (DNA ekstraksiyonu ve PCR) kapalı ortamda cihaz tarafından el değmeden yapılmaktadır. CRE ve VRE kitleri tamamen kullanıma hazır reagent stripler ve PCR kartuşları halinde kullanıcıya sunulmaktadır. Rektal sürüntü çubukları kitlerle birlikte gelen örnek tampon solüsyonlarına yerleştirilir, vortekslenir ve tüplerin ağzı kapatılır. Örnek tüpleri, reagent stripleri ve PCR kartuşları sisteme yüklenir ve cihaz çalıştırılır. BD MAX Checkpoint CPO assay ile *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP/VIM</sub> karbapenemaz genleri, Biogx Vancomycin Resistance OSR kitleri *bla*<sub>VanA</sub>, *bla*<sub>VanB</sub>, *bla*<sub>VanC1/C2</sub> vankomisin direnç genleri için tarama yapılır. Ortalama 2.5 saat sonra cihaz 24 örneğin sonucunu size raporlamaktadır.

## Bulgular

Karbapenem direnci taraması yapılan 48 örneğin 29'unda geleneksel kültür yöntemleri ile CRE (28 *K. pneumoniae* ve 1 *E. coli*) ve VRE taraması yapılan 48 örneğin 19'unda ise vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* izole edilmiştir. BD MAX PCR platformunda çalışılan örneklerden CRE için 5'inde, VRE için 3'ünde kültür sonuçlarıyla uyumsuz sonuçlar elde edilmiştir.

BD MAX Checkpoint CPO assay ile 29 örnekte karbapene-

**Tablo 1.** BD MAX sisteminde pozitif sonuç saptanan örneklerdeki direnç genlerinin dağılımı.

| BD MAX Checkpoint CPO                                                                 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Escherichia coli</i> |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| <i>bla</i> <sub>OXA</sub>                                                             | 17 (%58.62)                  | 1 (%3.45)               |
| <i>bla</i> <sub>NDM</sub>                                                             | 1 (%3.45)                    | -                       |
| <i>bla</i> <sub>KPC</sub>                                                             | -                            | -                       |
| <i>bla</i> <sub>IMP/VIM</sub>                                                         | -                            | -                       |
| <i>bla</i> <sub>OXA</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM</sub>                                 | 4 (%13.79)                   | -                       |
| <i>bla</i> <sub>OXA</sub> + <i>bla</i> <sub>IMP/VIM</sub>                             | 3 (%10.34)                   | -                       |
| <i>bla</i> <sub>OXA</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM</sub> + <i>bla</i> <sub>IMP/VIM</sub> | 3 (%10.34)                   | -                       |
|                                                                                       |                              |                         |
| Biogx Vancomycin Resistance OSR                                                       | <i>Enterococcus faecium</i>  |                         |
| <i>bla</i> <sub>VanA</sub>                                                            | 10 (%47.6)                   |                         |
| <i>bla</i> <sub>VanB</sub>                                                            | 2 (%9.52)                    |                         |
| <i>bla</i> <sub>Van C1/C2</sub>                                                       | 3 (14.28)                    |                         |
| <i>bla</i> <sub>VanA</sub> + <i>bla</i> <sub>Van C1/C2</sub>                          | 6 (%28.57)                   |                         |

\**bla*<sub>OXA</sub> ve *bla*<sub>OXA</sub> + *bla*<sub>IMP/VIM</sub> pozitif saptanan örneklerden birinde CRE ve *bla*<sub>VanB</sub> saptanan örneklerden ikisinde VRE üretilememiştir.

maz genlerinden en az biri tespit edilmişken, 19 örnekte herhangi bir gen saptanamamıştır. İki örnekte (1 *bla*<sub>OXA-48</sub> ve *bla*<sub>OXA-48</sub> + *bla*<sub>IMP/VIM</sub>) karbapenemaz geni tespit edilmişken, bu kökenler Kromojenik KPC agarda saptanamamıştır. Üç örnekte ise kromojenik KPC agarla karbapenem saptanmasına karşın CRE PCR kitinde karbapenemaz geni saptanamamıştır.

BD MAX Biogx Vancomycin Resistance OSR kit ile iki örnekte *bla*<sub>VanB</sub> geni tespit edilmesine karşın kromojenik VRE agarda üreme olmamıştır. Bir hastaya ait örnekte ise kromojenik agarda VRE saptanmış ancak PCR ile çalışılan genlerden hiçbirisi saptanamamıştır.

Bu sonuçlara göre kromojenik agarda tespit edilip otomatize sistem ve disk difüzyon testleri ile doğrulanmış CRE olgularını saptamada BD MAX Checkpoint CPO testinin duyarlılığı %89.5, özgüllüğü %88.8, pozitif tahmin değeri (PTD) %92.8, negatif tahmin değeri (NTD) %84.2 ve testin doğruluğu %89.3 olarak saptanmıştır. VRE olgularını saptamada Biogx Vancomycin Resistance OSR kitinin ise duyarlılığı %94.7, özgüllüğü %93.1, PTD %90, NTD %96.4 ve testin doğruluğu %93.7 olarak saptanmıştır.

Karbapenem dirençli izolatlardaki gen dağılımı incelendiğinde 18 kökenin (%62.07) tek başına, 10 kökenin (%34.47) ise diğer karbapenemaz genleriyle kombine olarak *bla*<sub>OXA-48</sub> içerdiği bulunmuştur. Hiçbir kökende *bla*<sub>KPC</sub> saptanamamıştır. Vankomisin dirençli izolatlardaki gen dağılımı incelendiğinde 10 kökenin (%47.6) tek başına, 6 kökende (%28.57) ise *bla*<sub>Van C1/C2</sub> ile kombine olarak *bla*<sub>VanA</sub> geni saptanmıştır. Vankomisin direnci saptanan 9 *E. faecium*'da (%42.85) *bla*<sub>Van C1/C2</sub> geni saptanmıştır. Tablo 1 'de BD MAX sistemiyle pozitif sonuç saptanan örneklerdeki direnç genlerinin dağılımı gösterilmiştir.

## Sonuç

Çalışmamız sonuçları irdelendiğinde özellikle birkaç nokta dikkat çekicidir. BD MAX Checkpoint CPO testinin duyarlılık ve özgüllüğü hesaplanırken yalancı negatif sonuç verdiği 3 kökenin kültür yöntemleri ile karbapenem dirençli olduğu saptanmıştır. Karbapenem direnci bakterilerde karbapenemaz üretimi ve diğer mekanizmalarla (Effluks pompa değişimleri, porin mutasyonları ve AmpC ve ESBL gibi diğer

beta laktamaz enzimleriyle) oluşabilir<sup>(3)</sup>. BD MAX Checkpoint CPO testi karbapenemaz üretiminde 5 büyükler diye adlandırılan KPC NDM, IMP, VIM ve OXA-48 genlerini saptamak üzere tasarlanmıştır. Dolayısıyla BD MAX sisteminin üç yalancı negatif sonuç verdiği karbapenem dirençli kökenlerde non-karbapenemaz mekanizmalarla ile direncin oluştuğunu ve bu durumunun BD MAX Checkpoint CPO testinin kullanımında sınırlandırma yaratacağını düşüncesindeyiz. Bu CRE saptama kitinin özellikle non-karbapenemaz mekanizmaların baskın olduğu türlerde (*Enterobacterspp.*, *E.coli* vb) tek başına tarama testi olarak kullanılmaması ve konvansiyonel testlerle doğrulama işlemlerinin yapılması gerekmektedir.

BD MAX Biogx Vancomycin Resistance OSR kitiyle iki kökende *bla*<sub>VanB</sub> tespit edilmesine karşın, konvansiyonel yöntemlerle vankomisin direnci saptanamamıştır. *vanB*'ye bağlı direncin saptanmasında günümüzde kullanılan ADT yöntemlerinin (agar veya sıvı MİK saptanması, otomatize sistemler) sıkıntılı olabileceği bildirilmektedir. Gerçek vankomisin direnci olan VanB içeren izolatlar genellikle fenotipik olarak düşük vankomisin direncine sahiptirler ve teikoplanine duyarlıdır (MİK 0.06-1 µg/ml). VanB içeren kökenler daha çok karşımıza genlerinin ifadesinin düşük olduğu ve sınır değerlerin altında MİK değerleri ile çıkarlar bunlar "düşük MİK'li VRE" olarak adlandırılırlar. Bu düşük-MİK VRE'lar vankomisinle uzun temas sonrasında MİK'lerini sınır değerin üzerine çıkarabilir. Düşük-MİK VRE izolatları sadece moleküler analiz ile saptanabilir. Günümüzde bu kökenlerin sıklıkları ve coğrafi dağılımları bilinmemektedir<sup>(4)</sup>. BD MAX sistemi ile VanB saptanan kökenler düşük MİK'li VRE olabilirler. Bu hastalarda vankomisin kullanılırken dikkatli olunmalıdır. Ayrıca VanB taşıyıcılığının moleküler testlerle ile doğrudan tespitinde karşılaşılan bir başka sorunda, bağırsakta bulunan anaerobik bakterilerdeki VanB genleri nedeniyle birçok yanlış pozitif sonuçlar elde edilmesidir<sup>(5)</sup>. Moleküler testlerle direkt rektal sürüntülerden VanB tespit edilen kökenler mutlaka fenotipik testlerle doğrulanmalıdır.

Sonuç olarak BD MAX platformunda çalışılan VRE ve CRE saptama kitleri, 24 hastaya ait direkt rektal sürüntü örneğinden 2.5 saat gibi kısa sürede güvenilir sonuç vermeleri ile ön plana çıkmaktadırlar<sup>(6-8)</sup>. Bu avantajları rutin laboratuvarlarda kullanımlarını desteklemektedir. Ancak özellikle CRE kitinin belirli karbapenemaz direnç genlerini saptayabilmek üzere tasarlanmış olması ve VRE kitince saptanan VanB dirençli kökenlerinde geleneksel yöntemlerle doğrulanma gereklilikleri kullanımlarını kısıtlamaktadır. Ayrıca yapılan maliyet analizlerinde bütün moleküler testlerde karşımıza çıkan yüksek maliyetler bu kitlerin rutin VRE ve CRE taramalarında kullanımını sınırlandıracak boyuttadır.

**Anahtar kelimeler:** BD MAX, Vankomisin, Enterokok, Karbapenem, Enterobacterales

## Kaynaklar

1. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. [https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf] Erişim tarihi: 02/01/2021  
https://doi.org/10.15620/cdc:82532

2. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance Annual Report 2020 [<https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2020/central-asian-and-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2020>] Erişim tarihi: 02/01/2021
3. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and future of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) infections. *Antibiotics* (Basel). 2019;8(3):122. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030122>
4. Martinez-Martinez L, Cantón Spain R, Stefani S, et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance; EUCAST: Växjö, Sweden, 2017.
5. Zhou X, Willems RJL, Friedrich AW, Rossen JWA, Bathoorn E. *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020;9(1):130. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00770-1>
6. Dalpke AH, Hofko M, Zimmermann S. Development of a real-time PCR protocol requiring minimal handling for detection of vancomycin-resistant enterococci with the fully automated BD MaxSystem. *J ClinMicrobiol*. 2016;54(9):2321-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.00768-16>
7. Sarı AN, Alp Çavuş S, Gülay Z. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin rektal sürüntü örneklerinden saptanmasında BD MAXTM CRE yönteminin etkinliği. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*. 2016;46(3):112-1. <https://doi.org/10.5222/tmcd.2016.112>
8. Girlich D, Oueslati S, Bernabeu S, et al. Evaluation of the BD MAX check-points CPO assay for the detection of carbapenemase producers directly from rectal swabs. *J Mol Diagn*. 2020;22(2):294-300. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.10.004>

## Ozon Terapi: MDR Gram Negatif Suşlarda Alternatif Bir Silah Olabilir mi?

Selin Uğraklı<sup>1</sup>, Fatma Esenkaya Taşbent<sup>2</sup>, Hatice Küçükceran<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Halk Sağlığı Müdürlüğü, Halk Sağlığı Laboratuvarı, Konya

<sup>2</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

<sup>3</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Konya

✉ dr.selinyumakci@gmail.com

Antibiyotikler, 20. yüzyıldaki tıp alanındaki en büyük keşiflerden olmuştur. Ancak kötü antibiyotik kullanım politikaları ve yeni antibiyotiklerin keşfinin görece sınırlı kalması ile mevcut antibiyotiklere karşı hızla direnç gelişmiş ve tedavilerde başarısızlığa sebep olmuştur<sup>(1)</sup>. Antimikrobiyal direnç, antibiyotiklerin tıp dışı hayvancılık ve tarımsal alanlarda denetimden uzak yoğun kullanımıyla ivme kazanmış, yeni direnç genlerinin ortaya çıkmasıyla büyüyen kompleks bir küresel sorun haline gelmiştir<sup>(2,3)</sup>. Özellikle Gram negatif bakterilerden *Enterobacterales* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp.) grubundaki bakterilerde gelişen ve hızla aktarılan direnç genleri sebebiyle pek çok hayat kurtarıcı antibiyotik zamanla etkisini yitirmektedir<sup>(4)</sup>. Çoklu ilaç direnci bulunan bu bakteriler hem toplumsal hem de nozokomiyal enfeksiyonların ilk sıralardaki etkenleri olup; morbidite ve mortaliteyi önemli oranda arttırmaktadır<sup>(4)</sup>.

Kalabalık yaşam, sanitasyon ve hijyenin yetersiz kalması, ticaret ve seyahatlerin artması yeni direnç genlerinin ve dirençli bakterilerin gelişiminde ve yayılmasında son derece etkili olmaktadır<sup>(4)</sup>. Patogenlerin sınır tanımadığını COVID-19 pandemisi ile bütün dünya ile eş zamanlı olarak dramatik bir şekilde deneyimlemiş bulunmaktayız. Nitekim pandemiyin çok öncesinde, son seçenek antibiyotiklerden kolistinde dirence yol açabilen *mcr-1* geninin hayvancılıkta tespitinden kısa bir süre sonra insanlara sıçrayıp, direncin küresel olarak yayılması ile 'tek sağlık' bakış açısı gündeme gelmiştir<sup>(2,5)</sup>. Bu kapsamda direnci azaltmaya yönelik alınacak küresel ve ulusal tedbirler kadar; yeni/alternatif tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi de önem kazanmaktadır<sup>(6)</sup>. Tüm dünyada yeni ilaç geliştirme çabalarına rağmen 1960'lı yıllardan bu yana pek az sayıda yeni antibiyotik kullanıma kazandırılmıştır. Yeni üretilen antibiyotiklere de, indüksiyon sonrası selektif baskılama sonucu dirençli olan patojenlerin seçilimi ile kısa sürede direnç gelişmektedir. Bu sebeple son yıllarda antibiyotik-dışı hedef spesifik tedaviler post-antibiyotik dönem için mevcut tedavilere destek amaçlı geliştirilmeye çalışılmaktadır. Alternatif tedaviler ile antibiyotiklerin kombine edilmesi yoluyla; antibiyotik direncinin azaltılması ve bakterisidal etkinliğin artırılması hedeflenmektedir<sup>(1)</sup>.

Çalışmamızda çoklu ilaç direnci bulunan klinik izolatlar üzerinde lokal ozon (O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> karışımı) tedavisinin in vitro bakterisidal etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

### Gereç ve Yöntem

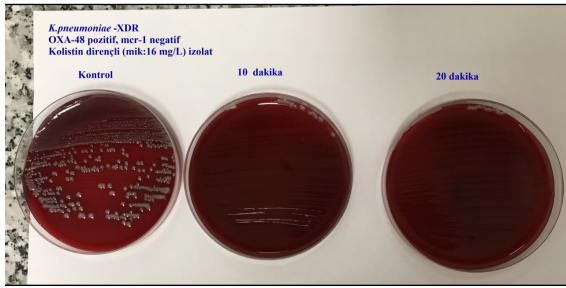
Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Bakterioloji Laboratuvarı'na enfeksiyon şüphesi ile gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen çoklu antibiyotik direnci (MDR) bulunan suşlar çalışmaya dahil edildi. İzolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri (AST) için Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemlerinden faydalanıldı. Kolistine ait duyarlılığı saptamak üzere in house olarak ISO-standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi (20776-1)(7) uyarınca ve CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)/EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) önerilerine göre çalışıldı.

Klinik sınır değerler için EUCAST version 10.0; 2020' ye göre değerlendirilme yapıldı<sup>(8)</sup>. Çalışmaya dahil edilen suşlardan *Acinetobacter baumannii*, aşırı dirençli (extensive drug resistance-XDR) özellikle olup; sadece kolistin ve tigesiklin duyarlılığı mevcuttu. *Salmonella* spp., MDR izolat olup; test edilen aminoglikozidlerin tümüne, seftazidime, sefepime ve piperasilin-tazobaktam dirençliydi. *K. pneumoniae* ise stok suşu olup kolistin dahil neredeyse tüm antibiyotiklere dirençli, XDR özellik göstermekteydi. *K. pneumoniae* izolatı moleküler yöntemlerle önceden OXA-48 karbapenemaz pozitif; mcr-1 direnç geni ise negatif olarak karakterize edilmişti.

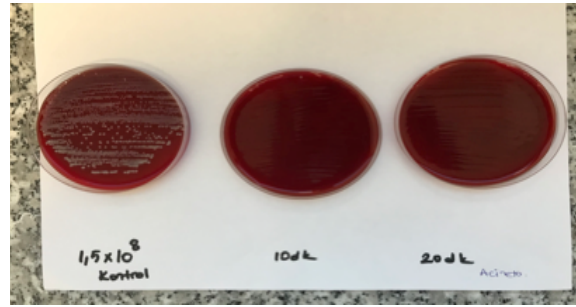
Çalışma için izolatların saf kültürlerinden, 0.5 McFarland (1.5\*10<sup>8</sup> cfu/ml konsantrasyonunda) bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyonun 1/10 oranında seri dilüsyonları yapılarak 1.5\*10<sup>2</sup> cfu/ml'ye kadar seyreltilti. Her bir dilüsyondan %5 koyun kanlı agar, hem kontrol hem de ozon uygulaması için ekimler yapıldı. Kontrol plakları direkt 37°C'lik etüve kaldırılırken, diğer besiyerlerine NEÜ Aile Hekimliği, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp polikliniği'nde 40 µg/ml dozda, 10 dakika ve 20 dakika olmak üzere farklı sürelerde lokal ozon uygulamasına tabi tutuldu. Uygulama sonrası plaklar 37°C'lik etüve kaldırıldı. 24 saatlik inkübasyonun sonunda kontrol besiyerleri ile ozon uygulanmış besiyerleri üreyen koloni sayıları açısından karşılaştırıldı (Resim 1, Resim 2, Tablo 1).

### Bulgular

Bu çalışma ile medikal ozonun (% ozon ve %95 oksijen karışımı) in vitro antibakteriyel etkinliği değerlendirildi. Çalışmadaki tüm bakteri türlerinin ozon gazına son derece duyarlı olduğu bulunmuştur. Test ettiğimiz suşlarda 10



Resim 1. *Klebsiella pneumoniae* izolatının ( $1.5 \times 10^8$  cfu/ml konsantrasyonundaki bakteri süspansiyonundan hazırlanan) 10 dakika ve 20 dakikalık lokal ozon (O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>) uygulaması sonrası koloni sayılarındaki değişimin görünümü.



Resim 2. *Acinetobacter baumannii* izolatının 10 dakika ve 20 dakikalık lokal ozon maruziyeti sonrası koloni sayılarındaki düşüş.

dakika gibi kısa süreli maruziyet ile görülen antibakteriyel etkinliğin; 20 dakikalık uygulama ile artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Lokal medikal ozonun kısa uygulama sürelerinde bile karbapenemaz üreten suşlar dahil belirgin in vitro bakterisidal etkinlik gösterdiği saptanmıştır (Resim 1).

## Sonuç

Gram negatif bakteriler arasında görülen çoklu ilaç direnç (MDR) halk sağlığı için büyük bir tehdit olmanın yanında; bu patojenlerle enfekte kişilerde tedaviye yanıtı azaltmaktadır<sup>(9)</sup>. Etkili tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması, kullanımda olan antibiyotiklerin toksik yan etkileri sebebiyle kombinasyon tedavilerine ihtiyaç artmaktadır<sup>(11)</sup>. Ozon gazı, keşfinden bu yana tıbbın pek çok alanında ve dezenfeksiyon amaçlı başarılı bir şekilde kullanılmıştır<sup>(10)</sup>. Ozon gazının, güçlü oksitadif özelliği sayesinde bakterisidal etkinlik sağlamaktadır<sup>(11)</sup>. Çalışmamızda lokal ozonun kısa maruziyet sürelerinde bile karbapenemaz üreten suşlar dahil belirgin in vitro antibakteriyel etkinlik göstermesi; ozonun kombinasyon tedavilerinin yeni bir alternatif seçeneği olma potansiyeli açısından değerlendirilmesi

gerektiğini düşündürmektedir. Nitekim ozon gazının dirençli cilt ve yara yeri enfeksiyonlarında kullanımı ve başarı ile tedavisini bildiren in vivo çalışmalar da mevcuttur<sup>(12-15)</sup>. Gulmen ve ark.<sup>(13)</sup> metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'un etken olduğu mediastinit olgusunu vankomisin- ozon kombinasyonu ile tedavi etmişlerdir. Belianin ve ark.<sup>(14)</sup> izoniazid ve/veya rifampisin dirençli *Mycobacterium tuberculosis*'e bağlı pulmoner enfeksiyonla seyreden hastalarda yaptığı çalışmada mevcut kemoterapiye ozon eklenmesiyle izoniazid ve rifampisin direncinde kontrol grubuna göre önemli oranda azalma saptandığını bildirmişlerdir. Diabetik ayak ülseri bulunan hastalarda yapılan bir çalışmada ise; mevcut tedaviye lokal ozon terapi eklenmesiyle bakteri kolonizasyonunda anlamlı derecede azalma raporlamışlardır<sup>(15)</sup>.

Verilerimiz doğrultusunda lokal ozon terapisinin uygulama imkanı bulunduğu dirençli cilt enfeksiyonlarının tedavisinde (diabetik ayak enf, dekübitüs ülser enf. gibi) mevcut antibiyoterapi ile birlikte kullanılması umut vaat edici olabilir.

Ozon, medikal olarak pek çok hastalığın tedavisinde başarı ile kullanılsa da; aşırı doza bağlı görülebilecek yan etkileri

Tablo 1. Farklı konsantrasyondaki bakteri süspansiyonlarının farklı sürelerdeki ozon uygulaması sonrası koloni sayılarındaki değişim.

| Konsantrasyon (cfu/ml)                            | $1.5 \times 10^8$ | $1.5 \times 10^7$ | $1.5 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^5$ | $1.5 \times 10^4$ | $1.5 \times 10^3$ | $1.5 \times 10^2$ |
|---------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b><i>Acinetobacter baumannii</i><sup>†</sup></b> |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| Kontrol (cfu/ml)                                  | $10^5$            | $10^5$            | $9 \times 10^4$   | $7 \times 10^4$   | $3 \times 10^4$   | $2 \times 10^4$   | $1 \times 10^4$   |
| 10 dakika (cfu/ml)                                | $1 \times 10^3$   | $1 \times 10^3$   | $1 \times 10^3$   | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
| 20 dakika (cfu/ml)                                | $1 \times 10^3$   | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
| <b><i>Salmonella spp.</i><sup>‡</sup></b>         |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| Kontrol (cfu/ml)                                  | $10^5$            | $10^5$            | $9 \times 10^4$   | $8 \times 10^4$   | $5 \times 10^4$   | $3 \times 10^4$   | $2 \times 10^4$   |
| 10 dakika (cfu/ml)                                | $3 \times 10^4$   | $2 \times 10^4$   | $1 \times 10^3$   | $1 \times 10^3$   | 0                 | 0                 | 0                 |
| 20 dakika (cfu/ml)                                | $1 \times 10^3$   | $1 \times 10^3$   | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
| <b><i>Klebsiella pneumoniae</i><sup>§</sup></b>   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| Kontrol (cfu/ml)                                  | $10^5$            | $10^5$            | $8 \times 10^4$   | $5 \times 10^4$   | $4 \times 10^4$   | $3 \times 10^4$   | $1 \times 10^4$   |
| 10 dakika (cfu/ml)                                | $1 \times 10^3$   | $1 \times 10^3$   | $1 \times 10^3$   | $1 \times 10^3$   | 0                 | 0                 | 0                 |
| 20 dakika (cfu/ml)                                | $1 \times 10^3$   | $1 \times 10^3$   | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |

<sup>†</sup> *A. baumannii* suşu XDR olup; sadece kolistin ve tigesikline duyarlıdır.

<sup>‡</sup> *Salmonella spp.* izolatları MDR özellik göstermektedir.

<sup>§</sup> *K. pneumoniae* stok suşu olup; moleküler olarak OXA-48 karbapenemaz ürettiği doğrulanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon ile kolistin dirençli (MiK:16 mg/L) ancak mcr-1 geni ise negatif olduğu tespit edilmiştir.



en aza indirmek ve yeterli antimikrobiyal etkinliğin sağtabilmesi için daha fazla bakteri türünü kapsayan ve klinikle desteklenen standardize çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik, direnç, ozon

#### Kaynaklar

1. Wang CH, Hsieh YH, Powers ZM, Kao CY. Defeating antibiotic-resistant bacteria: Exploring alternative therapies for a post-antibiotic era. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):1061. <https://doi.org/10.3390/ijms21031061>
2. Walsh TR, Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(10):1102-3. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30329-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30329-2)
3. Ugraklı S, Dogan M. Growing threat increased carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae*; antibiotic susceptibility pattern of *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital. *Int J Clin Microbiol.* 2020;1(2):1-7. <https://doi.org/10.14302/issn.2690-4721.ijcm-19-3154>
4. Nordmann P, Poirel L, Frey J. Crisis of emerging antibiotic resistances mirroring that of the COVID-19 in the age of globalisation. *Swiss Med Wkly.* 2020;150:w20402. <https://doi.org/10.4414/smw.2020.20402>
5. Walsh TR. A one-health approach to antimicrobial resistance. *Nature Microbiol.* 2018;3(8):854-5. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0208-5>
6. Şimşek H. Ulusal AMD Önleme Stratejik Eylem Planı ve Ulusal AMD Sürveyans Verileri. Ulusal Tek Sağlık Sempozyumu ve Çalıştayı Kitabı. 2019:44-7.
7. EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2016. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Recommendations\\_for\\_MIC\\_determination\\_of\\_colistin\\_March\\_2016.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf) (Erişim tarihi: Aralık.2020)
8. EUCAST. Break-point tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version10.0, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020. [https://eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://eucast.org/clinical_breakpoints/) (Erişim tarihi: Aralık.2020)
9. Anantharajah A, Glupczynski Y, Hoebek M, et al. Multicenter study of automated systems for colistin susceptibility testing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04059-4>
10. Babando P. Ozone therapy in dentistry: clinical experiences. *Ozone Ther.* 2017;2(2). <https://doi.org/10.4081/ozone.2017.7083>
11. Bialoszewski D, Pietruczuk-Padzik A, Kalicinska A, et al. Activity of ozonated water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Med Sci Monit.* 2011;17(11):BR339-44. <https://doi.org/10.12659/msm.882044>
12. De Lisi AV, Franzini M, Ricevuti G. Oxygen-ozone therapy in arthroplasty infections. *Ozone Ther.* 2019;4(1). <https://doi.org/10.4081/ozone.2019.8187>
13. Gulmen S, Kurtoglu T, Meteoglu I, Kaya S, Okutan H. Ozone therapy as an adjunct to vancomycin enhances bacterial elimination in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mediastinitis. *J Surg Res* 2013;185(1):64-9. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.05.085>
14. Belianin II, Shmelev EI. Changes in drug resistance of Mycobacteria in the simultaneous use of chemotherapy and intravenous infusions of dissolved ozone. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2004;(7):32-5.
15. Kadir K, Syam Y, Yusuf S, Zainuddin M. Ozone therapy on reduction of bacterial colonies and acceleration of diabetic foot ulcer healing. *Home Healthc Now.* 2020;38(4):215-20. <https://doi.org/10.1097/NHH.0000000000000889>



## 2018 ve 2020 Yıllarına Ait *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Kolistin Duyarlılık Durumlarının Karşılaştırılması

Nezahat Akpolat, Nurullah Uzuner, Muhammet Çelik

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

✉ nurullahuzuner38@gmail.com

### Giriş

*Acinetobacter baumannii*, solunum yolu, kan dolaşımı, idrar yolu, cerrahi alan enfeksiyonları başta olmak üzere bir çok hastalığa neden olan ve son zamanlarda antibiyotik direnci artmakta olan hastane ile ilişkili önemli bir patojendir<sup>(1)</sup>.

Çoklu ilaca dirençli (ÇİD) *A. baumannii*'nin neden olduğu sağlık hizmeti kaynaklı enfeksiyonların insidansı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır<sup>(2)</sup>. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, ÇİD *A. baumannii*'yi halk sağlığı için ciddi bir tehdit olarak sınıflandırmıştır ve Dünya Sağlık Örgütü, *A. baumannii*'yi yeni ilaç geliştirme için en öncelikli antibiyotik dirençli patojen olarak listelemiştir<sup>(3,4)</sup>.

Son zamanlarda ÇİD *A. baumannii*'nin neden olduğu kritik hastalarda ciddi enfeksiyonların tedavisi için kolistin (polimiksin E) tek başına veya diğer antibiyotiklerle birlikte kurtarma tedavisi olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır<sup>(5)</sup>. *Bacillus polymyxa* alt türü colistinun tarafından üretilen doğal bir madde olan kolistin, katyonik bir lipopeptiddir<sup>(6)</sup>. Dış zarın yırtılmasını sağlamak için lipid A grubu lipopolisakarit (LPS) ile etkileşime girerek ve hücre geçirgenliği değişikliklerine, hücresel içeriğin sızmasına ve hücre ölümüne yol açarak Gram negatif bakterilere karşı bakterisidal etkilidir<sup>(6,7)</sup>. Maalesef bu patojenlerin neden olduğu ciddi enfeksiyonları tedavi etmek için kolistin artan kullanımı, son seçenek ilaçlardan olan bu antibiyotik karşı direncin artmasına yol açmaktadır<sup>(8)</sup>.

Bu çalışmada özellikle yoğun bakım hastalarında ciddi enfeksiyon etkeni olan *A. baumannii* suşlarının 2018 ve 2020 yıllık kümülatif kolistin sıvı mikro dilüsyon sonuçları retrospektif olarak incelenmiş olup direnç oranları tartışılmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2018 ve 2020 yıllarında yatarak tedavi edilen hastalardan, mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* suşlarının kolistin anbitiyotikine karşı duyarlılığı incelenmiştir. Gelen örneklerin (numunenin çeşidine göre) %5 Koyun Kanlı Agar (KKA) (RTA, Türkiye), Eozin Metilen Blue (EMB) Agar (RTA, Türkiye), Sabouraud Dextrose Agar ve Çikolatamsı Agar besiyerlerine subkültürler yapılmış ve yine numune çeşidine göre 35°C'de 24 ile 120 saat arasında etüvde inkübe edilmiştir.

Trakeal aspiratların Gram boyaması Bartlett ve

Murray-Washington Skoruması sistemleri kullanılarak değerlendirildi. Skor anlamlıysa ve besiyerinde  $\geq 10^5$  CFU/ml saf ya da baskın olarak üreme olduysa etken olarak düşünüldü. Balgam örneklerinin Gram boyaması da Bartlett ve Murray-Washington Skoruması sistemleri kullanılarak değerlendirilmiş olup skoruması anlamlıysa ve besiyerinin özellikle ikinci alanında baskın üreme olduysa etken düşünüldü. Kan kültürleri için bir set kan kültürü örneğinde bile baskın ve kontaminasyonu düşündürmeyen üremeleri etken kabul edildi. Yara örneklerinin Gram boyaması Q (Quality) skoruması sistemi ile değerlendirildi. Q skoru anlamlı olup besiyerinde baskın bir üreme olduysa; idrar örneklerinde saf üremeler ve iki farklı etken üremesi durumunda koloni sayısı  $>10^4$  CFU/ml; üç farklı bakteri üremesinde ise koloni sayısı  $>10^5$  CFU/ml olan bakteri saptandıysa etken olarak düşünüldü. Beyin omurilik sıvısı için ise örnek miktarı 1 mL'den az olduğunda santrifüj yapılmadan Gram boyama hazırlanıp besiyerlerine de ekimi yapılmıştır. Örnek miktarı 1mL'den fazla olduğunda Gram boyama ve kültür işlemleri için 1500xg'de 5-10 dakika santrifüj edilip boyama ve kültür için 2-3'er damla dipteki çökeltiden inokule edilmiştir. Bu kriterlerin dışındaki üremeler etken olarak düşünülmemiştir.

Etken düşünülen koloniler öncelikle MALDI Biotyper 3.1 (BrukerDaltonics, ABD) kütle spektrometrisi ile *A. baumannii* olarak  $>2$  tanımlama skoruyla tür düzeyinde tanımlanmıştır. Kolistin duyarlılık testi için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Sonuçlar 2018 ve 2020 yılına ait European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)<sup>(9,10)</sup> önerileri doğrultusunda yorumlandı.

Çalışmaya yatarak tedavi alan hastaların *A. baumannii*'nin etken olarak saptandığı ilk izolatları dahil edilmiştir. Tekrar üremeleri, tarama amaçlı gönderilen örneklerden izole edilen suşlar ve poliklinik hastalarından izole edilen suşlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

### Bulgular

Çalışmaya 2018 yılına ait 50, 2020 yılına ait 152 izolat dahil edildi. 2018 ve 2020 yılında izole edilen *A. baumannii* suşları erkeklerde daha yüksek oranda bulundu (sırası ile %66 ve %66,4). Her iki yıla ait suşların büyük çoğunluğu erişkinlerden (%76 ve %85,53) ve yoğun bakımlardan (%86 ve %90,13) izole edildi. İki yıla ait suşların büyük çoğunluğu solunum yolu örneklerinden izole edildi (%44 ve %58,55). 2020 yılına ait solunum yolu ve diğer örneklerde üreyen suşlar incelendiğinde dirençli suşların büyük çoğunluğunun solunum yolu örneklerinden izole edildiği

**Tablo 1. Yıllara göre *Acinetobacter baumannii* suşlarının kolistin duyarlılık durumu [n(%)]**

|      | S           | R         | Toplam    | p       |
|------|-------------|-----------|-----------|---------|
| 2018 | 44 (88)     | 6 (12)    | 50 (100)  | 0.668   |
| 2020 | 137 (90.13) | 15 (9.87) | 152 (100) | (>0.05) |

tespit edildi (%60). Suşların kolistin duyarlılığı yıllara göre karşılaştırıldığında 2020 yılında 2018 yılına göre istatistiki olarak anlamlı olmayan düzeyde de olsa direnç oranının azaldığı görüldü (Tablo 1). 2018 yılına ait  $Mik_{50}$  ve  $Mik_{90}$  değeri sırası ile 1 mg/L ve 4 mg/L; 2020 yılına ait  $Mik_{50}$  ve  $Mik_{90}$  değeri sırası 1 mg/L ve 2 mg/L olarak bulundu.

### Sonuç

Çoklu ilaca dirençli (ÇİD) ve invaziv bir patojen olabilen *A. baumannii*, nozokomiyal enfeksiyonların başlıca nedenlerinden biri olup yüksek mortalite ile ilişkilendirilmiştir<sup>(14)</sup>. Klinik önemi, antibiyotiklere özgü ve çoklu ilaç direncinden sorumlu direnç mekanizmalarına sahip olması, mevcut antibiyotik tedavilerine yanıt vermemesi, hastane ortamlarında uzun süre kalabilmesi ve kolayca yayılabilmesinden kaynaklanmaktadır<sup>(14)</sup>. Dolayısıyla son on yılda *A. baumannii* en başarılı çoklu ilaca dirençli nozokomiyal organizmalardan biri haline gelmiştir. Çalışmamızda da mevcut izolatlarımızın tümü yatan hastalara ait olup 2018 yılında %43'ü, 2020 yılında %90.1'i yoğun bakım ünitesinde tedavi alan hasta örneklerine aitti. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, yoğun bakım ünitesi enfeksiyonlarının %20'sinden ÇİD *A. baumannii*'nin sorumlu olduğunu, tıbbi ekipmana bağlı olan hastalarda enfeksiyonların %7'sinde etken olduğunu bildirmektedir<sup>(15)</sup>. İzole edilen *A. baumannii* suşlarımızın büyük çoğunluğunun erişkinlerden oluştuğu görülmekle birlikte (2018 yılında %76, 2020 yılında %85.5) her yaş grubu için ciddi bir tehdit oluşturduğu bilinmektedir. Çalışmamızda suşların %12 (2018'de)'si ve %14.5 (2020'de)'i çocuk hasta örneklerinden izole edildi. Çelebi ve ark.<sup>(12)</sup>, çocuklarda beş yıllık *A. baumannii* enfeksiyon takiplerinde 95 hastada etkenin %84.3'ünün hastane kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *A. baumannii* suşlarında ÇİD oranı %33.6 ve ÇİD *A. baumannii* enfeksiyon mortalite oranını %50, ÇİD olmayan *A. baumannii* enfeksiyon mortalite oranını da %11 olarak saptamışlardır. *A. baumannii* enfeksiyonları çocuklar için de mortalite ve morbite açısından oldukça önemlidir.

*A. baumannii* enfeksiyonlarındaki patogeneze, içerdiği porinler, kapsül, hücre duvarı lipopolisakaritleri, enzimler, biyofilm üretimi, hareketlilik ve demir toplama sistemleri gibi birçok virülans faktörünün bir sonucudur. Bu tür hastalık oluşturma faktörleri, organizmanın stresli çevresel koşullara direnmesine ve ciddi enfeksiyonların gelişmesine yardımcı olur<sup>(14)</sup>. *A. baumannii*'nin enfeksiyonlarının artışına paralel olarak başlıca kullanılan antibiyotikler de etkisiz olmaya başlamış ve hemen hemen tüm mevcut ilaçlara dirençli suşların oluşumu endişe oluşturmıştır. *A. baumannii* direnç geliştirmesi sonucu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ampicilin-sulbaktam, seftazidim, florokinolonlar, kotrimoxazol, amikasin ve tetrasiklin gibi antimikrobiyaller yetersiz kalmaktadır<sup>(11)</sup>. Karbapenemler *A. baumannii* enfeksiyonlarında tercih

edilen antibiyotiklerken son yıllarda direnç oranları önemli ölçüde artmıştır. 2018 yılı CAESAR raporunda ülkemizde *A. baumannii* izolatlarında karbapenem direncini sırasıyla %91 olarak bildirmektedir<sup>(16)</sup>. Duman ve Tekerekoğlu<sup>(13)</sup> çalışmalarında imipenem ve meropenem direnç oranını %98 olarak belirlemişlerdir. Kolistin, polimiksin grubundan eski bir antibiyotik olup nefrotoksik ve nörotoksik özelliklerinden dolayı kullanımından vazgeçilmiştir. ÇİD Gram negatif türlerin ortaya çıkması ve *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olması kolistini yeniden tedavide kullanılır hale getirmiştir. Fakat tedavide kullanılmaya başlanmasını takiben kolistine dirençli ve heterodirençli *A. baumannii* suşları rapor edilmektedir<sup>(11)</sup>. Bilim dünyası dirençli bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili alternatif kombinasyonlar ve yeni antibiyotik arayışını sürdürmekte ve mevcut antibiyotiklerin direnç durumlarını takip etmektedir. Altı aylık on merkezli bir çalışmada<sup>(17)</sup> 2012 yılı *A. baumannii* izolatlarının kolistin direnci %1.2 saptanırken, Talan ve ark.<sup>(18)</sup> 2015 yılı yine yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *A. baumannii* suşlarında direnç oranı %27.2 olarak bildirilmektedir. Duman ve Tekerekoğlu<sup>(13)</sup> Ocak 2017- Aralık 2018 tarihli kan kültür örneklerinden izole edilen 97 *A. baumannii* izolatlarında kolistin direnç oranını %8.2,  $Mik_{50}$  değerini 0.5µg/ml ve  $Mik_{90}$  değerini de 2µg/ml olarak belirlemişlerdir. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2016 yılında Avrupa'daki kolistin direncini ortalama %4 olarak bildirmişlerdir<sup>(19)</sup>. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle 2018 yılında çalıştığımız 50 suşun %12' si 2020'de de 152 suşun %9.87'si kolistine dirençli saptandı.  $Mik_{50}$  ve  $Mik_{90}$  değerleri sırasıyla 2018 için 1 mg/L ve 4 mg/L, 2020 için de 1 mg/L ve 2 mg/L olarak belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı olmazsa da, 2020 yılında 2018 yılına göre *A. baumannii* suşlarının kolistin direncinde azalma gözlemlendi. Bu azalma, Covid19 pandemisi nedeniyle covid19 dışındaki nedenlerle hastanelere başvuran hasta sayısındaki düşüşe ve dolayısı ile *A. baumannii* nedenli enfeksiyonlarda kolistin kullanımının azalmış olmasıyla ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte suşların klonal yakınlıkları, tedavinin (monoterapi/ kombinasyon) şekli, direnç oranlarının değişmesinde etkili olabilen faktörlerdendir.

*Acinetobacter baumannii* yoğun bakım ünitelerindeki hastane kaynaklı pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının yaygın bir nedenidir<sup>(14)</sup>. Bu enfeksiyonların en yaygın kaynakları alt solunum yolu enfeksiyonu olan hastalar ve damar içi cihazlardır. *A. baumannii*'nin en yaygın kolonizasyon bölgesi solunum yolu (%80,8) ve ardından deri kolonizasyonudur (%12.4)<sup>(14)</sup>. Covid19 pandemisinin yaşandığı 2020 yılında solunum yolu örneklerinden izole edilen suş oranımız %58.55 olup 2018 yılı solunum yolu örneklerinden istatistiki olarak anlamlı olmayan düzeyde ( $p=0.072$ ) fazlaydı. SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda bakteriyel enfeksiyon prevalansı tam olarak anlaşılmamıştır. Covid-19 hastalarında bakteriyel ko-enfeksiyon ve ikincil enfeksiyonları irdeleyen bir meta analiz çalışmada solunum yolu ve kan örnekleri baz alınmıştır. COVID-19'lu 3338 hastayı temsil eden Meta-analizde, hastaların %3.5'inde bakteriyel ko-enfeksiyon ve hastaların %14.3'ünde ikincil bakteriyel enfeksiyon tanımlanmıştır<sup>(20)</sup>.

Sonuç olarak *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonlar sağlık kurumları için oldukça sorunludur. Dirençli izolatların hastanelerde kolonizasyonunun önlenmesi ve enfeksiyon

kontrol önlemlerinin ciddi düzeyde uygulanması gereklidir. *A. baumannii* suşları için son seçeneklerden biri olan kolistin doğru zamanda doğru endikasyonlarda kullanımı direnç oranını düşürebilir.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, kolistin, çoklu ilaca dirençli

#### Kaynaklar

1. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34(1):1-14. <https://doi.org/10.1086/668770>
2. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(10):3471-84. <https://doi.org/10.1128/AAC.01464-06>
3. Badave GK, Kulkarni D. Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: An emerging challenge. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(1):DC08-10. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11014.5398>
4. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(2): 148-65. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.2.148-165.1996>
5. Oleksiuk LM, Nguyen MH, Press EG, et al. In Vitro responses of *Acinetobacter baumannii* to two-and three-drug combinations following exposure to colistin and doripenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):1195-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01779-13>
6. 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>
7. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet*. 1997;349(9049):418-22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80051-7)
8. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(9):2070-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr239>
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 8.0 [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\_files/Breakpoint\_tables/v\_8.0\_Breakpoint\_Tables.pdf]. (Erişim tarihi: 01.02.2021).
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0 [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\_files/Breakpoint\_tables/v\_10.0\_Breakpoint\_Tables.pdf]. (Erişim tarihi: 01.02.2021).
11. Wentao Ni, Yanjun Li, Jie Guan et al. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;22;60(5):3215-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.00248-16>
12. Çelebi S, Hacımustafaoğlu M, Yüce N, ve ark. Çocuklarda *Acinetobacter spp.* enfeksiyonlarında risk faktörleri ve klinik sonuçları: Beş yıllık çalışma. *Çocuk Enf Derg*. 2010;4:15-20.
13. Duman Y, Tekerekoğlu MS. Yoğun bakım ünitelerinde izole edilen *A. baumannii* izolatlarının kolistin MİK değerlerinin ve direnç genlerinin irdelenmesi. *Türk J Intensive Care*. 2020;(baskıda) <https://doi.org/10.4274/tybd.galenos.2020.47965>
14. Moubareck CA, Halat DH. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(3):119. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>
15. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. 2013. [https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf]. (Erişim tarihi: 07.01.2021).
16. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance, Annual report 2018. World Health Organization, Denmark, 2019. [https://www.euro.who.int/\_data/assets/pdf\_file/0007/386161/52238-WHO-CAESAR-AR-2018\_low\_V11\_web.pdf?ua=1]. (Erişim tarihi: 01.02.2021).
17. Arslan Gülen T, İmre A, Ödemiş İ, Kayabaş Ü. *Acinetobacter baumannii* infections and antibiotic resistance in hospitalized patients in an education and research hospital: A six-year analysis. *Flora*. 2020;25(4):563-71. <https://doi.org/10.5578/flora.69434>
18. Talan L, Guven G, Yılmaz G, Altıntaş ND. Yoğun bakım ünitelerinde kontrol altına alınmakta güçlük çekilen mikroorganizmalar: *Acinetobacter*. *Yoğun Bakım Derg*. 2015;6:44-7. <https://doi.org/10.5152/dcbvbd.2015.930>
19. European Centre for Disease Prevention and Control. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. Stockholm: ECDC; 2016. [https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-latest-data-antibiotic-resistance-eu-2016]. (Erişim tarihi: 07.01.2021).
20. Langford BJ, So M, Raybardhan S, et al. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(12):1622-9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.016>

# Acinetobacter Türlerinde Kolistin ve N- asetilsistein Bileşiklerinin Tek Başına ve Kombine Antimikrobiyal Etkilerinin İn Vitro Değerlendirilmesi

Elif Çalışkan<sup>1</sup>, Zeynep Şeyma Işık<sup>2</sup>, Duygu Öcal<sup>3</sup>, Esra Akkan Kuzucu<sup>4</sup>,  
Mustafa Güzel<sup>5</sup>, Ümmü Gül Erdem<sup>1</sup>

<sup>1</sup>T.C. SB Ankara İSM SBÜ. Dışkapı Yıldırım Beyazıt EAH, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

<sup>2</sup>T.C. SB İstanbul İSM Bayrampaşa Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>4</sup>T.C. SB. Ağrı İSM Patnos Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ağrı

<sup>5</sup>Özel Maltepe Tıp Merkezi, İstanbul

✉ elif\_calskn@hotmail.com

## Giriş

*Acinetobacter* türleri sağlık hizmeti sistemlerini tehdit eden çoklu ilaç dirençli bakteriler arasında yeni tedavi geliştirilmesi ve direnç artışının önlenmesinde acil önceliğe sahip patojenlerdendir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yüksek mortalite ve morbidite oranlarına sahip nozokomiyal pnömoni etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde enfeksiyonlarda saptanan *Acinetobacter* spp. izolatlarının çoğunu karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* (Carbapenem resistant *A. baumannii*-CRAB) oluşturmaktadır. Karbapenem direnç oranları dünyanın bazı bölgelerinde %90'ı aşmaktadır<sup>(1)</sup>. CRAB enfeksiyonlarında kullanılabilen kısıtlı sayıda antimikrobiyal ilaç farmakokinetik özellikleri ve artan direnç oranları nedeniyle uygun terapötik seçenekler olmaktan uzaktır. Bu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan son çare ilaçlardan kolistin toksik yan etkileri ve direnç oranlarındaki artış nedeniyle kullanım alanının gittikçe daralması yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

N-asetilsistein (NAC) güvenli yan etki profiline sahip mukolitik, antioksidan bir bileşiktir. FDA tarafından onaylanmış NAC formülasyonları oral, IV ve inhaler yoldan kullanılabilir. Solunum yolu patolojilerinin tedavisinde uzun dönemden beri yaygın şekilde kullanımı mevcuttur. Bu özelliklerine ek olarak N-asetilsisteinin farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite ve biyofilm oluşumunun çeşitli basamaklarına etki ederek antibiyofilm etkinlik gösterdiğini destekleyen birçok çalışma mevcuttur ve bu alandaki çalışmalara karşı ilgi giderek artmaktadır. Solunum sistemi üzerinde yapılan çalışmalarda inhaler yoldan uygulamayla, oral yoldan daha yüksek NAC konsantrasyonlarına ulaşılabilirdi gözlenmiştir. Solunum sistemi patojenleri üzerine yapılan bir çalışmada NAC'ın 10 mM (1.6 mg/ml) ve 50 mM konsantrasyonlarda yaygın kullanılan antibiyotik gruplarıyla in vitro aktivitesi incelenmiş karbapenemler dışında genel olarak aktivitelerinde olumsuz etkileşim gözlenmemiştir<sup>(2,3)</sup>.

Solunum yolu enfeksiyonlarında topikal NAC kullanımı, klinik uygulamada sadece etkinliği nedeniyle değil, aynı zamanda anatomik hedefe metabolize edilmeden

ulaşabilmesi, daha yüksek dozlarda kullanılabilmesi, biyofilmler üzerine inhibitör etkilere sahip olması gibi nedenlerle tedavi seçenekleri kısıtlı enfeksiyonlar için yeni tedavi algoritmalarında araştırma öznesi olarak önem kazanmıştır.

Bu bilgiler ışığında çalışmada kolistin ve NAC bileşiklerinin *Acinetobacter* türleri üzerindeki in vitro ortamdaki tek başına ve kombine etkilerini ve olası sinerjistik etkinin saptanması durumunda yeni bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilme potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara İl Sağlığı Müdürlüğü Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü laboratuvarına Haziran 2018-Aralık 2019 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen alt solunum yolu örneklerinden rutin mikrobiyolojik incelemeler sonrasında elde edilen 116 *Acinetobacter* spp. izolatı ve *A. baumannii* ATCC 19606 suşu çalışmamızda kullanılmıştır. Tekrarlayan üremeleri olan hastalarda ilk saptanan izolat alınarak her hastadan tek bir izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

İzolatların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemlere ek olarak BD Phoenix, VITEK MS sistemleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık tespitinde BD Phoenix gram negatif bakteri paneli kullanılmıştır.

Kolistin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ortak önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemiyle belirlenmiş ve EUCASTv10.0 sınır değer tablolarına göre duyarlılık değerlendirilmiştir<sup>(4,5)</sup>.  $MİK_{COL} \leq 2$  mg/L bulunan izolatlar duyarlı,  $MİK_{COL} > 2$  mg/L bulunanlar ise dirençli kabul edilmiştir. Plaklar ortam havasında 35°C'de, 18-20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası mikropalak kuyucuklarında bakteri üremesinin inhibe olduğu, çıplak gözle belirlenebilen en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak değerlendirilmiştir. Arada atlayan tek bir kuyucuk olduğunda en yüksek MİK değeri okunurken,



üremeler arasında birden fazla atlayan kuyucuk olduğunda, bu izolatlara için test tekrar uygulanmıştır. SMD yönteminde kolistin sülfat tozu kullanılmış ve 96 kuyucuklu U tabanlı mikropiplarda son kolistin konsantrasyonları 128-0.125 mg/L aralığında değişecek şekilde dilüsyonlar yapılmıştır. Bakteri süspansiyonları 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış ve plaklardaki son konsantrasyonlar  $5 \times 10^5$  cfu/ml olacak şekilde dilüsyon yapılmıştır. Plakların son sütunları üreme kontrolünü değerlendirmek için kullanılmış, her plakta kolistin duyarlı (*Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ve dirençli (*E. coli* NCTC 13846) kalite kontrol suşları test edilerek yöntemin uygunluğu değerlendirilmiştir.

Kolistin-NAC etkileşimini değerlendirmek için her MİK aralığından izolatlara temsil edecek şekilde 116 izolattan 16'sı seçilmiş, bu izolatlara ve *A. baumannii* ATCC 19606 suşu için NAC MİK değerleri SMD ile belirlenmiştir. MİK<sub>NAC</sub> değerlerinin belirlenmesinde N-Acetyl-L-Cysteine tozu kullanılmıştır. Bileşiğin pH değeri oldukça düşük olduğundan (pH= 2-3) NaOH ve steril distile su kullanılarak pH değeri 6.5-7 aralığına ayarlanmıştır. SMD plaklarında son NAC konsantrasyonları 32- 0.06 mg/mL aralığında olacak şekilde seri dilüsyonlar yapılmıştır.

Bileşiklerin kombine ve tek başına in vitro etkinliklerini değerlendirmek için dama tahtası yöntemi kullanılmıştır. Her izolat-suş için bir mikropipla Tablo 1'de şematize edildiği şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan mikropiplalarda SMD ile tespit edilen MİK<sub>NAC</sub> ve MİK<sub>COL</sub> değerleri, bileşiklerin sistemik ve topikal uygulanabilecek konsantrasyonları dikkate alınarak mikropiplaların yatay düzleminde kolistin 128-0.125 mg/L aralığındaki seri dilüsyon yapılmış konsantrasyonları, dikey düzlemde N-asetilsisteinin 16-8-4-3.2-1.6-0.8 mg/mL'lik konsantrasyonları kombine edilmiştir. Bileşiklerin tek başına etkinliğini değerlendirmek için yatay ve dikey sıralar ayrılmıştır. Plakların son yatay sıraları kalite kontrolü için ayrılmıştır. Birer kuyucuk ise üreme ve sterilite kontrolü için kullanılmıştır. SMD yöntemindeki rutin inkübasyon sonrası her yatay sıra için üremenin bittiği kuyucuklar belirlenmiş ve bileşiklerin kombinasyonlarında denk geldiği MİK değerleri kaydedilmiştir. Bileşiklerin tek başına ve kombinasyonlardaki MİK değerlerine göre Fraksiyone İnhibitör Konsantrasyon (FİK) değerleri hesaplanmış ve  $\sum$  FİK indeksi=FİK A+FİK B (FİK A=A antibiyotikinin kombinasyondaki MİK değeri / A antibiyotikinin tek başına MİK değeri; FİK B=B antibiyotikinin

kombinasyondaki MİK değeri / B antibiyotikinin tek başına MİK değeri) formülüne göre FİK<sub>1</sub> hesaplanmıştır. FİK<sub>1</sub> ≤ 0.5 ise sinerjistik; > 0.5 - ≤ 1 ise additif/parsiyel sinerjistik; > 1 - < 4 ise indifera (etkisiz); ≥ 4 ise antagonistik etki olarak yorumlanmıştır<sup>(6)</sup>.

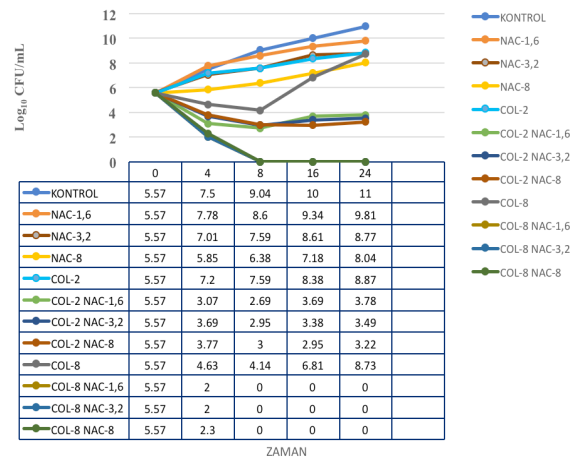
Bileşiklerin kombine kullanımda in vitro bakterisidal etki varlığını araştırmak için kolistin MİK değeri en yüksek bulunan izolat kullanılarak zamana bağlı öldürme kinetiği değerlendirilmiştir. Bunun için bileşiklerin plazma ve alveolleri kaplayan sıvı tabakasında ulaşabilecekleri dozlar dikkate alınarak son konsantrasyonlar kolistin için 2 ve 8 mg/L; NAC için 1.6-3.2-8 mg/ml; bakteri konsantrasyonu için  $10^6$  cfu/ml olacak şekilde tek başına ve kombine edilerek bileşikler içermeyen kontrol tüpüyle birlikte 12 adet bakteri-kolistin/NAC süspansiyonu içeren tüp hazırlanmıştır. Bu tüpler 35°C'de, ortam havasında, mekanik çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek 0-4-8-16-24. saatlerde her tüpten 100 µl alınarak  $10^{-1}$ 'den  $10^{-6}$  'ya kadar olacak şekilde 1 ml hacimli altışar adet dilüsyon tüpü hazırlanmıştır. Bu dilüsyonların her birinden 100 µl alınarak triptik soy agar plaklarına ekimler yapılmıştır. Plakların 24 saatlik inkübasyonu sonrası 30-300 arası koloni içeren plaklar sayılarak; koloni sayısı x dilüsyon oranı x10 (1ml'lik dilüsyondan 100 µl ekim yapıldığı için) formülüyle cfu/ml değeri hesaplanmış ve bu değerin log<sub>10</sub> cfu/ml karşılığı zamana bağlı öldürme kinetiği grafiğine yerleştirilmiştir. Başlangıçtakine göre bakteri sayısında ≥3log<sub>10</sub> azalma bakterisidal etki, kombine-tek başına uygulama arasında ≥2log<sub>10</sub> azalma sinerji <2log<sub>10</sub> azalma indifera etki, >2log<sub>10</sub> artma antagonizma olarak yorumlanmıştır.

## Bulgular

Çalışmaya dahil edilen izolatlara çok büyük kısmı yoğun bakım ünitelerinden (101, %87.1) ve endotrakeal aspirat (ETA) örneklerinden (89, %76.7) elde edilmiştir. BD Phoenix™ ile izolatlara 64'ü (%55.2) *Acinetobacter baumannii*, 52'si (%44.8) *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* kompleks olarak tanımlanmıştır.

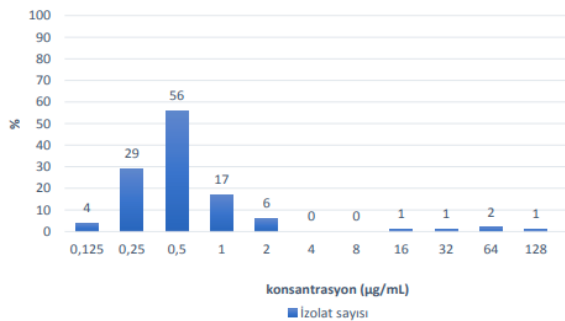
## Zamana Bağlı Öldürme Kinetiği

COL<sub>MİK</sub>:128mg/L NAC<sub>MİK</sub>:32mg/mL



Şekil 2. Kolistin-NAC kombinasyonlarının 117 numaralı izolatın log<sub>10</sub> cfu/ml değerlerine etkisinin zamana bağlı öldürme kinetiğiyle değerlendirilmesi.

## Kolistin MİK Dağılımı



Şekil 1. Kolistin MİK değerlerinin izolatlara göre dağılım grafiği.

Tablo 1. Dama tahtası yöntemiyle kolistin-NAC bileşiklerinin kombinasyonunun ve mikrolak düzeninin şematik gösterimi.

|                                                          |                  |                  |                  |                 |                 |                 |                 |                   |                    |                     |                 |
|----------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------|
| CL:128<br>NAC:16                                         | CL:64<br>NAC:16  | CL:32<br>NAC:16  | CL:16<br>NAC:16  | CL:8<br>NAC:16  | CL:4<br>NAC:16  | CL:2<br>NAC:16  | CL:1<br>NAC:16  | CL:0,5<br>NAC:16  | CL:0,25<br>NAC:16  | CL:0,125<br>NAC:16  | CL:0<br>NAC:16  |
| CL:128<br>NAC:8                                          | CL:64<br>NAC:8   | CL:32<br>NAC:8   | CL:16<br>NAC:8   | CL:8<br>NAC:8   | CL:4<br>NAC:8   | CL:2<br>NAC:8   | CL:1<br>NAC:8   | CL:0,5<br>NAC:8   | CL:0,25<br>NAC:8   | CL:0,125<br>NAC:8   | CL:0<br>NAC:8   |
| CL:128<br>NAC:4                                          | CL:64<br>NAC:4   | CL:32<br>NAC:4   | CL:16<br>NAC:4   | CL:8<br>NAC:4   | CL:4<br>NAC:4   | CL:2<br>NAC:4   | CL:1<br>NAC:4   | CL:0,5<br>NAC:4   | CL:0,25<br>NAC:4   | CL:0,125<br>NAC:4   | CL:0<br>NAC:4   |
| CL:128<br>NAC:3,2                                        | CL:64<br>NAC:3,2 | CL:32<br>NAC:3,2 | CL:16<br>NAC:3,2 | CL:8<br>NAC:3,2 | CL:4<br>NAC:3,2 | CL:2<br>NAC:3,2 | CL:1<br>NAC:3,2 | CL:0,5<br>NAC:3,2 | CL:0,25<br>NAC:3,2 | CL:0,125<br>NAC:3,2 | CL:0<br>NAC:3,2 |
| CL:128<br>NAC:1,6                                        | CL:64<br>NAC:1,6 | CL:32<br>NAC:1,6 | CL:16<br>NAC:1,6 | CL:8<br>NAC:1,6 | CL:4<br>NAC:1,6 | CL:2<br>NAC:1,6 | CL:1<br>NAC:1,6 | CL:0,5<br>NAC:1,6 | CL:0,25<br>NAC:1,6 | CL:0,125<br>NAC:1,6 | CL:0<br>NAC:1,6 |
| CL:128<br>NAC:0,8                                        | CL:64<br>NAC:0,8 | CL:32<br>NAC:0,8 | CL:16<br>NAC:0,8 | CL:8<br>NAC:0,8 | CL:4<br>NAC:0,8 | CL:2<br>NAC:0,8 | CL:1<br>NAC:0,8 | CL:0,5<br>NAC:0,8 | CL:0,25<br>NAC:0,8 | CL:0,125<br>NAC:0,8 | CL:0<br>NAC:0,8 |
| CL:128<br>NAC:0                                          | CL:64<br>NAC:0   | CL:32<br>NAC:0   | CL:16<br>NAC:0   | CL:8<br>NAC:0   | CL:4<br>NAC:0   | CL:2<br>NAC:0   | CL:1<br>NAC:0   | CL:0,5<br>NAC:0   | CL:0,25<br>NAC:0   | CL:0,125<br>NAC:0   | CL:0<br>NAC:0   |
| KALİTE KONTROL SUŞU : <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846 |                  |                  |                  |                 |                 |                 |                 |                   |                    |                     | SK              |
| CL:128                                                   | CL:64            | CL:32            | CL:16            | CL:8            | CL:4            | CL:2            | CL:1            | CL:0,5            | CL:0,25            | CL:0,125            |                 |

Tablo 2. İzolatlar ve ATCC suşunun dama tahtası yöntemiyle saptanan FİK indeksi değerleri ve kolistin-NAC kombinasyonlarına ait etkileşim tipleri.

| İzolat Numarası | Kolistin-NAC Kombinasyonlarına Ait FİK Değerleri |           |                            |      |      |      |      |      |
|-----------------|--------------------------------------------------|-----------|----------------------------|------|------|------|------|------|
|                 | MİK değeri                                       |           | NAC konsantrasyonu (mg/mL) |      |      |      |      |      |
|                 | COL µg/mL                                        | NAC mg/mL | 0,8                        | 1,6  | 3,2  | 4    | 8    | 16   |
| 15              | 0,125                                            | 32        | 1,01                       | 1,02 | 0,55 | 0,56 | 0,62 | 0,75 |
| 49              | 0,25                                             | 32        | 1,02                       | 1,05 | 1,1  | 0,62 | 0,75 | 1    |
| 83              | 0,25                                             | >32       | 1,01                       | 1,02 | 1,05 | 1,09 | 1,1  | 1,2  |
| 93              | 0,25                                             | 32        | 1,02                       | 1,05 | 1,1  | 0,62 | 0,75 | 1    |
| 80              | 0,5                                              | >32       | 0,51                       | 0,52 | 0,55 | 0,56 | 0,37 | 0,5  |
| 29              | 0,5                                              | 32        | 0,52                       | 0,55 | 0,6  | 0,62 | 0,75 | 0,75 |
| ATCC 19606      | 0,5                                              | >32       | 1,01                       | 1,02 | 1,05 | 1,06 | 0,62 | 0,75 |
| 121             | 1                                                | 4         | 0,7                        | 0,9  | 1,05 | 1,25 | -    | -    |
| 90              | 1                                                | >32       | 0,51                       | 0,52 | 0,55 | 0,31 | 0,37 | 0,5  |
| 57              | 1                                                | 32        | 1,02                       | 1,05 | 1,1  | 1,12 | 0,75 | 0,75 |
| 63              | 1                                                | 32        | 1,02                       | 1,05 | 1,1  | 1,12 | 0,75 | 1    |
| 72              | 2                                                | 32        | 0,13                       | 0,15 | 0,11 | 0,12 | 0,18 | -    |
| 67              | 2                                                | 32        | 1,02                       | 0,55 | 0,6  | 0,62 | 0,5  | 0,62 |
| 9               | 32                                               | >32       | 0,51                       | 0,15 | 0,11 | 0,09 | 0,15 | 0,28 |
| 96              | 64                                               | 32        | 0,52                       | 0,3  | 0,16 | 0,15 | 0,26 | 0,51 |
| 52              | 64                                               | >32       | 1,01                       | 0,52 | 0,17 | 0,09 | 0,15 | 0,25 |
| 117             | 128                                              | 32        | 0,52                       | 0,06 | 0,10 | 0,12 | 0,25 | -    |

FİK ≤ 0,5 sinerji  
 0,5 < FİK ≤ 1 aditif/parsiyel sinerji  
 1 < FİK ≤ 4 indifera/etkisiz olarak kategorize edilmiştir.  
 Üreme saptanmayan kombinasyonlar “ - ” ile belirtilmiştir.



SMD çalışması sonuçlarına göre 5 (%4.31) izolat kolistine dirençli, 111 (%95.68) izolat ise kolistin duyarlı olarak değerlendirilmiştir. *A. baumannii* ATCC 19606 için kolistin MİK değeri 0.5 mg/L olarak bulunmuştur. İzolatların MİK<sub>50</sub> değeri 0.5 mg/L, MİK<sub>90</sub> değeri ise 1 mg/L olarak saptanmıştır. İzolatların MİK değerlerinin sayı ve yüzdelere göre dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir. İzolatların genel antimikrobiyal duyarlılık profiline bakıldığında en büyük yüzdeyi XDR izolatlar (95, %81.8) oluştururken ve ikinci sırada MDR izolatlar (13, %11.2) yer almıştır. Kolistin dirençli izolatların hepsi aynı zamanda pandirençli olarak bulunmuştur. Bu izolatların hepsi yoğun bakım ünitelerinden gönderilen ETA örneklerinden elde edilmiştir. Bunlardan üçü *A. baumannii*, ikisi ise *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* kompleks olarak tanımlanmıştır.

Dama tahtası yöntemiyle değerlendirilen kolistin-NAC kombinasyonlarının etkileşimlerine bakıldığında kolistin duyarlı izolatlarda, özellikle kolistin MİK değeri düşük olanlarda, düşük NAC konsantrasyonlarında indeferan etki gözlenirken NAC konsantrasyonu  $\geq 4$  mg/ml üstünde aditif/parsiyel sinerjistik etki baskın hale gelmiştir. Kolistin MİK değerleri yüksek dirençli izolatlarda ise 0.8 mg/ml'de aditif/parsiyel sinerjistik etki hakimken 1.6 mg/ml ve üstü konsantrasyonlarda sinerji görülmüştür. Kolistin MİK değerlerindeki düşüş NAC konsantrasyonu artışıyla paralellik göstermiştir. MİK değerleri 32-64 mg/L arasında değişen izolatlarda kombinasyonlarda saptanan en düşük kolistin MİK değerleri 0.5-1 mg/L aralığında değişirken, MİK<sub>NAC</sub> değeri 32 mg/ml, MİK<sub>COL</sub> değeri 128 mg/L olan 117 nolu izolatta kolistin MİK değerinin  $<0.125$  mg/L kadar düşebildiği gözlenmiştir.

MİK<sub>COL</sub> değeri 128 mg/L bulunan 117 numaralı izolat için zamana bağlı öldürme kinetiği çalışmasında başlangıçtaki log<sub>10</sub>cfu/ml değerindeki saatlere göre değişimine bakıldığında; 8 mg/L kolistinle kombine edilen tüm NAC konsantrasyonlarında 4.saatte bakterisidal etki gözlenmiş, bu kombinasyonlarda 8.saatte üreme saptanmadığından bakteriyel eradikasyon olarak değerlendirilmiştir. Tek

başına ve kombine uygulama arasındaki farka bakıldığında 2 mg/L kolistin içeren kolistin-NAC kombinasyonlarındaysa sinerji saptanmıştır.

## Sonuç

Çalışmamızın sonuçları çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter* türleriyle ilişkili enfeksiyonlarının tedavisinde kolistin-NAC kombinasyonunun yeni bir seçenek olabileceğini göstermiştir. Bileşiklerin kombine kullanımda in vivo etkinliklerinin, yan etki profilinin, tedavide kullanılabilecek etkin dozların belirlenmesi için yapılacak in vivo deneyler ve klinik çalışmalarla bu bulguların desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Kolistin, N-Asetilsistein, sinerji, dama tahtası, zamana bağlı öldürme

## Kaynaklar

1. WHO. 2019. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance Annual report 2019.
2. Landini G, Di Maggio T, Sergio F, Docquier JD, Rossolini GM, Pallecchi L. Effect of high N-acetylcysteine concentrations on antibiotic activity against a large collection of respiratory pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(12): 7513-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.01334-16>
3. Dinicola S, De Grazia S, Carlomagno G, Pintucci JP. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(19):2942-8.
4. EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2016.
5. EUCAST. 2020. Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020.
6. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016;6(2):71-9. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

# ***Campylobacter* spp.’de Makrolid Direnç Mekanizmaları: Aktif Pompa, 23S rRNA, *rplD* ve *rplV* Gen Mutasyonları ve *ermB***

**Beyza Öncel, M. Ufuk Hasdemir, Burak Aksu**

*Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

✉ beyza.asker1@gmail.com

## **Giriş**

*Campylobacter* spp.’nin neden olduğu insan enfeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre *Campylobacter* enfeksiyonları, ishale seyreden dört global hastalıktan biridir ve gastroenteritin en yaygın bakteriyel nedeni olarak kabul edilmektedir<sup>(1)</sup>. Çoğu *Campylobacter* enfeksiyonunda antibiyotik kullanılsa da immün sistemi baskılanmış hastalarda, bakteriyemi durumunda, şiddetli ve uzun süren olgularda tedavi gerekebilir. Bu durumlarda öncelikle tercih edilen makrolid grubunun, başka insan enfeksiyonlarında, gıda endüstrisinde ve veterinerlikte yaygın kullanımıyla bu antibiyotiğe direnç oranları artmaktadır<sup>(2,3)</sup>. *Campylobacter* spp.’de makrolid direnci mekanizmaları; ribozomal hedef değişikliği, aktif ilaç pompaları, membran geçirgenliğindeki değişikliklerdir<sup>(4,5)</sup>. Çalışmamızda, klinik örneklerden izole edilen *Campylobacter* spp. izolatlarında eritromisin direncinden sorumlu mekanizmalardan, 23S rRNA gen bölgesindeki mutasyonları, L4 ve L22 ribozomal proteinlerindeki aminoasit değişimlerini, *ermB* varlığını araştırmayı ve efluks pompasının dirençteki rolünü belirlemeyi amaçladık.

## **Gereç ve Yöntem**

Hastanemizde 2017-2018 yılları arasında izole edilen ve disk difüzyon (DD) yöntemiyle eritromisine dirençli bulunan yedi *Campylobacter* spp. izolatı çalışmaya dahil edildi. İzolatların eritromisin minimum inhibitör konantrasyon (MİK) değerleri, ‘Resistance-nodulation-cell division’ (RND) tipi aktif pompa inhibitörü olan phenyalanin-arginin β-naphthylamide dihydrochloride (PAβN) varlığında (25 µg/mL) ve yokluğunda, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile EUCAST v.10.0’a göre belirlendi. PAβN varlığında eritromisin MİK değerlerindeki değişimler kaydedildi. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 ve efluks pompasını aşırı eksprese ettiği bilinen *Escherichia coli* AG102 suşları kalite kontrol izolatları olarak kullanıldı.

Çalışmaya alınan yedi *Campylobacter* spp. izolatında eritromisin direncine neden olabilecek diğer mekanizmaları araştırmak için ‘Single cell lysing buffer’ (SCLB) protokolü ile total hücre DNA’ları elde edildi. 23S ribozomal DNA V. bölgesi, L4 ve L22 proteinlerini kodlayan genler Gibreel ve arkadaşlarının, *ermB* gen bölgesi ise Zhang ve ark.nın<sup>(6)</sup> yaptığı çalışmalarda bahsedilen primerler kullanılarak çoğaltıldı<sup>(4,6)</sup>. Polimeraz zincir reaksiyonu ile doğru büyüklükte ampikon uzuluğuna sahip bant görülen ürünlerin, tanımlanma laboratuvarına (Eurofins Genomics, Almanya) gönderilerek DNA dizilemeleri yapıldı. Dizileme

analizi GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) adresi üzerinden, eritromisine duyarlı olduğu ve mutasyon saptanmadığı bilinen *C. jejuni* NCTC 11168 suşu referans alınarak yapıldı.

## **Bulgular**

Sıvı mikrodilüsyon testinde altı izolatın eritromisin MİK değeri ≥64 mg/L; bir *Campylobacter coli* izolatının ise 2 mg/L olarak saptanmıştır. Bu izolatların DD testindeki zon çapları incelendiğinde, eritromisin MİK değerleri ≥64 mg/L olan izolatların 6 mm, MİK değeri 2 mg/L olan izolatın 22 mm zon çapı olduğu görülmüştür. Bu sonuç, EUCAST’ın *C. coli*’de eritromisin için belirttiği 24 mm olan klinik sınır değere yakın sonuç veren bu gibi izolatlarda dikkatli olunması gerektiğine işaret etmektedir.

Aktif pompa inhibitörü varlığında yapılan SMD testinde PAβN, yedi izolatın hepsinin eritromisin MİK değerlerinde en az 4 katlık düşüşe yol açarak, izolatlarımızın eritromisin direncinde efluksun etkin rolü olduğunu açıkça göstermiştir (Tablo 1). Bir izolatla eritromisin MİK’i, PAβN varlığında duyarlı kategorisine geçmiş, ancak çoğu izolatın (SSC 69, SSC 77, SSC 89, SSC 111, SSC 126) MİK değerlerindeki düşüş, eritromisine duyarlı kategoriye girmesine yetmemiştir. Bu durum izolatlardaki eritromisin direncine başka mekanizmaların da eşlik ettiğini düşündürmüştür. Efluks pompasının, *Campylobacter* türlerinde düşük düzey makrolid direnci ile ilişkili olduğu, fakat eşlik eden 23S rRNA mutasyonları ile yüksek düzey makrolid direncinin de görülebileceği bildirilmiştir<sup>(7,8)</sup>.

Sıvı mikrodilüsyon testinde MİK’i ≥64 mg/L bulunan altı izolatın hepsinin 23S rRNA bölgesinde A2075G mutasyonu saptandı (Tablo 1). Bu mutasyona, MİK değeri 2 mg/L bulunan *C. coli* izolatında rastlanmadı. Bu bulgu, A2075G mutasyonun eritromisine dirençli *Campylobacter* izolatlarında en sık rastlanan ve yüksek düzey dirençle ilişkilendirilen mekanizma olduğu bilgisini desteklemektedir<sup>(9,10)</sup>. Yapılan çalışmalarda A2074C ve A2074G mutasyonları da eritromisin direnciyle ilişkilendirilse de çalışmamızda bu mutasyonlara rastlanmamıştır<sup>(11)</sup>. Çalışmamızda, SSC 36, SSC 77, SSC 111’de A2075G mutasyonu ile birlikte, SSC 97’de de tek başına olmak üzere dört izolatla C2113T mutasyonu gözlenmiştir (Tablo 1). Saptanan bu mutasyonun, eritromisine duyarlı suşlarda da görülmesi, yüksek düzey eritromisin direnciyle ilişkili olmadığı düşündürmüştür.

Dört izolatla L22 proteininde, I65V, A74G, S109A; bir izolatla L4 proteininde V121A ve T177S alterasyonları

**Tablo 1. *Campylobacter* izolatlarının, eritromisine direnç için araştırılan gen bölgelerinde saptanan nükleotit/aminoasit değişiklikleri.**

| Kökenler                    | Eritromisin MİK (mg/L) <sup>a</sup> | Nükleotit/aminoasit değişiklikleri |                 |                   |
|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------|-------------------|
|                             |                                     | 23S rRNA (nükleotit)               | L4 (aminoasit)  | L22 (aminoasit)   |
| SSC 36 <i>C. coli</i>       | 64 (2)                              | A2075G, C2113T                     | -               | I65V, A74G, S109A |
| SSC 69 <i>C. jejuni</i>     | 128 (32)                            | A2075G                             | -               | -                 |
| SSC 77 <i>C. coli</i>       | 128 (32)                            | A2075G, C2113T                     | -               | I65V, A74G, S109A |
| SSC 89 <i>C. jejuni</i>     | 64 (8)                              | A2075G                             | -               | -                 |
| SSC 97 <i>C. coli</i>       | 2 (<0.25)                           | C2113T                             | -               | I65V, A74G, S109A |
| SSC 111 <i>C. jejuni</i>    | 128 (8)                             | A2075G, C2113T                     | -               | I65V, A74G, S109A |
| SSC 126 <i>C. jejuni</i>    | 128 (32)                            | A2075G                             | V121A, T177S    | -                 |
| ATCC 33560 <i>C. jejuni</i> | 1 (0.125)                           | -                                  | TE <sup>b</sup> | I65V, S109A       |
| NCTC 11168 <i>C. jejuni</i> | 1 (0.125)                           | -                                  | -               | -                 |

<sup>a</sup> Parantez içindeki değerler, 25 µg/mL PA6N varlığındaki eritromisin MİK değerleridir.

<sup>b</sup> TE: Test edilmedi.

ATCC 33560: Duyarlılık testlerinde kalite kontrol kökeni olarak kullanılmıştır.

NCTC 11168: Eritromisine direnç için araştırılacak gen bölgelerinde mutasyon olmadığı bilinen "wild type" suştur.

bulundu. I65V ve S109A değişimleri, eritromisine duyarlı *C. jejuni* ATCC suşunda da saptandı. SSC 97 ve *C. jejuni* ATCC 33560 gibi duyarlı suşlarda da bu aminoasit değişikliklerinin görülmesi, dirençli izolatlardaki mekanizmayı açıklamada bu değişimlerin yeterli olmayacağını düşündürmektedir. Literatürdeki çalışmalarda eritromisine dirençli ve duyarlı izolatlarda, L4 ve L22 ribozomal proteinlerinde birçok aminoasit değişikliğine rastlanmış, bu mekanizma *Campylobacter*'de düşük düzey makrolid direnciyle ilişkilendirilmiştir<sup>(5,9,12)</sup>.

*Campylobacter*'lerde *ermB* geni taşıdığı belirlenen ilk suşun, 2014 yılında, Çin'de bir domuzdan izole edilen *C. coli* ZC113 suşu olduğu rapor edilmiştir<sup>(13)</sup>. Dirençten sorumlu diğer mekanizmaların saptanamadığı izolatlarda da bulunup yüksek düzey makrolid direncine neden olabileceği belirtilse de çalışmamızda yedi izolatın hiçbirinde kazanılmış eritromisin direnç geni, *ermB*, saptanmamıştır.

## Sonuç

Çalışmamızda, gastroenteritin en sık bakteriyel nedeni olarak kabul edilen *Campylobacter* spp. tedavisinde ilk tercih haline gelen makrolidlerin direnç mekanizmaları araştırılmıştır. İzolatlarımızda eritromisin direncinden, başta 23S rRNA gen bölgesindeki A2075G mutasyonu olmak üzere RND tipi bir aktif pompanın sorumlu olduğunu gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Campylobacter*, makrolid, direnç

## Kaynaklar

1. WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter> [Erişim tarihi:3.Ocak.2021].
2. Wimalaratna HM, Richardson JF, Lawson AJ, et al. Widespread acquisition of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates from UK retail poultry and evidence for clonal expansion of resistant lineages. BMC Microbiol. 2013;13:160. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-160>
3. Gibreel A, Taylor DE. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Antimicrob Chemother. 2006;58(2):243-55. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl210>

4. Gibreel A, Kos VN, Keelan M, et al. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(7):2753-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2753-2759.2005>
5. Lim SK, Moon DC, Chae MH, et al. Macrolide resistance mechanisms and virulence factors in erythromycin-resistant *Campylobacter* species isolated from chicken and swine feces and carcasses. J Vet Med Sci. 2016;78(12):1791-5. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0307>
6. Zhang A, Song L, Liang H, et al. Molecular subtyping and erythromycin resistance of *Campylobacter* in China. J Appl Microbiol. 2016;121(1):287-93. <https://doi.org/10.1111/jam.13135>
7. Gibreel A, Wetsch NM, Taylor DE. Contribution of the CmeABC efflux pump to macrolide and tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agent Chemother. 2007;51(9):3212-6. <https://doi.org/10.1128/AAC.01592-06>
8. Mamelli L, Prouzet-Mauléon V, Pagès J-M, Mégraud F, Bolla J-M. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: Role of efflux pumps and target mutations. J Antimicrob Chemother. 2005;56(3):491-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dki253>
9. Corcoran D, Quinn T, Cotter L, Fanning S. An investigation of the molecular mechanisms contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. Int J Antimicrob Agents. 2006;27(1):40-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.08.019>
10. Cheng Y, Zhang W, Lu Q, et al. Point deletion or insertion in CmeR-Box, A2075G substitution in 23S rRNA, and presence of *erm(B)* are key factors of erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from Central China. Front Microbiol. 2020;11:203. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00203>
11. Vacher S, Menard A, Bernard E, Santos A, Megraud F. Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. by real-time PCR. Microb Drug Resist. 2005;11(1):40-7. <https://doi.org/10.1089/mdr.2005.11.40>
12. Lehtopolku M, Kotilainen P, Haanperä-Heikkinen M, et al. Ribosomal mutations as the main cause of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(12):5939-41. <https://doi.org/10.1128/AAC.00314-11>
13. Qin S, Wang Y, Zhang Q, et al. Report of ribosomal RNA methylase gene *erm(B)* in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. J Antimicrob Chemother. 2014;69(4):964-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt492>

# Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Kan İzolatlarında Seftazidim-Avibaktam Duyarlılığının Üç Farklı Yöntemle Araştırılması

Ekin Kırbaş<sup>1</sup>, Murat Akova<sup>2</sup>, Banu Sancak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

✉ ekinkirbas@hacettepe.edu.tr

## Giriş

$\beta$ -Laktam antibiyotikler etkinlik, güvenilirlik ve geniş etki spektrumu sebebiyle enfeksiyonlarda en sık kullanılan antibiyotikler arasındadır. Azetidinon molekülüne bağlı farklı yapısal elemanlara göre penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve aztreonam olmak üzere dört ana gruba ayrılan  $\beta$ -laktamlar; bakteri hücre duvarında peptidoglikan çapraz bağlanmasını katalize eden transpeptidaz-transglukozilaz enzim aktivitesine sahip penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanarak etkinlik göstermektedir.  $\beta$ -laktam halkası açıl-D-Ala-D-Ala'nın yapısal analogudur.  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler ve D-Ala-D-Ala arasındaki yapısal benzerlik antibiyotiğin PBP'nin aktif bölgesine bağlanmasını sağlar ve transpeptidasyon reaksiyonunu inhibe ederek bakteri hücresinin lizis ve ölümüne yol açar.  $\beta$ -laktamazlar,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin siklik amid bağını hidrolize ederek halkayı açan ve penisiloid asit türevine dönüştüren enzimlerdir. Klasik  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri olan klavulanik asit ve sulbaktam yalnızca sınıf A  $\beta$ -laktamazları inhibe edebilmektedir. Yeni  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri olan vaborbaktam ve relebaktam ise sınıf A  $\beta$ -laktamazlara ek olarak bazı sınıf C  $\beta$ -laktamazları da inhibe edebilmektedir. Sentetik non- $\beta$ -laktam bir  $\beta$ -laktamaz inhibitörü olan avibaktam hem sınıf A hem sınıf C hem de bazı sınıf D  $\beta$ -laktamazları inhibe edebilmektedir.

## Gereç ve Yöntem

Ocak 2016- Ağustos 2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole edilmiş 167 adet karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli *K.pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatların seftazidim-avibaktam duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemi (BMD), gradyent test yöntemi (E-test, bioMérieux, Fransa) ve BMD temelli seftazidim-avibaktam duyarlılığını saptayan ticari test kiti (Sensititre, ThermoFisher Scientific, ABD) ile çalışılmıştır. Gradyent test ve Sensititre testi ile saptanan seftazidim-avibaktam duyarlılık sonuçları, altın standart yöntem olan BMD ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar EUCAST kılavuzunda belirlenmiş olan duyarlılık sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir.

## Bulgular

Çalışmada sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile seftazidim-avibaktam için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) aralığı, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla <0.06 - >128

$\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  ve >128  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir. Sıvı mikrodilüsyon ve gradyent testi sonuçlarına göre, 169 karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatının %20.1'i (n=34) seftazidim-avibaktama dirençli olarak saptanmıştır. Sensititre testi ile sonuçlarına göre, testin uygulandığı 162 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatının %21.6' i (n=35) seftazidim-avibaktama dirençli olarak saptanmıştır. Seftazidim-avibaktam gradyent testinin, altın standart yöntem olan BMD'a göre duyarlılığı %93.9, özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır. Sensititre testinin, altın standart yöntem olan BMD yöntemine göre duyarlılığı %96.9, özgüllüğü %97.6 olarak saptanmıştır.

## Sonuç

Çalışmada sıvı mikrodilüsyon ve gradient test yöntemleri ile %20.1 seftazidim-avibaktam direnci saptanmıştır. Altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon ile karşılaştırıldığında gerek gradient test gerek Sensititre kitiyle elde edilen sonuçların hem duyarlılık hem özgüllükleri yüksek olarak saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında seftazidim-avibaktam direncinin tespit edildiği çalışmalar mevcuttur. Dolayısıyla rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında seftazidim-avibaktam duyarlılıklarının çalışılması tedaviye yön vermesi açısından oldukça önemlidir.

Ülkemizde en sık OXA-48 karbapenemazlar görülmekle birlikte, başta NDM olmak üzere seftazidim-avibaktama dirençli metallo- $\beta$ -laktamazlar da saptanmaktadır. Bunun yanı sıra, son yıllarda saptanan OXA-48 varyantlarında da seftazidim-avibaktam direnci tespit edilmiştir. Dolayısıyla, seftazidim-avibaktam direnci saptanan *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz genlerinin moleküler yöntemlerle araştırılmasının ve OXA-48 geni tespit edilen izolatlarda OXA-48 genindeki olası değişikliklerin araştırılmasının gerekli olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** *Klebsiella pneumoniae*, karbapenem direnci, seftazidim-avibaktam

## Kaynaklar

1. Wilson WR, Kline EG, Jones CE, et al. Effects of KPC variant and porin genotype on the in vitro activity of meropenem-vaborbactam against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(3):e02048-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02048-18>
2. van Duin D, Lok JJ, Earley M, et al. Colistin versus ceftazidime-

- avibactam in the treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Clin Infect Dis. 2018;66(2):163-71.  
<https://doi.org/10.1093/cid/cix783>
3. Castanheira M, Mills JC, Costello SE, Jones RN, Sader HS. Ceftazidime-avibactam activity tested against Enterobacteriaceae isolates from U.S. hospitals (2011 to 2013) and characterization of  $\beta$ -lactamase-producing strains. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(6):3509-17.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00163-15>
  4. Flamm RK, Farrell DJ, Sader HS, Jones RN. Ceftazidime/avibactam activity tested against Gram-negative bacteria isolated from bloodstream, intra-abdominal and urinary tract infections in US medical centres (2012). J Antimicrob Chemother. 2014;69(6):1589-98.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dku025>



# Sjögren Sendromu, Romatoid Artrit ve Behçet Hastalarında BK Virüsün Araştırılması

Murat Türken<sup>1</sup>, Mustafa Yılmaz<sup>2</sup>, Ahmet Karataş<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Elazığ Ruh Sağlığı Hastanesi, Elazığ

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

<sup>3</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ

✉ muratturkenmur@gmail.com

## Giriş

Antibiyotik direnci, her geçen gün artan ve tüm dünyayı tehdit eden önemli bir sorundur<sup>(1)</sup>. 2050 yılında, antibiyotik direnci sebebiyle yılda on milyondan fazla ölüm ve 100 milyar dolardan fazla maddi kayıp beklenmektedir<sup>(2)</sup>. COVID-19 pandemisi de 2020 yılının başından bu zamana kadar hız kazanarak devam eden büyük toplumsal ve sağlık sorunlarına sebep olmuştur<sup>(3)</sup>. Şuan, COVID-19 sebebiyle 79.2 milyondan fazla insan enfekte olmuş, bunlarında 1.7 milyondan fazlasının yaşamını yitirdiği bilinmektedir<sup>(4)</sup>. Sekonder bakteriyel enfeksiyon (SBE) ile beraber hastalığı geçirenlerde artmış ölüm ve sekel oranları bildirilmiştir<sup>(5)</sup>. Ayrıca, viral faktörlerin immün yanıtı bozarak hücre ve doku yıkımını arttırması sebebiyle bakteriyel enfeksiyonların ortaya çıkması konusunda yatkınlığa sebep olduğu da bilinmektedir<sup>(6,7)</sup>.

COVID-19 hastalarında hastaneye yatırılma ihtiyacı duyan hastalar çoğunlukla 60 yaşından büyük hastalardır<sup>(8)</sup>. Önceki çalışmalarda hastaneye yatan hastaların özellikle sekonder bakteriyel enfeksiyona ve hastalığın ölüm, morbitide gibi sonuçlarına daha duyarlı olduğu gösterilmiştir<sup>(9)</sup>. Sekonder bakteriyel enfeksiyonların COVID-19 hastaları arasında %7 ile %15 arasında görüldüğü bildirilmiştir<sup>(10-12)</sup>.

SBE'ler, Wuhan'dan yapılan bir çalışmada COVID-19 hastalarının %15'inde görülmesine rağmen ölen hastaların %50'sinde görülmüştür<sup>(13)</sup>. Bu durum sebebiyle geniş spektrumlu ampirik antibiyotik kullanımı olası bakteriyel enfeksiyonları önlemek ve tedavi etmek amacıyla sıkça uygulanmıştır<sup>(12,14,15)</sup>. Ayrıca, kişisel koruyucu ekipman (KKE) kullanımı ve sağlık çalışanlarının el hijyeni alışkanlıklarının önemli ölçüde değiştiği bildirilmektedir<sup>(16)</sup>. Bununla birlikte, personel ve KKE eksiklikleri olması durumunda bakteriyel etkenlerin bulaşında artma olabileceği gibi pandemi öncesine göre daha fazla kullanılan ekipmanların ve artan el yıkama alışkanlıklarının iyi yönde değişmesinin bulaşı azaltma ihtimali de araştırılmalıdır. Bu durumu araştırmak ve antibiyotik uygulamaları için etkenlerin direnç profillerinin ve etiyolojilerinin incelenmesi, gelişmekte olan ülkeler için de pandemi döneminde özellikle önem arz etmektedir<sup>(17)</sup>.

Bu çalışmada; COVID-19 hastalarındaki sekonder enfeksiyon etkenleri, etkenlerin antibiyotik direnç durumları ve pandemi öncesine göre direnç durumlarının değişiminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Ege Üniversitesi (EÜ) Hastanesi'nde yapılmıştır ve veriler 15 Aralık 2019 ile 15 Haziran 2020 arasını kapsamaktadır. 15 Aralık 2019 ile 15 Mart 2020 arası pandemi öncesi dönem, 15 Mart 2020 ile 15 Haziran 2020 arası Türkiye'de pandeminin ilk üç ayı olarak değerlendirilmelidir.

Hastalardan alınarak EÜ hastanesine yollanan kan, solunum yolu, idrar yolu örnekleri ve diğer (gastrointestinal sistem örnekleri, doku vb) örneklerin kültür sonuçları, antibiyotik duyarlılık sonuçları mikrobiyoloji veri tabanından alınarak geriye dönük olarak incelenmiştir. Çalışma, Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu (No:20 – 9T / 75) ve Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmıştır.

## Bulgular

Toplamda 3532 hastadan alınan 4859 kültürde üreme gösteren örnek araştırma kapsamında incelendi. Pandemi öncesi döneme ait 3034 örnek 2143 hastadan, pandemi sırasındaki dönemde 1304 hastadan 1702 örnek ve toplam 1447 COVID-19 hastasından 85'inde 123 adet bakteriyel enfeksiyon etkeni tespit edildi.

**Pandemiden önce:** Örneklerin çoğu idrar yolu (1472, %48.52) ve solunum yolu (balgam, bronkoalveoler lavaj vb) (540, %17.32) örnekleriydi. *Escherichia coli* (766, %23.55), *Klebsiella pneumoniae* (324, %11.56), *Pseudomonas aeruginosa* (254, %8.37) tüm bakteriyel etkenler arasında en sık görülen gruplar olarak belirlenmiştir. Geniş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten Enterobacterales diğer çoklu ilaç direnci (ÇİD) olan etkenler arasında en çok (630, %20.76) görülen etken grubu olarak gözlenmiştir.

**Pandemi sırasında:** Etkenler en çok idrar (796, %46.77) ve kandan (276, 16.22%) izole edildi. En sık görülen etkenler *E. coli* (447, %26.26), *K. pneumoniae* (197, %11.57), *P. aeruginosa* (136, %7.99) oldu (Tablo 1). GSBL üreten Enterobacterales (353, %20.74) en sık ÇİD gösteren bakteri grubu olarak ve karbapenemaz üreten Enterobacterales en sık ikinci ÇİD direncine sahip bakteri grubu olarak belirlendi (62, 3.64%). COVID-19 hastaları bu grup dışında tutularak ayrıca incelenmiştir.

**COVID-19 Hastaları:** Toplam 1447 COVID-19 hastasının (ayaktan ve yatan) 85'inde 123 bakteriyel enfeksiyon etke-



ni tespit edilmiştir. 52 (%3.59) hastada sekonder bakteriyel enfeksiyon ve 38 hastada (%2.62) hastada da bakteriyel koenfeksiyon varlığı gözlenmiş, 5 hastada koenfeksiyon varlığında sekonder enfeksiyon gelişimi kaydedilmiştir. 24 hastadan (%28.24) birden çok etken izole edilmiş 61 hastada (%71.76) tek bakteriyel patojen izole edilebilmiştir. Etkenlerin çoğu idrar (56, %43.90) ve alt solunum yolu örneklerinden (48, %39.02) izole edilmiş olup, en sık etkenler *E. coli* (22, %17.89), *K. pneumoniae* (15, %12.2) ve *Acinetobacter baumannii* (12, %9.76)'dir. Toplam 123 etkenin 78'i (%63.41) hastanın hastaneye yatışından 2 gün sonra alınmış olup hastane enfeksiyonu olarak nitelendirilmiştir.

En çok izole edilen etken olan *E. coli*'nin %81.81(18) tanesi idrar örneklerinden tespit edilmiştir. Bununla beraber, *A. baumannii* alt solunum yolu enfeksiyonlarında en sık görülen enfeksiyon etkeni (10, %21.78) olarak ortaya çıkmıştır (Tablo 2). İzole edilen *A. baumannii* suşlarının hepsi karbapenem dirençlidir.

Daha önceki "severe acute respiratory syndrome" (SARS) ve "middle east respiratory syndrome" (MERS) epidemilerinden, invaziv mekanik ventilasyon tedavisi alan hastaların sekonder enfeksiyonlara daha yatkın olduğu ve sağkalımın bu durumda azaldığı bilinmektedir<sup>(18)</sup>. Bizim çalışmamızda tüm COVID-19 hastaları içerisinde (yatan ve ayaktan başvuran) bakteriyel koenfeksiyonlar ve sekonder bakteriyel enfeksiyonlar sırasıyla %2.62 ve %3.59 oranında tespit edilmiştir. Tüm hastalar içerisindeki düşük bakteriyel koenfeksiyon ve sekonder bakteriyel enfeksiyon birlikteliği düşünüldüğünde geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımında dikkatli olunmasının gerekliliği akıldan çıkarılmamalıdır.

Pandemi döneminde hastalarda %40.55'lik bir azalma meydana gelirken kültür pozitif örneklerde de %43.9'luk bir azalma meydana gelmiştir. Cerrahi işlemlerin, hastaneye yatışların kısıtlanması ve pandeminin ilk döneminde hastanede yoğunluğun minimuma indirilmesi sebebiyle bu düşüşler normal olarak karşılanabilir. Bununla beraber, hastanemizde *Staphylococcus aureus* içerisinde metisilin dirençli olanların oranının pandemi öncesinde %27.46 iken COVID-19 grubunda %18.18'e düştüğü belirtilmiştir. Cerrahi işlemlerin kısıtlanması sebebiyle ve COVID-19 hastalarından doku örneklerinin alınmasının daha az olması bu durum açıklanabilir. Ayrıca, çalışmamızda COVID-19 grubunda *A. baumannii* oranlarında pandemi öncesi ( $p=0.002$ ) ve pandemi grubuna ( $p=0.001$ ) göre iki kattan fazla bir artış gözlemlenmiştir. *A. baumannii*'lerin çoğunun (10, %83.33) solunum yolundan izole edilmesi ve solunum yolu bakteriyel enfeksiyonlarının COVID-19 grubunda belirgin artışı ( $p=0.001$ ) sebebiyle bu değişimin gerçekleştiği değerlendirilebilir. Ayrıca, New Jersey'den yapılan bir çalışmada, karbapenem dirençli *A. baumannii* sayılarının özellikle COVID-19 hastalarında diğer gruplardan sık görüldüğü ve çoğunun yoğun bakımda tedavi gören hastalardan izole edildiği belirtilmiştir<sup>(19)</sup>.

## Sonuç

Antibiyotik direnci, COVID-19 gibi devam eden, yavaş ilerliyor olsa da daha az önemli olmayan bir şekilde önemini sürdürmektedir. Bu kapsamda akılcı antibiyotik kullanımı konusunda çalışmaların devam etmesi ve daha da gelişti-

rilmesi önemlidir. Bununla beraber, COVID-19'un hastane temizlik şartlarında, çalışan davranışlarında yarattığı değişim ve dirençli suşların hastalar arasındaki yayılımına etkisi halen tam olarak belirlenebilmiş değildir. Sonraki çalışmalarda etkenler ve klinik bilgilerin (kataterizasyon, girişim vb) beraber incelenmesi ile bu durum netlik kazanabilecektir.

**Anahtar kelimeler:** COVID-19; antibiyotik direnci; sekonder bakteriyel enfeksiyon; bakteriyel koenfeksiyon

## Kaynaklar

1. Nieuwlaat R, Mbuagbaw L, Mertz D, et al. Coronavirus disease 2019 and antimicrobial resistance: Parallel and interacting health emergencies. Clin Infect Dis. 2020;ciaa773. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa773>
2. O'Neill J. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. 2014. [http://www.jpiamr.eu/wp-content/uploads/2014/12/AMR-Review-Paper-Tackling-a-crisis-for-the-health-and-wealth-of-nations\\_1-2.pdf](http://www.jpiamr.eu/wp-content/uploads/2014/12/AMR-Review-Paper-Tackling-a-crisis-for-the-health-and-wealth-of-nations_1-2.pdf) (Erişim tarihi: Ocak.2021)
3. Sher L. The impact of the COVID-19 pandemic on suicide rates. QJM. 2020;113(10):707-712. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcaa202>
4. WHO. COVID-19 Weekly Epidemiological Update. 2020;1:4. <https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20201012-weekly-epi-update-9.pdf> (Erişim tarihi: Ocak.2021)
5. Zhang H, Zhang Y, Wu J, et al. Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):1958-64. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1812437>
6. Morris DE, Cleary DW, Clarke SC. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics. Front Microbiol. 2017;8:1041 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01041>
7. Liderot K, Ahl M, Özenci V. Secondary bacterial infections in patients with seasonal influenza a and pandemic H1N1. Biomed Res Int. 2013;2013: 376219 <https://doi.org/10.1155/2013/376219>
8. Li X, Xu S, Yu M, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. J Allergy Clin Immunol. 2020;146(1):110-8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.006>
9. Zhang H, Zhang Y, Wu J, et al. Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):1958-64. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1812437>
10. Li J, Wang J, Yang Y, et al. Etiology and antimicrobial resistance of secondary bacterial infections in patients hospitalized with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective analysis. 2020;9(1):153 <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00819-1>
11. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020;395(10223):497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
12. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet. 2020;395(10229):1054-62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
13. Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. Lancet Respir Med. 2020;8(5):475-81. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)
14. Rothe K, Feihl S, Schneider J, et al. Rates of bacterial co-

- infections and antimicrobial use in COVID-19 patients: a retrospective cohort study in light of antibiotic stewardship. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;1-11.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-020-04063-8>
15. Sivapalan P, Sivapalan P, Ulrik CS, et al. Proactive prophylaxis with azithromycin and hydroxychloroquine in hospitalised patients with COVID-19 (ProPAC-COVID): A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2020;21(1):513.  
<https://doi.org/10.1186/s13063-020-04409-9>
  16. Metin N, Turan Ç, Utlu Z. Changes in dermatological complaints among healthcare professionals during the COVID-19 outbreak in Turkey. *Acta Dermatovenerologica Alp Pannonica Adriat*. 2020;29(3):115-22.  
<https://doi.org/10.15570/actaapa.2020.25>
  17. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: Implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis*. 2008;198(7):962-70.  
<https://doi.org/10.1086/591708>
  18. Yap FHY, Gomersall CD, Fung KSC, et al. Increase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition rate and change in pathogen pattern associated with an outbreak of severe acute respiratory syndrome. *Clin Infect Dis*. 2004;39(4):511-6.  
<https://doi.org/10.1086/422641>
  19. Perez S, Innes GK, Walters MS, et al. Increase in hospital-acquired carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection and colonization in an acute care hospital during a surge in COVID-19 admissions - New Jersey, February-July 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(48):1827-31.  
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6948e1>

# COVID-19 Hastalık Sürecinde Oluşan Antikorların Belirlenmesinde Kullanılan Yedi Platformun Analitik Performansının Değerlendirilmesi

Ayşe İstanbullu Tosun, Filiz Yarımcan

*İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

✉ filizyarimcan@hotmail.com

## Giriş

COVID-19'un laboratuvar tanısı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile SARS-CoV-2'ye ait genlerin tespiti şeklinde yapılmaktadır. Bununla birlikte, SARS-CoV-2'ye ait proteinlere karşı geliştirilen antikorları tespit etmeye yönelik pek çok serolojik kit de geliştirildi. Salgının başlangıcında, daha serolojik yanıtın nasıl olduğu konusunda bilgi yokken, hastalığa tanı koymak amacıyla geliştirilen bu kitlerin, akut fazda antikor gelişmediğinin görülmesiyle tanıda kullanılmayacakları anlaşılmış olsa da, tipik klinik ve radyolojik bulguların olduğu, ancak PCR testinin negatif bulunduğu olguların tanısında oldukça fayda sağlayan testlerdir. Ayrıca, seroprevalans çalışmalarında ve asemptomatik olarak hastalığı geçiren bireylerin belirlenmesinde bu testler kullanılmaktadır. Aşı uygulamalarına başlamadan önce ve aşının etkinliğinin tespitinde de serolojik testlerin önemi daha iyi anlaşılabacaktır.

Piyasada bulunan SARS-CoV-2 serolojik testleri pek çok açıdan farklılık taşır. Bazı kitler nükleokapsid proteinine karşı oluşan antikorları tespit etmek üzere geliştirilmişken, bazıları spike proteinine karşı, bazıları da her ikisine karşı geliştirilmiştir. Nispeten ucuz ve kolay üretilen kaset testlerden, rutin laboratuvarlarda yerini almış otoanalizörlerde kullanıma uygun olacak şekilde değişik teknolojiler kullanılarak geliştirilmiştir.

COVID-19'da oluşan immünolojik yanıtta, antikorlar belirtilerin başlangıcından yaklaşık 10 gün sonra ortaya çıkmaktadır. IgM ve IgG serokonversiyonu genellikle aynı anda gerçekleşmektedir<sup>(1)</sup>. SARS-CoV-2'ye karşı gelişen antikorlar, mevsimlik diğer koronavirüslerde olduğu gibi, zamanla kaybolmaktadır. IgM tipi antikorlar belirtilerin başlangıcından yaklaşık bir ay, IgG tipi antikorlar da yaklaşık olarak iki ay sonra pik yapar ve düşmeye başlar, birkaç ay içinde de kaybolur<sup>(2)</sup>. Bu şekildeki immün yanıtta 'IgM tipi antikor akut enfeksiyon, IgG tipi antikor geçirilmiş enfeksiyon' şeklinde klasik yorum yapılamayacağı için bakılan antikor tipinin bir önem taşımadığı anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, bu kitler geliştirilirken hastalığıdaki immün yanıt bilinmediğinden IgM, IgA, IgG ve total antikor tespit eden kitler bulunmaktadır.

Bu çalışmada amacımız, yedi tane platformun ürettiği anti-SARS-CoV-2 seroloji kitlerinin analitik performansını değerlendirmektir.

## Gereç ve Yöntem

Piyasada anti-SARS-CoV-2 antikorlarını insan serumunda

tespit etmeyi amaçlayan kit üreten yedi platform çalışmaya dâhil edildi.

Abbott Architect anti-SARS-CoV-2 IgG kiti ile nükleokapsit proteinine karşı oluşan IgG tipindeki antikorlar chemiluminescent magnetic microparticle immunoassay (CMIA) yöntemiyle belirlenmektedir.

Roche Elecsys SARS-CoV-2 kitiyle nükleokapsit proteinine karşı oluşan total antikorlar electrochemiluminescent (ECLIA) yöntemiyle tespit edilmektedir.

SNIBE MAGLUMI SARS-CoV-2 IgM/IgG kitiyle hem nükleokapsit hem spike proteinine karşı IgM antikorları için immunocapture chemiluminescent immunoassay (CLIA), IgG antikorları için indirekt CLIA yöntemiyle tespit etmektedir.

AFIAS COVID-19 Ab kiti ve GeTein SARS CoV-2 kiti benzer şekilde kart testlerin cihazda okunması esasına çalışmaktadır. Kaset testte kontrol çizgisinde oluşan floresan ışımaya ile test çizgisindeki floresan ışımaya miktarları oranlanarak bir endeks değeri elde edilip sonuç raporlanmaktadır. Bu teknoloji de Floresan Immunoassay (FIA) olarak adlandırılmaktadır. AFIAS'ta nükleokapsit proteinine karşı oluşan antikorlar, GeTein'de nükleokapsid ve spike proteinine karşı oluşan antikorlar tespit edilmektedir.

Lifotronic SARS-CoV-2 IgM/IgG kiti de nükleokapsit proteinine karşı oluşan IgM ve IgG tipi antikorları ayrı ayrı ECLIA yöntemiyle test etmektedir.

BioMerieux VIDAS SARS-CoV-2 kiti spike proteinine karşı oluşan IgM ve IgG için ayrı ayrı kitlerde Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA) teknolojisiyle çalışmaktadır.

Tüm bu kitler, üreticinin tavsiye ettiği şekilde, kendi cihazlarında çalışıldı.

Kit performans ölçümlerinin yapılması için SARS-CoV-2 antikorları için pozitif ve negatif olan serumlardan 'pozitif' ve 'negatif' gruplar oluşturuldu. Her iki grupta da 13 kadın ve 17 erkek sağlık çalışanının serumundan oluşmaktaydı. Negatif grupta yaş ortalaması 37.2±10.2 yıl (8 ile 63 yaş arası), pozitif grupta 32.9±10.2 yıl (10-47 yaş arası) olarak tespit edildi. Pozitif grubu oluşturan kişilerin 19'u COVID-19 geçirdiğini, PCR pozitif sonuç ile biliyordu. Geride kalan 11 kişiden üçü her ne kadar PCR pozitif sonuç elde edilmiş de olsa, tipik klinik ve radyolojik bulgular ile COVID-19 tanısı almıştı, diğer üç hasta hastalığı geçirdiğini bilen bir doktor hanımın eşi ve iki oğluydu, diğer beş kişi de hastalığı asemptomatik geçirmiş sağlık çalışanıydı.

Tablo 1. Çalışmaya dâhil edilen yedi platformun kitleriyle elde edilen analitik performans değerleri.

| Kit            | Duyarlılık (%) | Özgüllük (%) | Pozitif prediktif değer (%) | Negatif prediktif değer (%) | Testin gücü (%) |
|----------------|----------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| Abbott IgG     | 86.67          | 100.00       | 100.00                      | 99.30                       | 99.33           |
| Roche Total    | 93.33          | 100.00       | 100.00                      | 99.65                       | 99.67           |
| SNIBE IgM      | 26.67          | 96.67        | 29.63                       | 96.16                       | 93.17           |
| SNIBE IgG      | 63.33          | 100.00       | 100.00                      | 99.11                       | 98.17           |
| Afias IgM      | 0.00           | 100.00       | -                           | 95.00                       | 95.00           |
| Afias IgG      | 96.67          | 100.00       | 100.00                      | 99.82                       | 99.83           |
| Lifotronic IgM | 43.33          | 96.67        | 40.63                       | 97.01                       | 94.00           |
| Lifotronic IgG | 76.67          | 100.00       | 54.76                       | 98.75                       | 95.67           |
| Getein IgM     | 60.00          | 96.67        | 38.71                       | 96.84                       | 93.83           |
| Getein IgG     | 100.00         | 100.00       | 100.00                      | 100.00                      | 100.00          |
| VIDAS IgM      | 60.00          | 100.00       | 100.00                      | 96.94                       | 97.00           |
| VIDAS IgG      | 96.67          | 100.00       | 100.00                      | 99.82                       | 99.83           |

Pozitif ve negatif grupları oluşturan serumlar, çalışmaya dahil edilen tüm kitler ile çalışıldı. Performans hesapları yapılırken, pozitif kanların hem IgG hem IgM içerdikleri var sayıldı. Aşağıdaki formüller Excel tablosuna girildi ve her kit için elde edilen sonuçlar girilerek kit performans parametreleri hesaplandı.

Duyarlılık=Pozitif gruptan test ile pozitif bulunan örnek sayısı/30

Özgüllük=Negatif gruptan test ile negatif bulunan örnek sayısı/30

Pozitif Prediktif Değer (PPD)= $\frac{\text{Duyarlılık} \times \text{Prevalans}}{[\text{Duyarlılık} \times \text{Prevalans} + (1 - \text{Özgüllük}) \times (1 - \text{prevelans})]}$

Negatif Prediktif Değer (NPD)= $\frac{\text{Özgüllük} \times (1 - \text{Prevelans})}{[(1 - \text{duyarlılık}) \times \text{Prevelans} + \text{Özgüllük} \times (1 - \text{Prevelans})]}$

Testin Gücü= $\frac{\text{Duyarlılık} \times \text{Prevelans} + \text{Özgüllük} \times (1 - \text{Prevelans})}{\text{Özgüllük} \times (1 - \text{Prevelans})}$

Hastalık prevelansı, FDA'in de kullandığı, %5 olarak kabul edilerek hesaplar yapıldı.

İstatistiksel anlamlılık değerlendirilmesi için %95 güvenilirlik aralığı da Excel'in istatistik modülü kullanılarak hesaplandı.

## Bulgular

Elde edilen performans değerlerinin sonuçları Tablo'da özetlenmiştir. Abbott ARCHITECT sisteminde anti-SARS-CoV-2 IgG kitinin duyarlılığı %87.7 (%95CI %69.3-%96.2), özgüllüğü %100 (%95CI %88.4-%100) olarak tespit edildi. Roche, Elecsys Anti-SARS-CoV-2 kitinin duyarlılığı %93.3 (%95CI %77.9-%99.2), özgüllük %100 (%95CI %88.4-%100)'dü. SNIBE MAGLUMI SARS-CoV-2 IgM/IgG kitinin IgM için duyarlılığı %26.7 (%95CI %12.3-%45.9), özgüllüğü %96.7 (%95CI %69.3-%96.2), IgG için bu oranlar sırasıyla %63.3 (%95CI %69.3-%96.2) ve %100(%95CI %82.8-%99.9)'dü. AFIAS'ta IgM için duyarlılık %0, özgüllük %100 (%95CI %88.4-%100); IgG için duyarlılık %96.7 (%95CI %82.8-%99.9), özgüllük %100 (%95CI %88.4-%100) olarak tespit edildi. Lifotronic anti-SARS-CoV-2 IgM için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %43.3 (%95CI %25.7-%62.6), ve %96.7 (%95CI %82.9-%99.9); IgG için %76.7 (%95CI %57.7-%90.0) ve %100 (%95CI %88.4-%100) olarak hesaplandı. Getein sisteminde duyarlılık IgM için %60.0 (%95CI %40.6-%77.3), IgG için %100 (%95CI %88.4-%100); özgüllük de IgM için %96.7 (%95CI %82.7-%99.9), IgG için %100 (%95CI %88.4-%100) bulundu. BioMérieux platformunun sunduğu VIDAS Anti SARS-CoV-2 IgM kitinin duyarlılığı %60 (%95CI %40.6-

%77.3), özgüllüğü %100 (%95CI %88.4-%100); VIDAS Anti SARS-CoV-2 IgG kitinin duyarlılığı %96.7 (%95CI %82.8-%99.9), özgüllüğü %100 (%95CI %88.4-%100) olarak hesaplandı.

## Sonuç

Çalışılan tüm kitlerde IgG için özgüllük %100 bulundu yani anti-SARS-CoV-2 IgG için hiçbir yalancı pozitif sonuç elde edilmedi. Özgüllük açısından değerlendirildiğinde, tüm platformlar IgM için de iyi performans gösterdi, SNIBE, Lifotronic ve Getein sistemlerde, her platformda farklı bir hasta örneğinde olmak üzere birer yalancı pozitif sonuç elde edildi. Pozitif örnekleri yakalama gücü olarak da ifade edilebilecek duyarlılık değerleri IgG için %63.3 (SNIBE) ile %100 (Getein) arasında tespit edildi. IgM kitlerinde duyarlılık değerleri çok düşük tespit edildi [0% (AFIAS) ile %43.3 (Lifotronic)]. AFIAS sistemiyle IgM ve IgG sonuçları bir hasta için aynı anda sonuçlandırıldığı için, IgM'in çalışmıyor olması örneğin antikor içerip içermediğini değerlendirmek açısından bir sorun yaratmadı. AFIAS ile sadece bir pozitif hasta kaçırılmış oldu. IgM kitleri için tespit edilen düşük duyarlılık değerlerinin nedeni bazı hastalarda hastalığın bu aşamasında bu antikorların negatifleşmiş olması olabilir. Pozitif gruptaki hastaların dokuzunda tüm platformlarda IgM negatif bulundu. IgG'leri tüm örneklerde pozitif bulan bir platform vardı (Getein), bu yüzden IgG açısından performans değerlendirme sonuçları gerçek durumu yansıtmaktaydı.

Sonuç olarak, performans olarak test edilen tüm kitler benzer ve rutin laboratuvarında kullanılabilir kabul edilecek sonuçlar verdi.

**Anahtar kelimeler:** Duyarlılık, özgüllük, serolojik test, COVID-19

## Kaynaklar

1. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. Nat Med. 2020;26(6):845-8. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>
2. Seow J, Graham C, Merick B, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in three months following SARS-CoV-2 infection in humans. Nat Microbiol. 2020;5(12):1598-607. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00813-8>
3. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/elecsys-anti-sars-cov-2.html>
4. <https://www.maglumi.de/sars-cov-2-diagnostics/?L=1>
5. <https://www.fda.gov/media/137383/download>

# COVID-19 Hastalarında Sekonder Bakteriyel Enfeksiyon Etkenleri ve Antibiyotik Direncinin Pandemi Öncesine Göre Değerlendirilmesi: Retrospektif Çalışma

Mustafa Karataş<sup>1</sup>, Melike Yaşar<sup>2</sup>, Şöhret Aydemir<sup>2</sup>, Feriha Çilli<sup>2</sup>, Alper Tünger<sup>2</sup>,  
Volkan Özenci<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Karolinska Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji, Stokholm

✉ mustafa13karatas@gmail.com

## Giriş

Antibiyotik direnci, her geçen gün artan ve tüm dünyayı tehdit eden önemli bir sorundur<sup>(1)</sup>. 2050 yılında, antibiyotik direnci sebebiyle yılda on milyondan fazla ölüm ve 100 milyar dolardan fazla maddi kayıp beklenmektedir<sup>(2)</sup>. COVID-19 pandemisi de 2020 yılının başından bu zamana kadar hız kazanarak devam eden büyük toplumsal ve sağlık sorunlarına sebep olmuştur<sup>(3)</sup>. Şuan, COVID-19 sebebiyle 79.2 milyondan fazla insan enfekte olmuş, bunlarında 1.7 milyondan fazlasının yaşamını yitirdiği bilinmektedir<sup>(4)</sup>. Sekonder bakteriyel enfeksiyon (SBE) ile beraber hastalığı geçirenlerde artmış ölüm ve sekel oranları bildirilmiştir<sup>(5)</sup>. Ayrıca, viral faktörlerin immün yanıtı bozarak hücre ve doku yıkımını artırması sebebiyle bakteriyel enfeksiyonların ortaya çıkması konusunda yatkınlığa sebep olduğu da bilinmektedir<sup>(6,7)</sup>.

COVID-19 hastalarında hastaneye yatırılma ihtiyacı duyan hastalar çoğunlukla 60 yaşından büyük hastalardır<sup>(8)</sup>. Önceki çalışmalarda hastaneye yatan hastaların özellikle sekonder bakteriyel enfeksiyona ve hastalığın ölüm, morbitide gibi sonuçlarına daha duyarlı olduğu gösterilmiştir<sup>(9)</sup>. Sekonder bakteriyel enfeksiyonların COVID-19 hastaları arasında %7 ile %15 arasında görüldüğü bildirilmiştir<sup>(10-12)</sup>.

SBE'ler, Wuhan'dan yapılan bir çalışmada COVID-19 hastalarının %15'inde görülmesine rağmen ölen hastaların %50'sinde görülmüştür<sup>(13)</sup>. Bu durum sebebiyle geniş spektrumlu ampirik antibiyotik kullanımı olası bakteriyel enfeksiyonları önlemek ve tedavi etmek amacıyla sıkça uygulanmıştır<sup>(12,14,15)</sup>. Ayrıca, kişisel koruyucu ekipman (KKE) kullanımı ve sağlık çalışanlarının el hijyeni alışkanlıklarının önemli ölçüde değiştiği bildirilmektedir<sup>(16)</sup>. Bununla birlikte, personel ve KKE eksiklikleri olması durumunda bakteriyel etkenlerin bulaşında artma olabileceği gibi pandemi öncesine göre daha fazla kullanılan ekipmanların ve artan el yıkama alışkanlıklarının iyi yönde değişmesinin bulaş azaltma ihtimali de araştırılmalıdır. Bu durumu araştırmak ve antibiyotik uygulamaları için etkenlerin direnç profillerinin ve etiyolojilerinin incelenmesi, gelişmekte olan ülkeler için de pandemi döneminde özellikle önem arz etmektedir<sup>(17)</sup>.

Bu çalışmada; COVID-19 hastalarındaki sekonder enfeksiyon etkenleri, etkenlerin antibiyotik direnç durumları ve

pandemi öncesine göre direnç durumlarının değişiminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Ege Üniversitesi (EÜ) Hastanesi'nde yapılmıştır ve veriler 15 Aralık 2019 ile 15 Haziran 2020 arası kapsamaktadır. 15 Aralık 2019 ile 15 Mart 2020 arası pandemi öncesi dönem, 15 Mart 2020 ile 15 Haziran 2020 arası Türkiye'de pandeminin ilk üç ayı olarak değerlendirilmelidir.

Hastalardan alınarak EÜ hastanesine yollanan kan, solunum yolu, idrar yolu örnekleri ve diğer (gastrointestinal sistem örnekleri, doku vb) örneklerin kültür sonuçları, antibiyotik duyarlılık sonuçları mikrobiyoloji veri tabanından alınarak geriye dönük olarak incelenmiştir. Çalışma, Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu (No:20 – 9T / 75) ve Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmıştır.

## Bulgular

Toplamda 3532 hastadan alınan 4859 kültürde üreme gösteren örnek araştırma kapsamında incelendi. Pandemi öncesi döneme ait 3034 örnek 2143 hastadan, pandemi sırasındaki dönemde 1304 hastadan 1702 örnek ve toplam 1447 COVID-19 hastasından 85'inde 123 adet bakteriyel enfeksiyon etkeni tespit edildi.

**Pandemiden önce:** Örneklerin çoğu idrar yolu (1472, %48.52) ve solunum yolu (balgam, bronkoalveoler lavaj vb) (540, %17.32) örnekleriydi. *Escherichia coli* (766, %23.55), *Klebsiella pneumoniae* (324, %11.56), *Pseudomonas aeruginosa* (254, %8.37) tüm bakteriyel etkenler arasında en sık görülen gruplar olarak belirlenmiştir. Geniş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten Enterobacterales diğer çoklu ilaç direnci (ÇİD) olan etkenler arasında en çok (630, %20.76) görülen etken grubu olarak gözlenmiştir.

**Pandemi Sırasında:** Etkenler en çok idrar (796, %46.77) ve kandan (276, 16.22%) izole edildi. En sık görülen etkenler *E. coli* (447, %26.26), *K. pneumoniae* (197, %11.57), *P. aeruginosa* (136, %7.99) oldu (Tablo 1). GSBL üreten Enterobacterales (353, %20.74) en sık ÇİD gösteren bakteri grubu olarak ve karbapenemaz üreten *Enterobacterales* en



Tablo 1. İzole edilen bakterilerin gruplara göre dağılımı.

| İzole Edilen Etkenler           | Pandemiden Önce<br>n, (%) |         | Pandemi Sırasında<br>n, (%) |         | COVID-19 Hastaları<br>n, (%) |         |
|---------------------------------|---------------------------|---------|-----------------------------|---------|------------------------------|---------|
| <i>Escherichia coli</i>         | 766                       | 25.25   | 447                         | 26.26*  | 22                           | 17.89*  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | 324                       | 10.68   | 197                         | 11.57   | 15                           | 12.20   |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>  | 106                       | 3.49*** | 53                          | 3.11*** | 12                           | 9.76*** |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | 84                        | 2.77    | 39                          | 2.29    | 5                            | 4.07    |
| <i>Enterococcus faecium</i>     | 174                       | 5.74    | 115                         | 6.76    | 8                            | 6.50    |
| <i>Enterococcus faecalis</i>    | 201                       | 6.62    | 122                         | 7.17    | 9                            | 7.32    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | 254                       | 8.37    | 136                         | 7.99    | 8                            | 6.50    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | 193                       | 6.36    | 112                         | 6.58    | 11                           | 8.94    |
| <i>Proteus mirabilis</i>        | 79                        | 2.60    | 37                          | 2.17    | 3                            | 2.44    |
| Other                           | 853                       | 28.11   | 444                         | 26.09   | 30                           | 24.39   |
| Toplam                          | 3034                      | 100.00  | 1702                        | 100.00  | 123                          | 100.00  |

Tablo 2. COVID-19 hastalarından izole edilen etkenlerin etiyojileri.

|                                 | İdrar yolu<br>enfeksiyonları | Alt solunum yolu<br>enfeksiyonları | Kan dolaşımı<br>enfeksiyonları | Diğer | Toplam |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------|--------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | 9                            | 4                                  | 2                              |       | 15     |
| <i>Enterococcus faecalis</i>    | 8                            |                                    | 1                              |       | 9      |
| <i>Escherichia coli</i>         | 18                           | 1                                  | 3                              |       | 22     |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>  | 2                            | 10                                 |                                |       | 12     |
| <i>Enterococcus faecium</i>     | 8                            |                                    |                                |       | 8      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | 1                            | 7                                  | 1                              | 2     | 11     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | 2                            | 5                                  |                                | 1     | 8      |
| <i>Corynebacterium striatum</i> |                              | 5                                  |                                |       | 5      |
| Diğer                           | 8                            | 16                                 | 5                              | 4     | 33     |
| Toplam                          | 56                           | 48                                 | 12                             | 7     | 123    |

sık ikinci ÇİD direncine sahip bakteri grubu olarak belirlendi (62, 3.64%). COVID-19 hastaları bu grup dışında tutularak ayrıca incelenmiştir.

**COVID-19 Hastaları:** Toplam 1447 COVID-19 hastasının (ayaktan ve yatan) 85'inde 123 bakteriyel enfeksiyon etkeni tespit edilmiştir. 52 (%3.59) hastada sekonder bakteriyel enfeksiyon ve 38 hastada (%2.62) hastada da bakteriyel koenfeksiyon varlığı gözlenmiş, 5 hastada koenfeksiyon varlığında sekonder enfeksiyon gelişimi kaydedilmiştir. 24 hastadan (%28.24) birden çok etken izole edilmiş 61 hastada (%71.76) tek bakteriyel patojen izole edilebilmiştir. Etkenlerin çoğu idrar (56, %43.90) ve alt solunum yolu örneklerinden (48, %39.02) izole edilmiş olup, en sık etkenler *E. coli* (22, %17.89), *K. pneumoniae* (15, %12.2) ve *Acinetobacter baumannii* (12, %9.76)'dır. Toplam 123 etkenin 78'i (%63.41) hastanın hastaneye yatışından 2 gün sonra alınmış olup hastane enfeksiyonu olarak nitelendirilmiştir.

En çok izole edilen etken olan *E. coli*'nin %81.81(18) tanesi idrar örneklerinden tespit edilmiştir. Bununla beraber, *A. baumannii* alt solunum yolu enfeksiyonlarında en sık görülen enfeksiyon etkeni (10, %21.78) olarak ortaya çıkmıştır (Tablo 2). İzole edilen *A. baumannii* suşlarının hepsi karbapenem dirençlidir.

Daha önceki "severe acute respiratory syndrome"

(SARS) ve "middle east respiratory syndrome" (MERS) epidemilerinden, invaziv mekanik ventilasyon tedavisi alan hastaların sekonder enfeksiyonlara daha yatkın olduğu ve sağkalımın bu durumda azaldığı bilinmektedir<sup>(18)</sup>. Bizim çalışmamızda tüm COVID-19 hastaları içerisinde (yatan ve ayaktan başvuran) bakteriyel koenfeksiyonlar ve sekonder bakteriyel enfeksiyonlar sırasıyla %2.62 ve %3.59 oranında tespit edilmiştir. Tüm hastalar içerisindeki düşük bakteriyel koenfeksiyon ve sekonder bakteriyel enfeksiyon birlikteliği düşünüldüğünde geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımında dikkatli olunmasının gerekliliği akıldan çıkarılmamalıdır.

Pandemi döneminde hastalarda %40.55'lik bir azalma meydana gelirken kültür pozitif örneklerde de %43.9'luk bir azalma meydana gelmiştir. Cerrahi işlemlerin, hastaneye yatışların kısıtlanması ve pandeminin ilk döneminde hastanede yoğunluğun minimuma indirilmesi sebebiyle bu düşüşler normal olarak karşılanabilir. Bununla beraber, hastanemizde *Staphylococcus aureus* içerisinde metisilin dirençli olanların oranının pandemi öncesinde %27.46 iken COVID-19 grubunda %18.18'e düştüğü belirtilmiştir. Cerrahi işlemlerin kısıtlanması sebebiyle ve COVID-19 hastalarından doku örneklerinin alınmasının daha az olması ile bu durum açıklanabilir. Ayrıca, çalışmamızda COVID-19 grubunda *A. baumannii* oranlarında pandemi öncesi (p=0.002) ve pandemi grubuna (p=0.001) göre iki kattan fazla bir artış gözlemlenmiştir. *A. baumannii*'lerin



çoğunun (10, %83.33) solunum yolundan izole edilmesi ve solunum yolu bakteriyel enfeksiyonlarının COVID-19 grubunda belirgin artışı ( $p=0.001$ ) sebebiyle bu değişimin gerçekleştiği değerlendirilebilir. Ayrıca, New Jersey'den yapılan bir çalışmada, karbapenem dirençli *A. baumannii* sayılarının özellikle COVID-19 hastalarında diğer gruplardan sık görüldüğü ve çoğunun yoğun bakımda tedavi gören hastalardan izole edildiği belirtilmiştir<sup>(19)</sup>.

## Sonuç

Antibiyotik direnci, COVID-19 gibi devam eden, yavaş ilerliyor olsa da daha az önemli olmayan bir şekilde önemini sürdürmektedir. Bu kapsamda akılcı antibiyotik kullanımı konusunda çalışmaların devam etmesi ve daha da geliştirilmesi önemlidir. Bununla beraber, COVID-19'un hastane temizlik şartlarında, çalışan davranışlarında yarattığı değişim ve dirençli suşların hastalar arasındaki yayılımına etkisi halen tam olarak belirlenebilmiş değildir. Sonraki çalışmalarda etkenler ve klinik bilgilerin (kataterizasyon, girişim vb) beraber incelenmesi ile bu durum netlik kazanabilecektir.

**Anahtar kelimeler:** COVID-19; antibiyotik direnci; sekonder bakteriyel enfeksiyon; bakteriyel koenfeksiyon

## Kaynaklar

1. Nieuwlaat R, Mbuagbaw L, Mertz D, et al. Coronavirus disease 2019 and antimicrobial resistance: Parallel and interacting health emergencies. Clin Infect Dis. 2020;ciaa773. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa773>
2. O'Neill J. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. 2014. [http://www.jpiamr.eu/wp-content/uploads/2014/12/AMR-Review-Paper-Tackling-a-crisis-for-the-health-and-wealth-of-nations\\_1-2.pdf](http://www.jpiamr.eu/wp-content/uploads/2014/12/AMR-Review-Paper-Tackling-a-crisis-for-the-health-and-wealth-of-nations_1-2.pdf) (Erişim tarihi: Ocak.2021)
3. Sher L. The impact of the COVID-19 pandemic on suicide rates. QJM. 2020;113(10):707-712. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcaa202>
4. WHO. COVID-19 Weekly Epidemiological Update. 2020;1:4. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20201012-weekly-epi-update-9.pdf> (Erişim tarihi: Ocak.2021)
5. Zhang H, Zhang Y, Wu J, et al. Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):1958-64. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1812437>
6. Morris DE, Cleary DW, Clarke SC. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics. Front Microbiol. 2017;8:1041. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01041>
7. Liderot K, Ahl M, Özenci V. Secondary bacterial infections in patients with seasonal influenza a and pandemic H1N1. Biomed Res Int. 2013;2013: 376219. <https://doi.org/10.1155/2013/376219>
8. Li X, Xu S, Yu M, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. J Allergy Clin Immunol. 2020;146(1):110-8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.006>
9. Zhang H, Zhang Y, Wu J, et al. Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):1958-64. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1812437>
10. Li J, Wang J, Yang Y, et al. Etiology and antimicrobial resistance of secondary bacterial infections in patients hospitalized with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective analysis. 2020;9(1):153. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00819-1>
11. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020;395(10223):497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
12. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet. 2020;395(10229):1054-62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
13. Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. Lancet Respir Med. 2020;8(5):475-81. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)
14. Rothe K, Feihl S, Schneider J, et al. Rates of bacterial co-infections and antimicrobial use in COVID-19 patients: a retrospective cohort study in light of antibiotic stewardship. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020;1-11. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04063-8>
15. Sivapalan P, Sivapalan P, Ulrik CS, et al. Proactive prophylaxis with azithromycin and hydroxychloroquine in hospitalised patients with COVID-19 (ProPAC-COVID): A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. Trials. 2020;21(1):513. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04409-9>
16. Metin N, Turan Ç, Utlu Z. Changes in dermatological complaints among healthcare professionals during the COVID-19 outbreak in Turkey. Acta Dermatovenereologica Alp Pannonica Adriat. 2020;29(3):115-22. <https://doi.org/10.15570/actaapa.2020.25>
17. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: Implications for pandemic influenza preparedness. J Infect Dis. 2008;198(7):962-70. <https://doi.org/10.1086/591708>
18. Yap FHY, Gomersall CD, Fung KSC, et al. Increase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition rate and change in pathogen pattern associated with an outbreak of severe acute respiratory syndrome. Clin Infect Dis. 2004;39(4):511-6. <https://doi.org/10.1086/422641>
19. Perez S, Innes GK, Walters MS, et al. Increase in hospital-acquired carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection and colonization in an acute care hospital during a surge in COVID-19 admissions - New Jersey, February-July 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69(48):1827-31. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6948e1>

# Kolistinin *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Etkinliğinin Belirlenmesinde Vitek-2 Sistemi ile Sıvı Mikrodilüsyon Yönteminin Karşılaştırılması

Şölen Daldaban Dinçer

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ümraniye Eğitim Araştırma Hastanesi, İstanbul

✉ solen-dincer@hotmail.com

## Giriş

Çok ilaca dirençli gram-negatif bakterilerin ortaya çıkışı ile kolistin, karbapenem dirençli Gram negatif etkenlerin tedavisi için tigesiklin ile birlikte tek tedavi alternatifi olarak artan oranda kullanılmaktadır. Kolistin kullanımının artması nedeniyle de dünya çapında kolistin direncini rastlanılan sorunlardan biri hâline gelmiştir<sup>(1)</sup>.

Kolistin için antimikrobiyal duyarlılık testleri birçok nedenle teknik olarak sorun oluşturmaktadır. Bunun ana nedeni, büyük molekül ağırlığına sahip olan kolistinin ağara difüzyonunun zor olması, bu durumun disk difüzyon ve gradiyent test yöntemlerinin performansını düşürmesidir. Yapılan çalışmalarda, yarı-otomatize sistemlerin performanslarında kolistin direncini saptamada yeterli olmadığı gösterilmiştir<sup>(2)</sup>. 2017 yılında "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" ve "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" ortak çalışma grubu, kolistin duyarlılığının belirlenmesinde polistren mikropak ve kolistin sülfat tuzu kullanımını, referans yöntem olarak ise "International Organization for Standardization (ISO)" standart sıvı mikrodilüsyon yöntemine (SMD) (20776-1) göre çalışılmasını önermiştir<sup>(3)</sup>.

Çalışmamızda kolistinin gram-negatif bakterilere in vitro etkinliğinin belirlenmesinde Vitek-2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemi ve mikrodilüsyon temeline dayanan Sensititre (Thermo Fisher Scientific, Birleşik Krallık) hazır ticari sisteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya, 2019 yılında çeşitli klinik örneklerden

**Tablo 1. İzolatların Sensititre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan kolistin MİK değerleri ve Vitek-2 yöntemi ile saptanan kolistin MİK değerlerine göre karşılaştırılması.**

|                                                                                                        | Vitek-2 sistemi ile kolistin MİK (mg/L) değerlerine göre izolat sayıları (n= 44) |         |   |   |      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------|---|---|------|------|
|                                                                                                        | <=0.5                                                                            | 2       | 4 | 8 | >=16 | >=32 |
| Sensititre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kolistin MİK (mg/L) değerlerine göre izolat sayıları (n= 44) | 0.5<br>2<br>4<br>8<br>16<br>32<br>>=64                                           | 15<br>1 | 1 | 1 | 1    |      |
|                                                                                                        |                                                                                  |         | 2 |   | 4    |      |
|                                                                                                        |                                                                                  |         |   |   | 2    | 1    |
|                                                                                                        |                                                                                  |         |   |   | 8    |      |
|                                                                                                        |                                                                                  |         |   |   | 6    |      |
|                                                                                                        |                                                                                  |         |   |   | 3    |      |

[solunum yolu örneği (n= 16), kan (n= 11), cilt ve yumuşak doku (n= 10) ve idrar (n= 7), ] izole edilen farklı hastalara ait çok ilaca dirençli 44 *Klebsiella pneumoniae* izolatı dahil edildi.

İzolatların tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri "matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight, mass spectrometry (MALDI-TOF MS)" ve Vitek-2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemi ile yapıldı. Çalışmada, ayrıca mikrodilüsyon temeline dayanan 0.0625-128 mg/L konsantrasyon aralığında dehidrate kolistin ve üreme kontrol kuyucuğu içeren mikropaklar halinde kullanıma hazır olarak üretilmiş Sensititre (Thermo Fisher Scientific, Birleşik Krallık) marka kit kullanıldı.

Her iki sistemin birbiri ile kategorik uyumu (KU) [örtüşen (S,R) kategorik sonuç sayısı]; büyük hata (BH) (mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlı olup, otomatize antibiyotik duyarlılık sistemi ile yanlış dirençli saptanan sonuçlar) ve çok büyük hata (ÇBH) (mikrodilüsyon yöntemi ile dirençli olup, otomatize antibiyotik duyarlılık sistemi ile yanlış duyarlı saptanan sonuçlar) oranları hesaplandı. Sonuçlar, ISO kriterlerine göre değerlendirildi (KU >90; BH ve ÇBH <3%)<sup>(4)</sup>.

## Bulgular

İki *Klebsiella pneumoniae* izolatı Sensititrede kolistin duyarlı bulunurken, Vitek-2 sisteminde dirençli olarak bulunmuştur. BH oranı %4.5 olarak saptanırken, ÇBH saptanmamıştır. Sensititre ve Vitek-2 sisteminin KU oranı %95.4 bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir.

## Sonuç

Mevcut sorunlar ve kolistin duyarlılığının hızlı, doğru ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntemle çalışılarak optimum tedavinin mümkün olan en kısa sürede başlanması gerekliliği, uygulaması kolay, ek ekipman ve tecrübe gerektirmeyen kullanıma hazır ticari SMD temelli testlerin birçok laboratuvar tarafından giderek artan oranlarda kullanımına neden olmuştur<sup>(5)</sup>.

Çalışmamızda Sensititre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile Vitek-2 otomatize sistemi arasındaki kategorik uyum kabul edilebilir sınırlar içindeyken (%95.4), büyük hata oranı kabul edilebilir sınırların üzerinde (%4.5) saptanmıştır. Vitek-2 sistemi ile büyük hata oranının kabul edilebilir sınırların üzerinde bulunmuş olması nedeniyle, özellikle kolistin klinik olarak endike olduğu ve başka tedavi seçeneğinin kalmadığı durumlarda kolistin için referans sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Kolistin, sıvı mikrodilüsyon yöntemi, otomatize antibiyotik duyarlılık sistemi

## Kaynaklar

1. 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>
2. Girardello R, Cury AP, Franco MRG, et al. Colistin susceptibility testing and Vitek-2™: is it really useless? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;91(4):309-11. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.03.019>
3. EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2016. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Recommendations\\_for\\_MIC\\_determination\\_of\\_colistin\\_March\\_2016.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf) (Erişim Aralık 2020).
4. ISO 20776-1:2019. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Broth microdilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO, 2019.
5. Bardet L, Okdah L, Le Page S, Baron SA, Rolain JM. Comparative evaluation of the UMIC Colistin kit to assess MIC of colistin of gram-negative rods. *BMC Microbiol*. 2019;19(1):60. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1424-8>

# ***Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Kolistin Direncinin Belirlenmesinde Kolorimetrik Yeni Hızlı Bir Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemi**

**Kübra Yıldırım<sup>1,2</sup>, Ece Şimşek<sup>1,2</sup>, Serhat Bozkurt<sup>2</sup>, Orhan Koçak<sup>2</sup>, Özlem Koyuncu Özyurt<sup>3</sup>, Ahmet Yılmaz Çoban<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Antalya

<sup>2</sup>Verem Çalışmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi (AKVUAM), Antalya

<sup>3</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

✉ kubrayildirim@akdeniz.edu.tr

## **Giriş**

*Acinetobacter baumannii*, zorunlu aerob, pleomorfik, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketsiz gram negatif basildir. Saprofit olarak doğada ve hastane ortamında bulunur ve mekanik solunum cihazları gibi nemli yüzeylerde, deri gibi kuru yüzeylerde yaşayabilir. Sağlıklı bireylerin çok az bir kısmında normal orofarengeal floranın bir elemanı olarak, ayrıca vücudun farklı bölgelerinde bulunabilir ve değişik ağırlıkta seyreden enfeksiyonlara yol açabilir<sup>(1)</sup>. *A. baumannii* kompleksi, bakteriyemi, pnömoni, menenjit ve üriner sistem enfeksiyonları gibi sıklıkla hastanede kazanılan enfeksiyonlarla ilişkili olarak karşımıza çıkmaktadır<sup>(2)</sup>.

Diğer birçok fırsatçı gram negatif basilde olduğu gibi, artan antibiyotik direnci, *Acinetobacter spp.* türleri ile oluşan hastane enfeksiyonlarının tedavisini de engellemektedir. *A. baumannii* antibiyotiklere en sık direnç geliştiren türdür. *A. baumannii* kaynaklı enfeksiyonlarının tedavisi öncelikle in-vitro antibiyotik duyarlılık testlerine göre yapılmalıdır. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) saptanmasında sıvı mikrodilüsyon test yöntemi (SMD) ve agar dilüsyon test yöntemleri uygulanması ve elde edilen değerlerin bunların daha önceden saptanmış sınır değerleri ile karşılaştırılması altın standarttır<sup>(3)</sup>. Özellikle endişe konusu olan, *A. baumannii* kompleksinin, beta laktamlar, florokinolonlar, tetrasiklinler ve aminoglikozitler de dahil olmak üzere mevcut antibiyotiklere çoklu direnç (MDR) göstermesidir.

Bu amaçla çalışmamızda *A. baumannii* izolatlarında kolistin direncinin hızlı ve doğru olarak belirlenebilmesi amacıyla SMD temel alınarak, canlı bakterilerin görsel olarak tanımlanmasını sağlayan kolorimetrik bir duyarlılık test yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## **Gereç ve Yöntem**

Çalışmaya alınan 50 adet *A. baumannii* izolatı için tür düzeyinde identifikasyon MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) sistemiyle yapılmıştır. Kolistin MİK değerleri SMD yöntemi ile tespit edilmiş olup, EUCAST kriterlerine göre minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK)  $\leq 2$  µg/ml ise duyarlı ve  $>2$  µg/ml ise dirençli olarak belirlenmiştir<sup>(4)</sup>.

Tüm izolatların kolistin MİK değerleri rezasurin mikropalak yöntemi (RMY) ile de test edilmiştir. Kolistin 16-0.5 µg/ml konsantrasyonlarında test edilmiştir. Tüm plaklar SMD yöntemindeki gibi hazırlanmıştır. McFarland no 0.5 bulanıklığında hazırlanan bakteri izolatlarının 1:100 dilüsyonundan 50 µl plaklara eklenmiş, 5 saatlik inkübasyon sonrasında %0.02'lik taze rezasurin solüsyonundan tüm kuyucuklara 30 µl olarak ilave edilmiştir. Plaklar 1 saat daha inkübasyona bırakılarak, antibiyotiksiz kontrol kuyucuğunda rengin mavinden kırmızıya dönüşmesiyle test sonuçlandırılmıştır. MİK değeri rengin kırmızıya dönmediği son konsantrasyon olarak belirlenmiştir<sup>(5,6)</sup>.

## **Bulgular**

Çalışmada test edilen izolatların MİK sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur. SMD yöntemiyle 3 kolistin dirençli izolatın MİK değeri  $>16$  µg/ml olarak bulunurken, RMY ile bu izolatların birinin MİK değeri  $>16$  µg/ml, diğer iki izolatın ise 16 µg/ml olarak saptanmıştır. Kolistin dirençli diğer 3 izolat için MİK değerleri hem SMD yöntemi ve hem de RMY ile 16 µg/ml saptanmıştır. Bir dirençli izolatın MİK değeri her iki yöntemle de 4 µg/ml bulunmuştur. Duyarlı 7 izolatın MİK değerleri her iki yöntemde de 2 µg/ml olarak bulunmuştur. Altı izolatın MİK değerleri SMD yönteminde 1 µg/ml bulunurken, RMY ile 2 izolatın MİK değeri 1 µg/ml ve kalan 4 izolatın ise 0.5 µg/ml olarak saptanmıştır. Kalan duyarlı 30 izolatın MİK değerleri her iki yöntemle de 0.5 µg/ml ola-

**Tablo 1. SMD ve RMY ile elde edilen MİK sonuçlarının karşılaştırılması.**

| Yöntem | MİK<br>$>16$ µg/ml | 16 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | 1 µg/ml | $\leq 0.5$ µg/ml | Toplam izolat |
|--------|--------------------|----------|---------|---------|---------|------------------|---------------|
| SMD    | 3                  | 3        | 1       | 7       | 6       | 30               | 50            |
| RTY    | 1                  | 5        | 1       | 7       | 2       | 34               | 50            |

rak bulunmuştur. RMY ile çalışılan tüm isolatlar SMD yöntemiyle karşılaştırıldığında her iki yöntemde de toplamda 7 izolat dirençli kalan 43 izolat duyarlı olarak saptanmıştır. Sonuçlar FDA tarafından baz alınan kriterlere göre karşılaştırılmış ve kategorik uyum %100 olarak saptanmıştır<sup>(7)</sup>.

### Sonuç

Çok ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonu tedavisinde kolistin son çare antibiyotik olarak kullanılmaktadır<sup>(1)</sup>. Bu nedenle aynı gün içerisinde klinisyene duyarlılık sonucunu bildirmek tedavinin erken başlamasını sağlayacaktır. Sonuç olarak RMY kolistin direncinin erken tespiti için umut vaat etmekte olup, rutin laboratuvarlarda kullanılmadan önce çok merkezli ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, hızlı antibiyotik duyarlılık testi, resazurin, kolistin

### Kaynaklar

1. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int J of Antimicrob Agents. 2010;35(3):219- 26. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.024>
2. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;48(1):1-12. <https://doi.org/10.1086/595011>
3. Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, et al. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect. 2006;12(6):501-3. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01454.x>
4. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019.
5. Çoban AY. Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. J Clin Microbiol. 2012;50(7):2191-3. <https://doi.org/10.1128/JCM.00471-12>
6. Çoban AY, Uzun M, Akgunes A, Durupinar B. Comparative evaluation of the microplate nitrate reductase assay and the rezasurin microtitre assay for the rapid detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Mem Ins Oswaldo Cruz. 2012;107(5):578-81. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000500002>
7. Gıda ve İlaç İdaresi. 2009. Endüstri ve FDA için rehberlik. Sınıf II özel kontroller rehber dokümanı: antimikrobiyal duyarlılık testi (AST) sistemleri. Cihazlar ve Radyolojik Sağlık, Gıda ve İlaç İdaresi, ABD Sağlık ve İnsan Hizmetleri Bakanlığı, Silver Spring, ABD.

# Tüberküloz Tanısında Moleküler Testler Hayat Kurtarıcı Olabilir: Merkezi Laboratuvar Deneyimi

Ülkü Oral Zeytinli

*İstanbul Kamu Hastaneleri Hizmetleri 2. Başkanlık Merkezi Laboratuvar, İstanbul*

✉ zy.ulku@hotmail.com

## Giriş

Çalışmamızın amacı; Merkezi Laboratuvar'da 2020 yılında test edilmiş olan, mikobakteri kültür ve/veya PCR test istenilen BOS örneklerinin Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD) sonucu retrospektif olarak değerlendirmektir. İstanbul Kamu Hastaneleri Hizmetleri 2. Başkanlık Merkezi Laboratuvar Hizmet Bölgesi Anadolu yakasında bulunan 9'u Eğitim ve Araştırma Hastanesi olmak üzere toplam 14 hastaneden oluşmaktadır. Hastane laboratuvarlarında acil testler çalışmakta, idrar harici tüm örneklerin kültür ekimleri yapılmaktadır. İdrar kültür ekimleri, MALDI-TOF identifikasyon ve 11 hastanenin antibiyogramları, (3 büyük Eğitim Araştırma hastanesi'nde antibiyogramlar yapılmaktadır.) tüberküloz, IFA, PCR, manuel seroloji, hemogram, sedimentasyon, ELISA, seroloji ve allerji testleri Merkezi Laboratuvar'da çalışılmaktadır.

## Gereç ve Yöntem

1 Ocak 2020- 10 Aralık 2020 tarihleri arasında Merkezi Laboratuvar'da test edilmiş olan mikobakteri kültür ve/veya PCR istenilen 658 BOS örneği Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD) test sonucu retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

## Bulgular

Onbir aylık süreçte toplam 658 BOS örneğinde Xpert MTB/RIF ultra testi çalışılmıştır. Test edilen 658 BOS örneğinin 6'sında *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) DNA pozitif bulunmuştur. MTB DNA pozitif 6 BOS örneğinin 2 hastaya ait olduğu ve rifampisin direncinin negatif olduğu tespit edilmiştir. İlk hasta; 59 yaşında kadın hasta (Y.K.), 28 Mayıs 2020 tarihinde menenjit, septisemi, toksoplazmozis ön tanıları ile hastaneye yatırılmıştır. 6 Haziran, 22 Haziran ve 3 Temmuz 2020 tarihlerinde alınan ve mikobakteri kültür ve PCR istenilen BOS örnekleri, Xpert MTB/RIF ultra sistemi ile test edilmiş ve MTB DNA pozitif RIF direnci negatif bulunmuş, sonuçlar ortalama 2 saat 50 dakika içinde doktoruna bildirilmiştir. Hastanın kan kültüründe 11 Temmuz 2020 *Acinetobacter baumannii* üremesi olmuştur. Hastanın ARB sonuçları negatif, mikobakteri kültür testleri

sonuçlanmadan hastanın exitus olduğu bilgisine ulaşılmıştır. İkinci hasta 12 yaş erkek çocuk, (H.N.), 5 Ekim 2020 tarihinde bronkopnömoni ön tanısı ile hastaneye yatırılmıştır. 7 Ekim, 9 Ekim ve 26 Ekim 2020 tarihlerinde alınan ve mikobakteri kültür ve PCR istenilen BOS örnekleri, Xpert MTB/RIF ultra sistemi ile test edilmiş ve MTB-DNA pozitif RIF direnci negatif bulunmuş, sonuçlar ortalama 2 saat 27 dakika içinde doktoruna bildirilmiştir. 7 Ekim 2020 tarihinde klinisyene pozitif Xpert sonucu iletilmiş, tedavi planlanan steroid acilen durdurulmuştur. 9 Ekim 2020 tarihinde 2. BOS örneğinin Xpert testi sonucu da pozitif olunca tüberküloz tedavisi planlanmıştır. Hastanın mikobakteri kültür-identifikasyon 2 Kasım 2020 (26. gün), antibiyogram 29 Kasım 2020 (53. gün) tarihlerinde sonuçlanmıştır. Hastanın genel durumu iyi, tedavisi başarı ile devam etmektedir.

## Sonuç

Tüberküloz tanısı örneğin veriliş şekline göre laboratuvar uzmanının onayına kadar olan tüm süreçlerden etkilenmektedir. Konvansiyonel yöntemler malesef zaman alıcı moleküler yöntemler ise 'hızlı ve maliyetli' olarak değerlendirilmektedir. Fakat maliyet değerlendirilmesinde; hastaya en erken ve en doğru tanıyı koyabilme, hastanede yatış süresi, uygulanan ilaç tedavileri değerlendirilirse, Kısacası 'insan hayatı' düşünülürse; moleküler yöntemlerin özellikle BOS örnekleri gibi kıymetli örneklerde kullanılması çok büyük gerekliliktir.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, Xpert MTB/RIF, İstanbul

## Kaynaklar

1. Bhatia R, Dayal R, Jindal S, Agarwal D, Goyal A. GeneXpert for diagnosis of tubercular meningitis. Indian J Pediatr 2016;83(11):1353-5. <https://doi.org/10.1007/s12098-016-2096-0>
2. Bojang AL, Mendy FS, Tientcheu LD, et al. Comparison of TB-LAMP, GeneXpert MTB/RIF and culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in the Gambia. J Infect 2016;72(3):332-7. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.11.011>





olduğu gösterilmiş olup, patojeniteye etki eden mutasyonların ve farklı veri tabanlarında yayınlanan primer bölgele-  
rindeki değişimlerin saptanması, klinik seyir ve tanı kitleri-  
nin performanslarının değerlendirilmesi açısından önemli  
bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** SARS-CoV-2, RT-PCR, yeni kuşak dizile-  
me, biyoinformatik

#### Kaynaklar

1. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 107. [https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situation-reports/20200506covid-19-sitrep-107.pdf?sfvrsn=159c3dc\\_2](https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situation-reports/20200506covid-19-sitrep-107.pdf?sfvrsn=159c3dc_2) (Erişim tarihi: 15 Mayıs 2020).
2. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
3. Dallavilla T, Bertelli M, Morresi A, et al. Bioinformatic analysis indicates that SARS-CoV-2 is unrelated to known artificial coronaviruses. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(8):4558-64. [https://doi.org/10.26355/eurev\\_202004\\_21041](https://doi.org/10.26355/eurev_202004_21041)
4. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
5. Berngruber TW, Froissart R, Choisy M, Gandon S. Evolution of virulence in emerging epidemics. *PLoS Pathog.* 2013;9(3):e1003209. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003209>
6. Zhan SH, Deverman BE, Chan YA. SARS-CoV-2 is well adapted for humans. What does this mean for re-emergence? *bioRxiv.* 2020.05.01.073262. <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.073262>
7. Deng X, Achari A, Federman S, et al. Metagenomic sequencing with spiked primer enrichment for viral diagnostics and genomic surveillance. *Nature Microbiol.* 2020;5(3):443-54. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0637-9>
8. <https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/nextera-dna-flex-data-sheet-770-2017-011.pdf>

## COVID-19 Hastalığı İlişkili Rino-Orbital Mukormikoz: Vaka Serisi

Esma Eren, Hafize Sav

Kayseri Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kayseri

✉ esmaerenerilyilmaz@gmail.com

### Giriş

COVID-19, Severe Acute Respiratory Syndrome virus-2 (SARS-CoV-2)'nin etken olduğu bir solunum yolu hastalığıdır. Aralık 2019'da, Çin'de ilk kez tanımlanmış ve kısa sürede tüm dünyaya yayılmıştır<sup>(1)</sup>. Dünya Sağlık Örgütü tarafından pandemi ilan edilmiş ve ilk tanımlandığı günden itibaren yaklaşık 10 ayda yaklaşık 37 milyon kişi enfekte olmuş ve bir milyondan fazla kişi hayatını kaybetmiştir<sup>(2,3)</sup>. Hastalık kliniği asemptomatik olarak seyredebildiği gibi, solunum yetmezliğine kadar giden ağır tablolar gelişebilmektedir. Semptom tespit edilen vakalarda en sık solunum semptomları, ateş, öksürük ve dispne tanımlanmıştır. Daha ciddi vakalarda, pnömoni, ağır akut solunum yolu enfeksiyonu, böbrek yetmezliği ve hatta ölüm gelişebilir<sup>(4)</sup>.

En belirgin laboratuvar bulguları lenfopeni, nötrofil-lenfosit oranında artma, Laktat Dehidrogenaz (LDH) enzim artışı, karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, fibrinojen ve D-dimer artışıdır. Hastaların her iki akciğerinde infiltrasyon sık görülmektedir<sup>(5)</sup>. Klinik aniden bozulabilmekte ve oksijenizasyon yetersiz olmaktadır. Akut Respiratuar Distress Sendromu (ARDS) olarak bilinen tabloya hızlı ilerleme olmakta ve hastalar solunum yetmezliğinden kaybedilmektedir<sup>(4)</sup>. Tedaviye rağmen devam eden dirençli ateş, devamlı yüksek seyreden ya da artmaya devam eden C-reaktif protein (CRP) ve ferritin değerleri, D-dimer yüksekliği, lenfopeni ve trombositopeni şeklinde sitopeniler, karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, hipofibrinopeni veya trigliserid değerlerinde yükselme gibi bulgularının varlığı hastalık seyrine Makrofaj Aktivasyon Sendromu (MAS) tablosu veya sitokin fırtınasının eşlik ettiğine işaret eder<sup>(6)</sup>. Tedavisinde immunsupresif ajanlar olan tocilizumab, anakinra gibi monoklonal antikorlar ve steroidler kullanılmaktadır<sup>(7,8)</sup>.

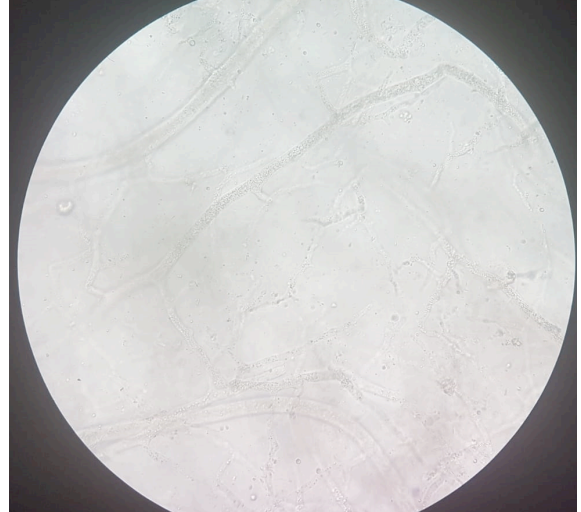
COVID-19 hastalığında oluşan immün disregülasyon, alveol hasarı, uzun süreli hastanede ve yoğun bakımda yatma, immunsupresif tedaviler alma sonucunda invaziv mantar enfeksiyonları gelişmektedir<sup>(9)</sup>. Bunun yanında diyabetes mellitus (DM), mukormikoz için risk faktörüdür ve steroid kullanımı kan glukoz düzeylerinin yüksek seyretmesine neden olmaktadır. Mukormikozun tanısı ve tedavisi oldukça güç ve zahmetlidir. Mortalite oranları yüksektir. Viral solunum yolu enfeksiyonlarına sekonder olarak artmış insidans ile görülebilir<sup>(9,10)</sup>. Burada COVID-19 tanısı ile tedavi almış ve mukormikoz gelişmiş altı vaka sunmaktayız. Vakalarımızın özellikleri ve aldıkları immunsupresif tedaviler Tablo 1'de verildi.

### Gereç ve Yöntem

Hastaların nazal sürüntülerinden SARS Cov-2 Real time PCR

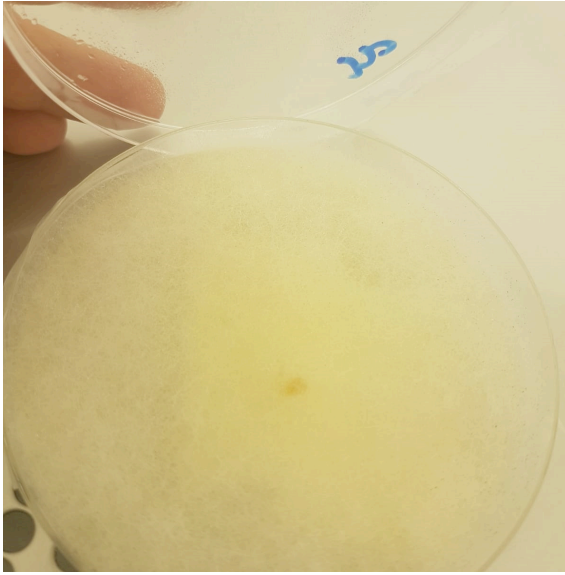
(Bioeksen, Türkiye) çalışıldı.

**Mikolojik inceleme:** Hastalarımızdan alınan örnekler, Kayseri Şehir Hastanesi Mikoloji laboratuvarında çalışıldı. Doku parçaları steril ortamda sikloheksimsiz Sabouraud dekstrozağara (SDA; Oxoid, Birleşik Krallık) ekim yapıldı ve 37°C ve 25°C inkübasyona bırakıldı. Direk mikroskopik inceleme için örneğin kalınlığı ve inceliğine göre doku parçalarına %15 ve %30 potasyum hidroksit ile muamele edildi. Sunmuş olduğumuz tüm hasta örneklerinin mikroskopik incelemesinde dallanan ve dallanmayan septasız geniş hiyalen hifler görüldü (Resim 1). Ayrıca üç ile beş gün arasında tüm petrilere doduran, koloni rengi beyazdan-gri renge dönen mantar üremeleri saptandı (Resim 2). Kültürler laktofenol pamuk mavisi ile değerlendirildi (Resim 3).



Resim 1. Dallanan ve dallanmayan septasız geniş hifler.

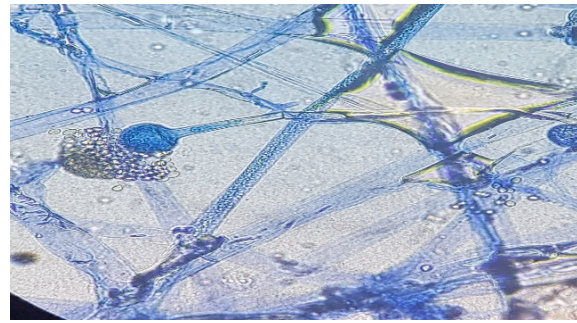
**Olgu 1:** Elli yedi yaşında erkek hasta, bilinen talasemi minör ve DM hastalığı ile takipliymiş. COVID-19 tanısı ile servise yatırılmış. Antiviral tedaviye ek olarak, ARDS olması nedeniyle deksametazon (16 mg/gün, parenteral) başlanmış. MAS ile uyumlu bulguları olması üzerine tocilizumab (100 mg, parenteral) verilmiş. Hastanın tedavisinin 14. gününde yüzünün sağ yarısında ağrı olması nedeniyle yapılan muayenede hassasiyet mevcut idi. Endoskopik sinüs muayenesinde ise maksiller sinüs mukozasında nekrotik ve kanamalı alanlar saptandı. Paranasal sinüs bilgisayarlı tomografi (BT) görüntülemesinde, sağ maksiller bölgede mukozal kalınlaşma izlendi. Hastaya liposomal amfoterisin B (5 mg/kg/gün, parenteral) başlandı. Hasta acil cerrahi debridman için operasyona alındı. İntraoperatif doku örneğinde *Mucor*



**Resim 2.** Petriyi dolduran, gri-beyaz koloni renkli, mantar üremeleri.

spp. üremesi bildirildi. Operasyon sonrası komplikasyon gelişmeyen ve parenteral antifungal tedavisi dört haftaya tamamlanan hasta, oral posakonazol tedavisi ile taburcu edildi.

**Olgu 2:** Yetmiş bir yaşında, DM ve kronik böbrek yetmezliği tanıları ile tedavi alan hasta, COVID-19 tanısı ile hastaneye yatırılmış. Antiviral tedavinin yanı sıra, sekonder bakteriyel pnömoni gelişimi nedeniyle meropenem (1 gr/gün parenteral), ARDS nedeni ile de deksametazon (6 mg/gün, parenteral) verilmiş. Kliniği düzelmesi üzerine de taburcu edilmiş. Dört gün sonra, nefes darlığı şikayeti ile tekrar başvuran hastada COVID-19 progresyonu saptanmış ve tekrar kliniğe yatırılmış. Hastanın sağ gözünde şişlik şikayeti olması ve maksiller bölgede hassasiyeti olması üzerine çekilen



**Resim 3.** Laktofenol pamuk mavisi ile boyama.

paranasal sinüs BT'de, sağ maksiller sinüste total havalanma kaybına neden olan, kemik duvarda yer yer destrüksiyona sebep olan yumuşak doku izlendi. Endoskopik muayene sinüs içerisinde püy görüldü. Hastaya meropenem (3 gr/gün, parenteral), liposomal amfoterisin B (5 mg/kg/gün, parenteral), posakonazol (200 mg/gün, oral) başlandı. Operasyona alınarak nekrotik dokular ve püy temizlendi. Doku kültürü *Mucor* spp. üredi. Antifungal tedaviyi dört hafta aldıktan sonra posakonazol oral tedavisi ile taburcu edildi.

**Tablo 1. COVID-19 tanısı ile tedavi alan ve küf enfeksiyonu gelişen hastalar.**

|        | Yaş | Cinsiyet | SARS-CoV-2 PCR | Toraks BT           | Alt Hastalık            | Entübasyon | Yüksek Doz Steroid          | Steroid/Doz                   | İmmüsupresif tedavi   | Tanı                       |
|--------|-----|----------|----------------|---------------------|-------------------------|------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1      | 57  | E        | Pozitif        | COVID-19 ile uyumlu | DM<br>Talasemi Taşıyıcı | -          | -                           | Deksametazon<br>16 mg/gün     | Tocilizumab<br>100 mg | Rino-orbital<br>Mukormikoz |
| Olgu 2 | 71  | E        | Pozitif        | COVID-19 ile uyumlu | DM<br>KBY               | -          | -                           | Deksametazon<br>16 mg/gün     | -                     | Rino-orbital<br>Mukormikoz |
| Olgu 3 | 88  | E        | Negatif        | COVID-19 ile uyumlu | HT<br>KAH               | -          | -                           | Metilprednisolon<br>40 mg/gün | -                     | Rino-orbital<br>Mukormikoz |
| Olgu 4 | 74  | K        | Pozitif        | COVID-19 ile uyumlu | DM<br>Hipotiroidi       | -          | -                           | Deksametazon<br>16 mg/gün     | -                     | Rino-orbital<br>Mukormikoz |
| Olgu 5 | 74  | E        | Negatif        | COVID-19 ile uyumlu | HT<br>KAH               | -          | -                           | Deksametazon<br>16 mg/gün     | Etanercept<br>50 mg   | Rino-orbital<br>Mukormikoz |
| Olgu 6 | 73  | E        | Pozitif        | COVID-19 ile uyumlu | DM<br>HT                | -          | Metilprednisolon<br>1000 mg | Deksametazon<br>8 mg/gün      | -                     | Rino-orbital<br>Mukormikoz |



**Olgu 3:** Seksen sekiz yaşında, bilinen hipertansiyon (HT) ve koroner arter hastalığı (KAH) olan hastada, COVID-19 tanısı ile 14 gündür antiviral ve deksametazon tedavisi almakta iken ortaya çıkan sol yanakta şişlik şikayeti oldu. Yapılan muayenesinde sol nazal kavitede hemorajik krutlar ve nazal kavitede beyaz renkli mantar hifleri izlendi. Liposomal amfoterisin B (5 mg/kg/gün, parenteral), posakonazol (200 mg/gün, oral) başlandı. Hasta mukormikoz ön tanısı ile operasyona alındı ve debridman yapıldı. İntraoperatif alınan doku kültüründe *Mucor* spp. üredi. Operasyon sonrası takiplerinde kardiyak arrest olan hasta, tedavinin altıncı gününde kaybedildi.

**Olgu 4:** Yetmiş dört yaşında, DM ve hipotiroidi tanıları ile takipli kadın hasta, COVID-19 nedeni ile 14 gün antiviral tedavi ve metilprednisolon (40 mg/gün, parenteral) tedavi aldıktan sonra taburcu edilmiş. Sağ yanakta şişlik olması üzerine tekrar başvurmuş. Paranasal sinüs BT'de sağ maksiller sinüsü dolduran opasite izlendi. Hasta mukormikoz ön tanısı ile operasyona alındı. İntraoperatif alınan doku kültüründe *Mucor* spp. üredi. Liposomal amfoterisin B (5 mg/kg/gün, parenteral) başlandı. Tedavinin 11. gününde hasta kaybedildi.

**Olgu 5:** Yetmiş dört yaşında, HT ve KAH tanıları ile takipli erkek hasta, COVID-19 tanısı ile kliniğe yatırılmış. ARDS olması nedeni ile deksametazon (12 mg/gün, parenteral) almakta olan hastaya, MAS gelişmesi üzerine etanercept (50 mg, subkutan) uygulanmış. Tedavinin 18. gününde sol göz kapağında düşme ve göz hareketlerinde kısıtlılık olan hastanın endoskopik sinüs muayenesinde nekrotik alanlara rastlandı. Hasta acil debridman için operasyona alındı ve liposomal amfoterisin B (5 mg/kg/gün, parenteral), posakonazol (200 mg/gün, oral) başlandı. İntraoperatif alınan doku kültüründe *Mucor* spp. üredi. Mevcut hali ile tedavisi, yoğun bakım ünitesinde devam etmektedir.

**Olgu 6:** Yetmiş üç yaşında, DM ve HT tanıları ile takipli hasta COVID-19 nedeni ile antiviral tedavi almış. Retrobulber nörit tanısı ile tekrar yatırılmış ve pulse steroid (1000 mg parenteral) verilmiş. Tedaviden 10 gün sonra hasta ekzofthalmus nedeni ile tekrar başvurmuş. Paranasal sinüs BT'de ethmoid sinüste kalınlaşma izlenmiş. Hasta mukormikoz tanısı ile operasyona alındı ve liposomal amfoterisin B (5 mg/kg/gün, parenteral), posakonazol (200 mg/gün, oral) başlandı. İntraoperatif alınan doku kültüründe *Mucor* spp. üredi. Hasta tedavinin altıncı gününde kaybedildi.

## Sonuç

COVID-19 hastalığının tedavisinde her an her şey değişebilmektedir ve henüz standardize edilmiş bir tedavi protokolü oluşturulamamıştır. Yukarda sunmuş olduğumuz altı rino-

orbital mukormikozlu hastanın COVID-19 tedavisi esnasında, değişen oranlarda steroid ve immünsüpresif ilaçlar kullanılmıştır. Bu hastalarda anjiyoinvazif karakterde olan mukormikoz enfeksiyonu sıklığının artması, mevcut alt hastalıkların yanı sıra kullanılan steroid ve immünsüpresyon ilaçlara bağlı olabilir. Bu nedenle bu hastalarda steroid ve benzeri ilaçların kullanımına dikkat etmek ve oluşabilecek sekonder fungal enfeksiyonları unutmamak gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** COVID-19, mukormikoz, immunsupresyon, diabetes mellitus

## Kaynaklar

1. Gorbaleya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiol.* 2020;5(4):536-44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
2. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed.* 2020;91(1):157-60. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397>
3. WHO situation reports- <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200628-covid-19-sitrep-160> (Erişim tarihi: Aralık.2020).
4. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061-9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
5. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020;323(13):1239-42. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
6. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. *Autoimmun Rev.* 2020;19(6):102537. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>
7. Tufan A, Avanoğlu Güler A, Matucci-Cerinic M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. *Turk J Med Sci.* 2020;50(S1):620-32. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-168>
8. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü- COVID-19 (sars-cov-2 enfeksiyonu) Rehberi Bilim Kurulu Çalışması. 14.Nisan.2020.
9. van de Veerdonk FL, Kolwijck E, Lestrade PPA, et al. Influenza associated aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(4):524-7. <https://doi.org/10.1164/rccm.201612-2540LE>
10. Lai CC, Yu WL. COVID-19 associated with pulmonary aspergillosis: A literature review. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020;S1684-1182(20)30238-3. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.09.004>

# *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Biyofilm Üretimi ve Antibiyotik Direnci

Bahise Çağla Taşkın Dalgıç, Gülgün Yenişehirli, Yunus Bulut

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tokat

✉ bahise91@hotmail.com

## Giriş

*Pseudomonas aeruginosa*, idrar yolu enfeksiyonları, pnömoni ve bakteriyemi dahil olmak üzere yüksek morbidite ve mortaliteye sahip nozokomiyal enfeksiyonların önde gelen etkenidir<sup>(1)</sup>. Bakterinin antimikrobiyallere karşı hem doğal hem de kazanılmış direnci enfeksiyonlarının tedavisini güçleştirmektedir<sup>(2)</sup>.

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye tutunarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarid matriks içine gömülü hâlde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur. *P. aeruginosa*'nın aljinat, Psl ve Pel olmak üzere biyofilm oluşumunda rol oynadığı bildirilen üç ekzopolisakkarit vardır<sup>(3)</sup>. Biyofilm oluşumu, klinik ortamlarda *P. aeruginosa*'nın hem akut hem de kronik enfeksiyonlarının patogeneze katkıda bulunur<sup>(4)</sup>. Biyofilmden bulunan bakteriler, planktonik formlarına kıyasla antimikrobiyal ajanlara çok daha dirençlidir ve konakçı immün yanıtı tarafından ortadan kaldırılması zor olan uzun süreli veya kronik enfeksiyonlara yol açar<sup>(5)</sup>. Biyofilm üretimi ile ilişkili antimikrobiyal direnç, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar durumunda klinik uygulamada ciddi bir tehdit oluşturmaktadır<sup>(6,7)</sup>. Bu tür enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler, planktonik formlardan çok biyofilmlere yönelik seçilmelidir<sup>(8)</sup>. Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm üretimini ve antibiyotik direnç profilini inceledik.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmaya, hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında 2020 yılında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 86 *P. aeruginosa* izolatı dahil edildi. Her hastaya ait tek bir izolat çalışmaya alındı. *P. aeruginosa* izolatlarının tanımlama ve seftazidim, sefepim, imipenem, meropenem, amikasin, gentamisin, siprofloksasin ve levofloksasin için duyarlılık testleri MicroscanWalkaway 96 Plus (BeckmanCoulter, ABD) otomatize sistem ile yapıldı. Sonuçlar EUCAST 2019 klinik sınır değerler tablosuna göre değerlendirildi<sup>(9)</sup>.

İzolatların biyofilm oluşumu, daha önce Freeman ve ark.'nın<sup>(10)</sup> tarif ettiği yöntem kullanılarak Kongo Kırmızı Agar (KKA) besiyerinde değerlendirildi. Kongo Kırmızı Agar (CRA) besiyeri; beyin kalp infüzyon buyyonu (Conda, İspanya) (37 g/L), sükröz (Isolab, Türkiye) (50 g/L), agar (10 g/L) ve Kongo kırmızısı boyası (CDH, Hindistan) (0.8 g/L) ile hazırlandı. Kongo kırmızısı boyası konsantre bir şekilde ayrı olarak hazırlandı ve her iki karışım otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildi. Besiyeri 55°C'ye soğutulduktan sonra Kongo kırmızısı boyası solüsyonu eklendi. Steril plastik petrilere dökülen besiyeri taze olarak kullanıldı. KKA besiyeri-

ne ekimleri yapılan izolatlar normal atmosferik koşullarda 37°C'de 1 gece inkübe edildi ve ertesi gün plaklar incelendi. KKA besiyerinde siyah koloni oluşturan izolatlar biyofilm üretimi pozitif ve şeffaf/kırmızı koloni oluşturan izolatlar biyofilm üretimi negatif olarak değerlendirildi<sup>(10)</sup>. Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, negatif kontrol olarak *S. epidermidis* ATCC 12228 suşları kullanıldı.

Çalışmada istatistiksel yöntem olarak ki-kare testi kullanıldı ve p değeri <0.05 anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

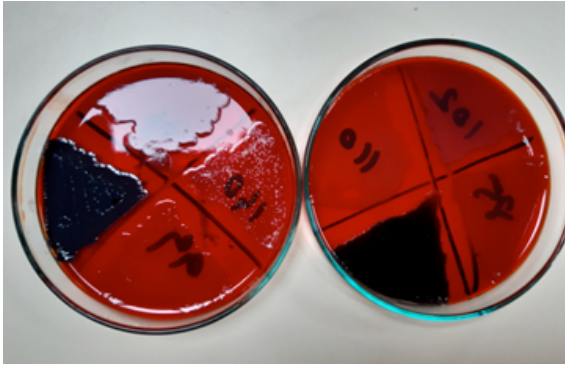
Çalışmamıza dahil ettiğimiz 86 *P. aeruginosa* izolatının 38'i alt solunum yolu, 21'i idrar, 17'si yara yeri, 9'u kan ve 1'i beyin omurilik sıvısı örneklerinden izole edilmiştir. İzolatlar arasında en yüksek antibiyotik direnç oranı %39,5 ile imipenem idi. Levofloksasine %30, seftazidime %22, sefepime %21, meropenem %17 ve amikasin %7 direnç belirlendi. Ayrıca amikasin ve meropenem orta duyarlı izolatların oranı sırasıyla %20 ve %23'tü (Tablo 1). *P. aeruginosa* izolatlarının %10,5'inde çoklu ilaç direnci (MDR) tespit edildi.

KKA yöntemiyle izolatların 9'unun (%10,5) biyofilm ürettiği tespit edildi. KKA besiyerinde biyofilm üretimi pozitif ve negatif *P. aeruginosa* izolatları Şekil 1'de gösterilmiştir. Biyofilm üreten 9 izolatın 3'ü (%33) imipenem, 2'si (%22) seftazidime, 2'si (%22) sefepime, 2'si (%22) levofloksasine ve 1'i (%11) meropenem dirençli olarak bulundu. Amikasin dirençli izolat bulunmadı. MDR tespit edilen izolatlardan 1'inde (%11) biyofilm üretimi gözlemlendi. Biyofilm üretimi gözlenmeyen 77 izolatın antibiyotik direnci; imipenem %40, levofloksasin %31, seftazidim %22, sefepim %21 ve meropenem %18 olarak bulundu. Biyofilm üreten ve üretmeyen izolatlar arasında antibiyotik direnci açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0,05).

Tablo 1. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotik direnç profili.

| Antibiyotik   | Duyarlı n (%) | Intermediate n (%) | Dirençli n (%) | Toplam n |
|---------------|---------------|--------------------|----------------|----------|
| İmipenem      | 52 (60,5)     | 0 (0)              | 34 (39,5)      | 86       |
| Meropenem     | 51 (60)       | 20 (23)            | 15 (17)        | 86       |
| Seftazidim    | 67 (78)       | 0 (0)              | 19 (22)        | 86       |
| Sefepim       | 68 (79)       | 0 (0)              | 18 (21)        | 86       |
| Amikasin      | 63 (73)       | 17 (20)            | 6 (7)          | 86       |
| Levofloksasin | 60 (70)       | 0 (0)              | 26 (30)        | 86       |





**Şekil 1.** Kongo kırmızısı agar besiyerinde biyofilm üretimi pozitif ve negatif *Pseudomonas aeruginosa* izolatları.

## Sonuç

*Pseudomonas aeruginosa*, bağışıklığı baskılanmış ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarında karşılaşılan enfeksiyonlar için ciddi bir endişe kaynağıdır<sup>(11)</sup>. Bakterinin pek çok antimikrobiyal ajana hızlı direnç geliştirme yeteneği enfeksiyonun tedavisini güçleştirmektedir.

*Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının yurt içinde ve dışında antimikrobiyal duyarlılıkları için yapılan çalışmalar incelendiğinde, direnç oranlarının yıllara ve bölgelere göre değişik dağılımlar gösterdiği dikkati çekmektedir<sup>(12)</sup>. Çalışmamızda izolatlar en yüksek oranda imipeneme (%39.5) ve en düşük oranda amikasinine (%7) direnç göstermiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada benzer şekilde en yüksek direnç oranı imipeneme (%43.4) ve en düşük direnç oranı amikasinine (%14.5) tespit edilmiştir<sup>(13)</sup>. Köse ve ark.<sup>(14)</sup> yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının meropenem duyarlılığını %53 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda meropeneme izolatların %17' si dirençliken %23'ü orta duyarlı olarak tespit edilmiştir. Karbapenemlere yüksek direnç oranları bu antibiyotiklerin *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılması nedeniyle olabilir.

Çalışmamızda anti-pseudomonal sefalosporinler olan seftazidim ve sefepime sırasıyla %22 ve %21 oranında direnç tespit edilmiştir. Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda seftazidime direnç oranları %15 ile %77 arasında değişmektedir<sup>(15,16)</sup>.

Çalışmamızda izolatların %10.5 i KKA yöntemiyle biyofilm üretti. Bakterinin biyofilm üretimi tespitinde Kongo kırmızı agar metodu, standart cam tüp yöntemi ve mikropalak yöntemi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar bu yöntemler arasında etkinlik farkı olduğunu göstermektedir. Samed ve ark.<sup>(17)</sup> *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm üretimini KKA ile %14 bulurken standart cam tüp yöntemi ile %30 ve mikropalak yöntemi ile %60 oranında tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada, *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm üretimini KKA ile %44 bulurken mikropalak yöntemi ile % 94 oranında tespit edilmiştir<sup>(1)</sup>.

Biyofilm üretimi *P. aeruginosa*'nın patogeneğinde anahtar bir role sahiptir çünkü biyofilm antibiyotiklerin bakterilere penetrasyonunu azaltır ve yüzeylerden çıkarılması güçtür. Biyofilm üretimi ile ilişkili antimikrobiyal direnç, biyofilm

ile ilişkili enfeksiyonlar durumunda klinik uygulamada ciddi sorun oluşturmaktadır. Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm üretimi ile antibiyotik direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlemlenmedi ( $p > 0.05$ ). Abdulhaq ve ark.<sup>(1)</sup> MDR olarak tespit ettikleri izolatların tamamının biyofilm ürettiğini tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada *P. aeruginosa*'da imipenem/silastatin ve seftazidim direnci ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı bir pozitif korelasyon gösterilmiştir<sup>(18)</sup>. Çoban ve ark.<sup>(19)</sup> ise, çalışmamızla benzer şekilde *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm üreten grup ile üretmeyenler arasında antibiyotik duyarlılıklarının karşılaştırılması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir.

Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm üretimi ve antibiyotik direnci araştırıldı. *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm üretimi ile antibiyotik direnci arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi ( $p > 0.05$ ). Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm üretiminin düşük oranda (%10.5) tespit edilmesi fenotipik yöntemin kısıtlılığından olabilir.

*Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında biyofilm üretiminin antibiyotik direncine etkisini daha iyi değerlendirebilmek için farklı fenotipik ve genotipik yöntemlerle yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** *Pseudomonas aeruginosa*, biyofilm, antibiyotik direnci

## Kaynaklar

1. Abdulhaq N, Nawaz Z, Zahoor MA, Siddique AB. Association of biofilm formation with multi drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. EXCLI J. 2020;19:201-8. <https://doi.org/10.17179/excli2019-2049>
2. Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. Nosocomial infections and their control strategies. Asian Pac J Trop Biomed. 2015;5(7):509-14. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001>
3. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. Appl Environ Microbiol. 2011;77(15):5238-46. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>
4. Schaber JA, Triffo WJ, Suh SJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell to-cell signaling. Infect Immun. 2007;75(8):3715-21. <https://doi.org/10.1128/IAI.00586-0>
5. Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. A genetic basis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. Nature. 2003;426(6964):306-10. <https://doi.org/10.1038/nature02122>
6. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. Int J Oral Sci. 2011;3(2):55-65. <https://doi.org/10.4248/IJOS11026>
7. Hall MR, McGillicuddy E, Kaplan LJ. Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians. Surg Infect. 2014;15(1):1-7. <https://doi.org/10.1089/sur.2012.129>
8. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the post antibiotic era. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(4):a010306. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>
9. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2019.

10. Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol. 1989;42(8):872-4.  
<https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
11. Bukholm G, Tannaes T, Kjelsberg AB, Smith-Erichsen N. An outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* associated with increased risk of patient death in an intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol. 2002;23(8):441-6.  
<https://doi.org/10.1086/502082>
12. Öztürk CE, Türkmen Albayrak H, Altınöz A, Ankaralı H. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotiklere direnç ve beta-laktamaz oranları. ANKEM Derg. 2010;24(3):117-23.
13. Uzunbayır-Akel N, Tekintaş Y, Yılmaz FF, ve ark. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının virülans özellikleri ve epidemiyolojik ilişkisi. Turk Hij Den Biyol Derg. 2019;76(4):395-404.  
<https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.68235>
14. Köse Ş, Atalay S, Ödemiş İ, Adar P. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2014;28(3):100-4.  
<https://doi.org/10.5222/ankem.2014.100>
15. Arabacı F, Oлдаçay M. Yoğun bakım servisinde yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallobeta-laktamaz oranlarının araştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2010;40(1):37-40.
16. Tozlu Keten D, Güzel Tunçcan Ö, Dizbay M, Arman D. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında doripenemin diğer karbapenemlerle in-vitro karşılaştırmalı etkinliği. ANKEM Derg 2010;24(2):71-5.
17. Samad A, Khan AA, Sajid M, Zahra R. Assessment of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and hydrodynamic evaluation of microtiter plate assay. J Pak Med Assoc. 2019;69(5):666-71.
18. Fricks-Lima J, Hendrickson CM, Allgaier M, et al. Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. Int J Antimicrob Agents. 2011;37(4):309-15.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.12.017>
19. Çoban AY, Çiftçi A, Onuk EE, Erturan Z, Tanrıverdi Çaycı Y, Durupınar B. Kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırılması ve bu özelliğin genotip ve antibiyotik duyarlılığı ile ilişkisinin belirlenmesi. Mikrobiyol Bul. 2009;43(4):563-73.

## Neden hVISA/VISA Araştırmalarını Sadece Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Yapıyoruz? hVISA Fenotipinde İki Metisilin Duyarlı *S. aureus* İzolatu

Bahise Çağla Taşkın Dalgıç<sup>1</sup>, Gülgün Yenişehirli<sup>1</sup>, Yunus Bulut<sup>1</sup>, Aydan Yenişehirli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tokat

<sup>2</sup>Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tokat

✉ bahise91@hotmail.com

### Giriş

*Staphylococcus aureus*, lokalize deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından invaziv enfeksiyonlara kadar, geniş klinik sendrom yelpazesine sahip dinamik bir patojendir<sup>(1)</sup>. *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüzde vankomisine duyarlılığı azalmış *S. aureus* izolatların sayısı giderek artmaktadır<sup>(2)</sup>. *S. aureus*'ta vankomisine azalmış duyarlılık mekanizmaları *vanA* operonunun edinimini içeren vankomisin direncinde görülen mekanizmadan farklıdır<sup>(3)</sup>. hVISA/ VISA izolatların ortaya çıkmasına, hücre duvar döngüsünün azalması, azalmış otolitik aktivite ve bazen hücre duvar sentezinin aktive olması sonucu hücre duvarının kalınlaşarak bölünme septumundaki vankomisin bağlanma bölgesine, vankomisin erişiminin azalmasının neden olduğu düşünülmektedir<sup>(4)</sup>. hVISA/ VISA fenotipinin moleküler mekanizmalarıyla ilgili birkaç gen bölgesi sorumlu tutulmaktadır. *GraRS* ve *walkR* gibi düzenleyici sistemleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların azalmış glikopeptit duyarlılığına neden olduğu gösterilmiştir. *WalkR* operonunun edinilmiş mutasyonlarının, artmış kapsül sentezine, hücre duvarı kalınlığında artışlara ve azalmış otolize yol açtığı gösterilmiştir<sup>(4)</sup>.

Hem ülkemizde hem de yurt dışında yapılan araştırmalara baktığımızda vankomisine azalmış duyarlılık çalışmalarının metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarına odaklandığını görmekteyiz<sup>(2,5)</sup>. Ancak vankomisine azalmış duyarlılık metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarında da ortaya çıkabilmektedir<sup>(6)</sup>. Yurt dışında bazı araştırmalar glikopeptitlere duyarlılığı azalmış MSSA izolatlarının artan mortalite ile ilişkisini ortaya koymuş bazıları ise mortalite artışından bağımsız komplike enfeksiyonda artışla ilişkilendirmiştir<sup>(7,8)</sup>. Ülkemizde glikopeptitlere duyarlılığı azalmış MSSA izolatlarıyla ilgili bir araştırma boşluğu olduğunu gözlemledik.

Tedavi stratejilerinin gözden geçirilmesi, klinik yansımaların incelenmesi ve gerçek prevelansların belirlenebilmesi için MSSA izolatlarının da glikopeptitlere azalmış duyarlılık açısından araştırılması gerektiğini düşünüyoruz. Çalışmamızda hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında hVISA fenotipinde 2 MSSA izolatu tespit ettik ve bu veriyi literatüre kazandırmayı amaçladık.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmamıza, hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında 2009-2013 yılları arası ve 2020 yılında çeşitli klinik

örneklerden izole edilen 50 adet MSSA izolatu dahil edildi. İzolatların metisilin duyarlılıkları 30 µg sefoksitin diski kullanılarak disk difüzyon testi yöntemi ile belirlendi. Vankomisin ve teikoplanin duyarlılıkları ise sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı. Sonuçlar European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2019 klinik sınır değerler tablosuna göre değerlendirildi<sup>(9)</sup>.

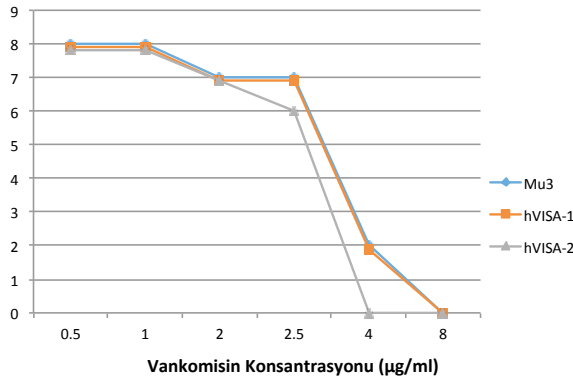
MSSA izolatlarının glikopeptitlere azalmış duyarlılık taraması için EUCAST önerileri doğrultusunda 5 mg/L teikoplanin içeren Mueller Hinton plağı kullanıldı. Bu işlem için bakterilerin 2.0 McFarland bulanıklıkta süspansiyonları hazırlandı. Bu inokulumdan 10 µl agar yüzeyine bir nokta şeklinde aktarıldı ve plak normal atmosferde 35°C'de 48 saat inkübe edildi. 48 saat sonunda plaklarda üreme görülmesi azalmış glikopeptit duyarlılığı şüphesini uyandırdı. Çalışmada pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 700698 (Mu3) (hVISA) ve *S. aureus* ATCC 700699 (Mu50) (VISA) suşları, negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

Teikoplanin tarama agar yöntemi ile hVISA şüpheli tespit edilen *S. aureus* izolatlarına hVISA varlığını doğrulamak için Wootton ve ark.nın<sup>(10)</sup> uyguladığı şekilde PAP-AUC yöntemi uygulandı. İzolatların 0.5 McFarland'a eşdeğer bulanıklıkta süspansiyonları hazırlandı (1.5x10<sup>8</sup> KOB/ml). Bu süspansiyon steril distile su içinde sulandırılarak 10<sup>3</sup> ve 10<sup>6</sup> lık konsantrasyonlar elde edildi. Her izolat için hazırlanan bu 3 sulandırımından 100 µl alınarak 0, 0.5, 1, 2, 2.5, 4 ve 8 mg/L vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon (BKİ) agarı ekilerek normal atmosferik koşullarda 35°C'de 48 saat inkübe edildi. 48 saat inkübasyon sonrasında plaklar üreme açısından değerlendirildi. Plaklarda her bir antibiyotik konsantrasyonu için üreme tespit edilen koloni sayısının logaritması göz önünde bulundurularak grafikler çizildi. Bu işlem hVISA kontrol kökeni Mu3 (ATCC 700698) içinde uygulandı. Grafikte her suş için elde edilen eğri altında kalan alan Microsoft 36 Excel 2016 MSO (Microsoft Office Professional Plus 2016, ABD) programı ile hesaplandı. Daha sonra her bir suşun eğri altında kalan alan (AUC) değeri, Mu3 kontrol suşunun AUC değerine oranlandı. Bu oran ≤0.90 ise VISA, 0.90-1.3 ise hVISA, ≥1.3 ise VISA olarak kabul edildi.

### Bulgular

İzolatların tamamı sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisin ve teikoplanin duyarlı olarak bulundu (MIK değeri ≤2 µg/ml). Teikoplanin tarama agar yöntemi ile 48 saat sonunda 7

MSSA izolatı (7/50) glikopeptitlere duyarlılığı azalmış olarak tespit edildi. Bu 7 izolata yapılan PAP-AUC sonucunda 2 MSSA izolatı heterojen vankomisin-intermediate *S. aureus* (hVISA) olarak değerlendirildi. Bu 2 izolat 2020 yılına ait yara kültürü örneklerinden izole edilmişti. Pozitif kontrol suşu Mu3 ve 2 izolata ait PAP-AUC grafiği Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Pozitif kontrol suşu Mu3 ve 2 izolata ait PAP-AUC grafiği.

## Sonuç

MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek olan vankomisin rutin laboratuvar testleri ile tespit edilemeyen dirençli alt popülasyonlarının varlığı ve antibiyotik duyarlılık testleriyle duyarlı kategoride olmasına rağmen MİK değerlerinde yükselme olması gibi sorunlar tedavi başarısını etkilemektedir. Daha yüksek vankomisin MİK'i olan *S. aureus* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların, duyarlı aralıkta olsa dahi, artmış mortalite, artmış relaps oranı, uzun süreli hastanede yatış gibi çeşitli kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>(11)</sup>. Bu nedenlerle *S. aureus* izolatlarında hVISA/VISA fenotipinin belirlenebilmesi oldukça önemlidir.

Hem yurt dışında hem de ülkemizde glikopeptitlere duyarlılığı azalmış *S. aureus* izolatları için yapılan çalışmalar MRSA izolatlarına odaklanmıştır. Yurt dışında yapılan bir meta-analiz çalışmasında, MRSA izolatlarında hVISA prevalansı % 6.05 ve VISA prevalansı %3.01 olarak tespit edilmiştir<sup>(2)</sup>. Ülkemizde ise MRSA izolatlarında hVISA prevalansı çeşitli çalışmalarda %0.9-21.3 gibi değişen oranlarda bulunmuştur<sup>(5,12,13)</sup>.

Vankomisine duyarlılığı azalmış MSSA izolatlarıyla ilgili ise yurtdışında sınırlı sayıda çalışma tespit ettik. Çinde Hu ve ark.<sup>(6)</sup> MSSA izolatlarında hVISA fenotipini %4 olarak bildirmişler ve hVISA prevalansının yıllar içinde arttığını tespit etmişlerdir. Literatürde, ülkemizden vankomisine duyarlılığı azalmış MSSA izolatlarının bildirildiği bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda 2 (%4) MSSA izolatını hVISA olarak tespit ettik. Ayrıca Hu ve ark.<sup>(6)</sup> çalışmasına benzer şekilde 2 izolatın da 2020 yılına ait örneklerden izole edilmesi dikkat çekicidir. Bu verilerle çalışmamız *S. aureus* izolatlarında vankomisine azalmış duyarlılık araştırmalarının MSSA izolatlarında da yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda 2 MSSA izolatı (%4) hVISA olarak tespit edildi. Çalışmamız ulaşabildiğimiz kadariyle ülkemizde tespit edilen hVISA fenotipinde MSSA izolatının bildirildiği ilk çalışmadır.

Glikopeptitlere duyarlılığı azalmış *S. aureus* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların klinik sonuçlarının daha iyi değerlendirilebilmesi, tedavi yaklaşımlarının gözden geçirilmesi ve bu fenotipin gerçek prevalansının bilinmesi için MSSA izolatlarında da glikopeptitlere azalmış duyarlılık araştırılmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** MSSA, hVISA, vankomisin

## Kaynaklar

- Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339:520-32. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>
- Zhang S, Sun X, Chang W, Dai Y, Ma X. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. PLoS one. 2015;10(8):e0136082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136082>
- Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2014;124(7):2836-40. <https://doi.org/10.1172/JCI68834>
- Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 2010;23(1):99-139. <https://doi.org/10.1128/CMR.00042-09>
- Kuşçu F, Öztürk DB, Gürbüz Y, Tütüncü EE, Şencan İ, Gül S. Metisiline dirençli stafilocoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2011;45(2):248-57.
- Hu J, Ma XX, Tian Y, Pang L, Cui LZ, Shang H. Reduced vancomycin susceptibility found in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Northeast China. PLoS One. 2013;8(9):e73300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073300>
- Castón JJ, González-Gasca F, Porras S, Romero MD, Gijón J. High vancomycin minimum inhibitory concentration is associated with poor outcome in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia regardless of treatment. Scand J Infect Dis. 2014;46(11):783-6. <https://doi.org/10.3109/00365548.2014.931596>
- Sullivan SB, Austin ED, Stump S et al. Reduced vancomycin susceptibility of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* has no significant impact on mortality but results in an increase in complicated infection. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(7):e00316-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00316-17>
- EUCAST T. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2019.
- Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol. 2007;45(2):329-32. <https://doi.org/10.1128/JCM.01508-06>
- Dhand A, Sakoulas G. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. F1000 Med Rep. 2012;4. <https://doi.org/10.3410/M4-4>
- Mirza HC, Sancak B, Gür D. The prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and heterogeneous VISA among methicillin-resistant strains isolated from pediatric population in a Turkish university hospital. Microb Drug Resist. 2015;21(5):537-44. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0048>
- Sancak B, Ercis S, Menemenlioğlu D, Çolakoglu Ş, Haşcelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. J Antimicrob Chemother. 2005;56(3):519-23. <https://doi.org/10.1093/jac/dki272>



# Kolistin Dirençli Karbapenemaz Üreten *Klebsiella pneumoniae*'da Antibiyotiklerin Sinerjistik Aktivitelerinin MALDI-TOF MS ile Belirlenmesi

Çağlar Yusuf YÜCEDAĞ<sup>1</sup>, Mehmet ÖLMEZ<sup>2</sup>, Hüseyin HATİPOĞLU<sup>2</sup>, Mehmet KÖROĞLU<sup>2</sup>, Mustafa ALTINDIŞ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Öğrencisi, Sakarya

<sup>2</sup>Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya

✉ maltindis@gmail.com

## Giriş

Karbapenem dirençli Enterobacterales üyesi bakterilerin, çok ilaca dirençli (MDR) ve geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (GSBL) bakteriyel patojenlerin hızla ortaya çıkması ve dünya çapında yayılması, küresel sağlık hizmetleri için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu da mevcut antibiyotiklerin neredeyse tamamına karşı direnç geliştirerek büyük bir sorun haline gelmektedir<sup>(1,2)</sup>.

*Klebsiella pneumoniae*, hastanede yatan hastalarda antimikrobiyal dirençli fırsatçı bir patojen haline gelmektedir. *K. pneumoniae*'daki antibiyotik direncinin ana mekanizmaları, penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamlara karşı direnç sağlayan geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamazların (ESBL) ekspresyonu ve karbapenemler dâhil tüm  $\beta$ -laktamlara direnç sağlayan karbapenemazların ekspresyonudur ve popülasyonun üyeleri genellikle birden fazla antimikrobiyale karşı kazanılmış direnç oluşturmaktadır. Bu etkenlerle, *K. pneumoniae* ekolojisi, popülasyon yapısı veya patojenite bilgisi nispeten sınırlanmaktadır. Son on yılda *K. pneumoniae*, GSBL'lar ve karbapenemaz üreten MDR suşların neden olduğu sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonların yaygınlığının artması nedeniyle önemli bir klinik ve halk sağlığı tehdidi olarak ortaya çıkmaktadır<sup>(3,4)</sup>.

Son yıllardaki gelişmelerle çeşitli mikroorganizmaların tanımlanmasında Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS) cihazıyla; kolay, hızlı, yüksek verimli ve düşük maliyetli oluşturmaları mikrobiyoloji laboratuvarında identifikasyonda kullanılabilecek yeni bir seçenek sunmaktadır. Son dönemlerde bakterilerde antibiyotik duyarlılık ve dirençliğin belirlenmesi içinde denlenmektedir<sup>(5)</sup>.

Bu çalışmanın amacı, hastanemizde çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarında MALDI-TOF MS kullanılarak kolistin, meropenem ve rifampisin antibiyotikleri için duyarlılık ve sinerjinin görsel olarak saptanması ve tüm izolatların kolistin+meropenem ve kolistin+rifampin antibiyotik sinerjistik aktivitesini, ayrıca referans yöntem olarak Checkerboard mikrodilüsyon ile MALDI-TOF MS yöntemini karşılaştırarak sinerjistik uyumları amaçlanmıştır.

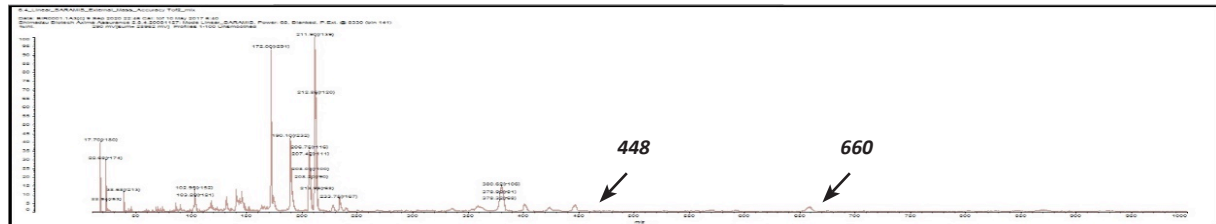
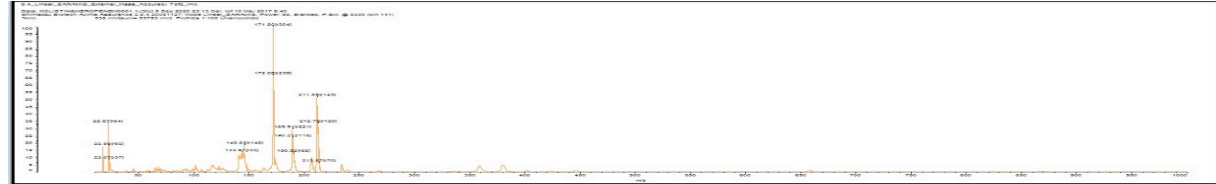
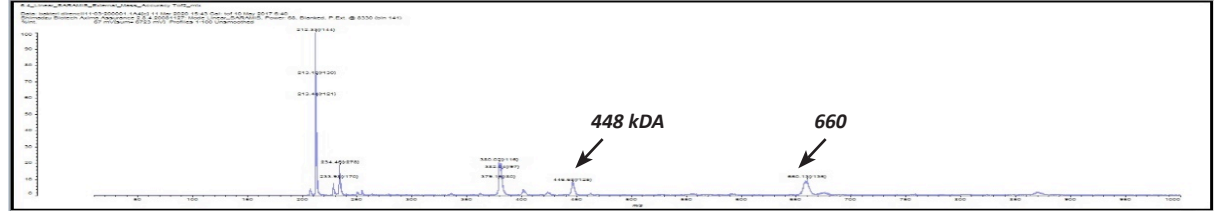
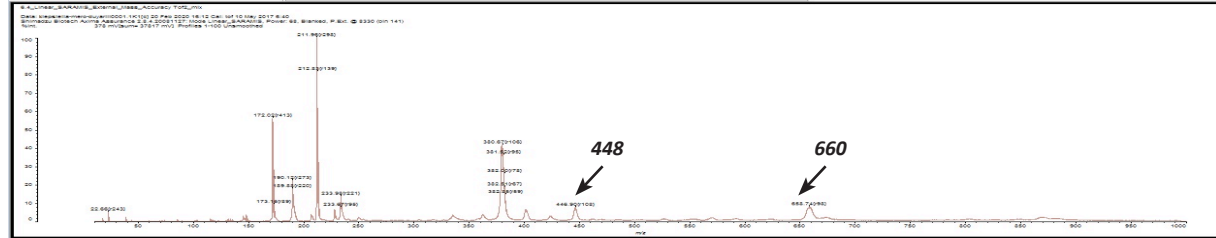
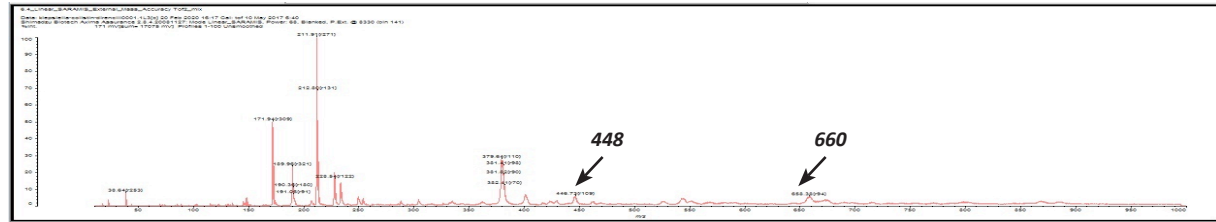
## Gereç ve Yöntem

Çalışmaya, Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2014-2020 yılları arasında farklı kliniklerden ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen klinik örneklerden (kan, idrar, rektal sürüntü, balgam, trakeal aspirat, kateter, periton vb.) elde edilen 20 adet kolistin dirençli *K. pneumoniae* bakteri izolatı dâhil edilmiştir. Tüm izolatlar çalışılncaya kadar boncuklu saklama besiyerinde -80°C'de saklanmıştır.

Klinik örneklerden ilk izolasyon aşamasında üretilen bakterilerin tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri VITEK 2® (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile yapılmıştır. Her bir izolatın kolistin, meropenem ve rifampisin minimum konsantrasyonu (MİK) değerleri Checkerboard (dama tahtası) yöntemi ile belirlendi. Dirençli ve duyarlı olma durumları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ve The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) sınır değerlerine göre yorumlanmıştır<sup>(6)</sup>.

Daha sonra sinerjik etki gösteren suşlar, kanlı agar plaklarına steril öze yardımıyla tek koloni düşürme tekniği ile pasajları yapılmıştır. Besiyerleri 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İzolatlar steril öze ile alınarak 300 µl Müller-Hinton Broth ile süspanse edilmiştir. Daha sonra vortexlenerek, McFarland 3.45 ile 4.55 (ortalama 4.00) bulanıklığı standardına ayarlanmıştır. Elde edilen süspansiyona 20 µl antibiyotik (kolistin 4 mg/ml, meropenem 8 mg/ml ve rifampisin 2 mg/ml) eklenmiştir. Elde edilen bakteri-antibiyotik süspansiyonu 37°C'lik etüvde 2.5 saat inkübe edildikten sonra 2 dakika süreyle 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, pellet kısmı 2 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur. İlk olarak 50 µl %70 formik asit eklenmiştir. Sonra 50 µl asetonitril eklenmiştir. Tekrar 2 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu kez süpernatant'dan 1 µl alınarak 48 pozisyonlu mikro plak kuyucuğuna damlatılıp, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 1 µl matris solüsyonu eklenmiştir. Solüsyon tamamen kuruduktan sonra MALDI-TOF MS cihazında çalışmak üzere hazır hale getirilmiştir<sup>(7)</sup>. Solüsyon tamamen kuruduktan sonra MALDI-TOF MS cihazında çalışmak üzere hazır hale getirilmiştir.





**Şekil 1. (Kolistin + Meropenem Sinerji Pozitif) MALDI-TOF MS yöntemi ile bakteri ve kombine antibiyotik (kolistin+meropenem) etkileşiminde sinerji pozitif tespiti.**

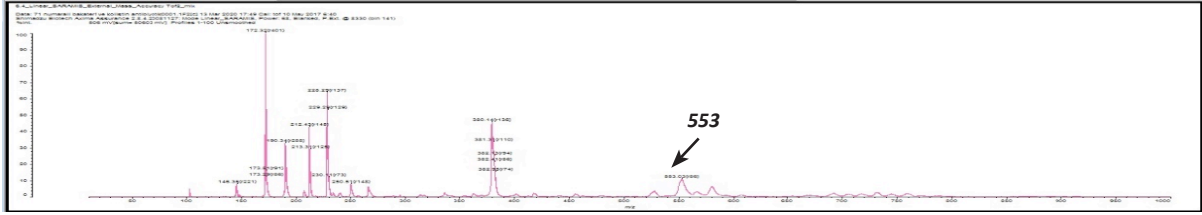
## Bulgular

Çalışmaya dâhil edilen 20 izolattan 11'i erkek ve 9'u kadın olarak görülmüştür. Suşların izole edildiği klinik örnekler değerlendirildiğinde; dördü (%20) rektal sürüntü, dördü (%20) yara kültürü, dördü (%20) trakeal aspirasyonu ve dördü (%20) idrar kültürü örneği olarak saptanmıştır. 20 adet *K. pneumoniae* bakteri izolatı CLSI ve EUCAST sınır değerlerine göre kolistin antibiyotik MİK değeri  $>128 \mu\text{g/ml}$  ile  $2 \mu\text{g/ml}$  arasındaki suşların 19'u (%95) dirençli ve 1'i (%5) duyarlı bulunmuştur. Aynı şekilde meropenem için MİK değeri  $>64 \mu\text{g/ml}$  ile  $0.5 \mu\text{g/ml}$  arasındaki suşların 12'si (%60)

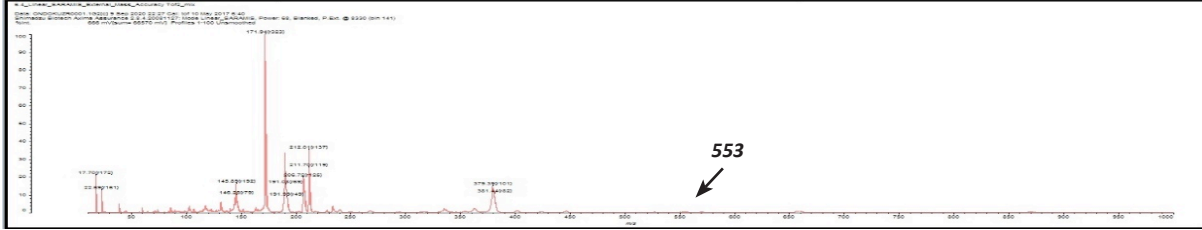
dirençli, 6'sı (%30) duyarlı ve 2'si (%10) orta duyarlı bulunmuştur. Rifampisin için MIC değeri  $>16 \mu\text{g/ml}$ 'de tüm isolatlar rifampisine dirençli bulunmuştur. Kolistin+meropenem kombinasyonunda 19 adet kolistin dirençli suşun 9'u (%45) sinerjik etki saptanmıştır. Diğer bir antibiyotik kombinasyon çalışmamız olan kolistin+rifampisin için suşların 16'sı (%80) sinerjik etkili olduğu belirlenmiştir.

Karbapenem direncine sahip suşların kombine ilaç kolistin+meropenem etkileşiminde pozitif sinerji tespiti Şekil 1'deki gibi siyah okla gösterilmiştir. Piklerin; A'da, B'de ve C'de 448.60 m/z ile 660.12 m/z piklerin varlığı E'de kaybolmuştur.

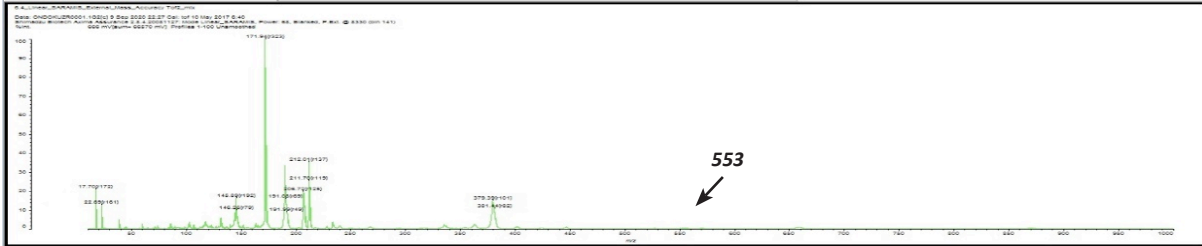
#### A. *Klebsiella pneumoniae* (Kolistin Dirençli Karbapenemaz Üreten Bakteri).



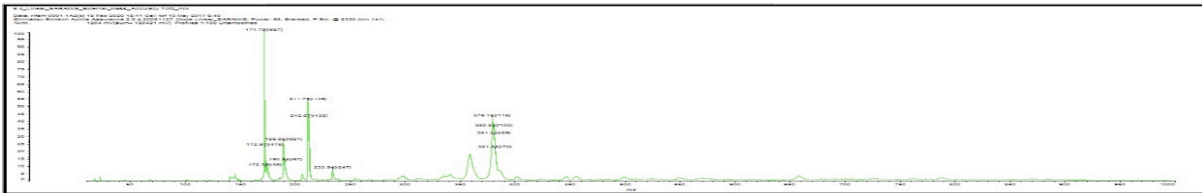
#### B. *Klebsiella pneumoniae* + Antibiyotik (Kolistin)



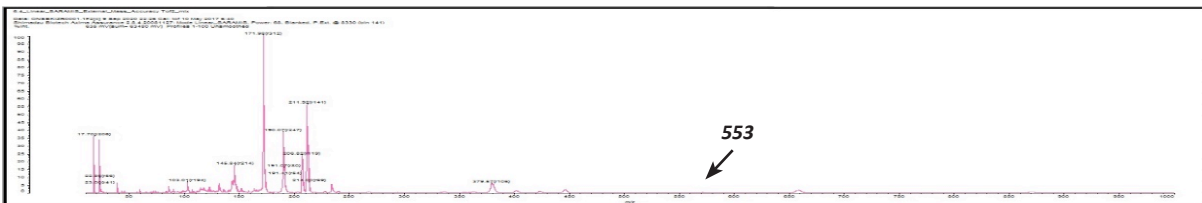
#### C. *K. pneumoniae* + Antibiyotik (Rifampisin)



#### D. Antibiyotik Kombinasyonu (Kolistin+Rifampisin)



#### E. *Klebsiella pneumoniae* + Antibiyotik Kombinasyonu (Kolistin+Rifampisin)



**Şekil 2. (Kolistin + Rifampisin Sinerji Pozitif) MALDI-TOF MS yöntemi ile bakteri ve kombine antibiyotik (kolistin+rifampisin) etkileşiminde sinerji pozitif tespiti.**

Karbapenem direncine sahip suşların kombine ilaç kolistin+meropenem etkileşiminde negatif sinerji tespiti Şekil 2'deki gibi siyah okla gösterilmiştir. Piklerin; A'da, B.de, C'de ve E'de 446.73 m/z ile 658.38 m/z piklerinde değişim gözlenmemiştir.

Karbapenem direncine sahip suşların kombine ilaç kolistin + rifampisin etkileşiminde pozitif sinerji tesbitinde 553.08 m/z piki kaybolmaktadır.

Karbapenem direncine sahip suşların kombine ilaç kolistin + rifampisin etkileşiminde negatif sinerji tesbitinde 558.03 m/z pikinde değişim gözlenmemektedir.

Kolistin+meropenem kombinasyonunda MALDI-TOF MS yöntemini Checkerboard yöntemi ile kıyasladığımızda 9 suşun 6'sında (%66.6) sinerjik uyum saptanmıştır. Bir değeri kolistin+rifampisin kombinasyonunda 16 suşun 11'inde (%68.7) sinerjik uyum saptanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. MALDİ-TOF MS ile Checkerboard yönteminin karşılaştırılması.

| Hasta No. | Gen - Xpert    | Checkerboard (Kolistin+Meropenem) | MALDİ-TOF MS (Kolistin+Meropenem) | Checkerboard (Kolistin+Rifampisin) | MALDİ-TOF MS (Kolistin+Rifampisin) |
|-----------|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1         | NDM-1 + OXA-48 | Additif                           | Sinerji                           | 1                                  | Sinerji                            |
| 2         | NDM-1          | Additif                           | Sinerji                           | 2                                  | Sinerji                            |
| 3         | NDM-1 + OXA-48 | Additif                           | Duyarlı                           | 3                                  | Sinerji                            |
| 4         | NDM-1          | Sinerji                           | Duyarlı                           | 4                                  | Sinerji                            |
| 5         | NDM-1 + OXA-48 | Additif                           | Sinerji                           | 5                                  | Duyarlı                            |
| 6         | NDM-1 + OXA-48 | Additif                           | Sinerji                           | 6                                  | Duyarlı                            |
| 7         | KPC            | Additif                           | Sinerji                           | 7                                  | Duyarlı                            |
| 8         | OXA-48         | Sinerji                           | Sinerji                           | 8                                  | Sinerji                            |
| 9         | OXA-48         | Sinerji                           | Sinerji                           | 9                                  | Sinerji                            |
| 10        | NDM-1          | Additif                           | Sinerji                           | 10                                 | Sinerji                            |
| 11        | NDM-1 + OXA-48 | Sinerji                           | Duyarlı                           | 11                                 | Sinerji                            |
| 12        | OXA-48         | Sinerji                           | Sinerji                           | 12                                 | Sinerji                            |
| 13        | NDM-1          | Sinerji                           | Sinerji                           | 13                                 | Sinerji                            |
| 14        | OXA-48         | Sinerji                           | Sinerji                           | 14                                 | Sinerji                            |
| 15        | NDM-1 + OXA-48 | Duyarlı                           | Duyarlı                           | 15                                 | Sinerji                            |
| 16        | KPC            | Duyarlı                           | Sinerji                           | 16                                 | Sinerji                            |
| 17        | OXA-48         | Sinerji                           | Sinerji                           | 17                                 | Sinerji                            |
| 18        | OXA-48         | Additif                           | Sinerji                           | 18                                 | Sinerji                            |
| 19        | OXA-48         | Additif                           | Sinerji                           | 19                                 | Sinerji                            |
| 20        | KPC            | Sinerji                           | Duyarlı                           | 20                                 | Sinerji                            |

## Sonuç

İlaç etkileşimi için MALDİ-TOF MS ve çalışmamızda referans olan Checkerboard mikrodilüsyon yöntemini karşılaştırdığında, kolistin+meropenem kombine ilaç etkileşimi için 11 suşun 6'sında (%66.6) sinerjistik uyumlu iken kolistin+rifampisin kombine ilaç etkileşimi için 16 suşun 11'inde (%68.7) sinerjistik uyum göstermektedir. Sinerji belirleme için MALDİ-TOF MS sistemi hızlı güvenilir bir yöntem gibi görünmekte birlikte daha ileri ve kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

**Anahtar kelimeler:** Kolistin, karbapenemaz, *Klebsiella pneumoniae*, MALDİ-TOF MS, Checkerboard

## Kaynaklar

- Chiarelli A, Cabanel N, Cupin IR, et al. Diversity of mucoid to non-mucoid switch among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. BMC Microbiol. 2020;20(1):325. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02007-y>

- Song M, Liu Y, Huang X, et al. A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant Gram-negative pathogens. Nature Microbiol. 2020;5(8):1040-50. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0723-z>
- Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nature Rev Microbiol. 2020;18(6):344-59. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
- Wyres KL, Wick RR, Judd LM, et al. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. PLoS Genet. 2019;15(4):e1008114. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008114>
- Welker M, Belkum AV, Girard V, Charrier JP, Pincus D. An update on the routine application of MALDİ-TOF MS in clinical microbiology. Expert Rev Proteomics. 2019;16(8):695-710. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1645603>
- CLSI. CLSI and EUCAST breakpoint table Version 8.1 (valid from 2018-05-15). Interpretation of MICs and zone diameters. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. Nature Protocol. 2009;4(5):732-42. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.37>

# Hipertansiyon Tedavisinde Kullanılan Kaptopril'in İn Vitro Antibakteriyal Etkinliğinin Araştırılması

Ayşe Hümeysra Taşkın Kafa<sup>1</sup>, Rukiye Aslan<sup>2</sup>, Cem Çelik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas

<sup>2</sup>Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Sivas

✉ ahtaskin@cumhuriyet.edu.tr

## Giriş

Mikroorganizmaların mevcut antibiyotiklere zamanla direnç geliştirmesi sonucu ciddi ve ölümcül enfeksiyonların tedavisi gün geçtikçe zorlaşmaktadır. Geliştirilen yeni antibiyotikler, geniş spektrumlu, bir dizi bilinen biyoaktif bileşiğin varyantları olduğundan ve benzer enzimatik yolları hedef aldıklarından dolayı bir süre sonra bu yeni ajanlara da direnç gelişmesi kaçınılmaz olmaktadır<sup>(1,2)</sup>.

L-Kaptopril, hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan bir anjiyotenzin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörüdür. Bu ilaç bir sülfhidril grubu ile ACE'nin katalitik çinkosuna bağlanarak aktivite gösterir<sup>(3)</sup>. β-Laktam grubu antibiyotikler, klinikte en sık kullanılan ajanlar olmakla birlikte, etkinlikleri direnç artışına bağlı olarak azalmaktadır<sup>(4)</sup>.

Metallo-β-laktamazlar karbapenemler dahil olmak üzere tüm β laktam ajanları parçalayabilen ve dirençten sorumlu en önemli enzim grubudur. Bu enzimler, aktif bölgelerinde yer alan metalleri hedef alan ilaçlar ile inhibe edilir<sup>(5,6)</sup>. Bu çalışmada, L-kaptoprilin standart bakteri suşlarına karşı antibakteriyal etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada 3 adet Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0277, 2 adet Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) mikroorganizma üzerinde L-kaptoprilin antibakteriyal etkinliğini araştırmak için agar disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır.

**Agar disk difüzyon yöntemi:** Başlangıçta saf L-kaptoprilin 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg ve 50 mg distile suda çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyondan 6 mm çapındaki steril boş disklere, her bir diske 20 µl olacak şekilde aseptik şartlara uyularak emdirilmiştir. McFarland 0.5 (1-5 x 10<sup>8</sup> hücre/ml) skalasına denk gelen süspansiyonlarından Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerlerine 100 µl aşılama yapılmış ve steril cam baget ile besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra 15-20 dk kurumaya bırakılmıştır.

L-Kaptopril emdirilmiş diskler besiyerine uygun aralıklar ile yerleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak siprofloksasin (5 µg/disk) ve amikasin (30 µg/disk) kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış besiyerleri 24 saat 37°C'de geliştirildikten sonra oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımı ile ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

**Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MIC) belirlenmesi:** Bakteri suşlarına karşı L-kaptoprilin MIC değerini belirlemek için Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2012) yöntemi kullanılmıştır<sup>(7)</sup>.

Kısaca, kanlı agar besiyerinde üretilen bakteri kolonilerinden alınarak McFarland 0.5 (1-5 x 10<sup>8</sup> CFU/ml) hazırlanan bakteri süspansiyonu, 2.5 x 10<sup>5</sup> CFU/ml'ye seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu mikropalakalar L-kaptoprilin iki kat seri dilüsyonları (5-0.009 mg/ml) MHB kullanılarak hazırlanmıştır. Daha önceden hazırlanan bakteri süspansiyonları da her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde inoküle edilmiştir. 11. kuyucuğa büyüme kontrolü olarak ilaç içermeyen besiyeri ve bakteri, 12. kuyucuğa sterilit kontrolü için MHB eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanmış mikropalakalar 24 saat 37°C'de geliştirildikten sonra gözle bakılarak üremenin olmadığı ilk kuyucuk MIC değeri olarak kabul edilmiştir.

## Bulgular

Disk difüzyon testi sonuçlarına göre 24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda, 50 µg/µl ilaç konsantrasyonunda test edilen tüm mikroorganizmalarda 9-12 mm arasında bir inhibisyon zonu oluşmuştur. En yüksek etki *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşu üzerinde görülmüştür. Yapılan mikrodilüsyon testinde ise *E. faecalis* ATCC 29212 MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri 1.25 mg/ml bulunurken, test edilen diğer tüm suşların MİK değeri 2.5 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

## Sonuç

Bu çalışmada L-kaptoprilin incelenen standart bakteri suşları üzerinde inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan sınırlı sayıda çalışmada L-kaptoprilin çinko metallo-β-laktamazlara karşı inhibe edici aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca bu ilacın *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir<sup>(8,9)</sup>. Sonuçlarımız önceki yürütülen çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

β-Laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençe mücadelede etkili MBL inhibitörlerinin geliştirilmesi önemli bir aşamadır. Hâlihazırda hipertansif hasta gruplarında sıklıkla kullanılan L-kaptoprilin antibakteriyal dirençte de kullanılabileceğini ve özellikle geniş spektrumlu MBL inhibitörlerinin içeriğinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca ileri çalışmalarda L-kaptopril ve güncel antibiyotiklerin birlikte kullanımıyla in vitro sinerjistik aktivitesinin belirlenmesi, ilacın mikroorganizmalar üzerindeki etkinliğinin daha

iyi anlaşılması açısından da yararlı olabileceği kanaatindeyiz.

**Anahtar kelimeler:** L-Kaptopril, Metallo- $\beta$ -laktamazlar, antibakteriyel aktivite

#### Kaynaklar

1. WHO. Antimicrobial Resistance. World Health Organization, 2002.
2. Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. Sci Am. 1998;278(3):46-53.  
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0398-46>
3. Rosendorff C. Captopril--an overview. S Afr Med J. 1982; 62(17):593-9.
4. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant  $\beta$ -lactamases. Ann N Y Acad Sci. 2013;1277:84-90.  
<https://doi.org/10.1111/nyas.12023>
5. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(3):577-81.  
<https://doi.org/10.1128/aac.39.3.577>
6. Day JA, Cohen SM. Investigating the selectivity of metalloenzyme inhibitors. J Med Chem. 2013;56(20):7997-8007. <https://doi.org/10.1021/jm401053m>
7. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, ABD, 2012.
8. Cushman DW, Ondetti MA. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. Nat Med. 1999;5(10):1110-3.  
<https://doi.org/10.1038/13423>
9. Gillner D, Armoush N, Holz RC, et al. Inhibitors of bacterial N-succinyl-L,L-diaminopimelic acid desuccinylase (DapE) and demonstration of in vitro antimicrobial activity. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19(22):6350-2.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.077>



# Bursa Uludağ Üniversitesi SUAM'daki 2007-2019 Yılları Arasındaki Kan Kültür Üremelerinin Değerlendirilmesi

Nazmiye Ülkü Tüzemen<sup>1</sup>, Halis Akalın<sup>2</sup>, Cüneyt Özakin<sup>1</sup>, Beyza Ener<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa

<sup>2</sup>Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa

✉ ulku\_kocman@hotmail.com

## Giriş

Kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE) tüm dünyada yüksek morbidite ve mortalite sebebidir. Toplumdan edinilen ve sağlık hizmeti ile ilişkili (nozokomiyal-hastane kaynaklı) olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır<sup>(1,2)</sup>. Avrupa ve Kuzey Amerika'da ilk 7 ölüm sebebi arasında olmakla birlikte her yıl bu bölgelerde iki milyondan fazla vaka görülmekte, vaka ölüm oranı %13-20 arasında değişmekte ve yıllık 250.000 ölümle sonuçlanmaktadır<sup>(3)</sup>. Değişen antimikrobiyal direnç oranları, patojen dağılımı, demografik bilgiler ve tıbbi bakım sunumunun tümü KDE epidemiyolojisini etkileyebilir. Son yıllarda etiolojisinde farklılıklar gözlenen KDE patojenlerinin sürekli olarak izlenmesi çok önemlidir. Mikrobiyolojik eğilimlerin incelenmesi, teşhis yaklaşımlarını, tedavi stratejilerini ve önleme programlarını bilgilendirmeye yardımcı olabilir<sup>(4,5)</sup>. Çalışmamız hastanemizdeki KDE etken olan mikroorganizmaların dağılımı ve antimikrobiyal direncin izlenmesi amacıyla yapıldı.

## Gereç ve Yöntem

**Çalışma tasarımı ve verilerin toplanması:** Bu çalışma tek merkezli bir çalışma olup 880 yatak kapasiteli bir üniversite hastanesi olan Uludağ Üniversitesine bağlı Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezinde (SUAM) yapıldı. Retrospektif olarak yapılan çalışmamızda Ocak 2007-Aralık 2019 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen kan kültürlerine ait veriler kullanıldı. Hastaların yaşı, cinsiyeti, yatan-ayaktan hasta olup olmadığı, etkenin nozokomiyal-toplum başlangıçlı olup olmadığı incelendi. Hastanın hastaneye yatışından 48 saat sonra alınan kan kültürlerinde üreyen etkenler nozokomiyal, diğerleri toplum başlangıçlı olarak kabul edildi<sup>(6)</sup>. Bir ay içindeki tekrarlayan etkenler çalışma dışı olarak kabul edilip, bir ay sonra tekrar aynı etkenin üremesi yeni bir enfeksiyon epizodu olarak kabul edilip çalışmaya dahil edildi<sup>(7)</sup>.

Çalışmaya dahil ettiğimiz örnekler ulusal ve uluslararası rehberlere uygun olarak belirlendi. Hastadan alınan bir veya daha fazla kan kültüründe patojen mikroorganizma saptanması ve hastadan farklı zamanlarda alınan iki veya daha fazla kan kültüründe aynı cilt flora üyesi [difteroidler (*Corynebacterium diphtheriae* dışındaki *Corynebacterium* spp.), *Bacillus* spp (*B. anthracis* hariç), koagülaz-negatif stafilokoklar (*Staphylococcus epidermidis* dahil), viridans grup streptokoklar, *Aerococcus* spp ve *Micrococcus* spp.] mikroorganizmaların üremesi halinde etken olarak kabul edildi ve bunun dışındakiler kontaminasyon olarak kabul

edildi<sup>(8)</sup>. Yaş grupları <1, 1-5, 6-18, 19-49, 50-64 ve >64 olarak sınıflandırıldı<sup>(9)</sup>. İstatistiksel analiz IBM SPSS 23.0 (IBM SPSS Statistics; Armonk, NY, ABD) programı kullanılarak yapıldı. Yıllara göre değişen mikroorganizmalar ve direnç oranları için lineer regresyon yöntemi ve diğer karşılaştırmaların tümünde  $\chi^2$  testi kullanıldı ve  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Mikrobiyolojik prosedürler:** Kan kültürleri BACTEC™ 9240 (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) tam otomatize kan kültürü cihazında 1-7 (5) gün takip edildi. Üreme sinyali veren örneklerden Gram boyama ile inceleme yapıldı ve bu örnekler %5 koyun kanlı agar ve Eosin Metilen Blue (EMB) agara ekilerek etüvde 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Besiyerlerinde üreme gözlenen mikroorganizmaların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler ve 2018 yılına kadar Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) tam otomatize sistemi, 2019 yılında ise, "matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry" (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonik, Bremen, Almanya) kullanıldı. Etken mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıkları 2014 yılına kadar Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterleri<sup>(9)</sup>, 2014 yılından itibaren ise European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterleri<sup>(10)</sup> doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi, gradient difüzyon yöntemi (bioMérieux, Fransa) ve Phoenix™ 100 tam otomatize sistemi ile belirlendi. *Enterobacteriaceae* ailesinde karbapenem direnci, *Enterococcus* spp. izolatlarında ise vankomisin ve teikoplanin direnci gradient difüzyon yöntemi ile doğrulandı. Stafilokoklarda metisilin direncine oksasilin ile bakıldı. Kalite kontrol suşları olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

## Bulgular

Laboratuvarımızda on üç yılda 154527 kan kültürü çalışıldı ve bunların %81.36'sında üreme olmadı, %18.64'ünde üreme saptandı. Kontaminasyon oranımız %7.99 olup üreme olan kan kültürlerinden 16448'i (%57.11) çalışma kriterlerini sağladı. Kan kültürlerinden 9429'u (%57.33) erkek, 7019'u (%42.67) kadın hastalara aitti. Örneklerin 14198'i (%86.32) (%72.83 dahili, %27.17 cerrahi) kliniklerden, 1679'u (%10.21) yoğun bakım servislerinden ve 571'i (%3.47) polikliniklerden gönderilmişti. Yıllara göre pozitif çıkan örnek sayısı benzer olsa da kontaminasyon olarak değerlendirdiklerimizi çıkarttığımızda anlamlı üreme oranı toplamda %10.64 olup, %14.15 ile 2010 yılında en fazla,

Tablo 1. Kan kültüründeki üremelerin ve antibiyotik direnç profillerinin yıllar içindeki değişimi.

|                                                                          | 2007 (%) | 2008 (%) | 2009 (%) | 2010 (%) | 2011 (%) | 2012 (%) | 2013 (%) | 2014 (%) | 2015 (%) | 2016 (%) | 2017 (%) | 2018 (%) | 2019 (%) | Genel Toplam (%) | P     |
|--------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------|-------|
| KNS (tümü)                                                               | 53.32    | 51.29    | 48.11    | 46.39    | 48.75    | 48.71    | 45.18    | 51.65    | 50.85    | 44.93    | 43.14    | 47.47    | 39.82    | 47.87            | 0.000 |
| KNS (nozokomiyal)                                                        | 26.58    | 24.10    | 24.66    | 23.92    | 19.80    | 18.13    | 20.73    | 16.82    | 13.45    | 12.39    | 7.98     | 13.43    | 15.18    | 18.97            | 0.000 |
| <i>Escherichia coli</i>                                                  | 6.65     | 7.48     | 6.72     | 4.15     | 8.31     | 8.44     | 8.77     | 5.59     | 6.55     | 6.29     | 6.03     | 6.77     | 8.90     | 6.87             | 0.454 |
| <i>Escherichia coli</i> (nozokomiyal)                                    | 10.26    | 13.25    | 8.40     | 5.98     | 13.53    | 10.88    | 9.35     | 6.54     | 10.00    | 10.66    | 9.13     | 11.57    | 14.14    | 10.13            | 0.317 |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                                             | 8.10     | 6.94     | 5.22     | 4.53     | 5.00     | 6.57     | 7.30     | 5.21     | 5.27     | 4.96     | 4.45     | 5.42     | 5.42     | 5.73             | 0.003 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (nozokomiyal)                               | 8.68     | 7.83     | 6.50     | 6.46     | 6.27     | 8.46     | 7.72     | 5.61     | 4.83     | 4.03     | 3.42     | 4.17     | 3.66     | 6.18             | 0.001 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                             | 4.71     | 5.30     | 5.00     | 3.77     | 5.89     | 4.77     | 5.13     | 4.21     | 5.78     | 6.59     | 6.99     | 7.13     | 7.06     | 5.47             | 0.000 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (nozokomiyal)                               | 9.47     | 8.43     | 6.50     | 6.70     | 11.88    | 9.06     | 8.54     | 7.94     | 13.45    | 14.12    | 14.45    | 17.59    | 15.18    | 10.59            | 0.000 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                                           | 5.06     | 4.99     | 5.79     | 5.47     | 5.81     | 5.79     | 3.91     | 3.83     | 3.66     | 4.74     | 4.10     | 3.88     | 3.99     | 4.75             | 0.001 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (nozokomiyal)                             | 9.21     | 7.83     | 8.67     | 9.33     | 9.90     | 12.08    | 8.94     | 8.41     | 7.59     | 8.07     | 9.13     | 5.56     | 7.85     | 8.79             | 0.009 |
| Vankomisin dirençli enterokok                                            | 1.49     | 0.00     | 2.15     | 13.48    | 15.94    | 12.31    | 23.21    | 9.80     | 21.67    | 9.46     | 6.38     | 6.25     | 3.28     | 9.48             | 0.251 |
| Vankomisin dirençli enterokok (nozokomiyal)                              | 0.00     | 0.00     | 4.65     | 21.62    | 25.71    | 13.51    | 47.37    | 14.29    | 26.09    | 18.75    | 4.55     | 6.25     | 0.00     | 14.37            | 0.925 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> oksasilin direnci                           | 36.75    | 17.98    | 20.55    | 22.22    | 16.13    | 17.86    | 15.48    | 14.71    | 12.90    | 22.39    | 19.61    | 20.00    | 11.32    | 20.06            | 0.000 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> oksasilin direnci (nozokomiyal)             | 51.52    | 26.92    | 41.67    | 37.04    | 31.58    | 21.43    | 31.58    | 8.33     | 14.29    | 21.43    | 11.11    | 11.11    | 14.29    | 29.46            | 0.000 |
| ESBL pozitif <i>Escherichia coli</i>                                     | 32.29    | 25.00    | 28.72    | 36.36    | 27.18    | 25.93    | 34.65    | 26.03    | 36.36    | 42.35    | 44.93    | 38.67    | 47.13    | 33.72            | 0.113 |
| ESBL pozitif <i>Klebsiella</i> spp.                                      | 42.31    | 37.84    | 30.59    | 30.00    | 24.72    | 16.00    | 25.61    | 11.11    | 48.10    | 67.62    | 58.00    | 60.00    | 41.77    | 39.34            | 0.059 |
| Meropenem dirençli <i>Escherichia coli</i>                               | 0.00     | 2.08     | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.93     | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 2.67     | 4.60     | 0.80             | 0.019 |
| Meropenem dirençli <i>Klebsiella</i> spp.                                | 0.00     | 1.35     | 3.53     | 6.25     | 12.36    | 9.33     | 4.88     | 19.44    | 31.65    | 45.71    | 35.00    | 37.78    | 39.24    | 20.04            | 0.000 |
| Meropenem dirençli <i>Acinetobacter</i> spp.                             | 59.30    | 46.43    | 61.29    | 75.73    | 81.82    | 73.86    | 66.13    | 84.48    | 63.16    | 76.32    | 78.85    | 72.55    | 70.00    | 69.51            | 0.296 |
| Kolistin dirençli <i>Acinetobacter</i> spp.                              | 0.00     | 1.19     | 1.08     | 0.00     | 1.14     | 0.00     | 0.00     | 0.72     | 0.00     | 0.00     | 1.92     | 5.88     | 10.00    | 1.37             | 0.001 |
| Kolistin dirençli <i>Klebsiella</i> spp.                                 | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 2.25     | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 1.27     | 3.81     | 20.00    | 12.66    | 4.60             | 0.000 |
| Trimetoprim sulfometaksazol dirençli <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 0.00     | 22.22    | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 3.70     | 0.00     | 4.11     | 0.00     | 0.00     | 5.00     | 3.33     | 0.00     | 2.43             | 0.496 |

%8.27 ile 2018 yılında en az üreme oranı saptandı.

En sık saptanan gram pozitif bakteriler (%63.02) [%47.87 koagülaz negatif stafilokok (KNS), %5.73 *S. aureus* ve %9.42 bunların dışındaki gram pozitif bakteriler] görülürken, ikinci sıklıkta gram negatif bakteriler (%34.34) [%16.20 *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri, %13.86 gram negatif non-

fermentatif basiller ve %4.27 bunların dışında kalan gram negatif bakteriler] görüldü. Mantarlar ise %2.64 ile en az sıklıkla saptanan mikroorganizma olup en sık *Candida parapsilosis* (%1.06) ve *Candida albicans* (%0.83) saptandı. Genel dağılıma baktığımızda ilk beş sıradaki mikroorganizmalar sırasıyla KNS, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, nozokomiyal kabul

**Tablo 2. Kan kültüründe üreyen dirençli mikroorganizmaların epidemiyolojik dağılımı.**

|                                              | Yaş grup (%) |       |       |       |       |       |       | Gönderilen klinik (%) |            |             |       | Enfeksiyon kaynağı (%) |                    |       | Cinsiyet |       |       |
|----------------------------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|------------|-------------|-------|------------------------|--------------------|-------|----------|-------|-------|
|                                              | 0            | 1-5   | 6-18  | 19-49 | 50-64 | ≥64   | p     | Klinik                | Poliklinik | Yoğun bakım | p     | Nozokomiyal            | Toplum başlangıçlı | p     | Kadın    | Erkek | p     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)          | 26.67        | 21.28 | 11.86 | 18.43 | 18.22 | 23.53 | 0.232 | 18.67                 | 12.50      | 40.28       | 0.000 | 29.46                  | 16.83              | 0.000 | 18.25    | 21.28 | 0.440 |
| Vankomisin dirençli enterokok                | 8.33         | 4.88  | 5.41  | 12.87 | 6.94  | 11.74 | 0.172 | 10.25                 | 0.00       | 6.82        | 0.169 | 14.37                  | 6.16               | 0.000 | 9.67     | 9.31  | 0.711 |
| ESBL pozitif <i>Escherichia coli</i>         | 20.83        | 57.14 | 50.00 | 32.52 | 28.57 | 35.49 | 0.001 | 33.86                 | 26.87      | 40.43       | 0.307 | 37.22                  | 31.84              | 0.068 | 31.31    | 35.70 | 0.593 |
| ESBL pozitif <i>Klebsiella</i> spp.          | 52.17        | 36.05 | 36.76 | 42.58 | 33.46 | 39.86 | 0.059 | 38.96                 | 18.18      | 47.17       | 0.032 | 48.19                  | 32.63              | 0.000 | 41.35    | 37.95 | 0.658 |
| Meropenem dirençli <i>Escherichia coli</i>   | 0.00         | 5.71  | 0.00  | 0.30  | 0.00  | 1.69  | 0.002 | 0.89                  | 0.00       | 0.00        | 0.601 | 1.52                   | 0.41               | 0.045 | 1.17     | 0.48  | 0.459 |
| Meropenem dirençli <i>Klebsiella</i> spp.    | 5.80         | 3.49  | 7.35  | 24.84 | 24.91 | 21.68 | 0.000 | 20.21                 | 4.55       | 21.70       | 0.174 | 28.36                  | 13.73              | 0.000 | 21.12    | 19.28 | 0.844 |
| Meropenem dirençli <i>Acinetobacter</i> spp. | 27.78        | 28.57 | 53.85 | 73.76 | 77.20 | 71.04 | 0.000 | 66.84                 | 33.33      | 82.39       | 0.000 | 74.49                  | 66.01              | 0.005 | 66.75    | 71.56 | 0.664 |
| Kolistin dirençli <i>Acinetobacter</i> spp.  | 0.00         | 0.00  | 0.00  | 1.06  | 2.00  | 1.68  | 0.731 | 1.31                  | 16.67      | 1.14        | -*    | 1.53                   | 1.26               | 0.723 | 1.74     | 1.10  | 0.340 |
| Kolistin dirençli <i>Klebsiella</i> spp.     | 0.00         | 0.00  | 0.00  | 6.45  | 4.09  | 6.64  | 0.007 | 4.90                  | 0.00       | 2.83        | 0.366 | 6.18                   | 3.39               | 0.029 | 4.72     | 4.51  | 0.348 |

\* Poliklinik hasta sayısı az olduğu için istatistik yapılmadı (n=1/6 dirençli)

ettiğimiz etkenlerin sıralamasına baktığımızda ise KNS, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii*, *S. aureus* olarak saptandı. Yıllar içinde değişen etkenlerin dağılımı ve antibiyotik direnç oranları Tablo 1'de verilmiştir. Özellikle nozokomiyal olmak üzere KNS görülme sıklığında azalma olduğu saptandı. *S. aureus* sıklığında azalma gözlenirken, özellikle nozokomiyal olmak üzere *K. pneumoniae* sıklığında belirgin bir artış olduğu saptandı. Vankomisin dirençli enterokok oranımız dalgalı seyir göstermekte olup en fazla 2013 yılında saptandı. *A. baumannii* sıklığında ise anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) oranında da yıllar içinde azalma olduğu görüldü. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) üreten *E. coli* ve *Klebsiella* spp. oranının 2016 yılında pik yaptığı görüldü. Meropenem dirençli *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'de ve kolistin dirençli *Acinetobacter* spp. ve *Klebsiella* spp.'de yıllar içerisinde bir artış olduğu saptandı. Meropenem dirençli *Acinetobacter* spp.'in 2014 yılında pik yaptığı saptandı.

Genel olarak antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların nozokomiyal kaynaklı enfeksiyonlarda daha sık görüldüğü ve cinsiyetle ilişkili olmadığı saptandı. Yoğun bakımda yatan hastalarda dirençli mikroorganizma görülme oranı daha fazla iken, VRE ve kolistin dirençli *Klebsiella* spp. daha çok kliniklerde yatan hastalarda görüldü. Örneklerin %23.71'i 18 yaş ve altındaki hastalara aittir. Yaş gruplarına göre dağılımına baktığımızda MRSA, VRE ve kolistin dirençli *Acinetobacter* spp. arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunamazken, ESBL pozitif *Escherichia coli* 18 yaş altında, ESBL pozitif *Klebsiella* spp. ise bir yaş altında daha yüksek oranlarda saptandı. Meropenem dirençli *Klebsiella* spp. ve *Acinetobacter* spp. ile kolistin dirençli *Klebsiella* spp. ve *Acinetobacter* spp. görülme sıklığının 18 yaş üzerinde daha küçük yaş grubuna göre belirgin arttığı saptandı.

## Sonuç

Kontaminasyon olarak değerlendirdiğimiz kan kültürü etkenlerini çalışmaya dahil etmememize rağmen KNS üreme oranının yüksek olduğu ama yıllar içerisinde düşüş eğiliminde olduğu saptandı. Karbapenem ve kolistin direncinde yıllar içerisinde artış görüldü. Yıllara göre kan kültürlerinde saptanan etkenlerin dağılımının değiştiği gözlemlendi. Bu nedenle yıllık değişimlerin izlenmesinin antimikrobiyal yönetimi ve enfeksiyon kontrolü açısından yol gösterici olduğunu düşünüyoruz.

**Anahtar kelimeler:** Antimikrobiyal direnç, bakteriyemi, kan kültürü

## Kaynaklar

1. Tian L, Zhang Z, Sun Z. Antimicrobial resistance trends in bloodstream infections at a large teaching hospital in China: a 20-year surveillance study (1998-2017). *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:86. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0545-z>
2. Maham S, Fallah F, Gholinejad Z, Seifi A, Hoseini-Alfatem SM. Bacterial etiology and antibiotic resistance pattern of pediatric bloodstream infections: A multicenter based study in Tehran, Iran. *Ann Ig*. 2018;30(4):337-45. <https://doi.org/10.7416/ai.2018.2225>
3. Pfaller MA, Carvalhaes CG, Smith CJ, Diekema DJ, Castanheira M. Bacterial and fungal pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2012-2017). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;97(2):115016. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115016>
4. Diekema DJ, Hsueh PR, Mendes RE, et al. The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents*

- Chemother. 2019;63(7):e00355-19.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00355-19>
5. Sader HS, Castanheira M, Streit JM, Flamm RK. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from patients hospitalized with bloodstream infections in United States medical centers (2015-2017). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;95(3):114850.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.06.002>
  6. Hattori H, Maeda M, Nagatomo Y, et al. Epidemiology and risk factors for mortality in bloodstream infections: A single-center retrospective study in Japan. *Am J Infect Control*. 2018;46(12):e75-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.06.019>
  7. Huang CH, Chiu CH, Chen IW, et al. Antimicrobial resistance and outcomes of community-onset bacterial bloodstream infections in patients with type 2 diabetes. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;15:271-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.008>
  8. CDC. Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated Bloodstream Infection and Non-central Line Associated Bloodstream Infection). Centers for Disease Control and Prevention. 2020. [https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/4psc\\_clabscurrent.pdf](https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/4psc_clabscurrent.pdf)
  9. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100. 23th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne: ABD; 2013.
  10. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020.

# Vankomisin Dirençli Enterokok ve Stafilokok Türlerinde Bulunan Direnç Genlerinin Moleküler Yöntemle Tespiti

Sümeysra Kayalı, Fatma Günbey, Merve Ayyıldız, Zülal Aşçı Toraman

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

✉ s\_kayali@hotmail.com

## Giriş

*Enterococcus* cinsi üyeleri insanda esas olarak gastrointes-tinal sistemde bulunmakta ve normal aerop barsak florası-nın önemli bir kısmını oluşturmaktadır. İnsanlarda görülen enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ından *Enterococcus faecalis* sorumludur. İkinci sırada *Enterococcus faecium* gö-rülmekte ve onu diğer türler takip etmektedir. Son zaman-larda özellikle çoklu ilaca dirençli *E. faecium* suşları bir çok merkezden bildirilmektedir<sup>(1)</sup>.

Enterokoklar başta üriner sistem enfeksiyonları olmak üze-re, yara enfeksiyonları, nozokomiyal pnömoni, sepsis, endo-kardit ve menenjit gibi birçok enfeksiyona neden olabilmek-tedir. Enterokok enfeksiyonlarının %60'ı hastane kaynaklı olup yarısı yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir<sup>(1,2)</sup>.

*Staphylococcus* cinsi üyeleri de insan florasında yer almak-tadır. *Staphylococcus aureus* sağlıklı insanların %30'unda nazofarenkste flora elemanı olarak bulunabilmektedir. Stafilokoklardan *Staphylococcus aureus* klinik olarak en önemli türdür ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (selülit, apse, impetigo, karbonkül, fronkül, folikülit vb.), pnömoni, oste-omiyelit ve sepsis gibi birçok enfeksiyona neden olmakta ve neredeyse tüm klinik örnekten izole edilmektedir. Hem hastane kaynaklı hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır<sup>(3,4)</sup>.

Antibiyotik direnci, enfeksiyon hastalıkları tedavisinde so-run oluşturmakta ve özellikle hastane kökenli etkenlerde daha fazla saptanmaktadır. Gram pozitif bakterilerin teda-visinde kullanılan ve güçlü antibiyotiklerden olan vanko-misinin, yaklaşık 30 yıl önce enterokok ve stafilokokların tedavisinde etkisiz kaldığı bildirilmiş ve bu direnç durumu-nun aktarıldığı gösterilmiştir<sup>(5,6)</sup>. Ülkemizde ilk olarak 2002 yılında, Antalya Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nden *vanA* genini içeren vankomisin dirençli *E. faecium* suşu ve yayılı-mı bildirilmiştir<sup>(7)</sup>.

Vankomisin, Gram pozitif bakterilerde hücre duvar yapısı-na ait peptidoglikan tabakayı oluşturan öncül peptidlerin terminal D-ala-D-ala dizisine bağlanıp transglukozilasyon reaksi-yonunu inhibe ederek peptidoglikan oluşumunu engellemektedir. Stafilokok ve enterokoklar da terminal D-ala-D-ala dizisinde değişiklik yaparak vankomisine direnç geliştirmektedir. Bu dirence neden olan *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* gibi birçok gen bölgesi tes-pit edilmiştir<sup>(8)</sup>. En sık görülenleri *vanA*, *vanB* ve *vanC* gen bölgeleridir<sup>(3)</sup>.

Bu çalışmada has-tanemizdeki vankomisin dirençli ente-rokok (VRE) ve stafilokok izolatlarının moleküler yöntemle direnç gen bölgelerinin tespiti amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Nisan 2019-Aralık 2020 tarihleri arasında bakteri kültür incelemede üreyen ve Phoenix otomatize kültür siste-mi (BD Diagnostics, ABD) ile vankomisin direnci saptanan enterokok ve stafilokok suşlarının multipleks PCR (Polime-raz Zincir Reaksiyonu) yöntemiyle real-time PCR cihazında (BD Max System, ABD) *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/3* van-komisin direnç gen bölgelerini saptayabilen Vancomycin Resistance-OSR ticari kiti (BioGx, Hollanda) kullanılarak elde edilen sonuçlar hastane otomasyon sisteminden ret-ropektif olarak elde edilmiştir.

Laboratuvarımıza ulaşan numuneler, numune türüne uy-gun besiyerlerine ekimleri yapıpıp etüvde bekletildi. Üre-me gözlemlendiğinde bakteri identifikasyonu ve antibiyogram tayini amacıyla otomatize kültür sistemine yüklendi. Van-komisine dirençli saptanan *Enterococcus* spp. ve *S. aureus* izolatları gen bölgesi tayini yapılmak üzere ileri işleme tabi tutuldu. Bu izolatların kolonilerinden, distile su ile bakteri süspansiyonu hazırlandı. Üretici firmanın önerileri doğrul-tusunda sisteme yüklendi ve elde edilen sonuçlar hastane otomasyon sistemine girildi.

## Bulgular

Çalışmaya 43 enterokok, 3 stafilokok türlerini içeren 46 suş dahil edildi. Bunların 17 (%37)'si kan, 11 (%24)'i idrar, 11 (%24)'i gaita, 3 (%6,5)'ü trakeal aspirasyon mayı, 3 (%6,5)'ü vücut sıvısı ve 1 (%2)'i kateter numunelerinden izole edildi. Bu numunelerin 21 (%46)'i yoğun bakım ünitelerinden, 25 (%54)'i klinik servislerden gönderildi.

Otomasyon kültür sisteminde vankomisin minimum inhi-bitör konsantrasyon (MİK) değeri; 44 (%96) izolatta '>16', sadece 2 (%4) *Enterococcus casseliflavus* izolatında '4' ola-rak saptandı.

Çalışmada 32 (%57) izolatta *vanA* gen bölgesi saptanırken hiçbir izolatta *vanB* gen bölgesi saptanmadı. İzolatların tür ve *vanA* direnç dağılımları Tablo 1'de sunulmuştur. Sadece 2 (%4) *E. casseliflavus* suşunda *vanC* ve 2 (%4) *E. faecium* suşunda ise *vanA* ve *vanC* gen bölgeleri saptandı.

## Sonuç

Vankomisin dirençli enterokok enfeksiyonu ve kolonizasyo-



**Tablo 1. İzolatların tür ve vanA direnç dağılımları.**

| İzolat türü                       | vanA direnci n (%) | N (%)    |
|-----------------------------------|--------------------|----------|
| <i>Enterococcus faecium</i>       | 25 (54)            | 28 (61)  |
| <i>Enterococcus faecalis</i>      | 5 (11)             | 7 (15)   |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> | -                  | 2 (4)    |
| <i>Enterococcus hirae</i>         | 1 (2)              | 1 (2)    |
| <i>Enterococcus raffinosus</i>    | -                  | 1 (2)    |
| <i>Enterococcus spp.</i>          | -                  | 4 (9)    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | 1 (2)              | 3 (7)    |
| Toplam                            | 32 (69)            | 46 (100) |

nu son yıllarda gittikçe artan oranlarda bildirilmektedir<sup>(9)</sup>. Hastanede yatış süresinin uzun olması, yoğun bakım ünitesinde yatış, VRE ile kontamine ekipmanlara maruziyet, VRE kolonize hastalarla temas gibi hastaneye ait faktörler; kronik böbrek yetmezliği, malignite, nötropeni, diabetes mellitus, geçirilmiş intraabdominal cerrahi, organ transplantasyonu gibi hastaya ait faktörler ve özellikle 2-3. kuşak sefalosporin, anti-anaerob antibiyotikler, kinolon, aztreonam gibi antimikrobiklerin gereksiz ve bilinçsiz kullanımı bu durumun risk faktörleridir<sup>(10)</sup>. Vankomisin dirençli *S. aureus* gelişiminde de benzer risk faktörleri söz konusudur. Vankomisin dirençli enterokoklarda dirençten sorumlu genin plazmid üzerinde yer aldığı ve gram pozitif bakteriler arasında aktarıldığı gösterilmiştir<sup>(11)</sup>.

Van A tipi VRE *vanA* gen bölgesi içerir ve vankomisine yüksek düzeyde direnç vardır. Bu direnç polimiksin B, basitrasin gibi diğer antibiyotikler ile indüklenebilir özelliktedir. Plazmidler ile *vanA* gen bölgesi bakteriler arasında aktarılmaktadır<sup>(12)</sup>.

Van B tipi VRE orta-yüksek düzeyde vankomisin dirençli ve indüklenebilir özelliktedir. Bu direktten sorumlu *vanB* gen bölgesi genellikle kromozom üzerinde olsa da, plazmid ve transpozonda bulunabilir ve transfer edilebilir özelliktedir<sup>(12)</sup>.

VanC tipi VRE vankomisine düşük düzeyde dirençlidir ve indüklenmez. Bu tipte intrinsek direnç söz konusudur ve *Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus*, *Enterococcus flavescens* türlerinde görülmektedir. Sadece kromozomal olarak aktarılan *vanC* gen bölgesi içerir. Çalışmamızda bu bilgilerle uyumlu olarak 2 *E. casseliflavus* suşunda *vanC* gen bölgesi saptanmıştır<sup>(12)</sup>. Ancak *vanC* gen bölgesinin *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinde de saptandığı çalışmalar mevcuttur<sup>(13,14)</sup>. Çalışmamızda *E. faecium* izolatlarında %7 oranında *vanA* ve *vanC* gen bölgesinin birlikte saptanması oldukça dikkat çekicidir.

Moosavian ve ark.<sup>(15)</sup> tarafından rektal sürüntü örneklerinden elde edilen vankomisin dirençli 56 *E. faecium* ve 3 *E. faecalis* izolatında *vanA* ve *vanB* gen bölgeleri multipleks PCR ile araştırılmış ve hiçbirinde *vanB* gen bölgesi saptanmamıştır. Sadece 56 *E. faecium* izolatının 54 (%96)'ünde ise *vanA* geni saptanmıştır. Çopur ve ark.<sup>(16)</sup> tarafından vankomisin dirençli 89 *E. faecium*, 4 *E. faecalis* izolatında *vanA* ve *vanB* gen bölgeleri araştırılmış; izolatların hepsinde *vanA* direnç gen bölgesi tespit edilmiştir. Hiçbirinde *vanB* gen

bölgesine rastlanmamıştır.

Çalışmamızla uyumlu olarak; başta *E. faecium* ve *E. faecalis* olmak üzere birçok enterokok türünde ve *S. aureus*'ta *vanA* gen bölgesi varlığı bildirilmiş ve plazmid aracılığıyla aktarılmasının etkisiyle en sık *vanA* vankomisin direnç gen bölgesi saptanmıştır<sup>(15-19)</sup>. Son dönemlerde *E. faecalis* izolatlarında *vanA* direnç geni varlığını bildiren çalışmalar artış göstermektedir<sup>(17,18)</sup>. Bizim çalışmamızda *E. faecium* izolatlarında %89 oranında, *E. faecalis* izolatlarında ise %71 oranında *vanA* direnç geni saptanmıştır.

Patel ve ark.<sup>(20)</sup> tarafından 100 VRE kolonilerinden multipleks PCR yöntemi ile *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/3* genlerinin varlığı araştırılmış; 37 izolatla hiçbir gen bölgesi saptanılmazken, 10 *E. faecium* (10/43) izolatında *vanA*, 28 *E. faecium* (28/43) ve 2 *E. faecalis* (2/34) izolatında *vanB*, 10 *E. gallinarum* (10/11), 1 *E. faecium* (1/43), 1 *E. faecalis* (1/34) izolatında *vanC1*, ve 6 *E. casseliflavus/E. flavescens* (6/10) izolatında ise *vanC2/3* gen bölgesi saptanmıştır. 1 *E. gallinarum* (1/11) izolatında ise *vanA* ve *vanC1* birlikte saptanmıştır<sup>(20)</sup>.

Çalışmamızda %26 oranında hiçbir gen bölgesinin saptanmama nedeni vankomisin direncine sebebiyet veren diğer gen bölgelerini (*vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL* *vanM*, vb.) içermesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür<sup>(8)</sup>.

Sonuç olarak; akılcı antibiyotik tedavisi ile vankomisine ve diğer antibiyotiklere dirençli suşların oluşumunun engellenmesi ve enfeksiyon kontrol önlemleri ile antibiyotik direnci aktarımının önüne geçilmesinin hayati önem arz ettiğini düşünülmektedir. *E. faecium* izolatlarında *vanA* ve *vanC* gen bölgesinin birlikte saptanması oldukça dikkat çekicidir.

**Anahtar kelimeler:** *vanA*, Vankomisin dirençli enterokok, Vankomisin dirençli stafilocok

#### Kaynaklar

1. Moellering RC. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases (6th ed). Churchill Livingstone, Philadelphia 2005:2411-7.
2. Durmaz G. Enterokoklar. In: Wilke A, Söyletir G, Doğanay M (editörler), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (3. baskı). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2008:2057-65.
3. Monson LS. Staphylococci. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G eds. Textbook of diagnostic microbiology. Fourth Edition. WB Saunders Company, 2011:316-29.
4. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. 2005;5(12):751-62. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
5. Sloos JH, van de Klundert JAM, van Boven CPA. Changing susceptibilities for glycopeptides in coagulase negative staphylococci, European Congress of Chemotherapy, Abstract Book p.163, Scotland, 1996.
6. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 1988;1(8575-6):57-8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)91037-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)91037-9)
7. Colak D, Naas T, Gunseren F, et al. First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. J Antimicrob Chemother. 2002;50(3):397-401. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf134>

8. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, et al. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(10):4606-12. <https://doi.org/10.1128/AAC.00714-11>
9. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. Infect Cont Hosp Epidemiol. 2008;29(11):996-1011. <https://doi.org/10.1086/591861>
10. Çetinkaya Şardan Y. Vankomisine Dirençli Enterokoklara Bağlı Hastane İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi ve Kontrolü. In: Serhat Ü, Gaye U, Sercan U (eds). Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi; 2012:263-80.
11. Çöleri A, Çökmüş C. Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları. Turk Hij Den Biyol Derg. 2008;65(2):87-96.
12. Başustaoğlu A. Enterokoklarda antibakteriyel direnç mekanizmaları ve direnç sorunu. Kitabında: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S (eds). Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2004:141-158.
13. Nishiyama M, Iguchi A, Suzuki Y. Identification of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* as vanC-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. 2015;50(1):16-25. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.964599>
14. Sun M, Wang Y, Chen Z, Zhu X, Tian L, Sun Z. The first report of the *vanC1* gene in *Enterococcus faecium* isolated from a human clinical specimen. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(6):712-5. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140019>
15. Moosavian M, Ghadri H, Samli Z. Molecular detection of *vanA* and *vanB* genes among vancomycin-resistant enterococci in ICU-hospitalized patients in Ahvaz in southwest of Iran. Infect Drug Resist. 2018;11:2269-2275. <https://doi.org/10.2147/IDR.S177886>
16. Saba Çopur Ş, Şahin F, Göçmen JS. Determination of virulence and multidrug resistance genes with polymerase chain reaction method in vancomycin-sensitive and -resistant enterococci isolated from clinical samples. Turk J Med Sci. 2016;46(3):877-91. <https://doi.org/10.3906/sag-1412-86>. PMID: 27513269
17. Manson JM, Keis S, Smith JM, Cook GM. A clonal lineage of VanA-type *Enterococcus faecalis* predominates in vancomycin-resistant Enterococci isolated in New Zealand. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(1):204-10. <https://doi.org/10.1128/aac.47.1.204-210.2003>
18. Strateva T, Peykov S, Sirakov I, Savov E, Dimov S, Mitov I. First detection and characterisation of a VanA-type *Enterococcus faecalis* clinical isolate from Bulgaria. J Glob Antimicrob Resist. 2019;18:260-2. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.030>
19. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Yale J Biol Med. 2017;90(2):269-81.
20. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR 3rd. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. J Clin Microbiol. 1997;35(3):703-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.3.703-707.1997>

## Nadir Bir Karaciğer Apsesi ve Bakteriyemi Etkeni: *Yersinia pseudotuberculosis*

Muhammed Alper Özarslan<sup>1</sup>, Bartu Çetin<sup>2</sup>, Mustafa Mustafayev<sup>3</sup>, Mert Pekerbaş<sup>4</sup>,  
Alper Tünger<sup>1</sup>, Fatma Feriha Çilli<sup>1</sup>, Fulya Günşar<sup>3</sup>, Asude Durmaz<sup>4</sup>, Ayça Aykut<sup>4</sup>,  
Şöhret Aydemir<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

<sup>4</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir

✉ alperozarslan@hotmail.com

### Giriş

*Yersinia* spp. *Enterobacteriaceae*'ye ait olan zoonotik bir patojendir. "*Yersinia*" cinsi ilk olarak 1944'de Van Loghem tarafından tanımlanmıştır. Daha önce *Pasteurella* cinsi içerisinde sınıflandırılmış olan *Yersinia pestis* ve *Yersinia pseudotuberculosis* bu cinsten ayrılmıştır ve veba etkenini 1894 yılında Hong Kong'daki bir veba epidemisi sırasında ilk kez izole eden Fransız bakteriyologu Alexandre Yersin'in hatrasına, *Yersinia* cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır. Daha sonra 1954 yılında Thal bu cinsin *Enterobacteriaceae* familyasına bağlanmasını teklif etmiştir<sup>(1-2)</sup>. *Yersinia* cinsi içinde 18 tür bulunmaktadır ancak sadece üçünün (*Y. pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*) önemli insan patojeni olduğu gösterilmiştir<sup>(3)</sup>. *Yersinia* enfeksiyonlarının tümü zoonotik olup insanlar rastlantısal konaklardır. Doğal rezervuarlar *Y. pestis* için sıçanlar ve kemirgenler, *Y. enterocolitica* için domuzlar, çiftlik hayvanları, kemiricilerdir; *Y. pseudotuberculosis* ise av kuşları dahil olmak üzere kemiriciler, vahşi hayvanlar gibi geniş bir yelpazedeki hayvanlar arasında endemiktir. *Y. pseudotuberculosis* insana bulaş çoğunlukla fekal-oral yolla olup insan enfeksiyonu kontamine olmuş ürün veya suyun yutulmasıyla veya enfekte bir hayvan-insan ile doğrudan temas yoluyla meydana gelebilir<sup>(4-6)</sup>.

*Yersinia pseudotuberculosis* fermentatif, oksidaz negatif, gram negatif fakültatif anaerob çomaklardır. Gram boyamada biyokimyasal açıdan dahil olduğu *Enterobacteriaceae*'den farklı olarak küçük ve kokobasil görünümündedir. *Y. pseudotuberculosis* biyokimyasal açıdan oda ısısında daha aktif ve hareketli olup; insan için patojen olan *Yersinia*'lar arasında ramnoz ve melibiyoza güçlü fermente edebilenidir. Ayrıca *Y. enterocolitica*'dan ayrımındaki temel reaksiyonlar, *Y. enterocolitica*'nın yapabildiği sükröz ve sorbitolün fermentasyonunu ve de ornitin dekarboksilasyonunu *Y. pseudotuberculosis*'in yapamamasıdır<sup>(5)</sup>.

Klinik örneklerde ender rastlanan bu etken en sık gastroenterit ve özellikle çocuklarda akut apandisit taklit eden mezenterik lenfadenit (psödoapandisit) tablolarına neden olmaktadır<sup>(6)</sup>. Nadiren bakteriyemi yapabilmekte olup genellikle karaciğer sirozu, hemokromatoz veya diyabet gibi altta yatan kronik hastalığı olanlarda daha fazla görülür.

Ayrıca erişkinlerde yine nadiren idrar yolu enfeksiyonu, artrit, osteomyelit ve bu olgudaki gibi karaciğer apsesi yapabilmektedir<sup>(6,7)</sup>. Bu yazıda, karaciğer apse aspirasyonu örneği ve kan kültüründe *Y. pseudotuberculosis* üreyen HFE geninde heterozigot H63D mutasyonu saptanan ve karaciğer görüntüleme ve kan değerlerinde demir birikimi olan bir kronik böbrek yetmezliği (KBY) olgusu sunulmaktadır.

### Olgu

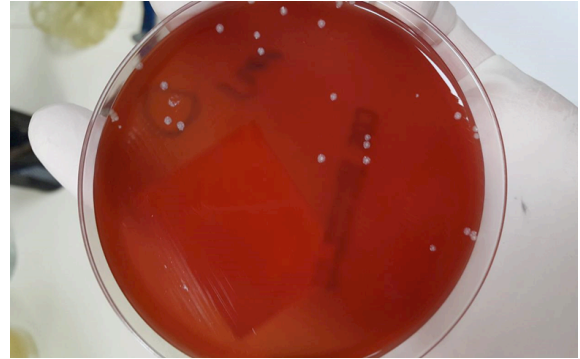
63 yaşında bilinen hipertansiyon (15 yıldır), Tip-2 diyabet (20 yıldır tanı ve glargine+insülin aspart kullanıyor), kronik böbrek yetmezliği (haftada 3 gün hemodiyaliz) ve periferik arter hastalığı olan erkek hasta acil servise 4-5 gündür devam eden epigastrik bölgede ağrı bulantı kusma ve ateş şikayetleri ile başvurdu. İlk muayenesinde 39.5 C ateşi mevcut olup, karın muayenesinde epigastrik bölgede hassasiyeti mevcuttu. Defans, rebound bulgusu yoktu. Gaz, gayta çıkışı olağan şekilde tanımlandı. Gastroenterit ilişkili bir yakınma ise belirtilmedi. Hastanın ilk alınan kanlarında beyaz kan hücresi (WBC) 17.01 10<sup>3</sup>/μL, C-reaktif protein (CRP) 228 mg/L idi. Acil serviste çekilmiş olan tüm vücut batin bilgisayarlı tomografisinde ise karaciğerde tüm segmentlerde yaygın en büyüğü 26 mm ölçülen multipl hipodens lezyonlar apse veya malignite ile uyumlu bulundu. Buna ek olarak asendan kolon ve hepatic fleksurda ılımlı kalınlık artışı ise kolit ile uyumlu olabileceği düşünüldü. Hastaya ampirik olarak sefotaksim ve metronidazol başlandıktan sonra bu bulgular sonucunda hastanın genel cerrahi kliniği yoğun bakıma yatırıldı. Hastanın yoğun bakım takibi ilk gününde genel durumu iyi ancak ateş yüksekliği mevcuttu, karın muayenesinde epigastrik bölgede hassasiyeti devam ediyordu. Defans, rebound bulgusu yoktu. Gaz, gayta çıkışı olağan olup bulantı kusması yoktu. Hastanın yatışının ilk günündeki takiplerinde alınan kanlarında WBC 20.440 10<sup>3</sup>/μL, CRP 234 mg/L idi. Hastaya çekilen organ spesifik manyetik rezonans (MR) görüntülemesinde karaciğerde 2 cm ve altında çok sayıda kist veya abse kuşuklu lezyonlar görüldü. Ayrıca karaciğer ve dalağın izointens görünümü ve karaciğerde tüm sekanslarda sinyal kaybı karaciğerde metal birikimini destekler nitelikteydi (Resim 1). Hasta operasyona alındı. Abse olduğu ön görülen bölgeden ponksiyon ile örnek alındı ve mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi. Genel durumu iyi olan, karın muayenesinde epigastrik



**Resim 1.** *Yersinia enterocolitica* enfeksiyonu nedeniyle apse olduğu ortaya çıkan çoklu hiperintens hepatik lezyonları (beyaz oklar) gösteren üst karın transvers T2 ağırlıklı manyetik rezonans görüntüleri. Aşırı demir yükü ile uyumlu karaciğer parankiminin karanlık sinyali önemlidir.

hassasiyet ve ateş dışında ek bulgusu olmayan hasta servis izlemine alındı. Hasta rutin hemodiyaliz hastası olması sebebiyle rutin diyalizine devam edildi. Hastanın genel cerrahi yoğun bakımda ateşli iken alınan ilk kan kültürü ve operasyonda sırasında alınan apse örneğinin bakteriyoloji laboratuvarında yapılan Gram boyamasında gram negatif küçük kokobasiller görüldü. Aps e örneğinin yapılan direkt mikroskopik incelemede de “Her sahada bol lökosit” saptandı. Aerop ve anaerob kan kültür şişelerine hasta başında ekilen kan örnekleri VersaTREK (Thermo Fisher Scientific, ABD) otomatize hemokültür sistemine yüklendi. Aps e örneği %5 koyun kanlı agar (KKA) ve eosin methylene-blue agara (BioMérieux, Fransa) ekilerek aerop ve anaerob atmosferde ayrı ayrı kültürleri yapıldı. Cihazda pozitif sinyal veren kan kültür şişeleri de aynı agarlara aerop ve anaerob atmosferde subkültüre edildi. 36°C’lik etüvde apse ve periferik kanın aerop atmosferdeki KKA’ındaki 24-48 saatlik inkübasyondan sonra gri-beyaz renkte göbekli (Resim 2), EMB’de ise iğne ucu kadar küçük koloniler gözlemlendi. Bu koloniler MALDI-TOF MS (Vitek MS) (BioMérieux, Fransa) kullanılarak *Y. pseudotuberculosis* olarak tanımlandı. *Y. pseudotuberculosis* tanımlanmasından sonra hastanın antibiyotik tedavisi seftriakson ve metronidazol olarak değiştirildi. *Y. pseudotuberculosis* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri için otomatize VİTEK-2 sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanıldı. Amoksisilin/klavulanik asit: S ( $\leq 2.0$ ), ampicilin :  $< 2.0$  mg/ $\mu$ l (duyarlı), sefuroksim aksetil:  $< 1.0$  mg/ $\mu$ l (duyarlı), seftriakson:  $< 0.25$  mg/ $\mu$ l (duyarlı), sefiksime: S ( $\leq 0.25$  mg/ $\mu$ l), amikasin:  $< 2.0$  mg/ $\mu$ l (duyarlı), gentamisin:  $< 1.0$  mg/ $\mu$ l (duyarlı), siprofloksasin:  $< 0.25$  mg/ $\mu$ l (duyarlı) olarak saptandı. Duyarlılık sonuçları EUCAST 2020 sınır değerler tablosu kullanılarak değerlendirildi<sup>(8)</sup>.

Genel cerrahi servis izleminde kan şekeri regüle seyreden hastanın insülin infüzyon ihtiyacı olmadığı için mevcut tedavisine devam edildi. Rutin biyokimya tetkiklerinde alkalen fosfataz ve gama glutamil transferaz enzimlerinin yükselmesi sebebiyle (sırasıyla 1921 U/L ,1454 U/L) HIV ve akut hepatit markerları bakıldı. Klinik tablo ile uyumlu bir pozitiflik saptanmadı. Karın ağrısı tamamen gerileyen, CRP



**Resim 2.** Aps e örneğinin ekildiği KKA’da gri-beyaz renkte göbekli *Yersinia pseudotuberculosis* kolonileri.

ve lökositozu gerileyen hastanın cerrahi herhangi bir sorunu kalmaması üzerine etyoloji araştırılması ve tedavi amaçlı gastroenteroloji servisine devri yapıldı. Gastroenteroloji serviste, apsede *Y. pseudotuberculosis* üremesi ve MR’da karaciğerde metal birikimi görüldüğü düşünülen hastanın bakılan ferritin değeri 13725  $\mu$ g/L saptanması nedeniyle hemokromatoz HFE geni mutasyon taraması yapıldı ve HFE geninde “Heterozigot H63D” mutasyonu saptandı. Bilgisayarlı tomografisinde görülen kolit şüphesi ve apsede üreyen etkenin *Y. pseudotuberculosis* olması üzerine de kolonoskopi yapıldı. Hastanın kolonoskopisinde 1 adet polip ve internal hemoroid dışında ek bir şey görülmedi.

Bakteriyoloji laboratuvarında kronik enterit ve bulaştırmalık açısından araştırmak için tedavinin 2.haftası yapılan “soğukta zenginleştirme” yönteminde dışkı örneği 3 cc 0.067 M PBS (fosfat tampon solüsyonu) içinde bir öze materyal homojenize süspansiyon olacak şekilde tüpte hazırlanıp 4°C’de 3 hafta bekletildi. 0-1.7-14-21.günlerde tüpten alınan örnek EMB agara pasajlandı 48 saat 26°C’de enkübe edildi<sup>(9)</sup>. *Yersinia* ile uyumlu bir koloni üremedi. KBY nedeniyle düzenli diyalizine devam eden hastanın KBY’e bağlı anemisi nedeniyle en son 2 yıl önce kan transfüzyonu yapıldığı öğrenildi. Servisteki klinik izlem sırasında da aktif kanama olmadan hemoglobin 6.4 g/dL olması üzerine iki ünite eritrosit süspaniyonu replasmanı yapıldı. Seftriakson ve metronidazol tedavisinin 18. gününde ateşsiz seyreden hastadan kontrol için alınan periferik kan kültüründe üreme saptanmadı. Seftriakson ve metronidazol 4.haftasında kontrol için çekilen üst abdomen bilgisayarlı tomografide karaciğerdeki abse odakları benzer boyut ve görünümde olup segment 6 düzeyindeki multiloküle görünümdeki apse odağında bir miktar regresyon saptandı. Total Bilirubin değerinde artış (3.87 mg/dL) ve apsede regresyonu devam ettirmek için antibiyotik rejimi dört haftalık seftriakson ve metronidazolden piperasilin tazobaktam şeklinde değiştirildi. İki haftalık piperasilin tazobaktam tedavisinin ardından ateşinin olmaması, genel durumu iyi ve vitalleri stabil olması üzerine hasta taburcu edildi. HFE genindeki heterozigot H63D mutasyonu için aileye genetik danışma verildi. Hastanın 4.5 ay sonra yapılan kontrol muayenesi olağan olup, ateş ve ağrı şikayeti bu süreçte belirtilmedi, hastanın çekilen kontrol Üst Batın bilgisayarlı tomografisinde 4.5 ay önce izlenmiş karaciğer içindeki multipl hipodens lezyonlar izlenmedi. KBY nedenli anemisi, demir birikiminin kontrol altında tutulması ve diğer komorbiditeleri (Tip-2 diabet ve



periferik arter hastalığı gibi) için dahiliye polikliniğinde tabibe alınması planlandı.

## Bulgular

*Yersinia pseudotuberculosis*'in doğal rezervuarları kemiriciler, vahşi hayvanlar ve av kuşlarıdır. Sıklıkla gıda veya su tüketimi ilişkili gastroenterit ve psödoapandisit tablosuna sebep olmaktadır. Gıda kaynaklı (çiğ süt, iceberg marul gibi) bu tabloya sebep olan büyük salgınlara da neden olmuştur<sup>(10-11)</sup>. Ayrıca 4°C gibi düşük sıcaklıklarda metabolik olarak aktif olduğu için buzdolabında saklanan gıdalarda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilir ve kış aylarında da daha fazla enfeksiyon yapabilir. Sekonder komplikasyon olarak da perforasyon<sup>(12)</sup>, intussusepsiyon<sup>(13)</sup> ve akut böbrek yetmezliği<sup>(14)</sup> yaptığı olgular da mevcuttur. Hemokromatoz başta olmak üzere karaciğer sirozu ve diyabet gibi altta yatan kronik hastalıklar bakteriyemi ve karaciğer apsesine neden olabilir<sup>(6-7)</sup>. Tedaviye rağmen bazen yüksek mortalite ile seyredebilmektedir.

Klasik olarak, *Y. pseudotuberculosis*'in tanımlanması ve tipendirilmesi "O-antijen serotipine" göre gerçekleştirilmiş olup 15 major serotip mevcuttur<sup>(15)</sup>. Bununla birlikte, vakalardan izole edilen suşların büyük çoğunluğu "O: 1 ve O: 3 serotiplerine" ait olduğundan, *Y. pseudotuberculosis*'in potansiyel salgınlara ilişkin araştırılmasında serotiplemenin kullanımı çok sınırlıdır<sup>(15-16)</sup>. *Yersinia pseudotuberculosis* çok sayıda virülans faktörü üretir. Özellikle YOPS (*Yersinia* outer proteins) içeren Tip 3 sekresyon sistemi ve *IRP-2* geni ile ilişkili siderofor-yersiniabactin mekanizması büyük önem arz etmektedir. YOPS'un sitozole Tip-3 sekresyon sistemi ile enjeksiyonu, bakterinin yararına olacak şekilde hücrede birçok mekanizmayı modüle veya inhibe eder. Siderofor-Yersiniabactin mekanizması ise bakterilerin çoğalması için önemli bir faktör olan "demirin" absorbe edilebilmesinde kullanılır<sup>(17-19)</sup>. Bu vakada da ferritin değeri 13725 µg/L şeklinde patolojik olarak yüksek miktarda olup hemokromatoz açısından HFE geninde heterozigot H63D mutasyonu saptanmıştır. Literatür taraması yapıldığında HFE genindeki H63D heterozigot mutasyonunun nadir de olsa hastalarda serum demir ve ferritin yüksekliği yapabildiği<sup>(20)</sup>, fakat kliniğin net bir şekilde açıklanabilmesi için hemokromatozis açısından ileri genetik inceleme yapılması gerektiği görüldü. Hemokromatozis mutasyon taraması için yapılan strip testin "Haemochromatosis StripAssay A (ViennaLab diagnostics GmbH, Avusturya)" sadece HFE genindeki en sık görülen mutasyonları kapsadığı göz önüne alındığında, hemokromatozise sebep olan HFE ve diğer genlerdeki mutasyonları ve muhtemel genetik immün yetmezlik hastalıklarını ortaya çıkarması amacıyla hastaya tüm ekzom sekanslama (WES) analizi yapılacaktır. Hastadaki olası hemokromatozis hastalığının ya da immün sistem defektinin de *Y.pseudotuberculosis*'in patojenitesine katkısı olduğu düşünüldü.

Enterik enfeksiyon yapmasıyla bilinen *Yersinia* alt türlerinin çoğu geniş spektrumlu sefalosporinler, aminoglikozidler, kloramfenikol, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfometoksazole duyarlıdır<sup>(6)</sup>. Hastamıza önce 4 hafta seftriksone ve metronidazol tedavisi uygulanmış olup ardından iki hafta da piperasilin-tazobaktam tedavisi ile izlenip antibiyotikleri kesilmiştir.

## Sonuç

Sonuç olarak hemokromatoz, diyabet gibi altta yatan kronik hastalığı olan karaciğer apseli hastalarda bakteriyolojik inceleme tanı ve tedavi açısından büyük önem arz etmektedir. Bu gibi olgularda *Y. pseudotuberculosis* nadiren de olsa karşımıza çıkabilmektedir. *Y. pseudotuberculosis* tedavisinde optimal bir rejim mevcut değildir ve bu nedenle antimikrobiyal terapi, doğru uygulanmış duyarlılık testlerinde antimikrobiyaller için saptanan minimal inhibitör konsantrasyon değerlerine dayandırılmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** Demir birikimi, hemokromatozis mutasyonu, karaciğer apsesi, *Yersinia pseudotuberculosis*

## Kaynaklar

1. Sagun E, Ergün Ö. Gıdalarda *Yersinia enterocolitica* ve önemi. YYÜ Vet Fak Derg. 1996;7(1-2):117-20.
2. Baylan O, Abaslı HE. *Yersinia enterocolitica* enfeksiyonları. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2005;35(3):232-47.
3. McNally A, Thomson NR, Reuter S, Wren BW. 'Add, stir and reduce': *Yersinia* spp. as model bacteria for pathogen evolution. Nat Rev Microbiol. 2016;14(3):177-90. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.29>
4. Slee KJ, Skilbeck NW. Epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections in sheep in Australia. J Clin Microbiol. 1992;30(3):712-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.30.3.712-715.1992>
5. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda JM. Enterobacteriaceae. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th Ed. 2016:279-85.
6. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Medical Microbiology 7th Ed. 2013:267-9.
7. Farrer W, Kloser P, Ketyer S. *Yersinia pseudotuberculosis* sepsis presenting as multiple liver abscesses. Am J Med Sci. 1988;295(2):129-32. <https://doi.org/10.1097/00000441-198802000-00008>
8. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>
9. Özkan Ö, Günhan C. Gastroenteritlerin *Yersinia enterocolitica* yönünden incelenmesi. Mikrobiyol Bul. 1994;28(1):16-20.
10. Williamson DA, Baines SL, Carter GP, et al. Genomic insights into a sustained national outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis*. Genome Biol Evol. 2016;8(12):3806-14. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw285>
11. Pärn T, Hallanvuo S, Salmenlinna S, et al. Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:1 infection associated with raw milk consumption, Finland, spring 2014. Euro Surveill 2015; 20(40):30033. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.40.30033>
12. Gaulier A, Poulton F. The place of anatomo-pathological study in the diagnosis of enterocolitis complicated by *Yersinia pseudotuberculosis*. Ann Pathol 1983;3(4): 301-5.
13. Koo JW, Cho CR, Cha SJ, Chung CY. Intussusception associated with *Yersinia pseudotuberculosis* infection. Acta Paediatr. 1996;85(10):1253-5. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1996.tb18242.x>
14. Koo JW, Park SN, Choi SM, et al. Acute renal failure associated with *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children. Pediatr Nephrol. 1996;10(5):582-6. <https://doi.org/10.1007/s004670050165>
15. Bogdanovich TM, Carniel E, Fukushima H, Skurnik M. Genetic (sero) typing of *Yersinia pseudotuberculosis*. Adv Exp Med Biol. 2003;529:337-40. [https://doi.org/10.1007/0-306-48416-1\\_65](https://doi.org/10.1007/0-306-48416-1_65)
16. Halkilahti J, Haukka K, Siitonen A. Genotyping of outbreak-



- associated and sporadic *Yersinia pseudotuberculosis* strains by novel multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). J Microbiol Methods. 2013;95(2):245-50.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.007>
17. Grabowski B, Schmidt MA, Rüter C. Immunomodulatory *Yersinia* outer proteins (Yops)—useful tools for bacteria and humans alike. Virulence 2017; 8(7):1124-47.  
<https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1303588>
  18. Sauter M, Vavricka SR, Locher P, et al. Multilocal hepatic abscess formation and sepsis due to *Yersinia enterocolitica* in a patient with hereditary hemochromatosis and type 2 diabetes mellitus. Case Rep Gastroenterol 2017;11(3):724-8.  
<https://doi.org/10.1159/000481932>
  19. Schubert S., Rakin A, Karch H, Carniel E, Heesemann J. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infect Immun. 1988;66:480-5.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.66.2.480-485.1998>
  20. Hollerer I, Bachmann A, Muckenthaler MU. Pathophysiological consequences and benefits of HFE mutations: 20 years of research. Haematologica. 2017;102(5):809-17.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2016.160432>

## Nadir Bir Karaciğer Apsesi ve Bakteriyemi Etkeni: *Yersinia pseudotuberculosis*

Muhammed Alper Özarslan<sup>1</sup>, Bartu Çetin<sup>2</sup>, Mustafa Mustafayev<sup>3</sup>, Mert Pekerbaş<sup>4</sup>,  
Alper Tünger<sup>1</sup>, Fatma Feriha Çilli<sup>1</sup>, Fulya Günşar<sup>3</sup>, Asude Durmaz<sup>4</sup>, Ayça Aykut<sup>4</sup>,  
Şöhret Aydemir<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

<sup>4</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir

✉ alperozarslan@hotmail.com

### Giriş

Anaerop bakteriler vücuttaki normal mikrobiyotanın önemli kısmını oluşturmaktadır. Bununla birlikte bu bakterilerin fırsatçı patojen oldukları; deri ve yumuşak doku, intraabdominal, plöropulmoner gibi endojen polimikrobiyal enfeksiyonlara yol açarak hayatı tehdit edebildikleri bilinmektedir. Bu nedenle anaerop enfeksiyonların tanısı büyük önem taşımaktadır<sup>(1,2)</sup>.

Anaerop bakterilerin rutinde sık karşılaşılan diğer bakterilere göre klinik örneklerden izole edilmeleri ve tanımlanmaları daha zor ve zaman alıcıdır. Bundan dolayı mikrobiyoloji laboratuvarlarının büyük kısmında anaerop bakterilere yönelik çalışmalar yapılamamaktadır. Bu da klinisyenleri ampirik tedaviye yönlendirmektedir. Son yıllarda anaerop bakterilerde antibiyotik direnci arttığından, anaerop bakterilere yönelik çalışmaların yapılması önem kazanmaktadır<sup>(3-6)</sup>.

Anaerop bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonunda; iş yükünün fazla olması, uzun zaman alması ve anaerobik ortamı sağlamada güçlük çekilmesi gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu olumsuzluklar düşünüldüğünde daha hızlı, iş yükü az olan yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni bir yöntem olan MALDI-TOF MS ile bakteri identifikasyonu tüm işlemler dahil olmak üzere 5-10 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebilmektedir<sup>(7)</sup>.

Kan dolaşımı enfeksiyonları, hızla tedavi edilmesi gereken ölümcül bir tablodur. Tüm bakteriyemilerin %1-17'sine anaerop bakteriler yol açmaktadır<sup>(8)</sup>. Kültür işlemleri uzun zaman aldığından hastalara ampirik olarak geniş spektrumlu antibiyotikler başlanmaktadır. Tanı süresini kısaltmak amacıyla mikroorganizmaların izolasyon işlemi henüz yapılmadan MALDI-TOF MS ile direkt olarak kan kültürü şişesinden identifikasyonu araştırmacıların ilgisini çeken yeni bir konudur. Bu yöntemle etken bakterilerin tanımlanması daha kısa sürmekte ve hastalara uygun tedavi daha erken başlanabilmektedir. Ancak henüz sınırlı sayıda bakteri bu yöntemle tanımlanabilmektedir<sup>(9)</sup>.

Bu çalışmada, Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma

Hastanesi (SÜEAH) Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin identifikasyonu MALDI-TOF MS ile yapılarak konvansiyonel ve otomatize ticari yöntemlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır. İkincil amaç olarak; daha hızlı identifikasyon yapabilmek için, kan kültür şişesinden pozitif sinyal alındıktan sonra anaerop bakterilerin direkt olarak MALDI-TOF MS ile identifikasyonu da araştırılmıştır.

### Gereç ve Yöntem

**Suşların seçimi:** Laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunan standart bakteri suşlarından *Bacteroides fragilis* ATCC 25285™, *Fusobacterium nucleatum* subsp. ATCC 25586™ suşları ile yara, kan ve steril vücut sıvıları gibi klinik örneklerden izole edilen anaerop bakteri suşları çalışmaya dahil edilmiştir. 16 adet *Prevotella* spp. (üç adet *Prevotella bivia*, iki adet *Prevotella buccae*, bir adet *Prevotella denticola*, iki adet *Prevotella intermedia*, bir adet *Prevotella loeschii*, iki adet *Prevotella melaninogenica*, iki adet *Prevotella nigrescens*, üç adet *Prevotella veroralis*), 14 adet *Bacteroides* spp. (sekiz adet *Bacteroides fragilis*, dört adet *Bacteroides thetaiotaomicron*, iki adet *Bacteroides ovatus*), 2 adet *Porphyromonas asaccharolytica*, 3 adet *Fusobacterium* spp. (iki adet *Fusobacterium nucleatum*, bir adet *Fusobacterium varium*), 3 adet *Veillonella dispar*, 6 adet *Fingoldia magna*, 3 adet *Peptostreptococcus anaerobius*, 4 adet *Peptoniphilus asaccharolyticus*, 3 adet *Anaerococcus vaginalis*, 2 adet *Parvimonas micra*, 3 adet *Actinomyces* spp. (iki adet *Actinomyces turicensis*, bir adet *A. europaeus*), 2 adet *Cutibacterium acnes*, 4 adet *Clostridium* spp. (iki adet *Clostridium ramosum*, birer adet *Clostridium perfringens* ve *Clostridium clostridioforme*), 1 adet *Atopobium rimae* ve 1 adet *Eggerthia cateniformis* olmak üzere toplamda 67 klinik izolat incelenmiştir.

**Kullanılan besiyerleri, kitler ve cihazlar:** Anaerop bakterileri izole edebilmek amacıyla temel besiyeri olarak anaerobik agar (Condalab, Madrid, İspanya) ve Schaedler agar (Oxoid, Basingstoke, İngiltere); *B. fragilis* grubu bakterileri seçici olarak üretmek için *Bacteroides* safra eskülin agar (Condalab, Madrid, İspanya); identifikasyon diskleriyle tanımlama yapmak amacıyla brusella agar (BBL, BD Diagnostic Systems, Sparks, ABD); anaerop bakteri suşlarının

**Tablo 1. Anaerob bakterilerin konvansiyonel yöntemler, Vitek 2 sistemi, MALDI-TOF MS yöntemi ile hem koloniden hem de direkt kan kültür şişesinden yapılan identifikasyonunun karşılaştırılması.**

| Bakteri adı              |                                            | Konvansiyonel yöntem |      | Vitek 2 sistemi |       | MALDI-TOF MS   |       |                 |
|--------------------------|--------------------------------------------|----------------------|------|-----------------|-------|----------------|-------|-----------------|
|                          |                                            | Tür                  | Cins | Tür             | Cins  | Direkt şişeden |       | Koloniden (Tür) |
|                          |                                            |                      |      |                 |       | Tür            | Cins  |                 |
| Gram negatif anaeroplara | <i>Bacteroides fragilis</i>                | 0                    | 9    | 8               | 0     | 8              | 1     | 9               |
|                          | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>        | 0                    | 4    | 0               | 0     | 3              | 0     | 4               |
|                          | <i>Bacteroides ovatus</i>                  | 0                    | 2    | 0               | 1     | 2              | 0     | 2               |
|                          | <i>Prevotella bivia</i>                    | 0                    | 3    | 3               | 0     | 3              | 0     | 3               |
|                          | <i>Prevotella veroralis</i>                | 0                    | 3    | 1               | 2     | 2              | 1     | 3               |
|                          | <i>Prevotella buccae</i>                   | 0                    | 2    | 0               | 1     | 1              | 0     | 2               |
|                          | <i>Prevotella intermedia</i>               | 0                    | 2    | 0               | 1     | 0              | 1     | 2               |
|                          | <i>Prevotella melaninogenica</i>           | 0                    | 2    | 1               | 1     | 0              | 0     | 2               |
|                          | <i>Prevotella nigrescens</i>               | 0                    | 2    | 1               | 1     | 0              | 0     | 2               |
|                          | <i>Prevotella loeschii</i>                 | 0                    | 1    | 0               | 1     | 0              | 0     | 1               |
|                          | <i>Prevotella denticola</i>                | 0                    | 1    | 0               | 0     | 0              | 0     | 1               |
|                          | <i>Veillonella dispar</i>                  | 0                    | 2    | 0               | 3     | 3              | 0     | 3               |
|                          | <i>Porphyromonas asaccharolytica</i>       | 0                    | 2    | 0               | 0     | 2              | 0     | 2               |
|                          | <i>Fusobacterium nucleatum</i>             | 0                    | 3    | 2               | 0     | 0              | 0     | 3               |
|                          | <i>Fusobacterium varium</i>                | 0                    | 1    | 1               | 0     | 0              | 0     | 1               |
| Gram pozitif anaeroplara | <i>Finnegoldia magna</i>                   | 0                    | 0    | 6               | 0     | 5              | 0     | 6               |
|                          | <i>Anaerococcus vaginalis</i>              | 0                    | 0    | 0               | 2     | 3              | 0     | 3               |
|                          | <i>Parvimonas micra</i>                    | 0                    | 0    | 2               | 0     | 2              | 0     | 2               |
|                          | <i>Cutibacterium acnes</i>                 | 2                    | 0    | 2               | 0     | 2              | 0     | 2               |
|                          | <i>Actinomyces turicensis</i>              | 0                    | 2    | 0               | 2     | 1              | 1     | 2               |
|                          | <i>Actinomyces europaeus</i>               | 0                    | 1    | 0               | 1     | 1              | 0     | 1               |
|                          | <i>Atopobium rimae</i>                     | 0                    | 0    | 1               | 0     | 1              | 0     | 1               |
|                          | <i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> | 0                    | 0    | 4               | 0     | 2              | 0     | 4               |
|                          | <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>       | 3                    | 0    | 3               | 0     | 1              | 0     | 3               |
|                          | <i>Clostridium perfringens</i>             | 1                    | 0    | 0               | 0     | 1              | 0     | 1               |
|                          | <i>Clostridium ramosum</i>                 | 0                    | 0    | 0               | 2     | 0              | 0     | 2               |
|                          | <i>Clostridium clostridioforme</i>         | 0                    | 1    | 0               | 0     | 0              | 0     | 1               |
|                          | <i>Eggerthia cateniformis</i>              | 0                    | 0    | 1               | 0     | 0              | 0     | 1               |
| TOPLAM                   | SAYI                                       | 6                    | 49   | 36              | 54    | 43             | 47    | 69              |
|                          | YÜZDE                                      | %8.7                 | %71  | %52.1           | %78.2 | %62.3          | %68.1 | %100            |

stok kültürü amacıyla skim milk besiyeri kullanıldı. Üremeyi artırmak için %5 koyun kanı, 1 µg/ml hemin ve 1 µg/ml vitamin K<sub>1</sub> ilave edildi.

Otomatize sistem tanı kiti: MALDI-TOF MS ve konvansiyonel yöntemlerle performansını karşılaştırmak amacıyla Vitek 2 sistemi kullanılarak Vitek 2 ANC Card (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile identifikasyon yapıldı.

**MALDI-TOF MS:** Çalışmaya alınan suşlar anaerobik kanlı agar ve Schaedler kanlı agarda yeniden üretildikten sonra, üremiş koloniden ve kan kültür şişesinden direkt olarak identifiye etmek amacıyla Vitek MS (bioMérieux, Durham, NC, ABD) kullanıldı. Matris olarak ise üretici firmanın önerileri doğrultusunda CHCA kullanıldı.

**Biyokimyasal testler:** Konvansiyonel yöntemler ile anaerob bakterileri tanımlamak için gram boya seti, identifikasyon diskleri, spot indol, katalaz, üreaz, nitrat redüksiyonu gibi biyokimyasal testler ile BSE agar kullanıldı.

**Bakteri süspansiyonlarının Hazırlanması:** Tüm bakteri suşları anaerobik agar ve Schaedler agar plaklarına ekildi. 37°C'de en az 48 saat inkübe edildi. Identifikasyon diskleri için ve kan kültürü şişesinden direkt identifikasyon işlemine kullanılmak üzere her bakteri için tek düşen kolonilerden spektrofotometrik yöntem kullanılarak (DensiCHEK plus, bioMérieux, Fransa) 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandı.

**Örneklerin toplanması ve işleme alınması:** Çalışmamıza anaerobik kültür istemiyle laboratuvarımıza gönderilen klinik örneklerden izole edilen 67 suş dahil edildi. Klinik örnekler öncelikle pürülan, kanlı, kötü kokulu olması gibi makroskopik özellikleri açısından değerlendirildi. Tüm örnekler anaerobik kültür plaklarına ekilerek 37°C'de en az 48 saat inkübe edildi. Ekim sonrası örneklerden preparat hazırlanarak gram boyama yapıldı ve mikroskopta incelendi.

**Kültür işlemleri ve identifikasyon:** Anaerobik kültür için uygun olan klinik örneklerden anaerobik agar ve Schaedler kanlı agara ekimleri yapıldı. Uygun inkübasyon süresi sonunda üreyen kolonilerin morfolojik görünümleri ve pigment oluşumu incelendi. Saf olarak üremiş koloniler, çalışmada kullanmak amacıyla pasaj alındıktan sonra MALDI-TOF MS ile identifiye edildi. Karışık üremenin olduğu plaklarda aerotolerans testi uygulandı.

**Kan kültürü şişesinden direkt identifikasyon:** Bakteri süspansiyonları hazırlandıktan sonra, kan kültürü şişelerine ekim yapılarak spike/simüle örnekler hazırlandı. Daha sonra tüm şişelere kan eklenerek inkübe edildi. Cihaz üreme sinyali verdiğinde anaerob besiyerlerine pasajlandı ve inkübasyona bırakıldı. Uygun süre inkübasyonun ardından plakların kültür değerlendirilmesi yapılarak MALDI-TOF MS ile tüm bakteriler kontrol amacıyla tekrar identifiye edildi. Direkt identifikasyon işlemi için pozitif sinyal veren tüm kan kültürü şişelerinden steril enjektörler vasıtasıyla 5 ml kan 16x100'lük 8.5 ml BD Vacutainer plastik SST jelli tüplere alındı. Tüpler 2000g hızında 15 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant dışarıya atıldı. Pelletin üzerine 3 ml SF ile 100'er µl asetonitril ve formik asit ilave edildikten sonra tüpler hafifçe elle karıştırıldı. Bu karışımdan 1 ml alınarak steril 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerine aktarıldıktan sonra 50 g hızında 2 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrası süpernatant kısmından 1 µl alınarak MALDI-TOF MS slaytında bulunan kuyucuklara inoküle edildi. Üzerlerine 1 µl matris ilave edildi. Bu karışım kuruduktan sonra slaytlar cihaza yüklenerek identifikasyon sonuçları değerlendirildi.

## Bulgular

**Konvansiyonel yöntem bulguları:** Öncelikle kolonilerden

hazırlanan preparatların gram boyaması yapılarak; bakterilerin morfolojik bulguları mikroskopta incelendi. Koloni özellikleri ve gram boyama bulgularına göre konvansiyonel testler uygulandı. Identifikasyon diskleri ile bazı antibiyotiklere duyarlılık, spot indol, safraya direnç, eskülin hidrolizi, katalaz, nitrat redüksiyonu, L-pirolidonil arilamidaz (PYR), üreaz gibi özellikleri incelendi. Tablo 1'de konvansiyonel yöntemlerin sonuçları verilmiştir.

**Otomatize sistem bulguları:** Otomatize yöntem olarak Vitek 2 sistemi kullanıldı. Bu yöntemle yapılan identifikasyonu sonuçları Tablo 1'de görülmektedir.

**MALDI-TOF MS ile kan kültürü şişesinden direkt identifikasyon bulguları:** MALDI-TOF MS ile koloniden çalışılan yöntemle karşılaştırıldığında; bu suşlardan 43 (%62.3) tanesinde tür düzeyinde, 47 (%68.1) tanesinde ise cins düzeyinde aynı sonuca ulaşıldı.

MALDI-TOF MS koloniden olan yöntem referans kabul edildiğinde konvansiyonel yöntem, Vitek 2 sistemi ve kan kültürü şişesinden direkt identifikasyonun uyum oranları sırasıyla; %71, %76.8 ve %68.1 olarak bulundu. Aynı şekilde uyum oranları gram negatifler için sırasıyla; %97.5, %70 ve %67.5 iken gram pozitifler için %34.4, %89.6 ve %68.9 idi. Her üç yöntemin de bir bakteriyi başka bir tür veya cins ile karıştırmadığı tespit edildi.

## Sonuç

Anaerob bakterilerin MALDI-TOF MS ile direkt olarak kan kültürü şişelerinden identifikasyonu literatürde yeni bir konudur. Bu yöntem ile sonuç verme süresi oldukça kısaltmakta ve direkt identifikasyon yönteminde kan kültürü şişesinin pozitif sinyal verdiği aynı gün içinde sonuç vermektedir. Duyarlılığı ve özgüllüğünün konvansiyonel yöntemler ve otomatize sistemlerden daha yüksek bulunması nedeniyle, son yıllarda MALDI-TOF MS anaerob bakterilerin identifikasyonunda referans yöntem olma potansiyeli taşımaktadır. Referans yöntem olan dizi analizi yöntemine göre çok daha hızlı, maliyet etkin ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Tanı süresinin kısaltılması ile tedavi erken yönlendirildiğinden; mortalite ve morbidite oranlarının düşmesi, hastanede yatış süresinin kısaltılması, hasta bakım maliyetlerinin düşmesi gibi yararlar sağlanacaktır.

Bu çalışmanın kısıtlılıkları arasında referans yöntem olan sekans çalışmasının yapılmamış olması, standart suş ve klinik izolat sayısının azlığı, şişeden direkt identifikasyonda lizis tamponlarının ve hazır ticari ürünlerin kullanılmamış olması sayılabilir.

Bu çalışmada MALDI-TOF MS yönteminin anaerob bakterilerin gerek koloniden gerekse de kan kültürü şişesinden direkt olarak identifikasyonunda büyük başarıyla kullanılabileceği ve sonuç verme süresini oldukça kısalttığı tespit edilmiştir. Konvansiyonel yöntemler, hızlı enzimatik otomatize sistemler ve MALDI-TOF MS arasındaki sonuçların büyük oranda uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Ancak kan kültürü şişesinden direkt identifikasyon yönteminin standardizasyonu henüz sağlanabilmiş değildir. Bu konuda daha detaylı ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** Anaerop, identifikasyon, izolasyon, kan kültürü, MALDI-TOF MS

#### Kaynaklar

1. Belizário JE, Napolitano M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front Microbiol.* 2015;6:1050. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01050>
2. Cohen-Poradosu R, Kasper DL. Anaerobic infections: General concepts. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Mandell GL, Douglas JE, and Bennett R (Eds.). 8th ed, Vol. 2, Elsevier Saunders, ABD, 2015:2736-43.
3. Olsen I, Solberg CO, Finegold SM. A primer on anaerobic bacteria and anaerobic infections for the uninitiated. *Infection.* 1999;27(3):159-65. <https://doi.org/10.1007/BF02561521>
4. Finegold SM. Anaerobic infections: General concepts. In: *Principles and practice of infectious diseases* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (Eds.), 5th ed, Churchill Livingstone, ABD, 2000.
5. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Anaerop Bakterilerin Genel Özellikleri. İçinde: *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008:2319-62.
6. Norin E. How normal is a “normal” flora in animal or man? *Anaerobe.* 2011;17(6):431-2. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.05.003>
7. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(3):547-603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>
8. Brook I. The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe.* 2010;16:183-9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.12.001>
9. Almuhayawi M, Altun O, Abdulmajeed AD, Ullberg M, Özenci V. The performance of the four anaerobic blood culture bottles BacT/ALERT FN, -FN Plus, BACTEC-plus and -lytic in detection of anaerobic bacteria and identification by direct MALDI-TOF MS. *PLoS One* 2015;10:e0142398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142398>



# Kan Örneklerinden İzole Edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* İzolatlarında İn Vitro Seftobiprol-Daptomisin Kombinasyonunun Etkinliğinin Araştırılması

Zeynep Şeyma Işık<sup>1</sup>, Elif Çalışkan<sup>2</sup>, Duygu Öcal<sup>3</sup>, Mustafa Çağatay<sup>2</sup>, Ümmü Gül Erdem<sup>2</sup>, Oğuz Alp Gürbüz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bayrampaşa Devlet Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, İstanbul

<sup>2</sup>SBÜ Dışkapı Yıldırım Beyazıt EAH, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

✉ zeynep\_seyma\_bayrak@hotmail.com

## Giriş

Enterokoklar, insan gastrointestinal sistem normal flora elemanı olup, üriner sistem enfeksiyonu, solunum yolu enfeksiyonu, endokardit, menenjit ve kan dolaşımı enfeksiyonu gibi ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara da neden olabilen fırsatçı patojenlerdir<sup>(1)</sup>. Dış ortam koşullarına dirençli olmaları ve yaygın çoklu antibiyotik direnci nedeni ile hastanede yatış süresini uzatır, tedavi maliyeti, tedavi başarısızlığı ve ölüm riskini artırır. Doğal direnç mekanizmalarının yanı sıra, kazanılmış direnç genleri nedeniyle yol açtıkları ciddi enfeksiyonların tedavi seçenekleri kısıtlıdır<sup>(2)</sup>.

Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium*, Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) tarafından yeni tedavilere ihtiyaç duyulan bir patojen olarak kabul edilmiştir<sup>(3)</sup>. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) de vankomisine dirençli *E. faecium*'u, yeni antibiyotik geliştirilmesi gereken öncelikli patojenler listesinde, yüksek önceliğe sahip patojenler grubuna dahil etmiş, mevcut ve etkili tedavi seçeneklerinin yetersizliğini vurgulamıştır<sup>(4)</sup>.

Bunlara ek olarak, glikopeptidlere dirençli *Staphylococcus aureus*'ların görülmeye de başlanmasıyla vankomisin etkinliğinin korunması günümüzde daha da önem kazanmıştır. Bu nedenle dirençli enterokokların neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde, vankomisine alternatif yeni tedavi rejimlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Günümüzde ilaç endüstrisinin, yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi için ayırdıkları fonları önemli ölçüde azaltmaları nedeni ile, ilaç direncinin üstesinden gelebilmek için antimikrobiallerin kombine kullanımı zorunlu hale gelmektedir. Seftobiprol, PBP5 de dahil olmak üzere çeşitli enterokokal PBP alt tipleri için yüksek bağlanma afinitesine sahip geniş spektrumlu, bakterisidal etkili 5. kuşak sefalosporindir ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* izolatlarına karşı in vitro aktivite gösterir<sup>(5-7)</sup>.

*Staphylococcus aureus* izolatlarında β-laktam antibiyotiklerin daptomisin ile kombinasyonları sonucunda bakteri hücre yüzey yükünde değişiklik sonrası sinerjik bir etki görülür<sup>(8,9)</sup>. Seftobiprolün enterokoklardaki etkisine dair sınırlı sayıda çalışma olup sinerjik etkisi hakkında henüz yeterli veri yoktur<sup>(10,11)</sup>.

Bu veriler ışığında seftobiprol, daptomisin gibi ajanların kombinasyonunun yeni tedavi seçenekleri olarak değerlendirilebilmesi için geniş kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

Bu çalışmada hastanemiz laboratuvarına gönderilen kan örneklerinden izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle daptomisin ve seftobiprolün in vitro duyarlılığı ve daptomisin-seftobiprol kombinasyonunun potansiyel sinerjik aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece tedavi seçeneği daralan enterokok enfeksiyonlarına alternatif bir tedavi seçeneği sağlanabilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmamıza, hastanemiz Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına, 2018 Ocak-2019 Aralık tarihleri arasında gönderilen, kan kültürü örneklerinden izole edilen 61 *E. faecalis* ve 39 *E. faecium* izolatı dahil edildi. Bu izolatlardan, üç *E. faecium* izolatı vankomisine dirençliydi.

İzolatların daptomisin (Carbosynth Limited, Birleşik Krallık) ve seftobiprol (Basilea Pharmaceutica, İsviçre) minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 standartları kullanılarak, sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi ile belirlendi. Daptomisinin etkililiğini gösterebilmesi için ortamda fizyolojik seviyelerde (50 mg/L) kalsiyum varlığı gerektiğinden, MHB besiyeri son kalsiyum konsantrasyonu 50 mg/L kalsiyum olacak şekilde ayarlandı ve çözücü, sulandırıcı ve izolatların inokülasyonunda besiyeri olarak kullanıldı. Daptomisin sonuçları CLSI standartlarına göre, *E. faecalis* için; ≤1 µg/mL bulunan izolatlar duyarlı, 2-4 µg/mL bulunan izolatlar doza bağlı duyarlı (SDD), ≥8 µg/mL bulunanlar ise dirençli, *E. faecium* için; ≤4 µg/mL SDD, ≥8 µg/mL dirençli olarak değerlendirildi<sup>(12)</sup>. Seftobiprolün European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ve CLSI rehberlerinde enterokok izolatları için klinik sınır değerleri bulunmadığından sonuçlar duyarlı veya dirençli olarak yorumlanamadı.

İzolatların tamamında gradiyent test (GT) yöntemi ile MİK değerleri ve in vitro sinerji varlığı araştırıldı. Kombinasyonu değerlendirmek için, öncelikle izolatların her iki antibiyotik için, GT yöntemi ile, MİK'leri belirlendi. Sonrasında GT

şeritleri kesişme noktası, her iki antibiyotik için MİK değeri olacak şekilde, 90° açı ile yerleştirilip, 35°'de bir gece inkübe edildi. Kombinasyon, izolatların fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksi hesaplanarak; sinerji, aditif, etkisiz veya antagonizma olarak yorumlandı (FİK indeksi;  $\leq 0.5$  sinerji, 0.5–1 aditif, 1-4 etkisiz,  $>4$  antagonizma)<sup>(13)</sup>.

Gradient test yöntemi ile sinerji saptanan (FİK indeksi=0.5) 11 nolu *E. faecalis* izolatına "Time Kill Assay" (TKA) çalışıldı. Bu izolatta TKA yöntemiyle de sinerjiyi saptayarak, GT yönteminin etkinliğinin gösterilmesi hedeflendi. İzolatın SMD yöntemiyle seftobiprol ve daptomisin için MİK'i 1 µg/mL olarak bulunmuştu. Seftobiprol için;  $\times 0.25$  MİK,  $\times 1$  MİK ve  $\times 4$  MİK; daptomisin için,  $\times 0.25$  MİK,  $\times 1$  MİK ve  $\times 2$  MİK ve kombinasyonlarıyla birlikte toplam 15 test ve bir kontrol tüpü hazırlandı. Her tüpten 0., 2., 4., 8., 12. ve 24. saatlerde ekimler yapıldı. Bir gecelik inkübasyon sonrası koloni sayımı yapılarak, ekimin yapıldığı saatteki mililitreye düşen canlı bakteri sayısı belirlendi. Her tüp için hesaplanan değerler Excel sayfasına aktarıldı. Zaman-konsantrasyon ilişkisi grafiği kullanılarak zaman-öldürme grafiği elde edildi. Sonuçlar değerlendirilirken, başlangıç bakteri sayısına göre 1000 kat ve üzeri ( $\geq 3\log_{10}$ ) azalmanın olduğu antibiyotik konsantrasyonu bakterisidal etkinin görüldüğü konsantrasyon, kombinasyon ise en etkili antibiyotiğe göre bakteri sayısındaki 100 kat ve üzeri ( $\geq 2\log_{10}$ ) azalma sinerji, 100 kattan daha az ( $< 2\log_{10}$ ) değişiklik etkisizlik, 100 kat ve üzeri ( $\geq 2\log_{10}$ ) artış antagonizma olarak tanımlandı.

## Bulgular

Yüz *Enterococcus* spp. izolatına SMD ve GT yöntemiyle daptomisin ve seftobiprol duyarlılığı çalışıldı.

Çalışmamızda daptomisin, *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarına karşı güçlü aktivite gösterdi. Daptomisine dirençli izolat saptanmadı, izolatların tamamının üremesi  $\leq 4$  µg/mL'de inhibe oldu. Bir vankomisin dirençli enterokok izolatının MİK'i 4 µg/mL bulundu. GT ve SMD yöntemine göre; 61 *E. faecalis* izolatının, 54'ü daptomisine duyarlı, 7'si SDD, 39 *E. faecalis* izolatının hepsi SDD bulundu. İzolatların %96'sında, iki yöntem arasında en fazla  $\pm 1$  dilüsyon fark bulunuyordu. Çok büyük ve büyük hata görülmedi.

Seftobiprolün ne EUCAST ne de CLSI'da enterokok izolatları için klinik sınır değerleri bulunmadığından sonuçlar duyarlı veya dirençli olarak yorumlanamadı. Çalışmamızda seftobiprol, *E. faecalis* izolatlarına karşı iyi aktivite gösterdi. İzolatların %90,2'sinin üremesi  $< 4$  µg/mL'de inhibe oldu. Ancak *E. faecium* izolatlarına karşı aktivite gösteremedi. 39 izolatın 34 (%87.2)'ünün MİK'i  $> 32$  µg/mL olarak bulundu. Yalnızca 5 (%12.8) izolatın üremesi  $< 4$  µg/mL'de inhibe oldu. İzolatların %81'inde, iki yöntem arasında en fazla  $\pm 1$  dilüsyon farkı bulunuyordu. 15 *E. faecalis* izolatında  $\pm 2$  dilüsyon, 4 *E. faecalis* izolatında  $\pm 3$  dilüsyon fark bulunuyordu.

Yüz *Enterococcus* spp. izolatına GT yöntemiyle seftobiprol ve daptomisin kombinasyonu çalışıldı. FİK indeksine göre sonuçlar sinerjik, aditif, etkisiz ya da antagonist olarak yorumlandı. Hiçbir izolatta antagonizma görülmedi. *E. faecalis* izolatların %24.6'sında sinerji görülürken, %70.5'inde aditif etki görüldü. *E. faecium* izolatlarının ise sadece %2.5 (n=1)'unda sinerji görülürken %53.8'inde kombinasyon etkisizdi. Üç VRE izolatının hepsinde kombi-

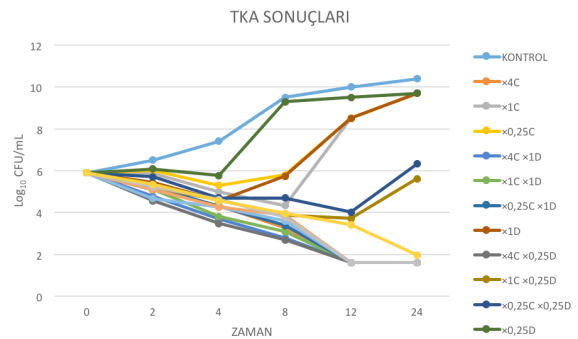
nasyon etkisizdi (Tablo 1).

**Tablo 1. Gradyent test sinerji sonuçları.**

|                                     | SİNERJİ<br>n (%) | ADİTİF<br>n (%) | ETKİSİZ<br>n (%) | ANTAGONİST<br>n (%) |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------------|
| <i>Enterococcus</i> spp.<br>(n=100) | 16<br>(%16)      | 60<br>(%60)     | 24<br>(%24)      | 0                   |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (n=61) | 15<br>(%24.6)    | 43<br>(%70.5)   | 3<br>(%4.9)      | 0                   |
| <i>Enterococcus faecium</i> (n=39)  | 1<br>(%2.5)      | 17<br>(%43.6)   | 21<br>(%53.9)    | 0                   |

GT yöntemi ile sinerji saptanan 11 no'lu *E. faecalis* izolatına TKA çalışıldı. Bu izolata karşı; daptomisin 2 µg/mL konsantrasyonda 24. saatte, seftobiprol 4 µg/mL konsantrasyonda 12. saatte bakterisidal aktiviteye gösterdi.

Üç seftobiprol, üç daptomisin konsantrasyonunun çapraz kombinasyonları olmak üzere toplam dokuz kombinasyon çalışıldı. 1 µg/mL daptomisin ile 1 µg/mL seftobiprolün, 1 µg/mL daptomisin ile 0.25 µg/mL seftobiprolün kombinasyonu 12. saatte en etkili olan antibiyotiğe göre  $\geq 2\log_{10}$  CFU/mL azalarak sinerji gösterdi. 2 µg/mL daptomisin ile 1 µg/mL seftobiprolün ve 2 µg/mL daptomisin ile 0.25 µg/mL seftobiprolün kombinasyonu 12. saatte en etkili olan antibiyotiğe göre  $\geq 2\log_{10}$  CFU/mL azalarak sinerji gösterdi. Yüksek konsantrasyonlarda, tek başına daptomisin ve seftobiprolün yüksek aktivitesi nedeniyle sinerjinin maskelendiği düşünüldü. İzolata ait zaman öldürme eğrileri Grafik 1'de gösterilmiştir.



**Grafik 1.** Bu grafikte; 4 µg/mL, 1 µg/mL ve 0.25 µg/mL konsantrasyonlarında seftobiprol, 2 µg/mL, 1 µg/mL ve 0.25 µg/mL konsantrasyonlarında daptomisin ve kombinasyonlarının çalışıldığı TKA sonuçları gösterilmiştir.

## Sonuç

Ülkemizde, enterokoklarda seftobiprol duyarlılığıyla ilgili yayınlanmış bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Çalışmamız bu konuda bir ilk olabilir. Seftobiprolün *E. faecalis* izolatlarındaki etkinliği göz önüne alındığında, klinik etkinliğinin anlaşılması için daha fazla çalışmayı hak ettiği düşünüldü. Özellikle dirençli izolatlar karşı sinerji potansiyelini daha iyi anlamak için seftobiprolün başka antibiyotiklerle kombinasyonu üzerine daha fazla çalışma yapılmalıdır. Bu tür araştırmalardan elde edilen bulgular, ilaç kombinasyon terapisinde seftobiprolün terapötik kullanımına yardımcı olabilir.

Ayrıca GT yönteminin, antibiyotik kombinasyonlarını değerlendirmek için hızlı, kolay ve güvenilir bir yöntem olduğu tekrar gösterilmiştir. GT, hastane ortamında antimikrobiyal kombinasyonların araştırılması için, ön test olarak değerlendirilebilir.

**Anahtar kelimeler:** Enterokok, daptomisin, seftobiprol, sinerji, time kill assay

#### Kaynaklar

1. Procop GW, Church C, Hall G, Janda JM, Koneman EW. Enterococcus species. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 7<sup>th</sup> ed. Lippincott, Philadelphia, ABD. 2017:768-774.
2. García-Solache M, Rice LB. The Enterococcus: A model of adaptability to its environment. Clin Microbiol Rev. 2019;32(2):e00058-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
3. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al. Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;48(1):1-12. <https://doi.org/10.1086/595011>
4. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. J Med Soc. 2018;32:76-7. [https://doi.org/10.4103/jms.jms\\_25\\_17](https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17)
5. Deshpande LM, Jones RN. Bactericidal activity and synergy studies of BAL9141, a novel pyrrolidinone-3-ylidenemethyl cephem, tested against streptococci, enterococci and methicillin-resistant staphylococci. Clin Microbiol Infect. 2003;9(11):1120-4. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00765.x>
6. Henry X, Amoroso A, Coyette J, Joris B. Interaction of ceftobiprole with the low-affinity PBP 5 of *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(2):953-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.00983-09>
7. Arias CA, Singh KV, Panesso D, Murray BE. Time-kill and synergism studies of ceftobiprole against *Enterococcus faecalis*, including  $\beta$ -lactamase-producing and vancomycin-resistant isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(6):2043-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.00131-07>
8. Leonard SN, Rolek KM. Evaluation of the combination of daptomycin and nafcillin against vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2013;68(3):644-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dks453>
9. Werth BJ, Sakoulas G, Rose WE, Pogliano J, Tewhey R, Rybak MJ. Ceftaroline increases membrane binding and enhances the activity of daptomycin against daptomycin-nonsusceptible vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):66-73. <https://doi.org/10.1128/AAC.01586-12>
10. Barber KE, Werth BJ, Ireland CE, et al. Potent synergy of ceftobiprole plus daptomycin against multiple strains of *Staphylococcus aureus* with various resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother. 2014;69(11):3006-10. <https://doi.org/10.1093/jac/dku236>
11. Campanile F, Bongiorno D, Mongelli G, Zanghì G, Stefani S. Bactericidal activity of ceftobiprole combined with different antibiotics against selected Gram-positive isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2019;93(1):77-81. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.07.015>
12. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29rd informational supplement. Document M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019. <https://clsi.org/standards/products/free-resources/access-our-free-resources/> (Erişim: 06.Ocak.2021)
13. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and E test. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40(8):1914-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.8.1914>

## Pozitif Kan Kültürü Şişesinden Direkt MALDI-TOF MS ile Hızlı Tanımlama

Hazan Zengin Canalp, Banu Bayraktar

*Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul*

✉ dr.hazanzengin@gmail.com

### Giriş

Kan dolaşımı enfeksiyonları ciddi mortalite ve morbiditeye sebep olan enfeksiyonlardır<sup>(1)</sup>. Sepsis ilişkili hipotansiyonu takiben, etkili tedavinin geciktiği her saat mortalitede yaklaşık %8 artışa neden olmaktadır<sup>(2)</sup>. Tanıda kan kültürü altın standart olup konvansiyonel yöntemlerle tanımlama, kan kültürü şişesinde üreme sinyali alındıktan sonra katı besiyerine ekim sonrası 18-24 saatlik inkübasyonu takiben koloni üremesine dayanır. Katı besiyerinde üreyen koloniden tanımlama yapabilen Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) ile kesin tanımlama dakikalar içerisinde sonuçlansa da; şişeden pozitif sinyal alınmasından, kesin tanımlamaya kadar geçen süre 24 saati aşabilmektedir. Yapılan çalışmalarda rutin tanımlamada katı besiyerindeki inkübasyon süresi kısaltılarak, MALDI-TOF MS ile daha erken zamanda bakterilerin güvenilir şekilde tanımlanabileceği gösterilmiştir<sup>(3-5)</sup>.

Pozitif kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile tanımlama işlemi “in-house” yöntemlerle sistem veri tabanı veya yazılımında değişiklik yapılmaksızın uygulanabilmektedir<sup>(6)</sup>. Bunun yanı sıra günümüzde MALDI-TOF MS sistemiyle direkt pozitif kan kültürü şişesinden mikroorganizma tanımlamak amacıyla geliştirilen ticari kitler ve yazılım modüllü de mevcuttur<sup>(7,8)</sup>. Pozitif kan kültürü şişesinden, çeşitli serum seperatör tüpler kullanılarak elde edilen çökeltiden MALDI-TOF MS sistemiyle bakterilerin %90’ın üzerinde doğru tanımlanabildiği gösterilmiştir<sup>(9,10)</sup>. Kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS ile hızlı tanımlama üzerine daha önce yapılan çalışmalarda sonuç verme süreleri, 18-24 saatlik inkübasyon yöntemiyle karşılaştırılmış olup kısa inkübasyon süreli rutin yöntemle karşılaştırılmasına dair veri bulunmamaktadır<sup>(11,12)</sup>.

Bu çalışmada pozitif kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile hızlı tanımlama yönteminin pratikte uygulanabilirliği, doğruluğu ve kısa inkübasyon süreli rutin yöntemle göre sonuç verme süresine katkısının ortaya koyulması amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

**Çalışmaya Alınan Numuneler:** Çalışmamıza Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarımızda Ekim 2019-Temmuz 2020 tarihleri arasında BACTEC FX (Becton Dickinson, Sparks, ABD) sistemiyle pozitif sinyal alınan 328 kan kültürü şişesi (BD BACTEC Plus Aerobic/F ve Anaerobic/F, Becton Dickinson, ABD) prospektif olarak dahil edildi. Erişkin hastalarda cin-

siyet farkı gözlemlenmeden, pozitif sinyal alınan tüm kan kültürü örnekleri incelendi. Aynı hastadan eş zamanlı alınan kan kültürü şişelerinden sadece ilk pozitif sinyal alınan şişe çalışmaya dahil edildi, tekrarlayan üremeler çalışmadan dışlandı.

**Rutin Tanımlama:** Tüm örneklerden Gram boyama ve %5 koyun kanlı agar, çikolata agara ekim yapıldı. Anaerobik şişeden üreme sinyali alındığında ek olarak Schaedler besiyerine ekim yapılarak uygun ortamlarda inkübasyon sağlandı. Rutin tanımlamada petrideki üremeler saat 09:00 ve 14:00’da olmak üzere günde iki kez kontrol edilerek gözle görülür yeterli üreme gösteren kültürlerden direk formik asit ekstraksiyon yöntemiyle MALDI Biotyper’da (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) bakteri tanımlaması yapıldı.

**Hızlı Tanımlama:** Hızlı tanımlamada Barnini ve ark.’nın<sup>10</sup> daha önce kullanmış olduğu yöntem modifiye edilerek kan kültürü şişelerinden serum seperatör tüp (BD Vacutainer SSTII Advance, Becton Dickinson Belliver Industrial Estate, İngiltere) yardımıyla hazırlanan pelletler kullanıldı. Direk formik asit ekstraksiyon yöntemiyle MALDI Biotyper’da elde edilen spektrumlar Bruker Biotyper 3.1 yazılımında RUO Versiyon 8.0 kütüphanesi kullanılarak analiz edildi. Hızlı tanımlama işlemleri mesai saatleri içerisinde günde iki kez olmak üzere (sabah 11:00, öğleden sonra 16:00) gerçekleştirildi. Hızlı tanımlama işlemine alınmaya kadar geçen sürede şişeler oda ısısında bekletildi. Hızlı ve rutin tanımlama yöntemlerinin uygulama aşamaları Şekil 1’de görülmektedir.

**Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz:** Üretici önerileri doğrultusunda; MALDI Biotyper’da 2.0 ve üzeri elde edilen skor değerleri tür düzeyinde güvenilir; 1.7-1.99 arasındaki skor değerleri cins düzeyinde güvenilir; 1.7’nin altındaki skor değerleri ise güvenilir olmayan tanımlama olarak kabul edildi. Doğru tanımlama için rutin tanımlama yönteminde 2.0 ve üzerindeki skorlar referans kabul edilerek, hızlı tanımlama sonuçlarının uyumu değerlendirildi. Hafta içi günlerde 06:00 ile 16:00 saatleri arasında pozitif sinyal alınan örnekler “Gündüz sinyal grubu”; 16:00 ile ertesi gün 06:00 arası pozitif sinyal alınan örnekler ise “Gece sinyal grubu” olarak tanımlandı. Şişeden pozitif sinyal alınmasından, tanımlamanın sonuçlanmasına kadar geçen süre saat cinsinden hesaplanarak her iki yöntem için sonuç verme süreleri elde edildi. İstatistiksel analizde SPSS 26.0 programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler kategorik değişkenler için sayı ve yüzde; sayısal değişkenler için

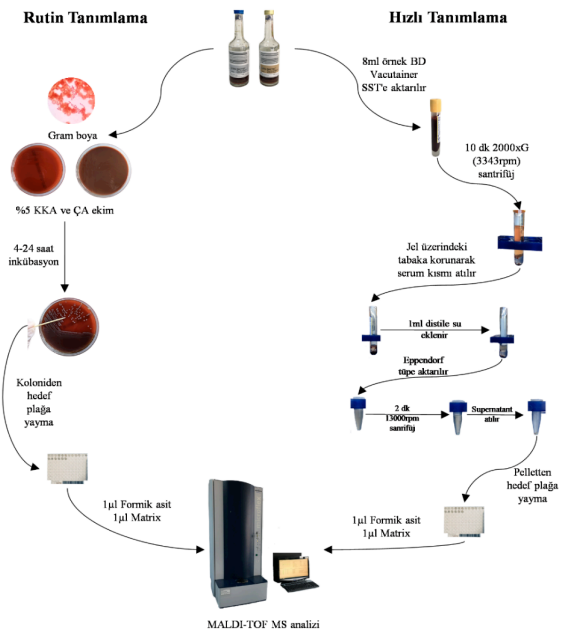
ortalama, standart sapma olarak verildi. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında Paired Sample t-test, veriler normal dağılmadığı durumda Wilcoxon testi kullanıldı. Tüm analizler %95 güven aralığında gerçekleştirildi. İstatistiksel anlamlılık seviyesi  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

## Bulgular

**Rutin Tanımlama Sonuçları:** 328 örnekte rutin yöntemle 190 (%57.9) Gram pozitif, 120 (%36.6) Gram negatif, 2 (%0.6) maya ve 16 (%4.9) polimikrobiyal üreme tanımlandı. Çalışmaya alınan örneklerden en sık 106 izolatla koagülaz negatif stafilokoklar; ikinci sırada ise 98 izolatla Enterobacteriales ailesine ait türler izole edildi. Tüm isolatlar rutin tanımlama yönteminde MALDI Biotyper ile 2.0'ın üzerinde skorlarla tanımlandı.

**Hızlı Tanımlama Sonuçları:** Hızlı tanımlama yöntemiyle monobakteriyel örneklerin %95.2'sinde (295/310) sonuç elde edilirken; %4.8'inde (15/310) sonuç elde edilemedi. Pozitif sinyal alınan örneklerin hızlı tanımlamasında değerlendirme sonuçları Şekil 2'deki şemada özet olarak gösterilmiştir.

Monobakteriyel örnekler içerisinde %93.2 (289/310) oranında tür düzeyinde doğru sonuçlar elde edildi. Tür düzeyinde doğru tanımlama sonucu alınan isolatların içerisinde tanımlama skorları 2.0'dan büyük, 1.7 ile 1.999 arasında ve 1.7'den küçüklerin oranları sırasıyla; %70.2, %22.2 ve %7.6 idi. Monobakteriyel örneklerde hızlı tanımlama sonuçla-



Şekil 1. Rutin ve hızlı tanımlama yöntemlerinin akış diyagramı.

rının türlere göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Hızlı tanımlama ile sonuç elde edilen örneklerin %97.9'unda tanımlama tür düzeyinde doğru, %1.4'ünde cins düzeyinde doğru, %0.7'sinin tanımlama sonucu yanlış.

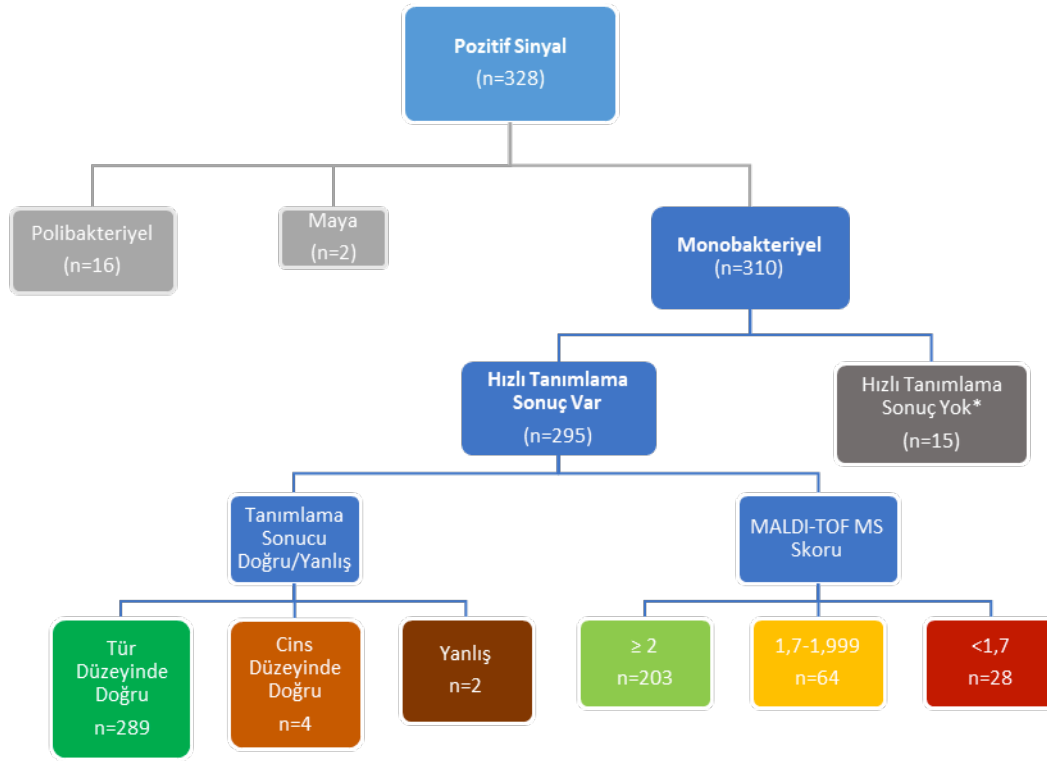
Tablo 1. Gradyent test sinerji sonuçları.

|                                         | Hızlı Tanımlama Sonucu |                    |           |           |         |         |          |                              |                     |          |            |
|-----------------------------------------|------------------------|--------------------|-----------|-----------|---------|---------|----------|------------------------------|---------------------|----------|------------|
|                                         | Tür Düzeyinde Doğru    |                    |           |           |         | CDD     | Yanlış   | Tanımsız                     | Tür Düzeyinde Doğru |          |            |
|                                         | n                      | MALDI-TOF MS Skoru |           |           | n       |         |          |                              | MALDI-TOF MS Skoru  |          |            |
| Gram Pozitif                            | n                      | < 1.7              | 1.7-1.99  | ≥ 2       |         |         |          | Gram Negatif                 | n                   | 1.7–1.99 | ≥ 2        |
| <i>S.epidermidis</i>                    | 43                     | 9                  | 20        | 8         | 1       |         | 5        | <i>E.coli</i>                | 61                  | 1        | 60         |
| <i>S.hominis</i>                        | 38                     | 1                  | 12        | 20        | 2       |         | 3        | <i>K.pneumoniae</i>          | 28                  | 1        | 27         |
| <i>S.aureus</i>                         | 36                     | 2                  | 11        | 19        |         | 1       | 3        | <i>A.baumannii</i>           | 10                  | 4        | 6          |
| <i>E.faecalis</i>                       | 17                     | 1                  |           | 16        |         |         |          | <i>P.aeruginosa</i>          | 5                   |          | 5          |
| <i>S.haemolyticus</i>                   | 13                     | 2                  | 4         | 4         | 1       |         | 2        | <i>Burkholderia cepacia</i>  | 2                   |          | 2          |
| <i>S.pneumoniae</i>                     | 8                      |                    |           | 8         |         |         |          | <i>E.cloacae</i>             | 2                   |          | 2          |
| <i>S.capitis</i>                        | 7                      | 3                  | 1         | 2         |         |         | 1        | <i>K.variicola</i>           | 2                   |          | 2          |
| <i>E.faecium</i>                        | 5                      |                    |           | 5         |         |         |          | <i>Salmonella spp.</i>       | 2                   |          | 2          |
| <i>C.striatum</i>                       | 4                      |                    | 2         | 2         |         |         |          | <i>Aeromonas hydrophilia</i> | 1                   |          | 1          |
| <i>C.afermentans</i>                    | 1                      |                    |           | 1         |         |         |          | <i>Bacteroides fragilis</i>  | 1                   |          | 1          |
| <i>C.jikeium</i>                        | 1                      |                    |           |           |         |         | 1        | <i>K.aerogenes</i>           | 2                   | 1        | 1          |
| <i>S.gallolyticus</i>                   | 2                      | 1                  | 1         |           |         |         |          | <i>P.mirabilis</i>           | 1                   |          | 1          |
| <i>S.pyogenes</i>                       | 2                      |                    | 1         | 1         |         |         |          | <i>S.maltophilia</i>         | 2                   | 1        | 1          |
| <i>Brevibacterium ravenpurgense</i>     | 1                      |                    | 1         |           |         |         |          | <i>Pseudomonas sp.</i>       | 1                   | 1        |            |
| <i>Clostridium ramosum</i>              | 1                      |                    |           | 1         |         |         |          |                              |                     |          |            |
| <i>Clostridium tertium</i>              | 1                      |                    |           | 1         |         |         |          |                              |                     |          |            |
| <i>Granulicatella adiacens</i>          | 1                      |                    |           | 1         |         |         |          |                              |                     |          |            |
| <i>Pseudoglutamicibacter cummingsii</i> | 1                      |                    | 1         |           |         |         |          |                              |                     |          |            |
| <i>S.agalactiae</i>                     | 1                      |                    |           | 1         |         |         |          |                              |                     |          |            |
| <i>S.anginosus</i>                      | 1                      | 1                  |           |           |         |         |          |                              |                     |          |            |
| <i>S.auricularis</i>                    | 1                      |                    | 1         |           |         |         |          |                              |                     |          |            |
| <i>S.cohnii</i>                         | 1                      | 1                  |           |           |         |         |          |                              |                     |          |            |
| <i>S.mitis</i>                          | 1                      |                    |           | 1         |         |         |          |                              |                     |          |            |
| <i>S.pettenkoferi</i>                   | 1                      |                    |           |           |         | 1       |          |                              |                     |          |            |
| <i>S.simulans</i>                       | 1                      |                    |           | 1         |         |         |          |                              |                     |          |            |
| <i>S.warneri</i>                        | 1                      | 1                  |           |           |         |         |          |                              |                     |          |            |
| Gram Pozitif Toplam n (%)               | 190                    | 22 (11.6)          | 55 (28.9) | 92 (48.4) | 4 (2.1) | 2 (1.1) | 15 (7.9) | Gram Negatif Toplam n (%)    | 120                 | 9 (7.5)  | 111 (92.5) |

CDD: Cins düzeyinde doğru

n: İzolat sayısı





Şekil 2. Pozitif sinyal alınan örneklerin hızlı tanımlama sonuçları.

Hızlı tanımlamada elde edilen skorların %90.5'i (267/295) 1.7'nin üzerinde olup, bunların tümü tür düzeyinde doğrudur. Skorları 1.7'den düşük olan 28 izolatın 22'si tür düzeyinde doğru, 4'ü cins düzeyinde doğru, 2'si yanlış tanımlamayı. Cins düzeyinde doğru tanımlanan 4 izolat ve yanlış tanımlanan 2 izolatın skorları 1.5'ten düşüktü.

Hızlı tanımlama skor değerleri 1.2, 1.3, 1.4 ve üzerinde saptanan izolatlarda tür düzeyinde doğruluk oranları sırasıyla; %97.9, %98.9, %99.3 olarak bulundu. Skor değerleri 1.5 ve üzerinde saptanan izolatlarda tür düzeyinde doğruluk oranı %100'dü.

Gram negatif monomikrobiyal 120 örneğin tümü hızlı tanımlama yöntemiyle 1.7 ve üzerinde skorlarla tanımlandı ve tüm izolatların tanımlaması referansla karşılaştırıldığında tür düzeyinde doğrudur. Hızlı yöntemle 190 gram pozitif örnekte tür düzeyinde doğru tanımlama oranı %88.9 idi. Cins düzeyinde doğru tanımlanan dört izolatın tümü koagülaz negatif stafilokoklardı. *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus pettenkoferi* türü iki izolat hızlı yöntemle sırasıyla 1.251 ve 1.389 skorlarla Mannheimia haemolytica olarak yanlış tanımlandı.

Katı besiyerinde yapılan kültür sonucunda polimikrobiyal üreme görülen 16 kan kültürü örneğinden 14'ünde üreyen bakterilerden biri hızlı yöntem ile doğru olarak tanımlandı, ek izolat tanımlanamadı; 1 örnek 1.42 skorla yanlış tanımlandı; 1 örnekte ise hiçbir etken tanımlanamadı.

**Sonuç Verme Süreleri:** Her iki tanımlama yöntemiyle

elde edilen ortalama sonuç verme süreleri karşılaştırıldı (n=295). Hızlı tanımlama ortalama sonuç verme süresi 7.88 (%95 GA: 7.25-8.52) saat; rutin tanımlama ortalama sonuç verme süresi 16.66 (%95 GA: 15.74-17.57) saat olarak bulundu. Hızlı tanımlama ortalama sonuç verme süresi rutin tanımlamaya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi (p<0.001).

Gündüz sinyal alınan grupta ortalama sonuç verme süresi, hızlı tanımlamada (Ort:2.86; %95 GA:2.65-3.07) rutin tanımlamaya (Ort:19.49; %95 GA: 18.08-20.89) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi (p<0.001). Gece sinyal alınan grupta ortalama sonuç verme süresinde, hızlı tanımlama (Ort:11.96; %95 GA:11.32-12.6) ve rutin tanımlama (Ort:14.36; %95 GA: 13.27-15.45) yöntemleri arasında anlamlı fark bulunamadı (p=0.146).

Gündüz sinyal grubunda hızlı tanımlama ortalama sonuç verme süresi rutin tanımlamaya göre, gram pozitif izolatlarda 19.65 saat; gram negatiflerde 12.67 saat daha kısa bulundu. Gece sinyal grubunda hızlı tanımlama ortalama sonuç verme süresi rutin tanımlamaya göre, gram pozitif izolatlarda 2.9 saat; gram negatiflerde 1.62 saat daha kısa bulundu.

## Sonuç

Çalışmamızda 328 pozitif kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS kullanılarak yapılan hızlı tanımlama yöntemiyle; monobakteriyel örneklerde skordan bağımsız olarak %93.2 oranında (289/310) tür düzeyinde doğru tanımlama başa-

rısı elde edilerek, ortalama sonuç verme süresi rutin tanımlamaya göre 16.63 saat kısaltılmıştır.

Çalışmamızda hızlı yöntem tanımlama sonuçları 1.2 ve üzerindeki skorlarda, referans yöntemle cins düzeyinde %99.3, tür düzeyinde %97.9 uyum göstermiştir. Hızlı yöntemle 1.5 ve üzerindeki skor değerlerinde tür düzeyinde %100 doğru tanımlanma başarısı elde edilmiştir.

Bu çalışmada pozitif sinyal alınan şişeden hızlı tanımlama işlemleri uygulanırken kendi laboratuvar koşullarımıza en uygun olan, rutinde yürütebileceğimiz günlük periyodik çalışma şekli tercih edilmiştir. İdeal koşullarda pozitif sinyal alındıktan itibaren her şişenin ivedilikle hızlı tanımlama işlemine alınması, sonuç verme süresini çok daha fazla iyileştirecektir.

Sonuç olarak ek donanım veya kit gerektirmeyen, kolay uygulanan bu hızlı tanımlama yöntemiyle günde iki kez periyodik çalışmayla bile ortalama tanımlama süresinin 16.63 saat kadar kısaltılabileceği gösterilmiştir. Rutin tanımlamada MALDI-TOF MS kullanan merkezlerde sonuç verme süresini iyileştirmek amacıyla bu yöntemin kullanılmasının hasta yönetimine olumlu katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kan kültürü, MALDI, BACTEC, bakteri, hızlı tanımlama

#### Kaynaklar

1. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med.* 2007;35(5):1244-50. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000261890.41311.E9>
2. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34(6):1589-96. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>
3. Verroken A, Defourny L, Lechgar L, Magnette A, Delmée M, Glupczynski Y. Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;34(2):405-13. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2242-4>
4. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):1001-6. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12640>
5. Kohlmann R, Hoffmann A, Geis G, Gatermann S. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int J Med Microbiol.* 2015;305(4-5):469-79. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.04.004>
6. Faron ML, Buchan BW, Ledebor NA. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for use with positive blood cultures: Methodology, performance, and optimization. *J Clin Microbiol.* 2017;55(12):3328-38. <https://doi.org/10.1128/JCM.00868-17>
7. Arroyo MA, Denys GA. Parallel evaluation of the MALDI sepsityper and verigene BC-GN assays for rapid identification of Gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2017;55(9):2708-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00692-17>
8. Kayin M, Mert B, Aydemir S, Özenci V. Comparison of rapid BACpro® II, Sepsityper® kit and in-house preparation methods for direct identification of bacteria from blood cultures by MALDI-TOF MS with and without Sepsityper® module analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(11):2133-43. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03654-4>
9. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(11):1631-8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03356.x>
10. Barnini S, Ghelardi E, Bruculeri V, Morici P, Lupetti A. Rapid and reliable identification of Gram-negative bacteria and Gram-positive cocci by deposition of bacteria harvested from blood cultures onto the MALDI-TOF plate clinical microbiology and vaccines. *BMC Microbiol.* 2015;15(1):1-8. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0459-8>
11. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of Matrix-Assisted Laser Desorption – Ionization Time of Flight Mass Spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1584-91. <https://doi.org/10.1128/JCM.01831-09>
12. Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Karlowicz JA, et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: Analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol.* 2012;50(10):3324-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01479-12>

# Akış Sitometrisi Temelli İdrar Analiz Cihazı UF-5000'in Gram Boyama Tahmin Özelliğinin Değerlendirilmesi

Ebru Fidan, Ayşegül Karahasan

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

✉ eeren52@gmail.com

## Giriş

Üriner sistem enfeksiyonları en sık karşılaşılan bakteriyel enfeksiyonlar arasındadır. Bu nedenle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında iş yükünün çok büyük bir bölümünü idrar kültürleri oluşturmaktadır. Birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında tüm kültürlerin %24-40'ı idrar kültürleridir<sup>(1)</sup>. Marmara Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında da çalışılan tüm bakteriyolojik tetkiklerin yaklaşık %40'ını idrar kültürleri oluşturmakta ve yıllık 50.000'e yakın idrar örneği çalışılmaktadır.

Laboratuvarımızda kültür istemiyle gelen idrar örnekleri öncelikle UF-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japonya) cihazıyla taranmaktadır. Cihaz tarafından sağlanan mikrolitredaki lökosit ve bakteri sayıları kullanılarak laboratuvarca daha önce belirlenmiş sınır değerlere göre<sup>(2)</sup> kültür negatif örnekler elenmektedir. Bu yolla kültür yapılacak örneklerde %40 oranında bir azalma sağlanmaktadır. UF-5000 cihazı, idrarda partikül analizi yapabilen floresans akış sitometrisi teknolojisiyle çalışan tam otomatik bir idrar analiz cihazıdır. Cihaz tarafından özel floresan boyalarla partiküllerin nükleik asit ve yüzey yapıları boyanır. İdrar örneğinin lazer ışınları altında akışı sağlanır ve boyalı partiküllerden yayılan ışık sinyalleri kullanılarak idrardaki şekilli elemanların tanımlama ve sayımı yapılır<sup>(3-5)</sup>. Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalarda farklı hücre duvar yapıları sebebiyle floresan boya tutulumu ve buna bağlı ışık sinyalleri farklılık göstermektedir. Bu özelliği kullanarak UF-5000 cihazı mikroorganizmaların Gram boyanma özelliği hakkında tahminde bulunmaktadır. Analiz sonucunda cihaz >100 bakteri/μL varlığında 'Gram negatif?', 'Gram pozitif?' ya da 'Gram poz/neg?' ve tanımlayamadığı durumlarda 'sınıflandırılmamış' işaretlerini (Bact Info Flag) kullanarak Gram boyanma özelliği raporlamaktadır<sup>(6)</sup>.

Laboratuvarımızda rutin uygulamada kültür için gelen tüm idrar örneklerine Gram boyalı mikroskopik inceleme yapılmakta ve kültür sonuçları ile birlikte raporlanmaktadır. Gram boyama idrardaki hücrelerin ve mikroorganizmaların sayı ve türlerinin belirlenmesinde, özellikle yatan hastalarda sepsis etkeninin erken dönemde tespiti ve ampirik tedavinin yönlendirilmesi açısından faydalıdır. Bu amaçla klinisyenin isteği üzerine laboratuvarında çalışılabilir<sup>(7)</sup>. Fakat tüm örnekler Gram boyama yapılması klinik açıdan ekstra bir fayda sağlamamakla birlikte laboratuvar için artmış maliyet ve iş gücü kaybına yol açacaktır. UF-5000 cihazında da mesai saatleri içerisinde gelen tüm idrar örnekleri çalışılmakta ve saatler içerisinde sonuç verebilmektedir. UF-5000 cihazının Gram işareti özelliği kabul edilebilir duyarlılık ve özgüllükte sonuçlar verebilirse, lökosit sayımları ile birlik-

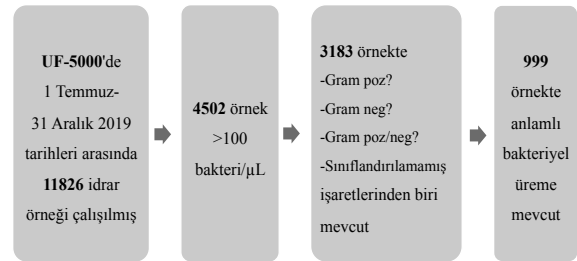
te Gram boyama yöntemine alternatif olarak kullanılabilir. Böyle bir uygulama laboratuvarımızda iş gücü ve maliyet kazancına katkıda bulunabilir. Bu hipotezden yola çıkarak çalışmamızda UF-5000 cihazının Gram boyanma özelliği tahmin performansı, rutin uygulamada kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla değerlendirildi.

## Gereç ve Yöntem

Marmara Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, 1 Temmuz-31 Aralık 2019 tarihleri arasında Sysmex UF-5000 cihazında çalışılan idrar örnekleri retrospektif olarak cihaz kayıtları üzerinden tarandı. Cihazın >100 bakteri/μL tespit ettiği örneklerden Gram işareti mevcut olanlar çalışmaya dahil edildi. Bu örneklerle ait kültür sonuçları, örnek numaraları kullanılarak Laboratuvar İşletim Sistemi (ALIS) üzerinden tarandı. Cihazda Gram işareti bulunup kültürde anlamlı bakteriyel üreme saptanan örneklerde 'Gram negatif?' ve 'Gram pozitif?' işaretlerin duyarlılıkları, özgüllükleri, pozitif prediktif değerleri (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) kültür sonucu altın standart kabul edilerek hesaplandı.

## Bulgular

UF-5000 cihazında 1 Temmuz-31 Aralık 2019 tarihleri arasında test edilip >100 bakteri/μL tespit edilen 4502 örnekten 3183 tanesinde Gram işareti mevcuttu. Bu örneklerle ait kültür sonuçları ALIS üzerinden tarandığında 999 örnekte anlamlı bakteriyel üreme tespit edildi (Şekil 1).



Şekil 1. Çalışmaya dahil edilen idrar örneklerinin seçimi.

UF-5000 cihazının Gram morfoloji işaretinin kültür sonucu ile karşılaştırılması Tablo 1'de verilmiştir. Toplamda anlamlı üreme tespit edilen 999 örnekten 669'unda 'Gram negatif?', 174'ünde 'Gram pozitif?', 141'inde 'Gram poz/neg?' işaret ve 15'inde 'sınıflandırılmamış' işareti mevcuttu. Cihazın Gram negatif işaret bildirdiği 669 örnekten 665'inde (%99.4) kültürde en az bir Gram negatif bakteri, Gram pozitif işaret bildirdiği 174 örnekten 123'ünde (%70.6) en az bir

**Tablo 1. UF-5000 cihazı Gram işaretleri ile kültür sonuçlarının karşılaştırılması.**

| UF 5000 Gram morfoloji işareti | Gram negatif <sup>a</sup> | Gram pozitif <sup>b</sup> | Gram pozitif ve Gram negatif | Toplam |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|--------|
| Gram negatif?                  | 653                       | 4                         | 12                           | 669    |
| Gram pozitif?                  | 51                        | 114                       | 9                            | 174    |
| Gram poz/neg?                  | 123                       | 5                         | 13                           | 141    |
| Sınıflandırılmamış             | 6                         | 8                         | 1                            | 15     |
| Toplam                         | 833                       | 131                       | 35                           | 999    |

<sup>a</sup> Gram negatif tek ya da iki farklı bakteri

<sup>b</sup> Gram pozitif tek ya da iki farklı bakteri

<sup>c</sup> Biri Gram negatif, biri Gram pozitif iki farklı bakteri

**Tablo 2. UF-5000 cihazının 'Gram pozitif?' ve 'Gram negatif?' işaretlerinin duyarlılık ve özgüllükleri.**

|                | Duyarlılık | Özgüllük | PPD   | NPD   |
|----------------|------------|----------|-------|-------|
| Gram negatif?* | 78.39      | 96.94    | 99.39 | 41.36 |
| Gram pozitif?* | 87.02      | 93.88    | 69.09 | 97.87 |

<sup>a</sup> Gram negatif tek ya da iki farklı bakteri

<sup>b</sup> Gram pozitif tek ya da iki farklı bakteri

<sup>c</sup> Biri Gram negatif, biri Gram pozitif iki farklı bakteri

Gram pozitif bakteri üremesi vardı.

Duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplanırken kültürde hem Gram pozitif hem Gram negatif bakteri üreyen örnekler hariç tutularak, değerlendirme 964 örnek üzerinden yapıldı. 'Gram negatif?' işaretin duyarlılığı %78.4, PPD'i %99.4, 'Gram pozitif?' işaretin duyarlılığı %87, PPD'i %69.1 olarak hesaplandı (Tablo 2).

## Sonuç

Laboratuvarımızda kültür öncesi idrar örneklerinin taranmasında kullanılan UF-5000 cihazı idrarda bulunan mikroorganizmaların Gram boyanma özellikleri ile ilgili de bilgi verebilmektedir. Çalışmamızda bu özelliğin rutin uygulamada kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla cihaz tarafından sunulan 'Gram negatif?' ve 'Gram pozitif?' işaretlerin duyarlılık ve özgüllükleri kültür sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Çalışmada cihazla Gram işareti bildirilmiş olup kültürde anlamlı bakteriyel üreme olan 999 örnek değerlendirildi. 'Gram negatif?' işaretin duyarlılığı %78.4, özgüllüğü %97, pozitif prediktif değeri %99.4, 'Gram pozitif?' işaretin duyarlılığı %87, özgüllüğü %94, pozitif prediktif değeri %69 olarak hesaplandı (Tablo 2). Cihaz tarafından 'Gram negatif?' işaret bildirilen 669 örnekten sadece 4'ünde saf Gram pozitif bakteri üremesi olup, bu işaret için duyarlılık Gram pozitiflere göre düşük olsa da pozitif prediktif değeri oldukça yüksekti. De Rosa ve ark.<sup>(6)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada yalnızca 'Gram negatif?' işaretin performansı değerlendirilmiş ve çalışmamızla benzer şekilde %81.7 duyarlılık, %95.9 özgüllük ve %95.8 pozitif prediktif değer bildirilmiştir. Kim ve ark.<sup>(5)</sup> çalışmasında çalışmamızda da olduğu gibi değerlendirme saf Gram pozitif ya da saf Gram negatif üreme olan kültürler üzerinden yapılmış

ve 'Gram negatif?' işaret için %91.7 duyarlılık, %90 özgüllük, 'Gram pozitif?' işaret için %81.3 duyarlılık %80 özgüllük bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada 'Gram poz/neg?' işaret de hem Gram pozitifler hem Gram negatifler için doğru işaret sayılarak değerlendirmeye dahil edilmiştir. Fakat bizim çalışmamızda Gram pozitif ve negatif bakteriler arasında ayırım yapamadığı için 'Gram poz/neg?' işaret duyarlılık hesabına dahil edilmedi. Bu nedenle 'Gram negatif?' işaret için duyarlılık çalışmamızda Kim ve ark.<sup>(5)</sup> çalışmasına göre düşük seviyelerde kalmakta, ancak her iki işaret için de daha yüksek özgüllükle sonuçlanmaktadır. Ren ve ark.<sup>(8)</sup> çalışmasında örneklerin %67.7'sinde cihazın doğru tahminde bulunduğu ve Gram negatif bakteriler için daha iyi performans sergilediği bildirilmiştir. Gram pozitif bakteriler duvar yapılarında bulunan peptidoglikan tabaka sebebiyle kimyasal ve mekanik strese daha dirençli olup, bu direnç floresan boyanın aviditesini etkileyerek Gram pozitifler için daha kötü performansla sonuçlanıyor olabilir.

Çalışmamızda değerlendirmeye alınan örneklerde ölçüt olarak cihaz tarafından saptanan mikrolitredeki bakteri sayısı kullanıldığı için, mayalar değerlendirmeye dahil edilmedi. Ancak Gram işareti bildirilen örneklerden 20 tanesinde anlamlı Candida spp. üremesi mevcuttu, bu 20 örneğin 14'ü için cihaz 'Gram pozitif?' işaret bildirirken, 6 tanesi sınıflandırılmamıştı. Kim ve ark.<sup>(5)</sup> çalışmasında da  $\geq 105$  kob/mL Candida spp. üremesi olan 30 örnekten, 8'inde 'Gram pozitif?', 2'sinde 'Gram negatif?' işaret mevcut olup, 20 tanesi sınıflandırılmamıştı. 'Gram pozitif?' işaret duvar yapısı sebebiyle mayalar için de doğru tahmin sayılabilir ve bu işaretin mevcut olduğu örneklerde cihaz tarafından verilen bakteri ve maya sayıları değerlendirilerek daha ileri bir ayırım yapmak mümkün olabilir.

Çalışmamız verilerine göre, UF-5000 cihazının Gram işareti tarama amaçlı kabul edilebilir duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Özellikle 'Gram negatif?' işaret için pozitif prediktif değer oldukça yüksek bulunmuştur. İdrar kültürlerinin büyük çoğunluğunun Gram negatif üremeyle sonuçlanacağı<sup>(9)</sup> düşünüldüğünde Gram işareti özelliği cihaz tarafından sağlanan bakteri ve lökosit sayımları ile birlikte Gram boyalı mikroskopik incelemeye alternatif olarak kullanılabilir. Ancak bu konuda henüz sınırlı sayıda bilimsel çalışma mevcut olup, daha fazla sayıda çalışmaya ve standardizasyona ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

**Anahtar kelimeler:** Sysmex UF-5000, idrar analizi, Gram boyama

## Kaynaklar

1. Wilson ML, Loretta Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis*. 2004;38(8):1150-8.  
<https://doi.org/10.1086/383029>
2. İlki A, Ayaş R, Özsoy S, Söyletir G. Cost-effectiveness of a new system in ruling out negative urine cultures on the day of administration. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(7):1119-23.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-017-2898-7>
3. Huysal K, Üstündağ Y. Otomatik idrar analizörleri: Mikroskopik Bakı. *Türk Klinik Biyokimya Derg*. 2015;13(2):83-7.
4. Previtali G, Ravasio R, Seghezzi M, Buoro S, Alessio MG. Performance evaluation of the new fully automated urine particle analyser UF-5000 compared to the reference method of the Fuchs-Rosenthal chamber. *Clinica Chimica Acta*. 2017;472:123-30.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.07.028>
5. Kim SY, Park Y, Kim H, Kim J, Koo SH, Kwon GC. Rapid screening of urinary tract infection and discrimination of Gram-positive and Gram-negative bacteria by automated flow cytometric analysis using Sysmex UF-5000. *J Clin Microbiol*. 2018;56(8):e02004-17.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02004-17>
6. De Rosa R, Grosso S, Lorenzi G, Bruschetta G, Camporese A. Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures. *Clinica Chimica Acta*. 2018;484:171-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.05.047>
7. Chan WW. Urine Cultures. In: Leber AL (Ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 4th Edition. Washington DC: ASM Press, 2016:3.12.1-33.
8. Ren C, Wu J, Jin M, Wang X, Cao H. Rapidly discriminating culture-negative urine specimens from patients with suspected urinary tract infections by UF-5000. *Bioanalysis*. 2018;10(22).  
<https://doi.org/10.4155/bio-2018-0175>
9. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 4. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017.



## Akış Sitometrisi Temelli İdrar Analiz Cihazı UF-5000'in Gram Boyama Tahmin Özelliğinin Değerlendirilmesi

Ebru Fidan, Ayşegül Karahasan

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

✉ eeren52@gmail.com

### Giriş

Solunum yolu enfeksiyonları (SYE) hem çocuklarda hem de yetişkinlerde en yaygın morbidite ve mortalite nedenlerindendir. Özellikle alt solunum yolu enfeksiyonlarının, 2016'da yaklaşık üç milyon ölüme sebep olarak en yaygın dördüncü ölüm nedeni olduğu bildirilmiştir. En fazla ölüm beş yaşından küçük çocuklar, ileri yaştaki yetişkinler, altta yatan komorbiditeleri veya baskılanmış bağışıklık sistemi olan hastalarda meydana gelmektedir. SYE, dünyada olduğu gibi ülkemizde de hastane başvurularının ve antibiyotik reçetelerinin özellikle kış ve ilkbahar aylarında önemli bir kısmını oluşturmaktadır.

Enfeksiyon etkenlerini saptamak için en ideal tanı sistemleri, özel laboratuvar donanımı ve nitelikli teknisyen gereksinimini en aza indirirken, hızlı, duyarlı, özgül ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlayan yöntemlerin kullanıldığı sistemlerdir. Moleküler testlerin ortaya çıkması, solunum yolu patojenlerinin geniş bir spektrum ile tespitini hızlı, duyarlı ve kolay uygulanabilir hale getirmiş ve böylece laboratuvar tanıyı klinik hasta yönetiminde daha etkili kılmıştır. Bu nedenle, SYE'ye yol açan patojenleri tespit eden multipleks PCR temelli solunum panelleri Mikrobiyoloji laboratuvarlarında gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır.

Çalışmamızda, solunum yolu patojenlerinin hızlı ve etkin tespitini sağlayan multipleks PCR yöntemi ile 2018-2019 yıllarında saptanan solunum yolu patojenlerinin detaylı retrospektif analizi amaçlanmıştır. Sonuçlar etkenlere, mevsimlere, yaş gruplarına, klinik ve radyolojik özelliklere göre değerlendirilmiştir.

### Gereç ve Yöntem

1 Ocak 2018 - 31 Aralık 2019 tarihleri arasında solunum yolu semptomları ile başvuran hastalardan (n=5151) nazofarengeal sürüntü (NFS) örnekleri alınmıştır. Örnekler, 17'si virüs ve 3'ü bakteri olmak üzere 20 patojeni yaklaşık bir saat içinde eşzamanlı saptayabilen FilmArray Solunum Paneli (BioFire Diagnostics, Inc., Salt Lake City, UT, ABD) ile çalışılmıştır. Hastaların FilmArray RP sonucu, yaş, cinsiyet, başvuru tarihi ve şekli gibi bilgileri ve pozitif saptanan hastaların eş zamanlı gönderilen diğer laboratuvar testleri Laboratuvar Bilgi Yönetim Sistemi'nden elde edilmiştir. Ayrıca pozitif saptanan hastaların başvuru birimi, başvuru sıradaki semptom ve bulguları, immün yeterlilik durumları, eşlik eden hastalıkları, tedavi ve tedavi sonrası prognozları gibi klinik verileri ise Hastane Bilgi Yönetim Sistemi'nden elde edilmiştir. İmmün yeterlilik durumları malignite, organ nakli ya da HIV-1 enfeksiyonu varlığı açısından değerlendiril-

rilerek belirlenmiştir. Eşzamanlı istenen toraks Bilgisayarlı Tomografileri (BT), laboratuvar bulgularından haberi olmayan iki radyolog tarafından birbirlerinden bağımsız olarak değerlendirilmiştir. BT'ler buzlu cam görünümü, konsolidasyon, plevral sıvı, mediastinal LAP, bronşiektazi, peribronşial kalınlaşma ve tomurcuklanmış ağaç görünümü varlığı açısından ayrı ayrı incelendikten sonra fikir birliğiyle bir sonuca ulaştırılmıştır. Laboratuvar verileri ile klinik ve radyolojik veriler ortak bir veritabanında birleştirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi Microsoft Office Excel 2016 ve SPSS versiyon 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) programları kullanılarak yapılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişki önemini belirlemek için Pearson ki-kare testi veya Fisher'in kesin testi kullanılmıştır. Sonuçlar p değeri <0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### Bulgular

İki yıllık süreçte 2915'ü çocuk (%56.6), 2236'si yetişkin (%43.4) hastalardan olmak üzere toplam 5151 NFS örneği test edilmiştir. En fazla sayıda örnek 18 yaş altı hasta grubundan (%56.6), en az sayıda örnek ise 45-64 yaş arası hasta grubundan gönderilmiştir (%12.3). Hem çocuk hem yetişkinlerde örnekler daha çok yatan hastalardan alınmıştır. 1243 örnekte (%24.1) en az bir patojen saptanmıştır. Bu örneklerin 202'si birden fazla mikroorganizma içermektedir (tüm örneklerin %3.9'ü). Pozitif saptanan hastaların demografik ve klinik özellikleri Tablo 1'de gösterilmektedir. En sık Rhino/enterovirüsler (RV/EV) (%11) tespit edilmiştir. RV/EV'yi influenza virüsleri (A veya B) (%4.9) ve parainfluenza virüsleri (PIV) (%3.3) takip etmiştir. En az saptanan patojen ise *Chlamydia pneumoniae*'dir (%0.3). 18 yaş altı ve 18-44 yaş arası hastalarda en sık saptanan patojen RV/EV iken 45-64 yaş arası ve 65 yaş üstü hastalarda en sık influenza virüsleri tespit edilmiştir. Diğer yaş gruplarında pozitiflik oranı birbirine çok yakın saptanırken 65 yaş üstü hastalarda bu oran daha düşük bulunmuştur (%16.8). Patojenlerin aylara göre dağılımları iki yıl için ayrı ayrı Şekil 1'de gösterilmektedir. Mevsimsel pikler, RV/EV enfeksiyonları için Eylül/Ekim ve Mart, influenza A için Ocak ve PIV için Haziran aylarında ortaya çıkmıştır. İnfluenza B ise her iki yılda da influenza A'nın düşüşe geçmesiyle ortaya çıkmış, 2018'de Şubat, 2019'da Nisan/Mayıs aylarında mevsimsel piklerini yaptıktan sonra Haziran itibarıyla de sonlanmıştır. Diğer patojenler için belirgin mevsimsel farklılıklar gözlenmemiştir, yıl boyunca sporadik olgulara neden oldukları izlenmiştir. Ateş, öksürük ve nefes darlığı saptanan en yaygın semptomlar olmakla birlikte öksürük, *Bordetella pertussis* enfeksiyonlarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.05). Pozitif saptanan hastaların 348'inin klinik verileri immünsüpresyon varlığını ortaya koymuştur. Bu hastalardaki patojen dağılımı toplam

**Tablo 1. Multipleks PCR ile pozitif saptanan hastaların demografik ve klinik özellikleri.**

| Özellikler               | Yıllar       |              | Toplam (n=1243) |
|--------------------------|--------------|--------------|-----------------|
|                          | 2018 (n=665) | 2019 (n=578) |                 |
| Cinsiyet n(%)            |              |              |                 |
| Kadın                    | 317 (47.7)   | 263 (45.5)   | 580 (46.7)      |
| Erkek                    | 348 (52.3)   | 315 (54.5)   | 663 (53.3)      |
| Yaş n(%)                 |              |              |                 |
| <18                      | 471 (70.9)   | 267 (46.2)   | 738 (59.4)      |
| 18-44                    | 92 (13.8)    | 121 (20.9)   | 213 (17.1)      |
| 45-64                    | 59 (8.9)     | 100 (17.3)   | 159 (12.8)      |
| ≥65                      | 43 (6.4)     | 90 (15.6)    | 133 (10.7)      |
| Median yaş               | 6            | 23           | 10              |
| Başvuru şekli n(%)       |              |              |                 |
| Ayaktan                  | 400 (60.2)   | 253 (43.8)   | 653 (52.5)      |
| Yatan                    | 265 (39.8)   | 325 (56.2)   | 590 (47.5)      |
| Komorbidite n(%)         |              |              |                 |
| Var                      | 187 (28.1)   | 192 (33.2)   | 379 (30.5)      |
| Yok                      | 478 (71.9)   | 386 (66.8)   | 864 (69.5)      |
| İmmünsüpresyon n(%)      |              |              |                 |
| Var                      | 138 (20.8)   | 210 (36.3)   | 348 (28)        |
| Yok                      | 527 (79.2)   | 368 (63.7)   | 895 (72)        |
| Semptom ve bulgular n(%) |              |              |                 |
| Aseptomatik              | 301 (45.3)   | 206 (35.6)   | 507 (40.8)      |
| Ateş                     | 188 (28.3)   | 235 (40.7)   | 423 (34)        |
| Öksürük                  | 197 (29.6)   | 204 (35.3)   | 401 (32.3)      |
| Balgam                   | 75 (11.3)    | 106 (18.3)   | 181 (14.6)      |
| Dispne                   | 130 (19.5)   | 127 (22)     | 257 (20.7)      |
| Burun akıntısı           | 40 (6)       | 46 (8)       | 86 (6.9)        |
| Prognoz n(%)             |              |              |                 |
| Ölüm                     | 6 (0.9)      | 17 (2.9)     | 23 (1.9)        |
| Sağkalım                 | 659 (99.1)   | 561 (97.1)   | 1220 (98.1)     |

popülasyondaki dağılıma benzerdir. Ancak *Bordetella pertussis*, immünsüpresif hastalarda saptanmamıştır. Patojen saptanan hastaların %34'ünde toraks BT görüntülemesi mevcut olup SYE tanısı hastaların %15'inde radyolojik bulgularla da desteklenmektedir. Radyolojik bulgular Şekil 2'de gösterilmiştir. En sık karşılaşılan radyolojik bulgu buzlu cam görünümüdür, saptanan bulgular patojene göre anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p>0.05$ ). Pozitif saptanan 1243 hastanın 585'ine antimikrobiyal ajan reçete edilmiş olup; %35.7'sine sadece antibiyotik, %3.8'ine sadece antiviral, %7.6'sına hem antibiyotik hem de antiviral reçete edilmiş, %52.9'una ise herhangi bir antimikrobiyal reçete edilmemiştir (Tablo 2). Antibiyotik reçete edilen hastaların

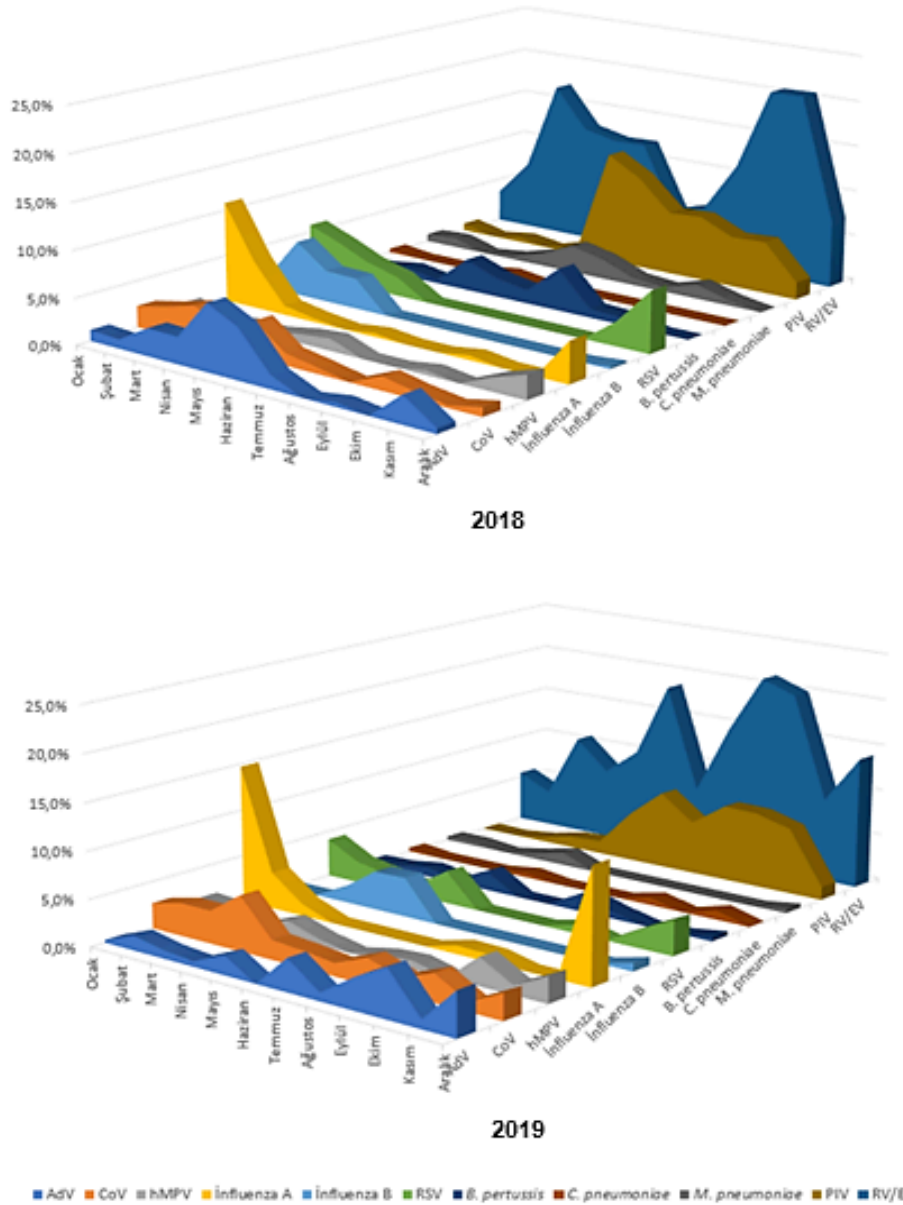
sadece %6.7'sinde etken bakteriyel bir patojendir. İnfluenza virüsle enfekte hastaların (n:253) %47.4'üne antiviral başlanmış olup influenza saptanan hastaların %49.8'i ayaktan, %50.2'si yatırılarak tedavi edilmiştir. Yatan hastalarda antiviral kullanımı ayaktan hastalara göre belirgin yüksektir (%73.2'ye karşı %21.4).

#### Sonuç

SYE'de klinik veya radyolojik bulgular tanıya yardımcı olsa bulgular patojenlere özgü olmamaktadır. Multipleks PCR temelli yöntemler ile solunum yolu patojenlerin tanısına ilişkin laboratuvar sonuçları hızlı bir şekilde verilmesine

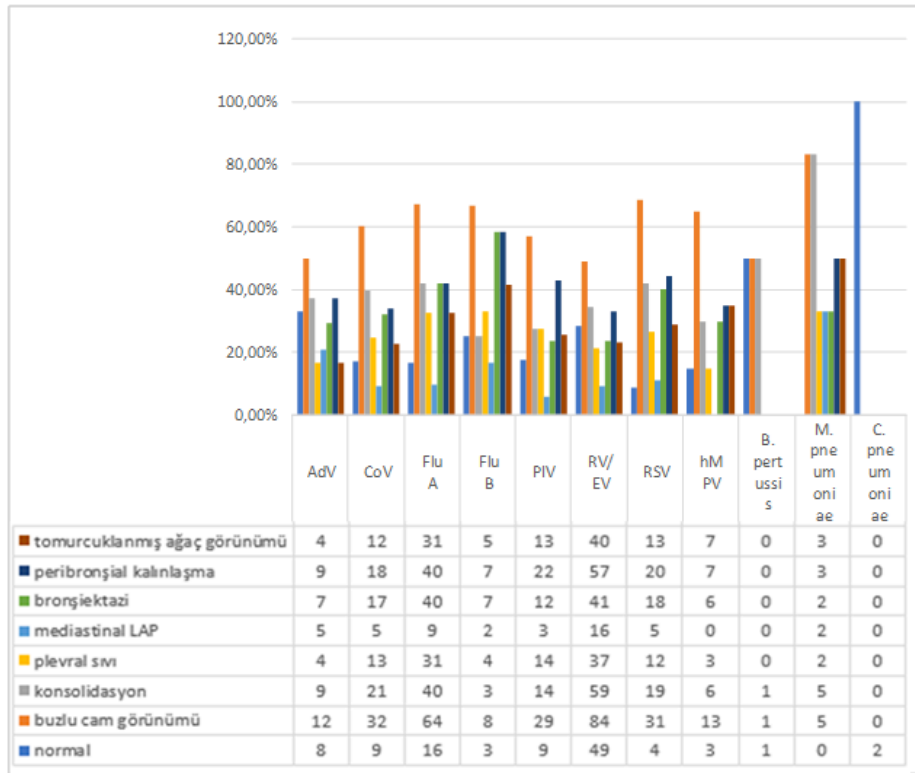
**Tablo 2. Solunum yolu patojeni saptanan hastalarda reçete edilen antimikrobiyal ajanlar.**

| Antimikrobiyal kullanımı                | İnfluenza A/B<br>(n=253) | İnfluenza A/B dışı viral<br>patojen (n=990) | Bakteriyel<br>patojenler<br>(n=74) | Toplam<br>(n=1243) |
|-----------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| Antibiyotik reçetesi; n (%)             | 19 (7.5)                 | 393 (39.7)                                  | 32 (43.2)                          | 444 (35.7)         |
| Antiviral reçetesi; n (%)               | 44 (17.4)                | 3 (0.3)                                     | -                                  | 47 (3.8)           |
| Antibiyotik + antiviral reçetesi; n (%) | 76 (30)                  | 14 (1.4)                                    | 4 (5.4)                            | 94 (7.6)           |
| Antimikrobiyal reçetesi yok; n (%)      | 114 (45.1)               | 506 (51.1)                                  | 38 (51.4)                          | 658 (52.9)         |



**Şekil 1. Multipleks PCR ile saptanan patojenlerin 2018 ve 2019 yıllarında aylara göre dağılımı**

Açıklamalar: AdV; Adenovirüs, CoV; Coronavirüs, hMPV; Human Metapneumovirüs, PIV; Parainfluenzavirüs, RSV; Respiratuar sinsityal virüs, RV/EV; Rhinovirüs/Enterovirüs.



Şekil 2. Patojen türüne göre rastlanan radyolojik bulgular.

rağmen bu sonuçların tedavi pratiğine yansımaları beklenilen düzeyde olamamıştır. Laboratuvar sonuçlarının etkili kullanılması ve akılcı antimikrobiyal kullanımı konusunda klinisyenlerle daha yakın iş birliği gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Solunum yolu enfeksiyonları, multiplex PCR, toraks BT, antiviral

#### Kaynaklar

1. WHO. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (Erişim tarihi: 20 Mayıs 2020)
2. Ciotti M, Maurici M, Santoro V, et al. Viruses of respiratory tract: an observational retrospective study on hospitalized patients in Rome, Italy. *Microorganisms*. 2020;8(4):501 <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040501>
3. Parčina M, Schneider UV, Visseaux B, Jozić R, Hannet I, Lisby JG. Multicenter evaluation of the QIAstat Respiratory Panel-A new rapid highly multiplexed PCR based assay for diagnosis of acute respiratory tract infections. *PLoS One*. 2020;15(3):e0230183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230183>
4. Li J, Tao Y, Tang M, et al. Rapid detection of respiratory organisms with the FilmArray respiratory panel in a large children's hospital in China. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):510. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3429-6>
5. Babady NE. The FilmArray® respiratory panel: an automated, broadly multiplexed molecular test for the rapid and accurate detection of respiratory pathogens. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013;13(8):779-88. <https://doi.org/10.1586/14737159.2013.848794>
6. Stamm DR, Stankewicz HA. Atypical bacterial pneumonia. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532239/> (Erişim tarihi: 20 Mayıs 2020)
7. Huang HS, Tsai CL, Chang J, Hsu TC, Lin S, Lee CC. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(10):1055-63. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.018>
8. Klein EY, Boeckel TPV, Martinez EMT, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(15):E3463-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>
9. Mengelle C, Mansuy JM, Pierre A, et al. The use of a multiplex real-time PCR assay for diagnosing acute respiratory viral infections in children attending an emergency unit. *J Clin Virol*. 2014;61(3):411-7. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.023>

# Kateter Örneklerinden İzole Edilen Stafilocok Türlerinin Biyofilm Özellikleri ve Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması

Yağmur Ekenoğlu Merdan<sup>1</sup>, Filiz Kibar<sup>2</sup>, Akgün Yaman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lefke Avrupa Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Lefke

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

✉ yekenoglu@eul.edu.tr

## Giriş

Damar içi kateterlerin kullanımı gün geçtikçe artmakta birlikte, nozokomiyal bakteriyemilerin en sık nedeni olarak görülmektedir. Kateter ilişkili enfeksiyonların (KİE) en sık etkenleri olarak Stafilocoklar, tüm KİE'nin %75-90'ından sorumludurlar<sup>(1,2)</sup>. KİE'nin yönetimi, geleneksel olarak enfekte olmuş kateterin çıkarılmasıdır. KİE genellikle nozokomiyal kökenli olduğu için, vankomisin, duyarlılık test sonuçları çıkıncaya kadar kullanılması önerilen antibiyotiktir<sup>(3)</sup>. Enfeksiyon etkeni koagülaz negatif stafilocoklardan (KNS) kaynaklandığında kateter çekilmeden antibiyotik tedavisine yanıt alınabileceği gibi etken *Staphylococcus aureus* veya *Staphylococcus haemolyticus* olduğunda kateterin çekilmesini gerekebilmektedir<sup>(4,5)</sup>. KİE etkeni olarak karşımıza çıkan stafilocokların biyofilm oluşturabilme potansiyelleri, kateter üzerindeki kolonizasyonlarını sağlamada önemli bir virülans faktörü olarak karşımıza çıkmakta ve tedaviyi güçleştirmektedir. Stafilocoklar biyofilm oluşturarak konak savunmasından ve antibiyotiklerden de korunmaktadırlar. Yapılan çalışmalar nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık %65'inden mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin sorumlu olduğunu ve bu durumun tedavi giderlerini çok yükselttiğini ortaya koymaktadır<sup>(6-8)</sup>. Biyofilm içerisinde mikroorganizmalar antimikrobiyal ajanlara, planktonik şekillerine göre 200-500 kat daha dirençlidirler. Planktonik şekli antimikrobiyal ajanlara karşı direnç göstermeyen bir mikroorganizma, biyofilm oluşturunca dirençli hale dönüşebilmektedir. Biyofilmin sağladığı antibiyotik direnci, planktonik formdaki bakterilere etkili olan antibiyotik dozlarının kullanıldığı tedavilerde güçlükler yaşatmaktadır<sup>(9,10)</sup>. Çalışmamızda kateter örneklerinden izole edilen *Staphylococcus* suşlarının biyofilm oluşturma potansiyelleri, biyofilm özellikleri ve antimikrobiyal direnç profilleri belirlenmiştir. Çalışmamız sonucunda elde edilen verilerin, stafilocoklara bağlı KİE'nin hastanemizdeki epidemiyolojisi, biyofilm oluşturma potansiyelleri ve antimikrobiyal direnç profilleri hakkında bilgi edinilmesini sağlanarak, tedavi protokollerine ışık tutması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmamıza, Eylül 2015 - Mart 2017 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına gönderilen kateter örneklerinden izole edilen 65 *Staphylococcus* spp. suşu dahil edilmiştir. Suşların identifikasyonu konvansiyonel yöntemler ve laboratuvar rutin olarak kullanılan Vitek 2 compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistem ile yapılmıştır.

Suşların antibiyotik duyarlılıkları, Vitek 2 compact otomatize sisteminde (bioMérieux) kullanılarak belirlenmiştir. Okasilin, vankomisin ve daptomisin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri CLSI M02-M07 standartlarına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Suşların metisilin direncinin doğrulanması *mecA* geninin tespiti ile sağlanmıştır. Bu amaçla suşların DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation (Roche Diagnostics) kitiyle yapıp, Real-time PCR işlemi LightCycler 480 II (Roche) cihazı ile LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master kiti (Roche) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak, *mecA* geni taşıdığı bilinen ATCC *S. aureus* 43300 referans suşu kullanılmıştır.

Suşların biyofilm oluşturma potansiyelleri ve özellikleri mikropalak yöntemi ile kantitatif olarak gösterilmiştir. 96 kuyucuklu mikropalak kuyucuklarına 180 µl triptik soy buyyon (TSB) aktarılmış ve üzerlerine, 24 saatlik kültürlerden hazırlanan 0.5 McFarland bulanıklıktaki bakteri süspansiyonundan 20 µl eklenmiştir. Hazırlanan mikropalaklar 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün mikropalaklar ters çevrilerek boşaltılıp 3 kez 200 µl fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Plaklar kurutularak 60°C'de 60 dakika bekletilerek biyofilmler fikse edilmiştir. Biyofilmler 150 µl %1'lik kristal viyole ile 15 dakika boyanmış ve ardından 200 µl steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile 3 kez yıkanmıştır. Kurutulan plakların üzerine %95'lik etanol konularak, oda ısısında 30 dakika bekletilmiş ve sonrasında plakların absorbanı spektrofotometrede (LX800, Biotek) 570 nm'de okutulmuştur. Pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturduğu bilinen *S. aureus* ATCC 25923, negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 ve steril kontrol olarak besiyeri içeren kuyucuklar kullanılmıştır. Her suş üç kez çalışıldı ve sonuçlar üç sonucun ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Hesaplama steril kontrol kuyucuklarının optik dansite değerinin (OD) ortalaması ve üç standart sapması hesaplanarak eşik değer optik dansite (OD<sub>c</sub>) değeri belirlendi. Elde edilen OD<sub>c</sub> değerine göre suşların biyofilm pozitiflikleri ve özellikleri yorumlanmıştır. Suşların OD ≤ OD<sub>c</sub> ise (-) "biyofilm negatif", OD<sub>c</sub> ≤ OD ≤ 2xOD<sub>c</sub> ise (+) "zayıf biyofilm üretti", 2xOD<sub>c</sub> ≤ OD ≤ 4xOD<sub>c</sub> ise (++) "orta düzeyde biyofilm üretti", OD > 4xOD<sub>c</sub> ise (+++) "güçlü biyofilm üretti" olarak değerlendirilmiştir.

## Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 62 Stafilocok suşunun 35'i (%56.5) *Staphylococcus epidermidis*, 12'si (%19.4) *S. haemolyticus*, altısı (%9.7) *Staphylococcus hominis*, beşi (%8.1) *S. aureus*,



**Tablo 1. İzolatların antibiyotik direnç paternleri.**

| ANTİBİYOTİK                    | Gentamisin   | Oksasilin    | Siprofloksasin | Vankomisin | Ertromisin   | Klindamisin  | Linezolid  | Daptomisin | Tetrasiklin  | Tigesiklin | Fosfomisin   | Fusidik asit | TMP-SMX     | iMLS <sub>B</sub> |
|--------------------------------|--------------|--------------|----------------|------------|--------------|--------------|------------|------------|--------------|------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|
| <i>S. epidermidis</i><br>n=35  | 19<br>(54.3) | 35<br>(100)  | 25<br>(71.4)   | 0<br>(0)   | 30<br>(85.7) | 21<br>(60)   | 3<br>(8.6) | 0<br>(0)   | 23<br>(65.7) | 0<br>(0)   | 3<br>(8.6)   | 23<br>(65.7) | 6<br>(17.1) | 4<br>(11.4)       |
| <i>S. haemolyticus</i><br>n=12 | 10<br>(83.3) | 12<br>(100)  | 12<br>(100)    | 0<br>(0)   | 12<br>(100)  | 7<br>(58.3)  | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 7<br>(58.3)  | 0<br>(0)   | 12<br>(100)  | 12<br>(100)  | 2<br>(16.7) | 2<br>(16.7)       |
| <i>S. hominis</i><br>n=6       | 1<br>(16.7)  | 5<br>(83.3)  | 3<br>(50)      | 0<br>(0)   | 5<br>(83.3)  | 2<br>(33.3)  | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(50)    | 0<br>(0)   | 5<br>(83.3)  | 5<br>(83.3)  | 0<br>(0)    | 2<br>(33.3)       |
| <i>S. aureus</i><br>n=5        | 1<br>(20)    | 2<br>(40)    | 1<br>(20)      | 0<br>(0)   | 2<br>(40)    | 2<br>(40)    | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 2<br>(40)    | 1<br>(20)  | 1<br>(20)    | 0<br>(0)     | 0<br>(0)    | 1<br>(20)         |
| Diğer<br>n=4                   | 3<br>(75)    | 3<br>(75)    | 3<br>(75)      | 0<br>(0)   | 4<br>(100)   | 3<br>(75)    | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 2<br>(50)    | 0<br>(0)   | 4<br>(100)   | 3<br>(75)    | 0<br>(0)    | 0<br>(0)          |
| Toplam                         | 34<br>(54.8) | 57<br>(91.9) | 44<br>(71)     | 0 (0)      | 53<br>(85.5) | 35<br>(56.4) | 3<br>(4.8) | 0<br>(0)   | 37<br>(59.6) | 1<br>(1.6) | 25<br>(40.3) | 43<br>(69.4) | 8<br>(12.9) | 9*<br>(14.5)      |

\*İndüklenebilir klindamisin direnci test sonucu pozitif suş sayısı

TMP-SMX: Trimetoprim / Sulfametoksazol

iMLSB: İndüklenebilir klindamisin direnci

**Tablo 2. Biyofilm pozitif ve negatif suşların antibiyotik direnç oranları.**

| ANTİBİYOTİK              | Gentamisin   | Oksasilin    | Siprofloksasin | Vankomisin | Ertromisin   | Klindamisin  | Linezolid  | Daptomisin | Tetrasiklin  | Tigesiklin | Fosfomisin   | Fusidik asit | TMP-SMX     | iMLS <sub>B</sub> |
|--------------------------|--------------|--------------|----------------|------------|--------------|--------------|------------|------------|--------------|------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|
| Biyofilm (+)<br>n=34 (%) | 21<br>(61.8) | 33<br>(97.1) | 28<br>(82.4)   | 0<br>(0)   | 29<br>(85.3) | 22<br>(64.7) | 3<br>(8.8) | 0<br>(0)   | 28<br>(82.4) | 1<br>(2.9) | 9<br>(26.5)  | 23<br>(67.6) | 6<br>(17.6) | 3*<br>(8.8)       |
| Biyofilm (-)<br>n=28 (%) | 13<br>(46.4) | 24<br>(85.7) | 15<br>(53.6)   | 0<br>(0)   | 23<br>(82.1) | 13<br>(46.4) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 9<br>(32.1)  | 0<br>(0)   | 15<br>(53.6) | 19<br>(67.9) | 2<br>(7.1)  | 6*<br>(21.4)      |

üçü (%4.8) *Staphylococcus capitis*, biri (%1.6) *Staphylococcus warnerii* olarak tiplendirilmiştir. İzolatların antibiyotik direnç paternleri Tablo 1'de verilmiştir. Metisilin direncinin belirlenmesinde altın standart sayılan *mecA* geninin PCR ile belirlenmesi ile 56 (%90.3) suş *mecA* pozitif olarak saptanmıştır. Oksasilin duyarlı beş suşun tümünde *mecA* geni negatif olarak saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde oksasilin dirençli sadece bir *S. epidermidis* suşunda *mecA* geni negatif olarak saptanmıştır. Linezolid dirençli olarak saptanan dört *S. epidermidis* suşunun sonuçları E-test ile CLSI 2017 kriterlerine göre doğrulanmış, dört suştan üçü dirençli olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca tigesikline dirençli bir MRSA suşu tespit edilmiştir.

Oksasilin, vankomisin ve daptomisin için MİK değerlendirilmesi CLSI 2017 verilerine göre değerlendirildi. Oksasilin, vankomisin ve daptomisin için MİK aralığı sırasıyla 0.125 ile >128, 0.125 ile 4 ve 0.06 ile 1 olarak belirlenmiştir. Suşların MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerleri oksasilin için 32/>128, vankomisin

için 1/2 ve daptomisin için 0.25/1 olarak hesaplanmıştır. Dahil edilen suşların 34'ü (%54.8) biyofilm oluşturabilme yönünden pozitif olarak bulundu. Biyofilm pozitif (BP) suşların biyofilm özellikleri değerlendirildiğinde, sekiz (%23.5) suşun zayıf (+), 11 (%32.4) suşun orta (++) ve 15 (44.1) suşun ise güçlü (+++) biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. BP ve BN (biyofilm negatif) suşların antibiyotik direnç paternleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Biyofilm pozitif suşların mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen vankomisin, oksasilin ve daptomisin için MİK<sub>50</sub> değerleri sırasıyla, 32, 1, 0,5 ve MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla >128, 2, 1 olarak belirlenmiştir. BN suşların mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen vankomisin, oksasilin ve daptomisin için MİK<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 32, 0,5, 0,25 ve MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla >128, 2, 1 olarak belirlenmiştir. BP suşların %94.1'i (32/34) ve BN suşların %85.7'si (24/28) *mecA* geni yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir.

## Sonuç

Çalışmamızda kateter örneklerinden izole edilen *Staphylococcus* suşlarının biyofilm oluşturma potansiyelleri ortaya konulmuştur. Suşların antimikrobiyal direnç profilleri çalışılmış, değerleri belirlenmiş ve metisilin direnci moleküler yöntemle doğrulanmış ve epidemiyolojik veriler elde edilmiştir.

Riboli ve ark.nın<sup>(11)</sup> 2014'te yenidoğanlarda KİE etkenlerinin araştırıldığı çalışmada; 29 en sık stafilokoklar (%79,3) saptanmıştır. *S. epidermidis* %65.5, *S. haemolyticus* %10.3 ve *S. aureus* %3.4 oranında izole edilmiştir. Öcal ve ark.nın<sup>(12)</sup> 2015 yılında yaptığı çalışmada kateter kolonizasyonu olarak değerlendirilen 35 KNS suşunun %40'ı *S. epidermidis*, %25.7'si *S. haemolyticus* ve %25.7'si *S. hominis* olarak saptanmıştır. Çalışmamızda 62 stafilokok suşunun %56.5'i *S. epidermidis*, %19.4'ü *S. haemolyticus*, %9.7'si *S. hominis*, %8.1'i *S. aureus* olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kateter örneklerinden izole edilen KNS suşlarının % 94.7'sinde metisiline direnç saptanmıştır. Ülkemizde UAMDSS 2016 verilerine göre invaziv MRSA yüzdesi %23.6 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda ise MRSA oranı %40 olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda KNS suşlarının %56.1'i, *S. aureus* suşlarının ise %40'ının biyofilm oluşturabilme yeteneğinde olduğu saptanmıştır. Öcal ve ark.nın<sup>(12)</sup> 2015 yılında yaptığı çalışmada kateter kolonizasyonu 35 KNS suşunun 29'unun (%82.6) BP olduğu ve biyofilm oluşumu gösteren suşların sekizi (%27.6) (+), 12'si (%41.4) (++) , 9'u (%31) ise (+++) özelliğinde biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır. 2017 yılında Kırmusaoğlu'nun<sup>(13)</sup> İstanbul'da yaptığı çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole ettiği *S. aureus* (n=82) ve *S. epidermidis* (n=287) suşlarında mikropak ve Kongo Red agar yöntemleriyle biyofilm pozitifliğini sırasıyla %73 ve %68 olarak saptamıştır. Veena ve ark.nın<sup>(14)</sup> 2015 yılında Hindistan'da yaptıkları çalışmada 100 metisilin dirençli KNS suşunun %75'inin mikropak yöntemiyle BP olduğunu ve BP suşlarının %60'ının güçlü biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir. Genel olarak ülkemizde ve yurtdışında yapılan çalışmalarda Stafilokokların biyofilm oluşturma oranı çalışmamızdan daha yüksek olarak bildirildiği gözlenmiştir.

Çalışmamızda BP suşların genel olarak antibiyotiklere daha dirençli oldukları gözlemlenmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalar irdelendiğinde, genel olarak biyofilm pozitifliğiyle antibiyotik direnç oranları korelasyon göstermekle birlikte<sup>(15,16)</sup>, Yurt dışında yapılan çalışmalarda da BP suşlarının BN suşlara göre antibiyotiklere direnç oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir<sup>(17,18)</sup>.

Çalışmamızda BP suşların %94.1'ünün ve BN suşların %85.7'sinin *mecA* geni yönünden pozitif olduğu tespit edilmiş ve istatistiksel olarak biyofilm pozitifliği ve *mecA* geni arasında bir ilişki saptanmamıştır (p>0.001). Senthilkumar ve ark.<sup>(19)</sup> 2014'te Hindistan'da yaptıkları çalışmada BP 33 suşun %81.8'i, BN 17 suşun %94.1'i *mecA* pozitif olarak tespit edilmiş ve biyofilm pozitifliği ile *mecA* geni arasında bir ilişki saptamadıklarını bildirmişlerdir. Shah ve ark.larının<sup>(20)</sup> 2019 yılında Hindistan'da 80 *S. aureus* ile yaptıkları çalışmada biyofilm oluşumu ile *mecA* varlığı arasında anlamlı bir ilişki gözlediklerini ve *mecA* pozitif *S. aureus* izolatları-

nın güçlü veya orta düzeyde biyofilm oluşturdıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda belirlenen suşların antibiyotik direnç paternlerinin, kateter ilişkili stafilokok enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde antibiyotik seçiminde yarar sağlayacağı düşünülmektedir. Çalışmamıza dahil ettiğimiz suşlarda nadir görülen 3 linezolid dirençli ve 1 tigesiklin dirençli suş tespit edilmiş olup, vankomisin ve daptomisin dirençli suşa rastlanılmamıştır. Nozokomiyal kökenli metisilin dirençli stafilokok suşlarının ampirik tedavisinde kullanılan vankomisin ve daptomisinin MİK değerleri belirlenmiş olup, tedavide etkili olabilecek dozların belirlenmesine ışık tutacağı düşünülmektedir. BP suşların çoğu antibiyotiğe karşı direnç oranlarının BN suşlardan yüksek olduğu görülmekle beraber istatistiksel olarak sadece tetrasiklindeki fark anlamlı olarak bulunmuştur. Yüksek oranda tespit ettiğimiz, metisilin direncinin saptanmasında altın standart kabul edilen *mecA* geni araştırılarak moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmiş ve biyofilm oluşumu ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmamıza benzer çalışmaların ülkemiz genelinde yapılmasına devam edilmesi, bize biyofilm enfeksiyonlarını anlamada ve tedavinin daha akılcı yönlendirilmesiyle ilgili yeni yaklaşımları birlikte getireceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik direnci, biyofilm, kateter ilişkili enfeksiyonlar, *mecA*, *Staphylococcus*

## Kaynaklar

1. Rosenthal VD, Maki DG, Jamulitrat S, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. Am J Infect Control. 2010;38(2):95-104. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2009.12.004>
2. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol. 2002;292(2):107-13. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00196>
3. Bouza E, Alvarado N, Alcalá L, Perez MJ, Rincon C, Munoz P. A randomized and prospective study of 3 procedures for the diagnosis of catheter-related bloodstream infection without catheter withdrawal. Clin Infect Dis. 2007;44(6):820-6. <https://doi.org/10.1086/511865>
4. Altun HU, Şener B. Biyofilm enfeksiyonları ve antibiyotik direnci. Hacettepe Tıp Derg. 2008;39(2):82-8.
5. Dündar V, Dündar DÖ. Stafilokok enfeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2008:2065-77.
6. Öztürk R. Kateter enfeksiyonlarında klinik, tanı ve tedavi. ANKEM Derg. 2000;14:460-7.
7. Almirall J, Gonzalez J, Rello L, et al. Infection of hemodialysis catheters: incidence and mechanisms. Am J Nephrol. 1989;9(6):454-9. <https://doi.org/10.1159/000168012>
8. Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know? J Hosp Infect. 2006;64(4):313-25. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028>
9. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. Science. 1999;283(5409):1837-9. <https://doi.org/10.1126/science.283.5409.1837>
10. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol. 2005;13(1):34-40. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>
11. Riboli DF, Lyra JC, Silva EP, et al. Diagnostic accuracy of semi-quantitative and quantitative culture techniques for the

- diagnosis of catheter-related infections in newborns and molecular typing of isolated microorganisms. BMC Infect. Dis. 2014;14:283.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-283>
12. Öcal D. Santral venöz kateterlerden izole edilen koagülaz negatif stafilokokların antimikrobiyal direnç profilleri ve biyofilm oluşturma özelliklerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması. [Uzmanlık tezi] Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 2015.
  13. Kırmusaoğlu H. The correlation of the biofilm production with methicillin rResistance in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. IJSR. 2017;73(4):191-205.  
<https://doi.org/10.21506/j.ponte.2017.4.17>
  14. Veena M, Ramya TG, Spoorthi KU, Vishwanath G. Association between biofilm formation and methicillin resistance in coagulase negative staphylococci. Int J Curr Microbiol App Sci. 2015;4(7):153-9.
  15. Demir C, Battaloğlu İnanç B. Nazal kolonize stafilokok türlerinde biyofilm üretiminin araştırılması. J Clin Anal Med. 2015;6(4):414-8,  
<https://doi.org/10.4328/JCAM.2082>
  16. Tetik T, Eryılmaz M, Akın M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokok suşlarında slime oluşumu ve antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin araştırılması. Ankara Ecz Fak Derg 2010;39(3):187-94.
  17. Balan G, Burduniuc O. Antimicrobial susceptibility and biofilm production among *Staphylococcus* and *Candida* species. Moldovan Med J. 2020;63(1):3-7.  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.3685641>
  18. Hashemzadeh M, Dezfuli AAZ, Nashibi R, Jahangirmehr F, Akbarian ZA. Study of biofilm formation, structure and antibiotic resistance in *Staphylococcus saprophyticus* strains causing women urinary tract infection in Ahvaz, Iran. New Microbes New Infect. 2021;39:100831  
<https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100831>
  19. Senthilkumar S, Chander A, Selvaprithiviraj V, et al. Detection of biofilm formation and mecA gene from clinical isolates of *Staphylococcus* sp. Adv Biomed Pharma. 2014;1(1):21-6.
  20. Shah MS, Qureshi S, Kashoo Z, et al. Methicillin resistance genes and in vitro biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2019;64:117-24.  
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.009>

# Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesindeki Hastaların Endotrakeal Aspirat Örneklerinden İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Direnç Oranları

Tuğba Ayvalık, Merve Köle, Emel Sesli Çetin, Mümtaz Cem Şirin, Buket Cicioğlu Arıdoğan,  
Server Yağcı

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta

✉ tuubaayvalik@gmail.com

## Giriş

Nozokomiyal enfeksiyonlar hastanede yatan hastaların önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasında yer almakta, hastaların yaşam kalitesinde bozulma, hastanede kalış süresini uzatmakta ve maliyette de artışa neden olmaktadır<sup>(1)</sup>. Yoğun bakım ünitesi (YBÜ)'lerinde görülen enfeksiyonlar nozokomiyal enfeksiyonların %25'ini oluşturmaktadır. Solunum sistemi enfeksiyonları YBÜ'de en sık görülen nozokomiyal enfeksiyonlardır<sup>(2,3)</sup>. YBÜ'de sıkça görülmekte olan alt solunum yolu enfeksiyonlarının (ASYE) tanısında endotrakeal aspiratın (ETA) duyarlılığı %38-100 arasında bildirilmektedir<sup>(4)</sup>. ETA kültürlerinin yapılması, tüm dünyada solunum yolu örneklemesinde en yaygın kullanılan noninvaziv mikrobiyolojik tanı yöntemidir. YBÜ'de tedavi edilen hastalar genellikle, girişimsel işlemlerin uygulandığı, altta yatan hastalıklar nedeniyle uzun süre hastanede yatan ve sıklıkla geniş spektrumlu antibiyoterapi uygulanan hastalardır<sup>(5)</sup>. YBÜ'lerinde gelişen enfeksiyonların nozokomiyal etkenleri hastaneden hastaneye hatta YBÜ'leri arasında farklılık gösterdiği gibi kendi ünitesi içinde de zamanla değişiklik gösterebilmektedir<sup>(5)</sup>. Diğer taraftan, bu ünitelerde yoğun antibiyotik kullanımının hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde ciddi boyutlarda dirençin oluşmasında önemli katkısı vardır<sup>(2)</sup>. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve diğer Enterobacteriaceae ailesinin üyeleri, *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* günümüzde yoğun bakımlardaki enfeksiyonlardan sorumlu tutulan dirençli mikroorganizmalardır<sup>(2,5)</sup>. YBÜ'sinde yatan hastalarda izole edilen etkenlerin ve bu etkenlerin antibiyotik duyarlılık profillerinin saptanması ve izlenmesi, nozokomiyal enfeksiyonların tedavisi ve önlenmesinde önem göstermektedir<sup>(6)</sup>. Bu çalışmada Ocak 2018-Eylül 2020 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi YBÜ'deki hastaların ETA örneklerinden izole edilen bakteriyel etkenler ve antibiyotik direnç oranlarının araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına anestezi, koroner, cerrahi, nöroloji ve neonatoloji yoğun bakımlarından gönderilen ETA örnekleri %5 koyun kanlı, Eosin Methylen Blue (EMB) ve çikolata agar besiyerlerine kantitatif yöntemle ekilerek, 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. Anlamli üreme olarak saf kültür halinde  $\geq 10000$  cfu/ml üreyen plaklar çalışmaya

dahil edildi. Üreyen suşların tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi kullanılarak yapıldı. Kolistin için ise Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. Duyarlılık sonuçları EUCAST ve gerektiğinde CLSI önerileri doğrultusunda değerlendirildi. Aynı hastaya ait tekrarlayan üremeler değerlendirme dışı bırakıldı. Bakteriler ve ADT'leri hastane veri tabanından retrospektif olarak elde edildi.

## Bulgular

Toplam 398 bakteri değerlendirildi, bunların 357'si (%89.7) Gram negatif, 41'i (%10.30) Gram pozitif. 2018 yılında tanımlanan 143 (%35.9) etkenin 132'si (%92.3) Gram negatif, 11'i (%7.7) Gram pozitif; 2019 yılında tanımlanan 128 (%32.1) etkenin 115'i (%89.8) Gram negatif, 13'ü (%10.2) Gram pozitif; 2020 yılında tanımlanan 127 (%31.9) etkenin 110'u (%86.6) Gram negatif, 17'si (%13.4) Gram pozitif. YBÜ'de görülen ASYE yol açan etkenler arasında *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* gibi Gram negatif nonfermantatif bakteriler ilk sırayı almakta, mortalite ve morbidite oranları oldukça yüksek seyretmektedir<sup>(7-9)</sup>. Bu çalışmada da ASYE etkeni olarak en sık *A. baumannii* (%43.9), ardından *P. aeruginosa* (%16) saptanmıştır (Tablo 1). Son yıllarda *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* suşlarında karbapenem direncine sık rastlanılmaktadır<sup>(10,11)</sup>. Bu çalışmada karbapenem direnci *A. baumannii* suşlarında %97.7 oranında, *P. aeruginosa* suşlarında %60.2 oranında ve *K. pneumoniae* suşlarında %50.5 oranında, saptanmıştır. *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* türlerinin çok ilaca dirençli suşlarında son yıllarda ciddi artışlar olmuştur<sup>(12)</sup>. Yoğun bakım ünitesi gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin sık kullanıldığı yerlerde meydana gelen enfeksiyonların en az %10-20'sinin çoklu dirençli mikroorganizmalar tarafından oluşturulduğu bildirilmektedir<sup>(13)</sup>. İzole edilen *A. baumannii* suşlarında en yüksek direnç karbapenem grubuna karşı saptanmış olup, kolistin direnciyse %11.4 oranında tespit edilmiştir. İzole edilen *P. aeruginosa* suşlarında en düşük direnç oranlarının sırasıyla kolistin ve amikasin ile elde edildiği görülmüştür. Benzer çalışmalarda *A. baumannii* suşunda kolistin, *P. aeruginosa* suşunda amikasin en etkili antibiyotikler olarak belirlenmiştir<sup>(14)</sup>. Çalışmamızda *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarının ikisinde de en etkili antibiyotik kolistin olarak tespit edilmiştir. *E. coli* ve *K. pneumoniae* gibi bazı Enterobacteriaceae ailesi üyeleri geniş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) enzimi üretme yeteneği ile başta geniş spektrumlu beta laktam antibiyotikler olmak üzere farklı

**Tablo 1. Endotrakeal aspirat örneklerinden izole edilen Gram negatif bakterilerin çeşitli .**

| Bakteriler                             | CAZ  | TZP  | GN   | IMP  | CIP  | AN   | SXT  | CL   |
|----------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (n=175) | 77.2 | 71.8 | 97   | 97.7 | 97.1 | 88.3 | 78.7 | 11.4 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=64)   | 23.1 | 34.9 | 21   | 60.2 | 48.8 | 7.6  | -    | 3    |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=43)    | 64.3 | 50.6 | 34.5 | 26.9 | 60.4 | 23.3 | 45.2 | 14   |
| <i>Escherichia coli</i> (n=17)         | 28.1 | 38.5 | 9.5  | 10.3 | 31.7 | 4.7  | 49.6 | 0    |
| Diğer <i>Enterobacteriaceae</i> (n=21) | 22.9 | 6.7  | 16.9 | 2.5  | 11.8 | 2.5  | 11.8 | 0    |
| Gram negatif nonfermenter basil (n=28) | 77.8 | 9.7  | 16.9 | 10.1 | 35.1 | 21.9 | 10.8 | 6.5  |

antibiyotiklere direnç oranları (%)

\* CAZ: Seftazidim, TZP: Piperasilin-Tazobaktam, GN: Gentamisin, IMP: İmipenem, CIP: Siprofloksasin, AN: Amikasin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, CL: Kolistin

gruplardan birçok antibiyotiğe direnç gösterebilmektedir<sup>(14)</sup>. Benzer çalışmalarda *E. coli* ve *K. pneumoniae* için GSBL pozitifliği oranları %55.3-%92 arasındadır<sup>(15,16)</sup>. Bu çalışmada ise GSBL pozitifliği oranları *E. coli* suşlarında %44.8; *K. pneumoniae* suşlarındaysa %69 olarak bulunmuştur.

Gram pozitif bakteriler YBÜ'lerinde ciddi enfeksiyonlara neden olabilen patojenler olup, MRSA ve VRE ile gelişen enfeksiyonların tedavileri zor ve mortalite oranı yüksektir<sup>(17)</sup>. Saptanan Gram pozitif etkenlerin %65.9'unu *S. aureus* oluşturmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ETA örneklerinden izole edilen MRSA oranları %11.4-60 arasında bildirilmiştir<sup>(18)</sup>. Çalışmamızda MRSA %20.7 oranında tespit edilmiş olup, ülkemizdeki verilerle benzer bulunmuştur. İzole edilen Gram pozitif bakterilerin hiçbirinde vankomisin, teikoplanin, linezolid direnci görülmemiştir.

## Sonuç

Sonuç olarak, YBÜ'lerde izlenen hastalarda gelişen enfeksiyonların belirgin özelliğinin sıklıkla dirençli patojenlerin etken olması ve tedavilerinin güç olduğu unutulmamalıdır. Çoklu ilaca dirençli mikroorganizmalarla enfeksiyon geliştiğinde hastaların mümkün olduğunca izole edilmesi, enfeksiyon kontrol önlemlerinin öden verilmeden uygulanması ve eğitimlerin düzenli olarak verilmesi dirençle mücadelede fayda sağlayabilir. YBÜ'lerde saptanan etkenlerin antimikrobiyal direnç paternleri düzenli olarak izlenmeli ve tedavi protokolleri bu doğrultuda güncellenmelidir. Etkeninin tanımlanması ve YBÜ antibiyotik direnç profilinin bilinmesi, antibiyotik seçimine yön vererek direnç oranlarını azaltmaya katkı sağlayacaktır. Her mikrobiyoloji laboratuvarının kendi YBÜ'den izole edilen mikroorganizmaları ve bunların antimikrobiyal direnç paternlerini belirli aralıklarla saptamasının ve bu verileri klinisyenlerle paylaşım uygun ampirik tedavi seçimlerinin belirlenmesinde ve hastane enfeksiyonlarının da kontrolünde etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik direnci, endotrakeal aspirat, yoğun bakım ünitesi

## Kaynaklar

1. Digiovine B, Chenoweth C, Watts C, Higgins M. The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(3):976-81. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.3.9808145>
2. Ertürk A, Çopur Çiçek A, Köksal E, Şentürk Köksal Z, Özyurt S.

Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg*. 2012;26(1):1-9. <https://doi.org/10.5222/ankem.2012.001>

3. Göktaş U, Yaman G, Karahocagil MK, ve ark. Anestezi yoğun bakım ünitesinde hastane enfeksiyonu etkenleri ve direnç profilinin değerlendirilmesi. *Yoğun Bakım Derg*. 2010;8(1):13-7.
4. Kollef MH, Burnham CD. Ventilator-associated pneumonia: the role of emerging diagnostic technologies. *Semin Respir Crit Care Med*. 2017;38(3):253-63. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1599224>
5. Yılmaz N, Köse Ş, Ağuş N, Ece G, Akkoçlu G, Kıraklı C. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar, antibiyotik duyarlılıkları ve nozokomiyal bakteriyemi etkenleri. *ANKEM Derg*. 2010;24(1):12-9.
6. Spencer RC. Epidemiology of infection in ICUs. *Intensive Care Med*. 1994;20(Suppl 4):S2-6. <https://doi.org/10.1007/BF01713975>
7. Gürgün A, Korkmaz Ekren P, Bacakoğlu F, et al. Ventilatörle ilişkili pnömoni tanısında endotrakeal aspiratın değeri. *Tüberk Toraks*. 2013;61(4):288-94.
8. Özünel L, Boyacıoğlu Z, Güreşer AS, Taylan Özkan A. Çorum Eğitim ve Araştırma Hastanesinde derin trekeal aspirat örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 2014;71(2):81-8. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2014.76093>
9. American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(4):388-416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200405-644ST>
10. Gözütok F, Mutlu Sangüzel F, Çelik İ, Berk E, Aydın B. Hastane enfeksiyonu etkeni *A. baumannii* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarının araştırılması. *Ankem Derg*. 2013;27(1):7-12. <https://doi.org/10.5222/ankem.2013.007>
11. İraz M, Ceylan A, Akkoyunlu Y. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının incelenmesi. *ANKEM Derg*. 2012;26(2):80-5. <https://doi.org/10.5222/ankem.2012.080>
12. Paterson DL. Serious infections in the intensive care unit: *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*. 2006;43(Suppl 2):S41-2. <https://doi.org/10.1086/504473>
13. Starnes MJ, Brown CV, Morales IR, et al. Evolving pathogens in the surgical intensive care unit: A 6-year experience. *J Crit Care* 2008; 23(4):507-12. <https://doi.org/10.1016/j.jcrrc.2008.02.007>
14. MacVane SH. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: A Focus on Gram-negative bacterial infections. *J Intensive*



- Care Med. 2017;3281):25-37.  
<https://doi.org/10.1177/0885066615619895>
15. Gözütok F, Mutlu Sarıgözel F, Aydın B, ve ark. Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi'nde 2013 yılında gelişen hastane infeksiyonlarının değerlendirilmesi. ANKEM Derg 2014; 28: 86-93.  
<https://doi.org/10.5222/ankem.2014.086>
  16. Sesli Çetin E, Kaya S, Pakbaş İ, Demirci M. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2007;14(2):69-73.
  17. Köksal İ. Yoğun bakımda gram pozitif bakteri sorunu. ANKEM Derg. 2009;238özel Sayı 2):143-7.
  18. Yenişehirli G, Yenişehirli A, Bulut Y, Bulut N. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının vankomisin, teikoplanin, linezolid, kinupristin-dalfopristin ve daptomisine in vitro duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2015;29(1):21-5.  
<https://doi.org/10.5222/ankem.2015.021>
  19. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. V.10.0, valid from 2020-01-01. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020.
  20. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI M100-ED30, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

# SARS-CoV-2 Kalitatif ‘Real Time PCR’ ile Elde Edilen Ct (Cycle threshold) Değerlerinin Kantitatif ‘Real Time PCR’ Sonuçları ile Karşılaştırılması

Selin Yiğit<sup>1</sup>, Erdem Şahin<sup>1</sup>, Kenan Yüce<sup>1</sup>, Aylin Altay Koçak<sup>2</sup>, Gülendamar Bozdayı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

✉ aynalty@hotmail.com

## Giriş

Aralık 2019’da Çin’in Wuhan şehrinde başlayıp tüm dünyaya yayılan ve SARS-CoV-2 olarak adlandırılan yeni koronavirüs salgını, 11 Mart 2020 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından pandemi olarak ilan edilmiştir<sup>(1)</sup>. Bu pandemi, patojenin tanısı için acil bir gereksinimi ortaya çıkarmıştır<sup>(2)</sup>. COVID-19 hastalığının tanısı, klinik ve epidemiyolojik olarak ve viral genomun nükleik asit amplifikasyonu yöntemine dayalı laboratuvar testleriyle birlikte değerlendirilerek koyulmaktadır. Bununla birlikte, COVID-19 tanısı için altın standart, nükleik asit amplifikasyonu yapan PCR temelli yöntemlerle saptanmasıdır<sup>(3)</sup>.

SARS-CoV-2, bir RNA virüsü olduğu için nükleik asit amplifikasyonunda, reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (reverse-transcription polymerase chain reaction=RT-PCR) kullanılır. Günümüzde, gerçek zamanlı reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (real-time reverse-transcription polymerase chain reaction=Real-time RT-PCR= rRT-PCR), konvansiyonel RT-PCR’a göre daha duyarlı olması, daha hızlı sonuç vermesi ve gerekirse viral yükün saptanması için kantitatif sonuç alınabilmesi açısından tercih edilmektedir. Dünya genelinde SARS-CoV-2 laboratuvar tanısında da bu avantajlardan dolayı rRT-PCR testleri kullanılmakta; ancak bu testler genellikle kantitatif sonuç vermektedir. COVID-19 enfeksiyonunda viral yükün ölçümü; hastaların takibi, tedavi yanıtlarının belirlenmesi ve enfektivite düzeylerini tespit etmek açısından yararlı bir yöntemdir<sup>(4)</sup>. Ek olarak, hasta örneklerindeki görece düşük viral yük, yalnızca negatif sonuçlar alınmasına neden olabilmektedir<sup>(5)</sup>. Kalitatif rRT-PCR yönteminde de ‘Ct’ değerlerine göre viral yük hakkında fikir sahibi olunabilmektedir, viral yük ne kadar yüksekse amplifikasyon eğrisi o kadar erken yükselmeye başlayacağı için, Ct değeri o kadar düşük olmaktadır. Ct değerlerinin kantitatif yorumu, reaksiyon koşulları ve amplifikasyon verimliliği dahil olmak üzere birçok faktöre bağlı olsa da, ortak bir teorik değer, Ct değerlerinin yorumlanması için yararlı bir kriter sağlayabilmektedir: Optimum koşullar altında Ct değerinde 3.3 birimlik bir artış, 10 kat daha az hedef RNA’ya karşılık gelmektedir<sup>(6)</sup>.

Bu çalışmada; Gazi Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Viroloji Laboratuvarı’na gönderilip kalitatif rRT-PCR yöntemiyle çalışılarak SARS-CoV-2 pozitif saptanan örneklerin, kantitatif bir Real Time PCR (RT-qPCR) kiti ile tekrar çalışılıp viral yüklerinin belirlenmesi, kalitatif yöntemde elde edilen Ct

değerleri ile viral yükler arasındaki ilişkinin incelenmesi ve SARS-CoV-2 virüsünün farklı kitler ve izolasyon metodları ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

**Çalışma Tasarımı:** Çalışmamıza 23 Eylül-25 Ekim tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Viroloji Laboratuvarı’nda kalitatif Real Time PCR SARS-CoV-2 testi çalışılıp pozitif saptanan 60 nazofarengeal sürüntü örneği dahil edilmiştir.

**rRT-PCR Testleri:** Örneklerin tamamı laboratuvarımıza 2 ml VNAT içeren transfer tüpleri ile gönderilmiş ve vorteks sonrası PCR aşaması gerçekleştirilmiştir (BioSpeedy® Direct RT-qPCR SARS-CoV-2, Bioeksen R&D Technologies Ltd., İstanbul, Türkiye). Kullanılan kit RdRP gen bölgesini hedeflemek ve saptama alt limiti 20 kopya/μl’dir. Çalışılan örnekler VNAT solüsyonu içerisinde -80°C’lik dondurucuya kaldırılmıştır. Dondurucudan çıkarılan örneklerin viral yüklerini analiz edebilmek amacıyla farklı bir ticari RT-qPCR kiti (genesig® COVID-19 Kit, PRIMER DESIGN, İngiltere) kullanılmıştır. Bu kit ise ORF1ab gen bölgesini hedeflemekte ve saptama alt limiti 0.33 kopya/μl’dir. Bu kit ile valide olan ekstraksiyon protokolü EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Almanya) kiti ile EZ1 Advanced XL (Qiagen, Almanya) cihazında otomatize olarak çalışılmıştır. Kit içeriğindeki konsantrasyonu 2x10<sup>5</sup> kopya/μl olan pozitif kontrolden her çalışmada seri dilüsyon yapılarak 6 farklı standart hazırlanmıştır (2-2x10<sup>5</sup> kopya/μl). Üreticinin talimatları doğrultusunda RotorGene Q (Qiagen, Almanya) cihazında RT-qPCR ile çalışılmıştır. Çalışmanın sonunda bir standart eğri oluşturulmuş ve örneklerin kantitasyonları bu eğriye göre otomatik olarak hesaplanmıştır.

## Bulgular

Kalitatif çalışmanın sonuçları değerlendirilirken, elde edilen Ct değerlerine göre örnekler, her grupta 10 örnek olmak üzere, altı gruba ayrılmıştır. Bu gruplandırma Ct değeri en yüksek olandan en düşük olana doğru yapılmıştır. Aynı örneklerin kantitatif yöntemle elde edilen viral yük değerleri bu gruplarla karşılaştırılmıştır. Elde edilen değerlerin aralıkları Tablo 1’de verilmiştir. Buna göre, kalitatif çalışmada amplifikasyon eğrisi olmayıp negatif olarak değerlendirilen ilk gruptaki örnekler kantitatif testle de negatif bulunmuştur. Ct değerleri 35-39 arasında olan ikinci gruptaki örneklerin ise kantitatif testle altısı negatif

**Tablo 1. Ct değerleri ile kantitatif değerlerin karşılaştırılması.**

| Grup No | Ct (cycle threshold) Aralığı | Kantitasyon Aralığı (kopya/μl)   |
|---------|------------------------------|----------------------------------|
| 1       | Tüm örnekler negatif         | Tüm örnekler negatif             |
| 2       | 39.41-35.45                  | 1 – 2 kopya/μl (6 örnek negatif) |
| 3       | 34.95-29.19                  | 2 – 106 kopya/μl                 |
| 4       | 27.70-24.70                  | 114 – 1920 kopya/μl              |
| 5       | 24.53-22.11                  | 994 – 10710 kopya/μl             |
| 6       | 22.04-18.98                  | 11063 – 82871 kopya/μl           |

bulunurken, dördünde 1-2 kopya/μl saptanmıştır. Takip eden gruplarda, Ct değerleri düştükçe kantitatif değerlerin arttığı görülmüştür.

### Sonuç

Bu sonuçlara göre, Ct değeri aralıkları ile viral yük değeri aralıkları oldukça uyumlu bulunmuştur. Özellikle kantitatif logaritmik değerlerin, Ct değerleriyle uyumlu olduğu görülmüş ve SARS-CoV-2 laboratuvar tanısında Ct değerlerine göre yarı kantitatif bir sonuç değerlendirmesi yapılmasının doğru bir yaklaşım olabileceği görülmüştür. Çalışmamızda ayrıca farklı kitler ve ekstraksiyon yöntemleri de karşılaştırılmıştır. VNAT solüsyonunda vorteks yapılarak amplifikasyon aşamasına geçilen ve ek bir ekstraksiyon aşaması gerektirmeyen yöntemin sonuçları ile ekstraksiyon aşaması olan kantitatif yöntemin sonuçları incelendiğinde; sonuçlar arasında bariz bir fark olmadığı görülmüştür.

**Anahtar kaynaklar:** SARS-CoV-2, COVID-19, Real time RT-PCR, cycle threshold (Ct), kantitasyon

### Kaynaklar

1. Çiçek C. Epidemiyoloji. In: Çiçek C (Ed). Mikrobiyoloji ve COVID-19. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020:1-6.
2. Liu X, Feng J, Zhang Q, et al. Analytical comparisons of SARS-CoV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/probe sets. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):1175-9. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1772679>
3. Oliveira BA, Oliveira LC, Sabino EC, Okay TS. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2020;62:e44. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062044>
4. Bozdayı G, Çağlar K. SARS-CoV-2 nükleik asit amplifikasyon testleri. In: Çiçek C (Ed). Mikrobiyoloji ve COVID-19. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020:33-41.
5. Deiana M, Mori A, Piubelli C, et al. Assessment of the direct quantitation of SARS-CoV-2 by droplet digital PCR. Sci Rep. 2020;10(1):18764. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75958-x>
6. Salvatore PP, Dawson P, Wadhwa A, et al. Epidemiological correlates of PCR cycle threshold values in the detection of SARS-CoV-2. Clin Infect Dis. 2020;ciaa1469. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1469>. <https://doi.org/>

# COVID-19 Hastalarından İzole Edilen SARS-CoV-2 Virüsünün Yeni Nesil Dizileme ile Tüm Genom Dizi Analizi

Erdem Şahin<sup>1</sup>, Hager Muftah<sup>1</sup>, Selin Yiğit<sup>1</sup>, Shaknoza Sarzhanova<sup>1,2</sup>,  
Özlem Güzel Tunçcan<sup>3</sup>, Murat Dizbay<sup>3</sup>, Işıl Fidan<sup>1</sup>, Kayhan Çağlar<sup>1</sup>, Güleendam Bozdayı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Ahmet Yesevi Uluslararası Türk-Kazak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Türkistan

<sup>3</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

✉ erdem.sahin2@gazi.edu.tr

## Giriş

Koronavirüsler, insanlarda hafif ila şiddetli seyirli solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilen oldukça çeşitli bir virüs grubudur. İnsanlarda enfeksiyon yaptığı bilinen 7 koronavirüs vardır. SARS-CoV-2'nin de içinde yer aldığı 3 tanesi (SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2) ciddi seyirli, ölümcül hastalığa neden olurken, 4 tanesi (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 HCoV-HKU1) hafif-orta seyirli enfeksiyonlardan sorumludur<sup>(1-4)</sup>.

Aralık 2019'da ilk olarak, Çin'in Wuhan şehrinde görülen SARS-CoV-2 virüsü, COVID-19 hastalığına neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 11 Mart 2020'de küresel salgın olarak ilan edilmiştir. Aralık 2020 tarihiyle birlikte dünya genelinde COVID-19 tespit edilen kişi sayısı 78 milyondan fazlayken Türkiye'de 2 milyondan fazla kişinin enfeksiyon geçirdiği bildirilmiştir<sup>(5-7)</sup>.

Coronaviridae ailesine ait olup zarflı pozitif polariteli tek iplikli bir RNA virüsüdür. Genom büyüklüğü yaklaşık 30 kilobazdır. 11 adet açık okuma bölgesi (ORF1ab, ORF2/S; Spike proteini, ORF3a, ORF4/E; Zarf proteini, ORF5/M; Membran proteini, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9/N; Nükleokapsid proteini ve ORF10) olup, bu bölgelerden 16 yapısal olmayan (nsP1-16), 4 yapısal (S, E, M ve N) protein ifadenlenmektedir<sup>(8)</sup>.

Antiviral tedaviler, virüste yeni mutasyonlara, mortaliteyi artıran daha virülen ve tedaviye dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, demografik ve klinik hasta bilgilerinin yanı sıra suş bilgisi, COVID-19 ile etkili mücadele için önemlidir. Bulaşma kökeninin, bulaşma zamanının ve bulaşma yollarının daha iyi anlaşılması ve bulaşıcılığı etkileyen mutasyonları tanımlamak için SARS-CoV-2 örneklerinin moleküler karakterizasyonunun yapılması gereklidir. Ek olarak, genoma ait bilgilerin analiz edilmesiyle elde edilen veriler, hastalık kontrolü ve aşı geliştirme çalışmaları için değerli olacaktır. Bu araştırmanın amacı, Türkiye'de pozitif olan hastalarda SARS-CoV-2 tüm genomunun yeni nesil dizileme yöntemiyle sekanslanarak, mutasyonların taranması ve diğer ülkelerdeki genom dizilemeyle karşılaştırılmasıdır.

## Gereç ve Yöntem

**Örneklerin toplanması ve saklanması:** Ağustos 2020-Eylül 2020 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Viroloji laboratuvarına rutin olarak, SARS-CoV-2 pozitifliği için araştırılması için gönderilen ve pozitif saptanan nazofaringeal sürüntü numunelerinden 12 adet örnek seçilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerin tamamı laboratuvarımıza 2 ml VNAT içeren transfer tüpleri ile gönderilmiştir ve vorteksleme sonrası Real-Time PCR yöntemiyle Bio-Speedy SARS-CoV-2 (2019-nCoV) qPCR Detection Kit v5.3 (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazında çalışılmıştır. Pozitif saptanan örnekler VNAT solüsyonu içerisinde çalışma gününe kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

**İzolasyon ve amplifikasyon:** Dizi analizi öncesinde otomatize EZ1 Advanced (Qiagen, Almanya) cihazında EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Almanya) ile viral nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu takiben, Primer Design Genesig COVID-19 (Genesig, İngiltere) kiti ile Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazı kullanılarak örneklerin amplifikasyonu yapılmıştır ve Ct değerleri 10-20 arasında olan viral yükü yüksek örnekler dizilemeye alınmıştır. Amplifikasyon eğrilerinin değerlendirilmesi Rotor Gene Software ile yapılmıştır.

**Kütüphanelerin hazırlanması:** İzolasyonu takiben, kütüphanelerin hazırlanması CleanPlex SARS-CoV-2 Panel (Paragon Genomics, ABD) kiti kullanılarak yapılmıştır. Kütüphanelerin hazırlanması ters transkripsiyon, amplifikasyon, enzimatik purifikasyon ve indeksleme aşamalarını içermektedir. İlk olarak komplementer DNA sentezi yapılmıştır. Daha sonra, iki farklı havuzda ve toplamda 343 amplikon içerecek şekilde multipleks stratejisi ile eş zamanlı olarak tüm genomun amplifikasyonunu yapılmıştır. Enzimatik temizleme aşamasının ardından Illumina platformuna uygun i5 ve i7 primerler kullanılarak her bir örneğin indekslemesi yapılmıştır. Her aşamanın sonunda Sera-Mag Select (Cytiva, ABD) kullanılarak manyetik boncuk purifikasyonu uygulanmıştır.

**Normalizasyon ve dilüsyon:** Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher, ABD) cihazında, Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher, ABD) ile kütüphanelerin ng/µl cinsinden miktarları belirlenmiştir. Kütüphanelerin ortalama baz uzunluğu jel elektrofezi ile görüntülenerek yaklaşık değerler belirlen-

miştir. Illumina firmasının rehberleri doğrultusunda manuel normalizasyon ile hesaplamalar yapılarak örneklerin nM cinsinden konsantrasyon değerleri belirlenmiştir. Mutasyon analizi için dizileme derinliğini en optimal 1000x kabul edilip hesaplamalar yapılmıştır ve tek seferde 12 adet örnek dizilemeye alınmıştır. Bütün örnekler 100 µM değerine dilüe edilmiştir.

**Dizileme:** Seyreltme işleminin ardından her bir kütüphane örneğinden 10 µl alınarak yeni bir tüpte karıştırılarak kütüphane yükleme havuzu oluşturulmuştur. Kütüphane havuzu, iSeq 100 (Illumina, ABD) platformunda, iki taraflı okumayla (2x150 bp), Generate Fastq modülünde custom kit ayarları kullanılarak iSeq 100 i1 Reagent (Illumina, ABD) kartuşuyla çalışılmıştır.

**Okumaların birleştirilmesi ve analizi:** Dizileme sonunda elde edilen ham okumalardan Cutadapt 3.1 ile adaptör primler kesilmiştir<sup>(9)</sup>. Web tabanlı Genome Detective programıyla dizilerin kalite analizi, hizalaması ve birleştirilmesi yapılarak konsensus diziler elde edilmiştir<sup>(10)</sup>. Birleştirilen dizilerin kalitesinin belirlenmesi web tabanlı Nextclade<sup>(11)</sup> uygulaması ile yapılmıştır. Web tabanlı CoV-Glue<sup>(12)</sup> ve CoVsurver araçları ile nükleik asit ve aminoasit değişiklikleri belirlenmiştir. GISAID veritabanından çekilen tüm genom dizileri ve MEGA X<sup>(13)</sup> programı kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır.

**Etik onam:** Bu araştırma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 22.05.2020 tarih ve 341 karar numarası ile onaylanmıştır.

Bu çalışma 01/2020-20 kodlu Gazi Üniversitesi BAP Projesi ile desteklenmiştir.

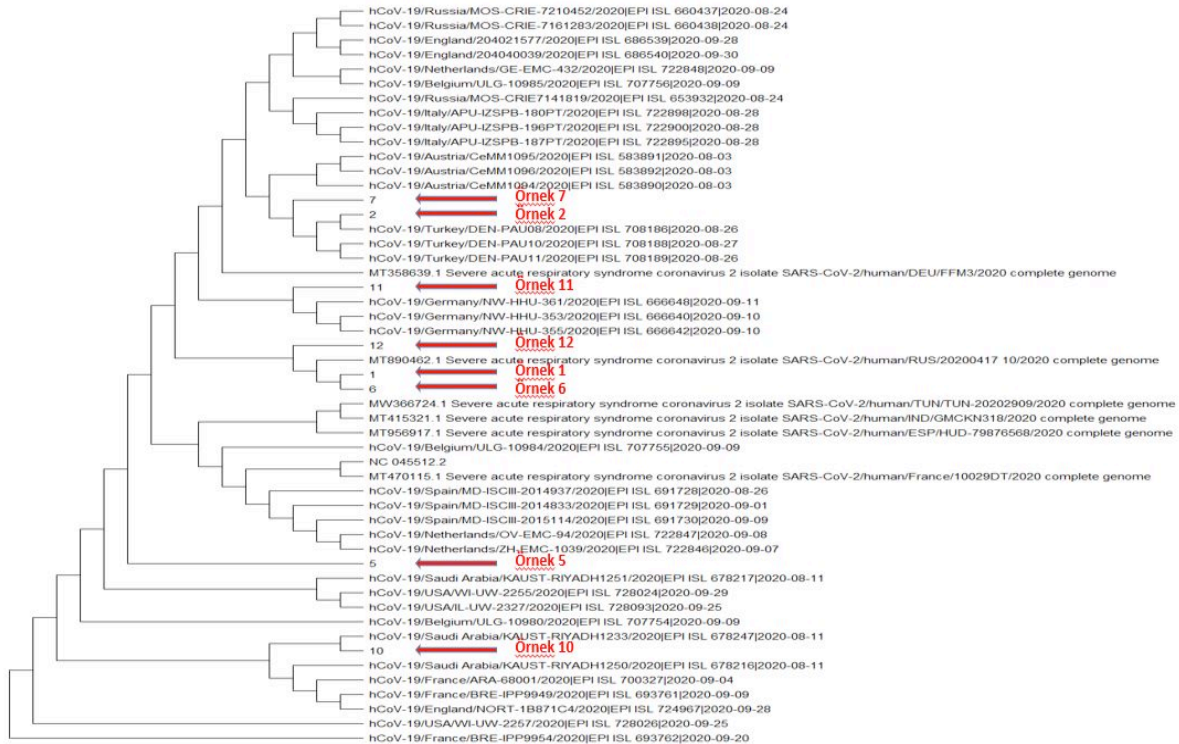
## Bulgular

Dizileme derinliği 400-6605 arasında değişirken, örneklerin tamamı en düşük %95 oranında dizilenmiştir. 12 örnekte toplam 215 adet nükleotid değişikliği (Ortalama 17.9) ve toplam 143 adet aminoasit değişikliği (Ortalama 11.9) tespit edilmiştir.

Nextclade konsensus dizi kalite değerlendirme sonuçlarına göre 4 örnek değerlendirmeden çıkarılarak, 8 örnekle analize devam edilmiştir. Değerlendirmeye devam edilen 8 adet örnekte toplam 130 adet nükleotid değişikliği (Ortalama 16.5) ve toplam 88 adet aminoasit değişikliği (Ortalama 11) tespit edilmiştir. Tiplerine göre, 5 non-coding, 33 synonymous ve 44 non-synonymous mutasyon görülmüştür.

ORF1ab gen bölgesi tüm genomun yaklaşık üçte ikisini kapsamaktadır. Mutasyonların büyük bir kısmı bu gen bölgesinde görülmektedir. Genellikle ORF1ab (29 adet ORF1a, 22 adet ORF1b) ve ardından S (8 adet) ve N (8 adet) bölgelelerinde mutasyonlar görülmüştür.

S gen bölgesinde yer alan D614G (23403A>G) mutasyonu ve ORF1b'de nsp12'de (RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin ifadelendiği gen bölgesi) P323L (14408C>T) mutasyonu bütün örneklerde tespit edilmiştir. 7 örnekte ORF1a'da yer alan 3037 nükleotit pozisyonunda C'den T'ye değişim tespit edilmiştir. Bunları N gen bölgesinde yer alan ve 6 örnekte tespit edilen G204R (28883G>C, N gen bölgesi) ve R203K (28881G>C, N gen bölgesi) aminoasit değişiklikleri takip etmektedir. Spike proteininde V70F (21770G>T, 1 örnek), D614G (23403A>G, 8 örnek), Q675H (23587G>T, 1 örnek), A879S (24197G>T, 1 örnek), A1070S (24770G>T, 1 örnek),



Şekil 1. Filogenetik analiz.



Tablo 1. Mutasyonlar ve sıklıkları tablolar.

| Gen Bölgeleri Mutasyon Sıklığı |                           |                          |        |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------|
| Gen Bölgesi                    | Missense (Kayıp) Mutasyon | Silent (Sessiz) mutasyon | Toplam |
| ORF1a                          | 12                        | 17                       | 29     |
| ORF1b                          | 14                        | 8                        | 22     |
| S                              | 6                         | 2                        | 8      |
| ORF3a                          | 3                         | 2                        | 5      |
| M                              | -                         | 3                        | 3      |
| ORF7b                          | 1                         | -                        | 1      |
| ORF8                           | 1                         | -                        | 1      |
| N                              | 7                         | 1                        | 8      |
| Toplam                         | 44                        | 33                       | 77     |

| En Çok Görülen Mutasyonlar |                       |             |                   |
|----------------------------|-----------------------|-------------|-------------------|
| Nükleotit Değişikliği      | Aminoasit Değişikliği | Kaç Örnekte | Gen Bölgesi       |
| 23403A>G                   | D614G                 | 8           | S                 |
| 14408C>T                   | P323L                 | 8           | ORF1 <sup>b</sup> |
| 3037C>T                    | -                     | 7           | ORF1 <sup>a</sup> |
| 28883G>C                   | G204R                 | 6           | N                 |
| 28882G>A                   | -                     | 6           | N                 |
| 28881G>A                   | R203K                 | 6           | N                 |
| 19839T>C                   | -                     | 4           | ORF1 <sup>b</sup> |
| 29402G>T                   | D377Y                 | 2           | N                 |
| 27798G>T                   | A15S                  | 2           | ORF7 <sup>b</sup> |
| 3117C>T                    | T333I                 | 2           | ORF1 <sup>a</sup> |

| Kodlanmayan Bölgelerde Görülen Mutasyonlar |              |            |           |                  |
|--------------------------------------------|--------------|------------|-----------|------------------|
| Nükleotit                                  | Referans Baz | Mutant Baz | Kaç Örnek | Bölge            |
| 241                                        | C            | T          | 8         | 5'-UTR           |
| 245                                        | C            | T          | 1         | 5'-UTR           |
| 26223                                      | A            | G          | 1         | Intergenic bölge |
| 27193                                      | T            | C          | 1         | Intergenic bölge |
| 29555                                      | C            | T          | 1         | Intergenic bölge |

| Yeni Mutasyonlar      |                       |             |             |
|-----------------------|-----------------------|-------------|-------------|
| Nükleotit Değişikliği | Aminoasit Değişikliği | Kaç Örnekte | Gen Bölgesi |
| 13772T>C              | V111A                 | 1           | nsp12       |
| 13838A>G              | H133R                 | 1           | nsp12       |
| 15317T>A              | M626K                 | 1           | nsp12       |

G1167F (25061G>T / 25062G>T, 2 örnek) aminoasit değişiklikleri görülmüştür.

Kodlanmayan bölgelerde 241C>T (5'-UTR, 8 örnek), 245C>T (5'-UTR, 1 örnek), 26223A>G (Intergenic bölge, 1 örnek), 27193T>C (Intergenic bölge, 1 örnek), 2955C>T (Intergenic bölge, 1 örnek) mutasyonları görülmüştür.

ORF1b, nsp12'nin ifadelendiği gen bölgesinde ise 3 yeni mutasyon (13772T>C; V111A; 1 örnek, 13838A>G; H133R; 1 örnek, 15317G>A; M626K; 1 örnek; H133R) tespit edilmiştir. H133R ve M626K mutasyonları birlikte tek bir örnek- te tespit edilmiştir (Tablo 1).

Örneklerimizle benzer tarihlerde dizilemesi yapılmış farklı

ülkelerden tüm genom dizileri ile kendi örneklerimiz karşılaştırılmıştır. 10 numaralı örneğin Suudi Arabistan kökenli dizisiyle benzer olduğu görülmüştür. 11 numaralı örnek Almanya kökenli dizilerle aynı dalı paylaşmaktadır. 1, 6 ve 12 numaralı örnekler Rusya kökenli dizilerle benzerlik göstermektedir. 2 numaralı örnek ise Türkiye kökenli dizilerle benzerlik göstermektedir (Şekil 1).

### Sonuç

Bütün örneklerde D614G mutasyonu mevcuttur. Bu mutasyon S gen bölgesindedir ve S gen bölgesinden virüsün konak hücreye tutunmasında görevli spike proteini ifadenmektedir. Spike proteini bulaşıcılığı etkilenmesi ve aşı hedeflerinin belirlenmesinde önemlidir. Daha önce yapılan

bir çalışmada bu mutasyonu bulunduran virüslerin enfeksiyonda yüksek viral yük düzeylerine neden olabileceği gösterilmiştir<sup>(14)</sup>. Veritabanlarında bulunan dizilerde sıklıkla karşımıza çıkan P323L değişimi örneklerimizin tamamında saptanmıştır. Bu mutasyonun bulunduğu gen bölgesi nsp12 proteinin yani RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin ifade edildiği bölgedir. Bu mutasyona ek olarak bu gen bölgesinde daha önce görülmemeyen 3 yeni mutasyon bulunmuştur. Antiviral ilaçlar olan, remdesivir ve favipiravirin hedefi bu proteindir ve bu bölgedeki mutasyonlar tedaviye dirençli suşların ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir<sup>(15)</sup>. Ek olarak D614G mutasyonu ve ORF1ab de yer alan iki mutasyon (3037C>T ve 14408C>T; P323L) sıklıkla birlikte görülmektedir. Birlikte görülen bu mutasyonlar Avrupa'da görülen varyantlardan birisi olarak tanımlanmıştır<sup>(16)</sup>.

SARS-CoV-2 virüsünün artmış bulaştırıcılık özellikleriyle ön plana çıkan varyantları mevcuttur, fakat bunların herhangi birinin hastalık durumunu kötüleştirdiğine dair kanıt yoktur. Ancak, genetik materyal değişikliklerinin, virulansı etkilediği bilinmektedir. Özellikle Spike proteini mutasyonları bulaşıcılığı etkilemesi ve aşı hedeflerinin belirlenmesinde önemlidir. Mutasyonlar virüsün replikasyon yeteneklerini artırabilir ve daha hızlı yayılmasını neden olabilir. Böyle bir genetik varyant, diğer varyantların sayısını domine ederek yayılma olasılığını yükseltebilmektedir ve bu varyant kısa sürede popülasyonda baskın hale gelecektir. Bununla birlikte, farklı bir varyantın sayısının artması, virüsün özelliklerini değiştirmesinden ziyade, birçok kişiyi enfekte eden birisinden kaynaklandığında göstergesi olabilmektedir. Bu nedenle mutasyonların izlenmesi ve konak hücre reseptörlerine affinite, bulaştırıcılık, yüksek viral yük düzeyleri, ölümcül etki gibi virulansla bağlantılı durumlarının mutasyonlarla ilişkisi araştırılmalıdır.

Bu çalışma Türk toplumunda dolaşan virusun genetik karakterizasyonu belirlemek için yapılan bir ön çalışmadır. Mutasyonların patojenite üzerindeki etkisini görmek için genel popülasyonu kapsayan araştırmalara ihtiyaç vardır. Virolojik analizler ile virüs evriminin izlenmesi toplumsal açıdan hayati önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** COVID-19, Mutasyon Analizi, SARS-CoV-2, tüm genom dizileme, yeni nesil dizileme

#### Kaynaklar

1. Yin Y, Wunderink RG. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology*. 2018;23(2):130-7. <https://doi.org/10.1111/resp.13196>

2. WHO Statement regarding cluster of pneumonia cases in Wuhan, China. <https://www.who.int/china/news/detail/09-01-2020-who-statement-regarding-cluster-of-pneumonia-cases-in-wuhan-china> (Erişim tarihi: 4.Ocak.2021)
3. WHO | Novel Coronavirus – China. WHO. <http://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/> (Erişim tarihi: 4.Ocak.2021)
4. Coronaviruses. <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/coronaviruses> (Erişim tarihi: 4.Ocak.2021)
5. Xie M, Chen Q. Insight into 2019 novel coronavirus - An updated interim review and lessons from SARS-CoV and MERS-CoV. *Int J Infect Dis*. 2020;94:119-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.071>
6. Covid19. <https://covid19.saglik.gov.tr/> (Erişim tarihi: 4.Ocak.2021)
7. Coronavirus Update (Live): 85,553,477 Cases and 1,851,918 Deaths from COVID-19 Virus Pandemic - Worldometer. <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (Erişim tarihi: 4.Ocak.2021)
8. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(10):165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2020.165878>
9. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J*. 2011;17(1):10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
10. Cleemput S, Dumon W, Fonseca V, et al. Genome Detective Coronavirus Typing Tool for rapid identification and characterization of novel coronavirus genomes. *Bioinformatics*. 2020;36(11):3552-5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa14>
11. Hadfield J, Megill C, Bell SM, et al. NextStrain: Real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*. 2018;34(23):4121-3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407>
12. Singer JB, Gifford RJ, Cotten M, Robertson DL. CoV-GLUE: A web application for tracking SARS-CoV-2 genomic variation. 2020; Preprints.org <https://doi.org/10.20944/preprints202006.0225.v1>
13. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547-9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
14. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: Evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell*. 2020;182(4):812-827.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>
15. Koyama T, Platt D, Parida L. Variant analysis of SARS-cov-2 genomes. *Bull World Health Organ*. 2020;98(7):495-504. <https://doi.org/10.2471/BLT.20.253591>
16. Koyama T, Weeraratne D, Snowdon JL, Parida L. Emergence of drift variants that may affect covid-19 vaccine development and antibody treatment. *Pathogens*. 2020;9(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens9050324>

## Pandemi Döneminde SARS-CoV-2 ve Diğer Solunum Yolu Viral Etkenlerinin Birlikteliklerinin Değerlendirilmesi

Selin Yiğit<sup>1</sup>, Shaknoza Sarzhanova<sup>1,2</sup>, Canan Doğu Tok<sup>1</sup>, Murat Dizbay<sup>3</sup>, Kayhan Çağlar<sup>1</sup>, Gülendam Bozdayı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Türk-Kazak Üniversitesi Fen Fakültesi, Türkistan

<sup>3</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

✉ selnyigt@gmail.com

### Giriş

SARS-CoV-2 virüsü, ilk kez 2019 yılı Aralık ayında Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkmıştır. Tek sarmallı bir RNA virüsüdür ve Covid-19 hastalığının etkenidir. SARS-CoV-2, insanlarda enfeksiyonlara neden olduğu bilinen yedinci CoV'dur. Önceden keşfedilen altı koronavirüsün dördü (HCoV-229E, NL63 ve HKU1) bağışıklığı yeterli bireylerde soğuk algınlığı semptomlarına neden olurken, kalan ikisi zoonotik kökenli olup (SARS-CoV-1 ve MERS-CoV) yüksek ölüm oranlarına sahiptir<sup>(1)</sup>.

Hastalığın ateş, halsizlik, boğaz ağrısı, öksürük gibi özgül olmayan belirtileri bulunmaktadır. Bu nedenle ayırıcı tanısında Adenovirüs, İnfluenza, RSV, Parainfluenza virüs gibi diğer viral etkenler de düşünülmelidir<sup>(1,2)</sup>.

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı Laboratuvarına gönderilen solunum yolu örneklerinin SARS-CoV-2 ve diğer solunum yolu viral etkenleri varlığı açısından eş zamanlı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

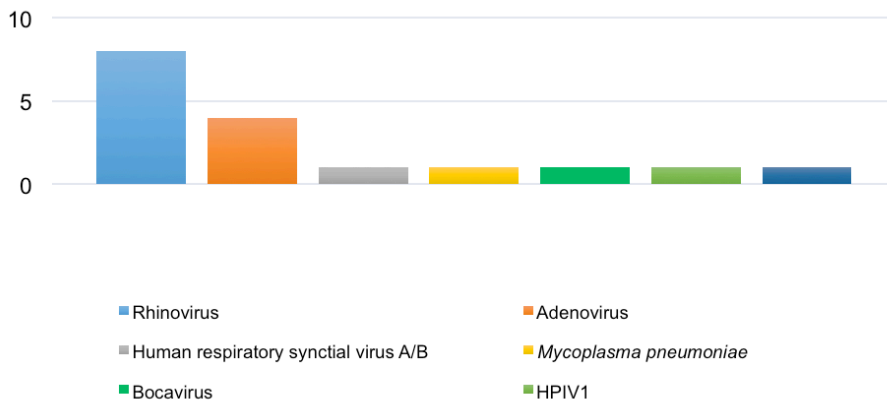
### Gereç ve Yöntem

Çalışmamıza 20 Mart-2 Aralık 2020 tarihleri arasında farklı kliniklerden solunum yolu enfeksiyonu bulguları olan 0-94

yaş aralığında 657 hastanın 756 örneği dahil edilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen örneklerin tamamı nazofarengeal sürüntü örneklerinden oluşmaktadır. Örnekler çalışma aşamasına kadar vesonrasında -80°C'de muhafaza edilmiştir. Örneklerden viral nükleik asit ekstraksiyonu EZ1 Advanced (Qiagen, Almanya) cihazı ile otomatize olarak yapılmıştır. SARS-CoV-2 varlığı açısından değerlendirme ise PRIMER DESIGN genesig® COVID-19 kiti ile Qiagen Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diğer solunum yolu viral etkenlerinin varlığının tespiti ise Fast Track Diagnostics FTD Respiratory Pathogens 21 kiti kullanılarak Qiagen Rotor-Gene Q cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Fast Track Diagnostics FTD Respiratory Pathogens 21 kiti 20 farklı viral etken ve *Mycoplasma pneumoniae* tespitine olanak sağlamaktadır.

### Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 756 örneğin 145 (%19)'i solunum yolu viral etkenleri açısından pozitif olarak saptanmıştır. SARS-CoV-2 pozitifliği ise 97 (%12.8) örnekte tespit edilmiştir. SARS-CoV-2 negatif olarak bulunan örneklerden 131 (%19.8)'i diğer solunum yolu viral etkenleri açısından pozitif olarak tespit edilmiştir. SARS-Cov-2 pozitif olarak bulunan örneklerden 14 (%14.4)'ünün diğer solunum yolu viral etkenlerinin en az biri ile beraber olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1). Bu örneklerden 3 tanesinde aynı anda birden fazla viral etkenin varlığı saptanmıştır. SARS-CoV-2 ve



Şekil 1. SARS-CoV-2 Pozitif ve diğer solunum yolu viral etkenlerde pozitif örneklerin dağılımı.

diğer viral etkenlerden en az biri ile birlikte pozitif saptanan örneklerin 8 (%57.1)'inde Rhinovirus ve 4 (%28.5)'ünde ise Adenovirüs görülmüştür.

SARS-CoV-2 ve diğer solunum yolu viral etkenleri pozitif 14 örneğin 10 (%71.4)'u çocuk 4 (%28.6)'ü ise erişkin hasta örneklerinden oluşmaktadır.

### Sonuç

Çalışmamızda Covid-19 hastalarında diğer solunum yolu viral etkenlerinin eş zamanlı varlığı düşük oranda tespit edilmiştir. SARS-CoV-2 pozitif hastalarda diğer viral patojenlerin varlığının araştırıldığı yayınlar, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde düşük prevalans bildirilmiştir<sup>(3)</sup>. Bu durumun küresel SARS-CoV-2 salgının başlamasından kısa süre sonra, toplumun kazandığı maske takma alışkanlığının solunum yolu virüslerinin toplumda azalmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. SARS-CoV-2 ile diğer solunum yolu viral etkenlerinin birlikte görüldüğü grubun büyük oranını çocukların oluşturmasını

da çocuklarda maske takma alışkanlığının zor edinilmesi ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** SARS-CoV-2, solunum yolu viral etkenleri, polimeraz zincir reaksiyonu

### Kaynaklar

1. Tu H, Tu S, Gao S, Shao A, Sheng J. Current epidemiological and clinical features of COVID-19; a global perspective from China. J Infect. 2020;81(1):1-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.011>
2. Calcagno A, Ghisetti V, Burdino E, et al. Coinfection with other respiratory pathogens in COVID-19 patients. Clin Microbiol Infect. 2020;S1198-743X(20)30494-8  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.08.012>
3. Castillo EM, Coyne CJ, Brennan JJ, Tomaszewski CA. Rates of coinfection with other respiratory pathogens in patients positive for coronavirus disease 2019 (COVID-19). J Am Coll Emerg Physicians Open. 2020;1(4):592-6.  
<https://doi.org/10.1002/emp2.12172>

# Covid-19 PCR Testlerinde Erken ve Geç Ct Değerlerine Sahip Örneklerin vNAT Solüsyonu İçindeki Stabilizasyon Sürelerinin Değerlendirilmesi

Sultan Gülbahçe Orhan, Aydan Yıldız, Filiz Kaya

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

✉ sultan.gulbahce@gmail.com

## Giriş

Koronavirüs hastalığı 2019 (Covid-19), doğrudan insandan insana bulaşabilen yeni bir koronavirüs olan SARS-CoV-2'nin neden olduğu solunum yolu hastalığı pandemisi<sup>(1)</sup>. Virüs yayılımını sınırlandırabilmek ve hastalığın tedavisi için enfekte bireylerin hızlı ve doğru tespiti büyük önem taşımaktadır<sup>(2)</sup>.

Akut SARS-CoV-2 enfeksiyonlarının tanısı, gerçek zamanlı revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (rRT-PCR) gibi nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT'ler) ile viral gen bölgelerinin saptanmasına dayanır. Bu testlerin hedefleri E, RdRP, N ve S genleri üzerindeki bölgelerdir<sup>(3)</sup>.

Ülkemizde, Covid-19 tanısında viral RNA'nın varlığının gösterilmesi esasına dayanan RT-PCR testleri pandemi başlangıcından bu yana mikrobiyoloji laboratuvarlarında aktif olarak çalışılmaktadır. Sağlık Bakanlığı Ulusal Rehberi'nde de akut enfeksiyonu ve asemptomatik taşıyıcılığı tespit etmede ilk tercih edilmesi gereken tanı aracı olarak gösterilen RT-PCR testleri, zaman alıcı ve özel işlemler gerektiren yöntemlerdir<sup>(4)</sup>.

RT-PCR testleri ile SARS-CoV-2; bronkoalveolar lavaj sıvısı, balgam, burun sürüntüsü, fibrobronkoskopik fırça biyopsisi, farengeal sürüntüler, dışkı ve kan gibi çok çeşitli hasta numunesinde tespit edilebilmektedir<sup>(5)</sup>. Numunelerin doğru şekilde alınmaması ve uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılmaması tanıya yanlış sonuçlara yol açabilir. Numune alındıktan sonra sürüntü çubukları hızla steril viral nükleik asit koruyucu sıvı ve/veya viral taşıma ortamına konulmalı ve laboratuvara gönderilene kadar +4°C'de tutulmalıdır<sup>(4)</sup>.

Ülkemizde laboratuvarlara gönderilen numunelerin transportu ve saklanması için Sağlık Bakanlığı tarafından temin edilen Bio-Speedy vNAT (viral nucleic acid extraction buffer) (Bioeksen, Türkiye) transfer tüpleri kullanılmaktadır. vNAT transfer tüpleriyle, örnek alımını takiben beş dakika içinde enfeksiyöz materyal inaktive olurken, örnek de ekstraksiyon aşamasına gerek kalmadan nükleik asit amplifikasyon işlemine hazır hale gelmektedir. vNAT içeriğindeki polietilenimin kaplı tetradeseil dimetil benzil amonyum klorür bazlı nanopartiküller ve tween 20, virüsün zarf ve nükleokapsidini parçalayarak genomun serbest bırakılmasını sağlarken; nanopartiküller, NaN<sub>3</sub> ve guanidinyum tiyosiyanat da açığa çıkan genomun bütünlüğünü korumaktadır. BSA (bovine serum albümin) ise PCR inhibitörlerini kompanze etme görevi görür<sup>(6)</sup>.

Bu çalışmada, vNAT transfer tüpleri ile laboratuvara gelen ve SARS-CoV2 pozitif olarak saptanan yüksek ve düşük viral yüklü numunelerdeki RNA varlığının stabilizasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Covid-19 PCR Tanı Laboratuvarı'na vNAT tüpü ile gelen ve RT-PCR ile SARS-CoV2 pozitif olarak saptanan 20 erken Ct'li (Ct<20), 20 geç Ct'li (Ct>25) (Şekil 1) toplam 40 hasta numunesi 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine ayrılarak +4°C'de saklanmıştır. Bu numuneler Qiagen Rotorgene 5 Plex PCR Cihazı ile Gensutek Coronex-Covid-19 RT-qPCR tanı kiti kullanılarak günlük olarak çalışılmış ve her güne ait Ct değerleri kaydedilmiştir. Erken Ct'li örnekler 14 gün, geç Ct'li örnekler ise yedi gün süresince çalışılmış, çalışma sonunda Ct değerlerindeki değişimler değerlendirilmiştir.

## Bulgular

Çalışmanın ilk günü Ct değeri 20'nin altında saptanan numuneler yüksek viral yüklü, Ct değeri 25'in üzerinde saptanan numuneler ise düşük viral yüklü olarak değerlendirilmiştir. Bu numunelerin Ct değerlerindeki değişimlerin günlük olarak incelenmesi sonucunda yüksek viral yükü olan 20 numunenin Ct değerlerinde 14 gün sonuna kadar anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Tablo 1). Geç Ct tespit edilen düşük viral yüklü 20 numunenin dördü ikinci gün, biri üçüncü gün, üçü beşinci gün, altısı ise altıncı gün

Tablo 1. Yüksek viral yüklü örneklerin günlere göre pozitiflik durumları.

|          | 1.gün   | 3.gün   | 5.gün   | 7.gün   | 9.gün   | 11.gün  | 13.gün  | 14.gün  |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 2.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 3.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 4.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 5.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 6.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 7.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 8.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 9.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 10.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 11.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 12.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 13.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 14.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 15.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 16.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 17.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 18.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 19.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 20.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |



negatifleşmiştir (Tablo 2). Pozitifliği devam eden örneklerin Ct değerlerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

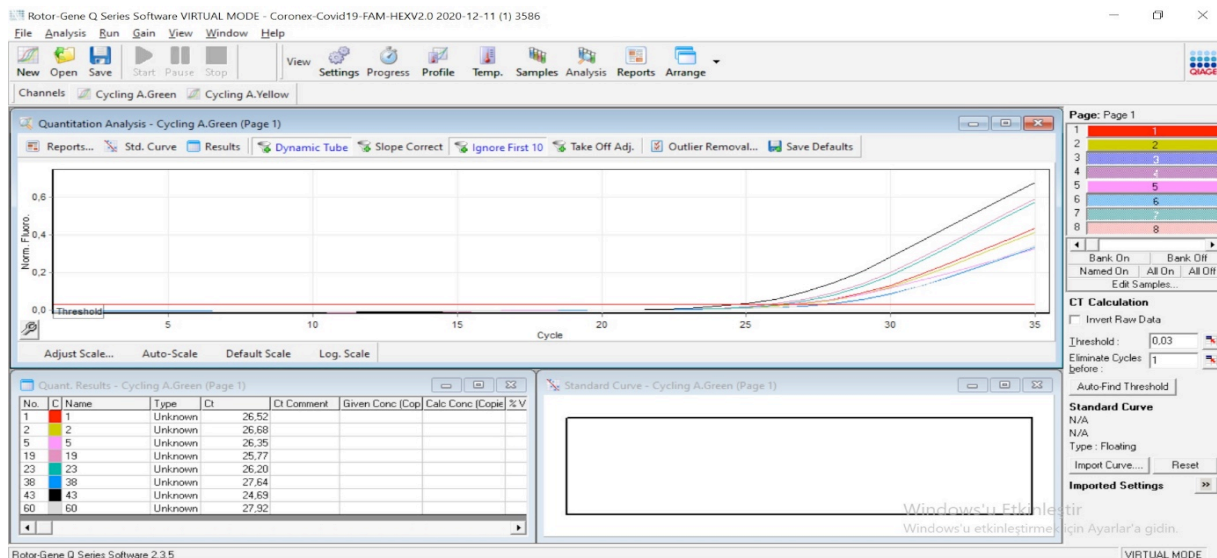
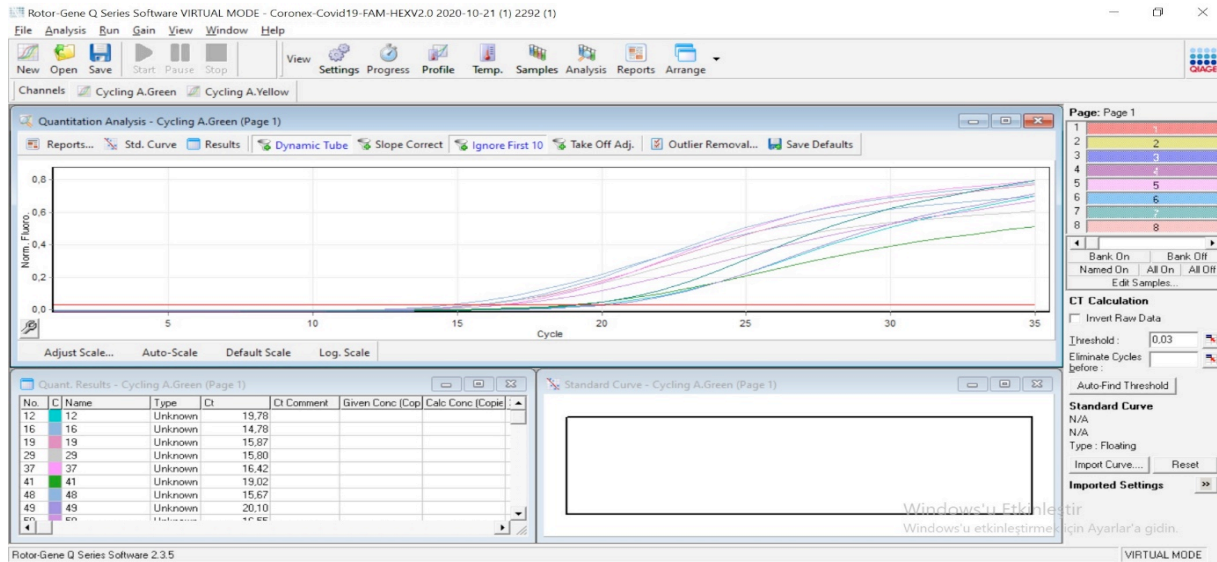
## Sonuç

Covid-19 tanısının konulmasında solunum yolu örneklerinde SARS-CoV-2 RNA'sının RT-PCR ile gösterilmesi altın standart yöntemdir<sup>(7)</sup>. Covid-19 salgınının kontrol altına alınmasında, SARS-CoV-2 pozitif kişilerin en kısa sürede saptanarak hasta ve temaslarının izole edilebilmesi için RT-PCR testleri büyük önem taşımaktadır<sup>(8)</sup>.

Moleküler testlerin hassasiyetleri örnek türü ve miktarı, hastalığın evresi ve yerleşim yeri, viral yük, örneğin uygun koşullarda transportu ve saklanması gibi birçok faktörden etkilenmektedir<sup>(9)</sup>. Covid-19 tanısında, enfeksiyonun farklı evrelerinde alınan hasta örneklerindeki viral yük değişikliği gösterebilmektedir<sup>(10)</sup>. Özellikle hastalığın başlangıç/bitiş evrelerinde ve düşük viral yükü olan hastalarda solunum

**Tablo 2. Düşük viral yüklü örneklerin günlere göre pozitiflik durumları.**

|          | 1.gün   | 2.gün   | 3.gün   | 4.gün   | 5.gün   | 6.gün   | 7.gün   |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 2.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 3.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Negatif | Negatif |
| 4.Hasta  | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 5.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 6.Hasta  | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 7.Hasta  | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 8.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 9.Hasta  | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 10.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Negatif | Negatif |
| 11.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Negatif | Negatif |
| 12.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 13.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 14.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Negatif | Negatif |
| 15.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Negatif | Negatif |
| 16.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif |
| 17.Hasta | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 18.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 19.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 20.Hasta | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif |



**Şekil 1. Erken ve geç Ct'li örnekler ait amplifikasyon eğrileri.**

yolu örneklerinde viral RNA'nın saptanmasında güçlükler yaşanabilmektedir<sup>(7)</sup>.

Yaptığımız çalışmada hasta numunelerinin vNAT solüsyonunda bekleme süresinin, PCR pozitifliği ve Ct değerleri üzerine etkisi incelenmiştir. Buna göre yüksek viral yükü olan örneklerde 14 gün sonunda negatifleşme ya da Ct değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, düşük viral yükü olan örneklerde ikinci günden itibaren negatifleşme görülmeye başlanmıştır. Bu nedenle düşük viral yükü olan örneklerde viral RNA kaybının önlenmesi için vNAT solüsyonuna alınan tüm örneklerin bekletilmeden hızla çalışılması önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** Covid-19, koronavirüs, vNat, RT-PCR

#### Kaynaklar

1. Mayeur N, Berthoumieu P, Charbonneau H. Does nasal screening for *Staphylococcus aureus* before surgery compromise health care professional safety in the COVID-19 era?. J Thorac Cardiovasc Surg. 2020;160(2):e39.
2. Erol Ç, Karakuş R. COVID-19 tanısında PCR testleri ve klinik ile ilişkisi. Atak Yücel A, editör. İmmünoloji ve COVID-19. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020:50-3.
3. WHO. Diagnostic testing for SARS-CoV-2: interim guidance, 11 September 2020. World Health Organization, 2020.
4. T.C. Sağlık Bakanlığı. Covid-19 (Sars-Cov-2 Enfeksiyonu) Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı. Ankara: 7 Aralık 2020.
5. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. JAMA. 2020;323(18):1843-4. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>
6. <https://www.bioeksen.com.tr/vnat-transfer-tupu-> (Erişim tarihi: 23.12.2020)
7. Öcal D, Vezir S, Karahan ZC. Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri. Memikoğlu KO, Genç V.(eds). COVID-19. Ankara Üniversitesi Basımevi. 2020:17-26.
8. Ekemen-Keleş Y, Yılmaz-Çiftdoğan D. Çocuklarda Covid-19 hastalığının mikrobiyolojik tanısı. Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi. 2020;30(Ek sayı):76-84.
9. Togay A, Yılmaz N. SARS-CoV-2'nin laboratuvar tanısı. Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi. 2020;30(Ek sayı):70-5.
10. Aktan C. COVID-19 Tanısında Kullanılan Moleküler Analiz Yöntemleri. In: Evreklioğlu C. (Ed.) Sağlık Bilimleri Alanında Akademik Çalışmalar – Cilt II. Gece Kitablığı; 2020:257-64. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2020.04.014>

# SARS COV-2 RT-QPCR Testinde Thresholdu Geçmeyen Sigmoidal Eğriye Sahip Hastaların Değerlendirilmesi

Ayşe Özkaçmaz<sup>1</sup>, Mehmet Parlak<sup>1</sup>, Sercan Özkaçmaz<sup>2</sup>, Hüseyin Güdücüoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>YYÜ Dursun Odabaşı Tıp Merkezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van

<sup>2</sup>YYÜ Dursun Odabaşı Tıp Merkezi, Radyoloji Anabilim Dalı, Van

✉ ayseozkacmaz@gmail.com

## Giriş

COVID-19 hastalarının hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması, toplumdaki enfeksiyon zincirini kırmak için kritik öneme sahiptir. Semptomların ve radyolojik bulguların spesifik olmamasından dolayı hastalığın tanısının, virüsün spesifik gen dizilimini çoğaltan moleküler testlerle doğrulanması gerekmektedir. Moleküler testler; vaka tanımlama, izolasyon, temas takibi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin rasyonelleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün önerileri doğrultusunda, ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile viral nükleik asit tespiti, COVID-19'un etiyolojik tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir<sup>(1)</sup>.

Kullanımda olan SARS-CoV-2 RT-qPCR testi, önce SARS-CoV-2 RNA'yı DNA'ya ters transkribe ederek (RT adımı) ve ardından qPCR gerçekleştirerek gerçek zamanlı ölçüm sağlamaktadır. Bu sırada floresans sinyali, amplifiye nükleik asit miktarı ile orantılı olarak artar ve numunedeki RNA'nın doğru kantitasyonu sağlanır. Floresan miktarı belirli sayıda PCR döngüsü (Ct değeri) içinde belirli bir eşişe ulaşır ise sonuç pozitif olarak kabul edilir. Döngü eşiş (Ct), geniş bir şekilde kategorize edilebilen yarı kantitatif bir değerdir ve viral yük ile ters orantılıdır. Düşük Ct değerleri tipik olarak viral genetik materyalin yüksek konsantrasyonunu temsil ederken, yüksek Ct değerleri ise viral genetik materyalin düşük konsantrasyonunu belirtir ve daha düşük bulaşıcılık riski ile ilişkilidir<sup>(2)</sup>. Bunun yanında yüksek Ct değerleri; erken enfeksiyon, yetersiz toplanmış numune, uygun koşullarda transfer edilmemiş veya hatalı işlenmiş numuneler gibi enfeksiyon bulaş riskinin yüksek olduğu bir tabloyu da işaret edebilir. Bu yüzden test sonuçlarının, özellikle de testin alt tespit sınırına yakın RNA miktarında gelen sonuçların, klinik olarak ne anlama geldiğinin daha yakından incelenmesi, laboratuvar, klinik ve halk sağlığı stratejilerine rehberlik edebilir. Biz de bu amaçla karar verme aşamasında zorlandığımız, Covid 19 şüphesi ile kombine burun-boğaz sürüntüsünde RT-PCR testi yapılan ve test sonucunda floresan sinyali threshold'un altında kalan ancak sigmoidal eğri paterni gösteren hastaların laboratuvar, klinik ve radyolojik bulgularını analiz ettik<sup>(3-5)</sup>.

## Gereç ve Yöntem

Eylül-Aralık 2020 ayları arasında hastanemize Covid-19 şüphesi ile başvuran hastalara SARS CoV-2 Double Gene RT-qPCR (Bio-Speedy,Türkiye) kiti ile PCR incelemeleri yapılmıştır. Kit önerileri doğrultusunda threshold değeri

Biorad CFX 96 cihazı için 200 RFU'ya ayarlanması önerilmektedir. Çalışmada floresan seviyesi 50-200 RFU arasında kalan ve kit önerilerine göre negatif olarak değerlendirilen sigmoidal eğriler çalışmaya dâhil edilmiştir. Bu hastalara ait laboratuvar, klinik ve radyolojik bulgular hastane veritabanından geriye dönük olarak taranmış ve Covid 19 şüphesi açısından değerlendirilmiştir. Demografik özellikler, ortalama ve standart sapma, bağımsız değişkenler ise yüzde ve sayı olarak hesaplanmıştır.

## Bulgular

Yapılan incelemelerde RT-PCR testinde thresholdu geçmeyen ve sigmoidal eğri paterni gösteren 151 hasta saptanmıştır. 46'sı testten önce, 12'si testten sonra, ikisi de testten önce ve sonra pozitif PCR sonucu bulunan toplam 60 hasta, iyileşmekte olan veya yeni başlangıçlı SARS Cov-2 enfeksiyonu varlığı lehine yorumlanmıştır. Geriye kalan 91 hasta, yakın tarihlerde PCR test istemi açısından incelenmiş ancak pozitif PCR sonucu bulunmamıştır. Bu 91 hastanın 49'u erkek 42'si kadın (E/K=1.17) ve ortalama yaşları 42.1±18.2 (4-87 yıl) olarak bulunmuştur. Hastalara ait laboratuvar ve Toraks BT test sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Toraks BT incelemesi olan 25 hastanın 20'sinde (%80) Covid-19 ile uyumlu radyolojik bulgular saptanmıştır. Buna ilave olarak laboratuvar bulgularından en sık CRP (%73.3), LDH (67.9), D-dimer (%65.5) ve ferritin yüksekliği (%48) saptanmıştır. Klinik açıdan bakıldığında 91 hastanın tamamında öksürük, kas ağrısı, baş ağrısı, kırgınlık, boğaz ağrısı ve nefes darlığı semptomlarından en az birinin varlığı tespit edilmiştir. Laboratuvar, klinik ve/veya radyolojik olarak uyumlu bulunan 11 hastaya (%12) Covid-19 tedavisi başlandığı görülmüştür.

Tablo 1. Laboratuvar ve toraks BT test sonuçları.

| Test Adı             | Pozitiflik Sayısı | Test Edilen Hasta Sayısı (n) | %    |
|----------------------|-------------------|------------------------------|------|
| Toraks BT İncelemesi | 20                | 25                           | 80   |
| CRP Yüksekliği       | 22                | 30                           | 73.3 |
| LDH Yüksekliği       | 19                | 28                           | 67.9 |
| D-dimer Yüksekliği   | 11                | 39                           | 65.5 |
| Ferritin Yüksekliği  | 12                | 25                           | 48   |
| Lenfosit Düşüklüğü   | 12                | 34                           | 35.3 |
| Nötrofil Yüksekliği  | 11                | 34                           | 32.4 |
| AST Yüksekliği       | 8                 | 32                           | 25   |
| CK-MB Yüksekliği     | 7                 | 30                           | 23.3 |
| INR Yüksekliği       | 4                 | 33                           | 12.1 |
| ALT Yüksekliği       | 2                 | 30                           | 6.7  |
| Lenfosit Yüksekliği  | 2                 | 34                           | 5.9  |
| aPTT Yüksekliği      | 1                 | 33                           | 3    |

## Sonuç

Karar vermede zorluk yaşadığımız threshold altında kalan bu tarz sigmoidal eğriler, iyileşmekte olan viral yükü düşen hastalara ait olabileceği gibi, bilinmeyen enfektivite riskiyle beraber asemptomatik hastalara veya viral yükü ileri dönemde artacak presemptomatik hastalara da ait olabilir. Ayrıca bu eğriler; yetersiz toplanmış, uygun koşullarda saklanmamış veya analiz sırasında hatalı işlenmiş viral yükü yüksek örneklerle de ait olabilir. Bu sebeple threshold altında kalan bu tarz sigmoidal eğrilerin varsa laboratuvar, klinik, radyolojik ve eski PCR sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi ve gerektiğinde test tekrarı olarak raporlanması kanaatine varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Covid-19, RT-PCR, threshold, sigmoidal eğri

## Kaynaklar

1. WHO. Diagnostic testing for SARS-CoV-2 Interim guidance. 11 September 2020 <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2> [Erişim tarihi: 8 Ocak 2021].
2. Tom MR, Mina MJ. To interpret the SARS-CoV-2 test, consider the cycle threshold value. Clin Infect Dis. 2020;71(16):2252-4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa619>
3. Suo T, Liu X, Feng J, et al. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):1259-68. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1772678>
4. Baggio S, L'Huillier AG, Yerly S, et al. SARS-CoV-2 viral load in the upper respiratory tract of children and adults with early acute COVID-19. Clin Infect Dis. 2020;ciaa1157. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1157>
5. Cycle threshold (Ct) in SARS-CoV-2 RT-PCR. A guide for health protection teams about interpreting Ct in real-time, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays performed for Sars-CoV-2. Public Health England. PHE publications gateway number: GW-1651. <https://www.gov.uk/government/publications/cycle-threshold-ct-in-sars-cov-2-rt-pcr> [Erişim tarihi 8 Ocak 2021].

## SARS-CoV-2 Antikor Kitlerinin Performans Değerlendirmesi

Burçin Şener<sup>1</sup>, Ekin Kırbaş<sup>1</sup>, Banu Sancak<sup>1</sup>, Ayşegül Gözalan<sup>2</sup>, Ebru Evren<sup>3</sup>, Zeynep Ceren Karahan<sup>3</sup>,  
Ayşın Zeytinoğlu<sup>4</sup>, Bedia Dinç<sup>5</sup>, Alparslan Alp<sup>1</sup>, Gülçin Telli Dizman<sup>6</sup>, Gökhan Metan<sup>6</sup>,  
Serhat Birengel<sup>7</sup>, Ezgi Gülten<sup>7</sup>, Meltem Taşbakan<sup>8</sup>, Müge Ayhan<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Alanya, Antalya

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>4</sup>Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>5</sup>Bilkent Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

<sup>6</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

<sup>7</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

<sup>8</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

<sup>9</sup>Bilkent Şehir Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Ankara

✉ ekinkirbas@hacettepe.edu.tr

### Giriş

COVID-19 tanı ve izleminde kullanılmakta olan SARS-CoV-2 antikor tanı kitleri farklı antijen içerikleri ve saptadıkları antikor izotipi açısından farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmada Türkiye’de SARS-CoV-2 antikor saptanması amacıyla kullanımda olan beş firmaya ait, altı immunoassay kitinin performanslarının ve uyumlarının karşılaştırılması, antikor sonuçlarının RT-PCR ve hasta klinikleriyle birlikte yorumlanması amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Türkiye’de dört merkezde SARS-CoV-2 RT-PCR pozitifliği ve/veya özgül toraks BT bulgusuyla COVID-19 tanısı alan hastalar dahil edilmiştir. Serum örnekleri PCR pozitifliği veya klinik pozitifliğini takiben 15-30 gün arasında alınmıştır. Negatif kontrol olarak prepandemik dönemde toplanan serum setleri kullanılmıştır. Kitlerin geçerlilikleri (duyarlılık, özgüllük), tekrarlanabilirlikleri ve kitler arası uyum (Kappa testi) değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışması için aynı gün içinde üç pozitif (düşük ve yüksek pozitif), üç negatif örneğin üç kez tekrarı “intra-assay tekrarlanabilirlik” ve beş gün boyunca aynı üç pozitif, üç negatif örneklerin günlük tekrarı “inter-assay tekrarlanabilirlik” gerçekleştirilmiş, SD ve CV değerleri hesaplanmıştır. Çalışmada Architect i4000SR (Abbott Diagnostics) IgG, Elecsys (Roche Diagnostics) total antikor, Access (Beckman Coulter) IgG, Atellica-IM (Siemens Healthcare Diagnostics) total antikor ve Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 S ve NCP antijen IgG ELISA kitleri değerlendirilmiştir.

### Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 143 hastanın 133’ünde SARS-CoV-2 RT-PCR pozitif, 10’unda negatif olarak saptanmıştır. PCR negatif hastalarda COVID-19 tanısı toraks BT ve/veya özgül klinik bulgularla konulmuştur. COVID-19 tanısı alan hastaların 88’inde (%61.5) tüm kitlerle antikor saptanmış, 12’sinde (%8.3) hiçbir kitle antikor saptanmamıştır. Siemens

total Ig antikor kitinin, altı kitin arasında en yüksek duyarlılığa (%89.4) sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Çalışmaya dahil edilen kitlerin özgüllükleri %98-100 arasında değişmektedir (Tablo 1). Çalışılan kitlerin tekrarlanabilirlikleripozitif örnekler için kabul edilebilir sınırlar içindeyken, negatif serum örneklerinin tekrarlanabilirliği Atellica IM ve Euroimmun kitlerinde kabul edilebilir sınırların dışında bulunmuştur.

Çalışmada PCR ve semptom verilerine göre üç grup oluşturulmuştur (PCR+ Semptom+ PS grubu, PCR+ Semptom- P grubu, PCR- Semptom+ S grubu). PS grubunda 123/143 hasta, P grubunda 11/143 hasta, S grubunda 10/143 hasta bulunmaktadır. PS grubunda %96.7, P grubunda %63.6, S grubunda %70 oranında antikor pozitifliği saptanmıştır. PCR pozitif, asemptomatik hastaların olduğu S grubunda antikor pozitifliği %70 oranında görülmüştür.

Testler arası uyum Kappa 0.56-0.88 arasında değişmekte olup, aynı antijeni içeren kitler arası uyum iyi/çok iyi; farklı antijenleri içeren kitler arası uyum orta/iyi düzeylerde belirlenmiştir (Tablo 2).

### Sonuç

Çalışmaya dahil edilen Architect i4000SR (Abbott Diagnostics) IgG, Elecsys (Roche Diagnostics) total antikor, Access (Beckman Coulter) IgG, Atellica -IM (Siemens Healthcare Diagnostics) total antikor ve Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 S ve NCP antijen IgG ELISA kitlerinin tümü yüksek özgüllük değerleri sergilemiştir. Tüm kitlerin pozitif serumlar için tekrarlanabilirliği yeterli düzeydeyken negatif serumlar için Atellica-IM ve Euroimmun kitlerinin tekrarlanabilirliği düşük bulunmuştur. Düşük değerlere sahip negatif örneklerde görülen çok küçük değişimler CV değerlerinde büyük sapmalara neden olarak tekrarlanabilirlik sonuçlarının düşük olmasına neden olmuştur. Daha çok sayıda negatif örneklerle tekrarlanabilirlik çalışmasının gerçekleştirilmesi uygun olacaktır.



**Tablo 1. Mutasyonlar ve sıklıkları tablolar.**

| Kit                        | % Duyarlılık | % Özgüllük | Tekrarlanabilirlik (%CV) |         |             |         |
|----------------------------|--------------|------------|--------------------------|---------|-------------|---------|
|                            |              |            | Intra-assay              |         | Inter-assay |         |
|                            |              |            | Pozitif                  | Negatif | Pozitif     | Negatif |
| Abbott                     | %73.4        | %100       | 1.1                      | 0       | 1.3         | 9.2     |
| Beckman<br>Coulter         | %88.2        | %100       | 5.2                      | 17.3    | 3.5         | 13.3    |
| Euroimmun<br>(S antijen)   | %88.3        | %98        | 4.4                      | 0       | 10.1        | 34.6    |
| Euroimmun<br>(NCP antijen) | %76.1        | %98        | 2.2                      | 15.8    | 10.1        | 34.6    |
| Roche                      | %78.9        | %100       | 0.5                      | 1.6     | 4.4         | 2.0     |
| Siemens                    | %89.4        | %100       | 1.0                      | 43.3    | 0.8         | 107.0   |

**Tablo 2. Kitler arası uyumun Kappa değeri ile değerlendirilmesi.**

| Kitler arası<br>uyum | Beckman<br>Coulter | Euroimmun S   | Euroimmun<br>NCP | ROche         | Siemens       |
|----------------------|--------------------|---------------|------------------|---------------|---------------|
| Abbott               | %57 (P=0.001)      | %63 (P=0.001) | %85 (P=0.001)    | %74 (P=0.001) | %51 (P=0.001) |
| Beckman<br>Coulter   |                    | %80 (P=0.001) | %56 (P=0.001)    | %58 (P=0.001) | %88 (P=0.001) |
| Euroimmun S          |                    |               | %58 (P=0.001)    | %71 (P=0.001) | %83 (P=0.001) |
| Euroimmun<br>NCP     |                    |               |                  | %66 (P=0.001) | %56 (P=0.001) |
| Roche                |                    |               |                  |               | %63 (P=0.001) |

S antijenine karşı antikorları saptayan kitlerin duyarlılığı daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bu durum çalışmaya dahil edilen hastalardan serum örneklerinin tanı konmasını takiben en erken 14 gün sonra alınmasıyla ilişkili olabilir. Nükleokapsid antijenine karşı antikorlar hastalığın daha erken dönemlerinde daha yüksek oranda saptanırken, spike proteinine karşı gelişen antikorlar daha geç dönemlerde ortaya çıkmakta ve daha uzun süre pozitif kalmaktadır.

SARS-CoV-2'ye karşı gelişen antikor yanıtı değerlendirilirken hastanın kliniği, PCR sonucu, serum örneğinin hastalığın kaçınıcı gününde alındığı, olası temas öyküsü gibi bilgiler dikkate alınmalı, antikor pozitifliğinin kesin koruyuculuk anlamında olmadığı vurgulanmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** SARS-CoV-2, antikor kitleri

#### Kaynaklar

1. Kittel M, Muth M, Zahn I, et al. Clinical evaluation of commercial automated SARS-CoV-2 immunoassays. *Int J Infect Dis.* 2021;103:590-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.003>
2. Jääskeläinen AJ, Kuivanen S, Kekäläinen E, et al. Performance of six SARS-CoV-2 immunoassays in comparison with microneutralisation. *J Clin Virol.* 2020;129:104512. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104512>
3. Nicol T, Lefevre C, Serri O, et al. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J Clin Virol.* 2020;129:104511. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104511>

## Bazı Antiseptiklerin *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarına Karşı Etkinliklerinin Karşılaştırılması

Suna Sibel Gürpınar<sup>1</sup>, Duygu Öcal<sup>2</sup>, Müjde Eryılmaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

✉ drduygunil@hotmail.com

### Giriş

Sağlık hizmeti verilmesi sırasında bulunmayan bir enfeksiyon etkenine veya toksinlerine bağlı olarak ortaya çıkan lokal veya sistemik bir durum (advers etki) olarak tanımlanan sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon (SHİE)'ler özetle herhangi bir ortamda sağlık hizmeti sunumuyla ilişkili olan enfeksiyonlardır<sup>(1)</sup>. SHİE'ler dünya çapında sağlık hizmetlerinde en sık görülen yan etkilerdir ve önemli mortalite, morbidite nedenidir<sup>(2)</sup>. SHİE bulaşı eksojen veya endojen yollar ile olmaktadır. *Acinetobacter* türleri, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* gibi çoklu ilaç dirençli mikroorganizmalar sağlık çalışanı veya kontamine ekipmanlar aracılığıyla sonraki hastaya bulaşabilir<sup>(1)</sup>. *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa*, hastane enfeksiyonu etkeni olarak özellikle yoğun bakım ünitelerinden sıklıkla izole edilen bakterilerdir. Dış ortam koşullarına dayanıklı olmaları nedeniyle hastane ortamında uzun süre canlılıklarını koruyabilmektedirler. Bu bakteriler, günümüzde birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiş olup, tedavisinde sorun yaşanan mikroorganizmalar arasında yer almaktadırlar. Bu nedenle SHİE'lerin önlenmesi ve kontrolünde dezenfeksiyon antisepsi sterilizasyon uygulamaları, uygun antibiyotik kullanımı, yoğun bakımda ve ameliyathanelerde enfeksiyon kontrolü, izolasyon önlemleri, hastane temizliği, çamaşırhane hizmetleri, mutfak, havalandırma, atıklar, sürveyans ve el hijyeni gibi uygulamaların hepsi göz önünde bulundurulmalıdır<sup>(1,3)</sup>.

Klorheksidin glukonat (KHG) kullanım amacı ve endikasyonuna göre %0.02-4 konsantrasyon aralığında kullanılır ve aktivitesi pH 5.5-7.0 arasında maksimumdur. Klorheksidin bakterilerde hücre duvarını yıkar ve sitoplazmada presipitasyona yol açar. Antibakteriyel etkisi alkol ile kıyaslandığında çok yavaştır ancak kalıcılığı daha fazladır. Klorheksidin el hijyeni, cerrahi öncesi cilt dezenfeksiyonu, damar kateter takılması öncesinde ve kateter bakımında, yoğun bakım hastası banyosu gibi çeşitli klinik kullanım alanları bulunmaktadır<sup>(4,5)</sup>.

Klorheksidin etkinliği konsantrasyon ve pH bağımlı olmakla birlikte geniş spektrumlu bir ajan olup gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Ancak bazı gram negatif bakterilerde (*P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* ve *Serratia marcescens*) direnç gelişebilir. *Pseudomonas*'lara etkinliğinin fazla olmaması nedeni ile; stok solüsyonlarında bu bakterinin üremesini engellemek için düşük oranda

alkol ilave edilir. İn-vitro çalışmalarda HIV, sitomegalovirüs, influenza ve RSV gibi zarflı virüslere karşı güçlü etkinlik tespit edilmiştir, mikobakteriler, dermatofitler, rota, adeno ve enterovirüs gibi zarfsız virüsler üzerine etkisi zayıftır. Bakteri sporlarına etkisi yoktur<sup>(4,5)</sup>.

Alkoller sağlık hizmetlerinde yaygın olarak kullanılan antiseptiklerdir. İzopropanolün %60'lık konsantrasyonu "Avrupa El Dezenfeksiyonu Standardı EN 1500" için referans ajan olarak kabul edilir. Cilt üzerindeki mikroorganizmaları en hızlı öldüren ve sayısını en hızlı azaltan antiseptiklerdir. Alkol hızlı aktivite gösterir, ancak kalıcı etkisi yoktur. Etkinlik için 25-30 saniyebeklenmelidir. Protein denatürasyonu ve lipid tabakayı parçalayarak antimikrobiyal etki gösterirler. Protein denatürasyonunda su gerekli olduğu için yüksek konsantrasyonlarda (%96) antimikrobiyal etkinlik azalmaktadır. Etkinliğini konsantrasyon, ortamdaki protein miktarı, ısı ve mikrobiyal yük belirlemektedir. Bakterisidal, fungusidal, virüsidal ve mikobakterisidal aktivitelere sahiptir fakat sporosidal aktivitesi ve protozoon ookistlerine etkisi yoktur. Şu ana kadar alkollere karşı bakteriyel direnç bildirilmemiştir<sup>(4)</sup>.

Doğru antiseptikle, uygun konsantrasyon ve temas süresinde yapılan antisepsi, enfeksiyon kontrolü açısından çok önemlidir. Centers for Disease Control and Prevention, invaziv girişimlerden önce cilt dekontaminasyonu için KHG ve %70 alkol kullanımını önermektedir<sup>(6)</sup>. KHG derinin stratum corneum tabakasına bağlanarak kalıcı etkinlik sağlarken, uçucu bir madde olmasından dolayı alkolün kalıcı etkinliği yoktur. Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilmiş *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarına karşı tek ve kombine halde hazırlanan %2 KHG ve %70 2-propanol (%70 2-P)'ün etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Merkez Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilmiş 12 *A. baumannii* (6 yara, 3 idrar, 1 balgam, 1 doku, 1 trakeal aspirat) ve 25 *P. aeruginosa* (12 balgam, 6 yara, 4 trakeal aspirat, 2 idrar, 1 doku) izolatı dahil edilmiştir. İzolatların identifikasyonları, konvansiyonel yöntemler ve MALDI-TOF MS (BD, Bremen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin uygulanmasında ve sonuçların değerlendirilmesinde European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kullanılmıştır ve sonuçlar EUCAST'ın kriterlerine göre

duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak değerlendirilmiştir<sup>(7)</sup>. Kalite kontrol için *S. aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 standart suşları kullanılmıştır.

İzolatların test edilen antiseptiklere duyarlılığı, 30 saniye temas süresinde kantitatif süspansiyon testi ile gerçekleştirilmiştir<sup>(8,9)</sup>. Kantitatif süspansiyon testi uygulanmadan önce ilk olarak çalışmada kullanılan her antiseptik için uygun nötralizan belirlenmiştir. Kullanılacak olan nötralizanın uygunluğu için 900 µl antiseptik solüsyonuna 100 µl steril distile su eklendikten sonra vorteksle karıştırılıp, bir dakika beklenmiştir. Bu karışımdan 10 µl alınarak 990 µl nötralizan sistem (Ringer solüsyonu ile hazırlanmış %0.5'lik Tween 80 çözeltisi) içine eklenmiş ve daha sonra 10 µl bakteri süspansiyonu ilave edilerek vorteksle karıştırılmıştır. Ringer solüsyonu kullanılarak 10<sup>-5</sup>'e kadar dilüsyonları hazırlandıktan sonra her bir dilüsyondan 100 µl alınarak, triptik soy agara (TSA) ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve oluşan koloniler sayılarak, mililitrede koloni oluşturan birim (kob) olarak kaydedilmiştir. Steril distile kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Kontrol petrilere ile test petrilere arasında kob bakımından fark bulunmaması, nötralizanın uygun olduğunu göstermektedir.

Uygun nötralizan belirlendikten sonra test edilen antiseptiklerin etkisi, kantitatif süspansiyon testi ile belirlenmiştir. TSA besiyerinde bulunan bakteri kolonisi, 10 ml triptik soy buyyon (TSB) içeren tüpün içinde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra hücre peletleri TSB ile yıkanmıştır. TSB içinde bulunan bakteriler 0.5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır. 900 µl antiseptik solüsyonuna, 100 µl bakteri süspansiyonu eklendikten sonra 30 saniye beklenmiştir. Temas süresi sonunda karışımdan 10 µl alınarak, 990 µl nötralizan sistem içine eklenmiş ve 10<sup>-1</sup>'den 10<sup>-3</sup>'e kadar dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan 100 µl alınarak TSA üzerine yayma plak tekniği ile ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılmış ve mililitrede kob olarak belirtilmiştir. Redüksiyon oranı antiseptik etkisi olarak aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplanmıştır:

$\log_{10} \text{redüksiyon} = \log_{10} \text{preantiseptikli sayım} - \log_{10} \text{antiseptikli sayım}$

Değerlendirmede  $\geq 5 \log_{10}$  redüksiyon değerleri yeterli mikrobisidal aktivite belirtisi olarak kabul edilmiştir. Dilüent ve kontrol grubu olarak steril distile su kullanılmıştır. Her bir test bakterisi için işlem iki paralel olarak uygulanmıştır.

## Bulgular

*Acinetobacter baumannii* izolatlarının tümü siprofloksasine, trimetoprim/sulfametoksazole, imipeneme, mero-peneme, gentamisine ve netilmisine karşı dirençli bulunurken, 11 izolatın amikasinine, bir izolatın kolistinine karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının 15'inin piperasiline, 12'sinin siprofloksasine, 12'sinin seftazidime, dokuzunun imipeneme, dokuzunun piperasiline tazobaktama, yedisinin sefepime, sekizinin gentamisine, dokuzunun meropeneme, üçünün tobramisine, ikisinin amikasinine ve ikisinin kolistinine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

Paralel olarak iki tekrarlı yapılan nötralizan belirleme testi sonucunda; test petrilere ile kontrol petrilere arasında koloni büyüklüğü, büyüme oranı, kob sayıları bakımından fark olmadığı için Ringer Solüsyonu ile hazırlanmış %0.5'lik Tween 80 çözeltisi çalışmada kullanılan bütün antiseptikler için uygun nötralizan olduğuna karar verilmiştir.

Test edilen tüm antiseptiklerin (%2 KHG-%70 2-P ve %2 KHG+%70 2-P), 30 saniyelik temas süresinde, çalışmada kullanılan klinik *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarına karşı  $\log_{10}$  redüksiyon değerleri 5'den fazla olarak hesaplanmıştır. Test edilen antiseptiklerin tek (%2 KHG-%70 2-P) veya kombine (%2 KHG+%70 2-P) kullanımları arasında mikrobisidal etki açısından fark olmadığı görülmüştür.

## Sonuç

Bakterisidal etkinlik açısından %70 2-P/%2 KHG kombinasyonunun cilt antisepsisinde daha etkili olabileceği düşünülse de 30 saniye temas süresinde %2 KHG ve %70 2-P'ün tek ya da kombine kullanımı arasında fark olmadığı görülmüştür. Tedavisinde sorun yaşanan bu tür dirençli bakterilerin çeşitli antimikrobiallere karşı direnç profillerinin izlenmesi enfeksiyon kontrolü açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, antisepsi, klorheksidin glukonat, *Pseudomonas aeruginosa*

## Kaynaklar

1. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Süveyans Standartları, 2017. [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasicihastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Klavuzlar/Ulusal\\_Saglik\\_Hizmeti\\_Iliskili\\_Enfeksiyonlar\\_Surveyans\\_Standartlari\\_2017.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasicihastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Klavuzlar/Ulusal_Saglik_Hizmeti_Iliskili_Enfeksiyonlar_Surveyans_Standartlari_2017.pdf) (Erişim tarihi: Aralık 2020).
2. World Health Organisation. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide 2011. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80135/1/9789241501507\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80135/1/9789241501507_eng.pdf?ua=1) (Erişim tarihi: Aralık 2020).
3. Hastane öncesi acil sağlık hizmetlerinde enfeksiyon hastalıklarından korunma rehberi [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar\\_db/hastaliklar/SHIE/Rehber/HASH\\_Enfeksiyon\\_Hastaliklarndan\\_Korunma\\_Rehberi.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar_db/hastaliklar/SHIE/Rehber/HASH_Enfeksiyon_Hastaliklarndan_Korunma_Rehberi.pdf) (Erişim tarihi: Aralık 2020).
4. DAS. Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon Rehberi, Dezenfeksiyon Antisepsi Sterilizasyon Derneği, Ankara, 2019.
5. Kayaalp O. Antiseptikler ve dezenfektanlar. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Ankara. 1. Cilt, 12. baskı. 2009:307-14.
6. Rutala WA, Weber DJ, HICPAC. Centers for Disease Control and Prevention; Atlanta (GA): 2008. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. [http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/Disinfection\\_Nov\\_2008.pdf](http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008.pdf) (Erişim Tarihi: Aralık 2020).
7. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. (Version 9.0) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019.
8. European Committee for Standardization. EN 1040, Chemical disinfectants and antiseptics-quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements. (Phase 1). Brussels, Belgium: European Committee for Standardization; 2005.
9. Eryılmaz M, Akın A, Arıkan A. Bazı dezenfektanların nozokomiyal enfeksiyon etkeni *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus* spp. izolatları üzerine olan etkilerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2011;45(3):454-60.

## COVID-19 Antikor Yanıtının Üç Farklı Test ile Değerlendirilmesi

Özgür Appak<sup>1</sup>, Abdurrahman Gülmez<sup>2</sup>, Irmak Güzel<sup>3</sup>, Naciye Sinem Gezer<sup>4</sup>,  
Özlem Gürsoy Doruk<sup>5</sup>, Osman Alparslan Ergör<sup>6</sup>, Nuran Esen<sup>3</sup>, Ayça Arzu Sayiner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>İstanbul Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul

<sup>3</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>4</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>5</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

<sup>6</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İzmir

✉ ozgur.appak@deu.edu.tr

### Giriş

SARS-CoV-2 tanı testleri virüsü direkt olarak tespit eden nükleik asit testleri (NAT) ile viral antijen testleri ve konağın virusa karşı geliştirdiği bağışık yanıtı saptayan serolojik testlerden oluşmaktadır<sup>(1)</sup>. Real time RT-PCR (RT-qPCR) testi, SARS-CoV-2'yi saptamak için altın standart yöntemdir. Bununla birlikte, numune alma ve taşıma, RNA ekstraksiyonu, RT-qPCR yöntemi ve kişideki virüs dinamikleri gibi nedenlerle NAT'de yalancı negatiflikler söz konusu olabilmektedir<sup>(2)</sup>. Serolojik testlerinin yapılması nispeten daha kolaydır ve hızlı sonuç alınmaktadır. NAT ile karşılaştırıldığında daha az teknik bilgi ve ekipman ihtiyacı nedeniyle birçok temel laboratuvarı uygulanabilmektedir. Serum ve/veya plazma örnekleri ile çalışıldığında laboratuvar personeli için daha az risk oluşturmaktadır. Artan talep nedeniyle birçok üretici firma, farklı tekniklere dayalı antikor testleri geliştirmiş ve bunlar sınırlı klinik numune ile yapılan çalışmalar sonucu piyasaya sürülmüştür. Antikor testlerinin sahadaki performansını ve doğruluğunu değerlendiren çalışmalara gereksinim vardır.

Bu çalışmada, COVID-19 antikorları üç farklı ticari antikor testi ile araştırılmıştır. Antikor testlerinin performanslarının belirlenmesi ve SARS-CoV-2 RT-qPCR, bilgisayarlı akciğer tomografi (BT) ve biyokimyasal parametrelerin antikor yanıtına etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

COVID-19 Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 31 Mart 2020-17 Mayıs 2020 tarihleri arasında COVID-19 şüphesiyle gönderilen nazofarengeal sürüntü örneklerinde SARS-CoV-2 real time RT-PCR (RT-qPCR) çalışılan ve aynı zamanda plazma örneklerinde antikor testi yapılan 129 hastanın sonuçları incelendi. PCR testinin üzerinden  $\geq 14$  gün (14-43 gün, ortalama 25.45 gün) süre geçen 88 olgu çalışmaya alındı.

Antikor tespiti üç ayrı ticari test ile yapıldı. Bunların ikisi hızlı immünokromatografik test (Hotgen, Beijing Hotgen Biotech, Çin ve Türklab, İzmir, Türkiye), diğeri ise ELISA esaslı test (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika, Lübeck, Almanya) idi. Solunum yolu örneklerinde SARS-CoV-2 RNA tespitinde, "COVID-19 RT-qPCR Tespit Kit" (Bio-speedy, An-

kara, Türkiye) kullanıldı. "Cycle threshold" (Ct) değeri  $< 40$  olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

Hastaların biyokimyasal parametrelerinden prokalsitonin, CRP ve D-dimer düzeyleri ile toraks BT sonuç raporları değerlendirmeye alındı. Testler sırasıyla ADVIA Centaur B-R-A-H-M-S PCT, Beckman Coulter ve Siemens BCS XP sistemleri ile çalışıldı. Hastaların toraks BT değerlendirmesinde, "Radiological Society of North America" (RSNA) nın COVID -19 için önerdiği sınıflamaya göre "tipik, atipik, belirsiz, negatif" olarak yapıldı<sup>(3)</sup>. Tipik COVID-19 görünümü saptandığında BT bulgusu var, diğerleri saptandığında BT bulgusu yok olarak değerlendirildi.

Çalışma üniversitemizin Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu onayı (15/06/2020, karar no:2020/13-26) ile gerçekleştirildi. T.C. Sağlık Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün, <https://bilimselarastirma.saglik.gov.tr/> adresinden ve Uygulama ve Araştırma Hastanesi Başhekimliği'nden (22.05.2020 tarih ve 72292585-00.99-E.42637 sayı ile) gerekli çalışma izinleri alındı.

### Bulgular

Çalışmanın yapıldığı 31 Mart - 17 Mayıs 2020 döneminde 6983 nazofarengeal sürüntü örneği SARS-CoV-2 RT-qPCR ile değerlendirildi. Bunların %9.9'da (693/6983) pozitiflik saptandı. RT-qPCR çalışılan 129 hastanın plazma örneklerinde antikor yanıtı incelendi. PCR testinin üzerinden  $\geq 14$  gün (14-43 gün) geçen 88 olgu çalışmaya dahil edildi.

Olguların %48.9'u (43/88) erkek, %51.1'i (45/88) kadın ve ortalama yaş  $37 \pm 12.74$  idi (median yaş=35). Hastaların %77.3'ü (68/88) çalışan sağlıklı polikliniğinden gelen olgulardan oluşmaktaydı. Hastaların 41/88'de (%46.6) RT-qPCR pozitifliği saptandı. Bunlardan 17'sinde (%41.4) en az iki test ile antikor pozitifliği varken, bir hastada sadece Euroimmun testi ile antikor saptandı. Viral RNA negatif olan 47 hastanın 45'de (%95.7) antikor saptanmaz iken iki hastada sadece Euroimmun testi ile pozitiflik bulundu. Türklab testinde reaksiyon saptanan örneklerin tümünde IgM ve IgG pozitifliği birlikte idi. Cinsiyet ve yaşın antikor pozitifliğine etkisi incelendiğinde Hotgen ( $p=0.010$ ) ve Euroimmun testinde ( $p=0.042$ ) erkek cinsiyette antikor pozitifliği anlamlı olarak yüksek bulunurken, Türklab testinde ( $p=0.162$ )

**Tablo 1. COVID-19 antikor yanıtının üç farklı test ile değerlendirilmesi.**

|                                                                  |         | RT-PCR      |             |
|------------------------------------------------------------------|---------|-------------|-------------|
|                                                                  |         | Pozitif     | Negatif     |
|                                                                  |         |             |             |
| <u>Hotgen-Türklab-Euroimmun- <math>\geq 2</math> antikor (+)</u> | Pozitif | 15-15-18-17 | 0-0-2-0     |
|                                                                  | Negatif | 26-26-23-24 | 47-47-45-47 |
| Toplam                                                           |         | 41          | 47          |

**Tablo 2. Hızlı antikor testlerinin Euroimmun'a göre duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri.**

| Hotgen/Turklab | Euroimmun |         |
|----------------|-----------|---------|
|                | Pozitif   | Negatif |
|                |           |         |
| Pozitif        | 15        | 0       |
| Negatif        | 5         | 68      |
| Toplam         | 20        | 68      |

cinsiyetin etkisi gözlenmedi. Yaşın antikor pozitifliğine etkisi değerlendirildiğinde, antikor pozitif hastaların yaş ortalamasının, antikor negatiflerden anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı. Ortalama yaş, Hotgen testi pozitiflerde  $43.47 \pm 15.89$  ( $p=0.042$ ), Türklab testi pozitiflerde  $46.73 \pm 20.42$  ( $p=0.032$ ) idi. Euroimmun testinde de antikor pozitiflerde yaş ortalaması daha yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0.075$ ). Antikor pozitifliği kriteri olarak üç antikor testinden ikisinde pozitiflik olması esas alındığında antikor pozitifliği cinsiyetten bağımsız ( $p=0.060$ ) iken, yaş ortalaması antikor pozitiflerde anlamlı olarak ( $p=0.047$ ) daha yüksek saptandı.

En az iki test ile antikor sonucu pozitif saptananların ( $n=17$ ) tümünde viral RNA pozitif idi. Antikor pozitifliği ile PCR testinde saptanan Ct değeri arasındaki ilişki incelendiğinde, Ct değeri  $\leq 18.92 \pm 7.87$  ( $p<0.000$ ) ve viral Ct/İK Ct oranı  $\leq 1.01 \pm 0.47$  olanlarda ( $p=0.014$ ) antikor pozitifliği anlamlı olarak daha yüksek oranda saptandı.

RT-qPCR test pozitifliği esas alındığında Hotgen ve Turklab antikor testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri aynı olup, duyarlılık %36.6, özgüllük %100 olarak hesaplandı. İki hızlı immünokromatografik test ile 15'er hastada antikor pozitifliği saptandı. Bunların 13'ü aynı hasta iken, farklı dört hastanın ikisi Hotgen için pozitif, diğer ikisi Türklab için pozitif. İmmünokromatografik testler ile antikor saptanan tüm hastalarda ELISA ve RT-qPCR test sonuçları da pozitif. Euroimmun testinin ise duyarlılığı %43.9, özgüllüğü ise %95.7 idi. İki hastada PCR negatif olmasına rağmen Euroimmun testi ile antikor pozitifliği saptandı. Bu iki olgu pandemi / acil servis polikliniğine başvuran hastalar olup, birinin Euroimmun IgG S/CO değeri 2.04, toraks BT ve biyokimya parametreleri normal bulundu. Diğer olguda ise S/CO değeri 1.48 olup, toraks BT ve biyokimya testlerinin istemi yoktu.

RT-qPCR esas alındığında antikor testlerinin pozitif prediktif değerleri (PPD) Hotgen ve Turklab için %100, Euroimmun için %90, negatif prediktif değerleri (NPD) Hotgen ve Turklab için %64.4, Euroimmun için %66.2' idi. En az iki antikor pozitifliği esas alındığında ise RT-qPCR'a göre duyarlılık %41.5, özgüllük %100, PPD %100, NPD %66.2 olarak belirlendi (Tablo 1). Euroimmun ELISA test sonucu esas alındığında, Hotgen ve Turklab testlerinin her ikisi için, duyarlılık %75, özgüllük %100, PPD %100, NPD %93.15 idi (Tablo 2).

Çalışma grubundaki 88 olgunun %53.4'ünde (47/88) prokalsitonin, %59'unda (52/88) D-dimer ve %63.6'sında (56/88) CRP, %58'ünde (51/88) toraks BT verileri mevcutt. En az iki antikor testi pozitif saptanan 17 hastanın üçünde toraks BT sonucu Covid-19 için tipik saptanırken, antikor ve PCR testi negatif bir hastada da toraks BT tipik olarak değerlendirildi ( $p=0.007$ ). Çalışmaya dahil edilen biyokimyasal parametreler olan CRP, D-dimer ve prokalsitonin değerleri ile antikor ve RT-qPCR sonuçları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Antikor sonuçlarını etkileyen bağımsız değişkenler lojistik regresyon analizi ile değerlendirildi. Hastalarda BT bulgusu varlığının antikor sonuçlarının pozitif olmasını anlamlı olarak 13.62 kat etkilediği saptandı. Aynı yöntem ile RT-qPCR sonuçlarını etkileyen bağımsız değişkenler incelendiğinde erkek cinsiyetin PCR sonuçlarını pozitif yönde 4,725 kat etkilediği saptandı.

RT-qPCR pozitif ve antikor testi yapılan 40/41 olgunun klinik verilerine ulaşıldı. Olguların semptomlarının (ateş, baş/boğaz ağrısı, öksürük, nefes darlığı, tat/koku alamama, kas ağrısı, ishal) olup olmadığı belirlendi. PCR ve  $\geq 2$  test ile antikor pozitif 17 olgunun 16'sında (%94) en az bir semptom vardı. PCR pozitif antikor negatif olguların ise 13/23'de (%56.5) semptom saptandı ( $p=0.01$ ).

### Sonuç

Çalışmamızda ağırlığını (%77.3) sağlık çalışanlarının oluşturduğu bir grupta, RT-qPCR testinden  $\geq 14$  gün sonra antikor yanıtı iki hızlı immünokromatografik ve bir IgG-ELISA testi ile değerlendirilmiştir. RT-qPCR pozitiflerde antikor pozitifliği %41.4 oranında saptanmıştır. Biri total değeri IgM/IgG ayırımı yapabilen iki adet immünokromatografik testin performansları arasında bir fark bulunmamıştır. IgG ELISA testinin duyarlılığı, immünokromatografik testlerden daha yüksektir. İmmünokromatografik testlerin ELISA testine göre duyarlılıkları %75 ve özgüllükleri %100'dür. İmmünokromatografik testlerin yüksek özgüllüğü, pozitif sonuca



güvenilebileceğini, düşük duyarlılığı ise negatif sonucun enfeksiyonu dışlama kriteri olamayacağını göstermektedir. Hızlı immünokromatografik testlerde negatif sonuç alınmasına rağmen antikor varlığının daha duyarlı bir yöntem olan ELISA ile saptanabileceği görülmüştür. Antikor yanıtı ile erkek cinsiyet, yaş, toraks BT bulgusu ve düşük PCR Ct değeri arasında korelasyon saptanmıştır.

**Teşekkür:** Antikor kitlerini koşulsuz ve ücretsiz olarak temin eden Euroimmun ve Turklab firmalarına teşekkür ederiz. Çalışmanın tasarımı ve sonuçlarından çalışma ekibi sorumlu olup, herhangi bir dış etki söz konusu değildir.

**Anahtar kelimeler:** SARS-CoV-2, tanı, seroloji, antikorlar

#### Kaynaklar

1. Patel R, Babady E, Theel ES, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. mBio. 2020;11(2):e00722-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00722-20>.
2. Li J, Ye G, Chen L, Wang J, Li Y. Analysis of false-negative results for 2019 novel coronavirus nucleic acid test and related countermeasures. Chinese J Laborat Med. 2020;43:E006.
3. Simpson S, Kay FU, Abbata S, et al. Radiological Society of North America Expert Consensus Statement on Reporting Chest CT Findings Related to COVID-19. Endorsed by the Society of Thoracic Radiology, the American College of Radiology, and RSNA - Secondary Publication. J Thorac Imaging. 2020;35(4):219-27. <https://doi.org/10.1097/RTI.0000000000000524>

## Kriptokok ve CMV Menenjitlerinin FilmArray Menenjit/Ensefalit Paneli ile Saptanması: İki Olgu Sunumu

Furkan Polat<sup>1</sup>, Melike Yaşar<sup>1</sup>, Dilek Yeşim Metin<sup>1</sup>, Ayşın Zeytinoğlu<sup>1</sup>, Hüsnü Pullukçu<sup>2</sup>, Mete Akısü<sup>3</sup>, Deniz Akyol<sup>2</sup>, Candan Çiçek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

✉ drfurkanpolat24@gmail.com

### Giriş

Bu çalışmada diğer laboratuvar yöntemlerine göre daha kısa sürede sonuçlanan hızlı moleküler yöntem kullanılarak, enfeksiyon hastalıklarının tanısında hızlı sonuç almanın olgu yönetimini etkileyip etkilemediği araştırılmıştır.

### Olgu 1

*Cryptococcus* tür kompleksi bazidiyomiset sınıfında yer alan maya mantarıdır. Bunlar santral sinir sisteminin mantar enfeksiyonlarının en sık görülen etkenleridir<sup>(1)</sup>. *Cryptococcus neoformans* tüm dünyada yaygın olup daha çok bağışık baskılı hastalarda fırsatçı enfeksiyona yol açarken, *Cryptococcus gattii* ise tropikal ve subtropikal bölgelerde bağışıklık sistemi normal kişilerde enfeksiyon oluşturan primer etkindir<sup>(2)</sup>. Bu maya mantarı solunum yolu ile vücuda alınır, sağlıklı bireylerde hafif ya da inaparan enfeksiyon şeklinde görülürken, bağışıklığı baskılanmış kişilerde kan beyin bariyerini aşarak meningoensefalite neden olur<sup>(3)</sup>. Tanı BOS örneğinin mikolojik incelemesi ile konur. BOS örneğinin çini mürekkebi ile direkt mikroskopik incelemede kapsüllü maya mantarının görülmesi ve kültürde üretilmesi altın standarttır. Ayrıca tanıda kapsül polisakkarit antijeninin araştırılmasının duyarlılığı yüksektir. Kapsül polisakkarit antijenini saptamaya yönelik lateks aglütinasyon, ELİSA ve immunokromotografik temelli çok sayıda ticari kit mevcuttur. Son yıllarda hızlı moleküler yöntemler tanıda önemli rol oynamaktadır.

38 yaşında erkek hasta Ege Üniversitesi Acil servisine bir haftadır geçmeyen baş ağrısı şikayeti ile başvurdu. Fizik muayenede meninks irritasyon bulguları olmayan hastanın dengersiz yürüyüş dışında anormal bir bulgusu bulunamadı. TA 150/80 mmHg, nabız 65/dk, vücut ısı 38.3°C olarak saptandı. Biyokimyasal testlerinde CRP 47.5 mg/dl, trombosit sayısı 140 bin/ $\mu$ L dışında anormal bir değer saptanmadı. Acil serviste çekilen kranial MR "Ensefalit lehine bulgu izlenmedi, sol serebral hemisfer lateral ventrikül atrium komşuluğunda beyaz cevherde hiperintens odak izlenmiştir." şeklinde raporlandı. PA akciğer filminde sol akciğer alt lobta yer yer birleşme eğiliminde olan bazılarında kavitasyon sahaları içeren konsolidasyon sahaları izlendi. Hastanın kanı bir hemşire ile temas ettiği için iş kazası kodlaması ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına geldi. Serolojisinde Anti-HIV pozitifliği saptanan hastanın Anti-HIV 1+2 (p24) ve doğrulama testinde

HIV 1 pozitifliği saptandı. Daha sonrasında bakılan HIV RNA testi yüksek düzeyde pozitif saptandı. BOS biyokimyasında glukoz 47 mg/dL, protein 67 mg/dL idi. Bakteriyolojiye gönderilen BOS örneğinde direk bakısında 60 lökosit/mm<sup>3</sup> ve her sahada 1-2 eritrosit görüldü. Eş zamanlı gönderilen BOS örneğinde FilmArray M/E Paneli ile *C. neoformans*/*C. gattii* saptandı. Kriptokok antijen testi ile pozitiflik doğrulandı. Ardından çini mürekkebi ile yapılan mikroskopik incelemede kapsüllü maya hücreleri görüldü. Klinisyene panik bildirimi yapıldı. Hastaya Amfoterisin B+ Flukonozal tedavisi başlandı. Hastanın BOS örneğinin laboratuvara kabulü ile klinisyene panik bildirimi arasında geçen süre 3 saat 46 dakika olarak hesaplandı. Üç gün sonra diğer BOS örnekleri ile eş zamanlı olarak mikoloji laboratuvarına gelen BOS örneğinin kültüründe üreme oldu. Üreyen mikroorganizma MALDITOF-MS (Biomeriux, Fransa) ile *C. neoformans* olarak tanımlandı. Tedavisinin ardından hasta kontrollere gelmek üzere taburcu edildi.

### Olgu 2

Sitomegalovirüs (CMV), dünya çapında endemik olan herpesvirüs grubunda bulunan bir DNA virüsüdür. Tüm herpesvirüsler gibi CMV de dokularda latent olarak kalabilme, reaktivasyon özelliklerine sahiptir ve bu nedenle ömür boyu süren bir enfeksiyondur<sup>(4)</sup>.

Konjenital CMV enfeksiyonu, canlı doğan bebeklerin %2'sini etkileyen yaygın bir prenatal viral enfeksiyon olduğundan<sup>(5)</sup> önemli bir tıbbi sorundur ve ciddi neonatal ve çocukluk çağı sekellerine yol açabilir. Yenidoğanda hiçbir semptom görülmesi dahi ilerleyen yıllarda sekeller bırakabilmesi açısından tanı konulması önemlidir<sup>(6)</sup>. Maternal primer CMV enfeksiyonu sırasındaki gebelik yaşı, intrauterin CMV bulaşma oranını ve doğumdaki semptomları ve uzun vadeli sekelleri etkileyen önemli bir faktör olarak kabul edilir. Gebeliğin ilk trimesterinde görülen primer CMV enfeksiyonlarında bu riskin daha fazla olduğu gösterilmiştir<sup>(7)</sup>.

On dokuz günlük kız bebek uzamış sarılık ve nöbet öyküsü ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvurdu. Sağlıklı anneden gebeliğin 37.haftasında 1830 gr olarak doğan bebeğin IUGR öyküsü mevcuttu. Annenin gebeliği sırasında yapılan testlerde oligohidroamniyozu saptanırken herhangi bir uteroplasental yetmezlik bulgusu bulunmadı. Diğer kardeşlerinde bu şekilde bir öykü yoktu. Alınan ayrıntılı anamnezde uzamış sarılığı açıklayabilecek bir

öyküsü mevcut değildi. Yapılan fizik muayenede nabız:133 /dk, solunum sayısı 50 /dk, kan basıncı 97/59 mmHg, ateş 36.8°C olarak saptandı. Fizik muayenede hepatosplenomegali dışında anormal bir bulgu yoktu. Biyokimyasal testlerinde kanda direkt bilirubin 18 mg/dL, total bilirubin 21mg/dL, Hb 7.4 g/dL, platelet sayısı: 28 bin/ $\mu$ L olarak saptandı. Batın USG'sinde hepatosplenomegali doğrulandı. Kranial BT'sinde kalsifiye alanlar görülen hastadan TORCH enfeksiyonları açısından seroloji laboratuvarına örnek gönderilmesi önerildi. Gönderilen kan örneklerinde Anti CMV IgM zayıf pozitif (1.160 S/CO), CMV IgG pozitif (241.9 S/CO) saptandı. BOS biyokimyasında glukoz 43 mg/dL, protein 216 mg/dL, albumin 113 mg/dL olarak bulundu. Gönderilen BOS örneğinden FilmArray M/E Panel'inde CMV DNA pozitif saptandı. Hasta CMV ensefaliti olarak değerlendirilip gansiklovir tedavisi başlandı. Hastanın BOS örneğinin laboratuvara kabulü ile klinisyene panik bildirimi arasındaki süre 2 saat 45 dakika olarak belirlendi. Hastaya hızlı tanı konulmasına karşın hasta dış merkezde vakit kaybettiği için bir gün sonra exitus oldu.

**Anahtar kelimeler:** Hızlı sendromik panel, menenjit/ensefalit, sitomegalovirüs, *C. neoformans*

## Kaynaklar

1. Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus*. From human pathogen to model yeast. Washington (DC): ASM Press; 2011
2. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(8):873-81. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
3. Elsegeiny W, Marr KA, Williamson PR. Immunology of cryptococcal infections: developing a rational approach to patient therapy. *Front Immunol*. 2018;9:651. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00651>
4. Alford C, Britt W. Cytomegalovirus. In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, et al (eds). *Virology*. 2.baskı 1990:1981-2010.
5. Ornoy A, Diav-Citrin O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2006;21(4):399-409. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.02.002>
6. Pass RF, Arav-Boger R. Maternal and fetal cytomegalovirus infection: diagnosis, management, and prevention. *F1000Res*. 2018;7:255. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12517.1>
7. Enders G, Daiminger A, Bäder U, et al. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol*. 2011;52(3):244-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.07.005>

# Anti-Nükleer Antikor Test Sonuçlarının İndirekt İmmüno Floresan Antikor ve İmmünoblot Yöntemiyle Birlikte Değerlendirilmesi

Yasemin Cezaroğlu, Server Yağcı, Mümtaz Cem Şirin, Buket Cicioğlu Arıdoğan, Emel Sesli Çetin

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta

✉ server.yagci@yahoo.com

## Giriş

Otoimmün hastalıkların tanı ve takibinde çekirdek, çekirdekçik, sitoplazma ve hücre yüzey antijenlerine karşı sentezlenen antinükleer antikorlar (ANA) kullanılmaktadır. Özellikle Sistemik lupus eritematozus (SLE), Sjögren sendromu ve dermatomyozit gibi sistemik otoimmün romatizmal hastalıklarda önemli bir tarama testi olan ANA indirekt immüno floresan (IIF) testi altın standart kabul edilmektedir<sup>(1)</sup>. IIF testi ile ANA pozitifliği saptandığında, özgül ANA komponentlerine karşı antikor varlığının ayrı ayrı araştırılması önerilmektedir. Otoimmün hastalıkların tanısında Enzim immünassay, Kemilüminesans mikropartikül immünassay, Multiple mikrobocuk immünassay ve İmmünoblot gibi birçok ticari testler mevcuttur. İmmünoblot testleri otoantikorların özgül olarak tespit edilmesinde kolay uygulanabilirliği ve otomatize olarak değerlendirilebilmeleri açısından son yıllarda daha da önemli testler haline gelmiştir<sup>(1)</sup>.

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na eş zamanlı gönderilen örneklerle yapılan ANA IIF testi ve ANA immünoblot test sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesini ve ANA IIF testi pozitif bulunan olguların IFA patern profili ve bu olgular arasında ANA immünoblot test pozitifliğinin dağılımının incelenmesini amaçlamaktadır.

## Gereç ve Yöntem

Ekim 2019-Ekim 2020 yılları arasında otoimmün hastalık şüphesiyle laboratuvara gönderilen örneklerden eş zamanlı ANA IIF ve ANA immünoblot testi çalışılan 1094 hasta serumu sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir.

Serum örnekleri çalışma yapılana kadar -20°C'de bekletilmiştir. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda hasta serumları 1/100 oranında sulandırılarak HELMED Blot (AESKU.SYSTEMS, Almanya) otomatize cihazı ile çalışılmış ve değerlendirme yapılmıştır.

ANA IIF testi doku olarak HEP-2 hücrelerini içeren AESKUSLIDES ANA-HEP-2 (Aesku Diagnostics, Almanya) kiti ile çalışılmıştır. Hazırlanan preparatlar 400x büyütmede floresan mikroskopunda (Aesku Diagnostics, Almanya) değerlendirilmiştir. Sonuçlar slaytlarda izlenen floresan şiddetine göre kalitatif olarak (zayıf pozitif, +, ++, +++) ve paternlerine göre raporlanmıştır.

ANA immünoblot, AESKUBLOTS ANA-17 Comp (Aesku Diagnostics, Almanya) kiti kullanılarak 17 farklı parametre (U1 snRNP, Sm/snRNP, Smd1, PCNA, dsDNA, Rib-P, nükleosom, histones, SS-A, SS-B, CENP-B, Scl-70, Jo-1, Scl-70, Mi-2 ve Ku) çalışılmıştır. Çalışılan 17 parametre için ayrı ayrı olmak üzere sonuçlar; negatif veya pozitif (zayıf pozitif, ++, +++) şeklinde kategorize edilerek rapor edilmiştir.

## Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 1094 hasta örneğinin 662'si (%60.5) kadın, 432'si (%39.5) erkek hastalara aitti. ANA IIF testi ile serum örneklerinin 722'si (%66) negatif, 372'si (%34) pozitif olarak saptanmıştır. Çalışmada en sık Nöroloji (n=109), Romatoloji (n=90) ve Gastroenteroloji (n=51) bölümlerinden gönderilen örneklerde ANA pozitifliği saptanmıştır.

ANA pozitif örneklerde sırasıyla en sık sitoplazmik (138; %37.1), homojen (81; %21.8), granüler (72; %19.4), miks (37; %60) ve diğer paternler (yoğun ince benekli, nükleer dot, nükleer membran, sentromer, nükleolar) (44; %11.8) saptanmıştır. ANA pozitif bulunan 372 örneğin floresans seviyelerine göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. ANA pozitif örneklerin floresans seviyelerinin dağılımı.

| Floresans seviyesi | Sayı | Oran  |
|--------------------|------|-------|
| Zayıf pozitif      | 105  | %28.2 |
| +                  | 142  | %38.2 |
| ++                 | 87   | %23.4 |
| +++                | 38   | %10.2 |

ANA pozitif örneklerin immünoblot testlerinde en az bir banda karşı pozitiflik saptanmış hasta sayısı 84 (%22.6) olup hastaların 52'sinde tek bant, 32'sinde birden fazla bant pozitifliği tespit edilmiştir. Toplam bant pozitifliği ise 141 olup en sık tespit edilenler sırasıyla SS-A (%65.5), dsDNA (%26.2) ve nükleozom bantları (%19) idi.

Diğer taraftan, ANA negatif bulunan hastaların 68'inde (%9.4) ANA immünoblot testinde en az bir banda karşı pozitiflik görülmüş ve sırasıyla en sık SS-A, dsDNA ve nükleozom bantlarında pozitiflik saptanmıştır. ANA immünoblot pozitifliklerinin ANA paternlerine göre dağılımları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. ANA immüno blot bant pozitifliği saptanan hastalarda (n=84) ANA IIFA patern dağılımı.

| ANA IIF boyanma Paternleri | ANA İmmüno blot Bant Profilleri |      |       |           |        |        |        |       |      |       |        |
|----------------------------|---------------------------------|------|-------|-----------|--------|--------|--------|-------|------|-------|--------|
|                            | SS-A                            | SS-B | dsDNA | Nükleozom | Histon | SM/RNP | Scl-70 | Rib-P | Jo-1 | Diğer | Toplam |
| Sitoplazmik (n=138)        | 12                              | 4    | 4     | 3         | 1      | 2      | 1      | 2     | 2    | 0     | 31     |
| Homojen (n=81)             | 3                               | 0    | 7     | 6         | 1      | 1      | 3      | 1     | 0    | 1     | 23     |
| Granüler (n=72)            | 17                              | 3    | 5     | 1         | 2      | 1      | 1      | 3     | 0    | 0     | 33     |
| Miks paternler (n=37)      | 16                              | 5    | 3     | 4         | 3      | 3      | 1      | 2     | 0    | 0     | 37     |
| Diğer paternler (n=44)     | 7                               | 2    | 3     | 2         | 1      | 0      | 2      | 0     | 0    | 0     | 17     |
| Toplam (n=372)             | 55                              | 14   | 22    | 16        | 8      | 7      | 8      | 8     | 2    | 1     | 141    |

## Sonuç

Kadın hastaların ANA pozitiflik oranının (245; %66) erkek hastalara göre daha yüksek saptanması literatür ile uyumlu bulunmuştur<sup>(2-3)</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda otoimmün hastalık şüphesi ile IIF testi uygulanan hasta örneklerinde ANA pozitiflikleri %19.4-33.3 olarak bildirilmiştir<sup>(3-5)</sup>. Çalışmamızda benzer hastalar için ANA pozitiflik oranı ise %34 olarak bulunmuştur. Bu oran ülkemiz verileri ile uyumlu olmakla beraber zayıf pozitif (%28.2) ve (+) (38.2) olarak bildirilen pozitifliklerinin yüksek oranı dikkat çekicidir. Düşük titre pozitifliklerin %10-15 oranında sağlıklı bireylerde görülebildiği bilinmektedir<sup>(1)</sup>.

Çalışmamızda IIF testi ile en sık görülen patern benzer çalışmalardan farklı bulunmuştur. Karakeçe ve ark.nın<sup>(4)</sup> çalışmasında IIF ile en sık granüler (%30.1) ve nükleolar (%16.2), Aktar ve ark.nın<sup>(5)</sup> çalışmasında ise yine granüler (%39.8) ve nükleolar (%20.9) paternler en sık olarak gözlenmiştir. Çalışmamızda ise en sık sitoplazmik (%37.1) ve homojen (%21.8) paternler saptanmıştır. Otoimmün hastalıkların tanısında ANA IIF testi altın standart kabul edilmekle birlikte testin sonucunu etkileyen pre-analitik, analitik ve post-analitik pek çok faktör bulunmaktadır. Mikroskopik değerlendirme subjektif olduğundan, laboratuvarlar arası ve laboratuvar içi standardizasyonu sağlamak zordur<sup>(1)</sup>. Çalışmamızdaki patern dağılım oranlarının diğer çalışmalardan farklı olması buna bağlı olabilir. Ayrıca çalışmamızdaki ANA pozitif serum örneklerinin en fazla nöroloji bölümünden gönderilen hastalara ait olduğu dikkati çekmektedir. Nöroloji kliniklerinde, ANA testi nörolojik hastalıklar içerisinde özellikle demiyelinizan hastalık ayırıcı tanısında, polinöropati ya da myopatilerde ve genç yaş serebrovasküler olgularda etyolojiyi araştırmak amacı ile sıklıkla istenmektedir. Solomon ve ark.<sup>(6)</sup> multipl skleroz (MS) hastaları-nın %25'inde ANA pozitifliği olduğunu, bunun MS ile SLE ayırıcı tanısında önem taşıdığını belirtmiştir. Ancak nöroloji kliniklerinde ANA pozitif olan hastaların etiyolojisine bakıldığında, ANA incelemesinin gerekli olmayacağı farklı hasta gruplarının olduğu ve bunun da

ANA testinin belli bir algorithmden bağımsız olarak istenmiş olması ile açıklanabileceği vurgulanmıştır<sup>(7)</sup>.

Çalışmamızda ANA IIF testi ile pozitif saptanan 372 hastanın 84'ünde (%22.6) immüno blot ile bant pozitifliği saptanmıştır. Afşar ve ark.nın<sup>(8)</sup> çalışmasında ANA IIF testi ile pozitif saptanan 215 hastanın 171'inde (%79.5), Yumuk ve ark.nın<sup>(9)</sup> yaptığı çalışmada IIF pozitif 208 hastanın 126'sında (%60.5), Berkem ve ark.nın<sup>(10)</sup> çalışmasında 88 IIF pozitif örneğin 29'unda (%32.9) immüno blot ile bant pozitifliği saptanmıştır.

En sık saptanan sitoplazmik paternde en sık immüno blot profilinin SS-A olması gözden kaçırılmış bir ANA pozitifliğine veya yalancı immüno blot pozitifliğine bağlı olabileceği düşünülmüştür. İkinci sıklıkta tespit edilen homojen paternde ise en sık dsDNA ve nükleozom bantlarının saptanması ANA pozitif hastalarda homojen boyanmada en sık saptanan antikorlar olduğu bilgisi ile uyumlu bulunmuştur<sup>(1)</sup>. Yakın zamanlı bir çalışmada sağlıklı kontrollerde immüno blot ile en sık olarak anti-SSA ve anti-SSB antikorları gözlenmiştir<sup>(11)</sup>. Çeşitli çalışmalar, özellikle anti-SSA antikorları için HEp-2 hücreleri üzerinde IIF'nin sınırlı duyarlılık ve özgüllüğünü göstermiştir<sup>(12-13)</sup>. Çalışmamızda ANA IIF negatif bulunan hastalarda gözlenmiş olan SS-A bant pozitifliği immüno blot testleri ile SS-A pozitifliklerinin sağlıklı kişilerde de gözlenebildiği bilgisi ile açıklanabileceği gibi SS-A pozitifliği bulunan örneklerin IIF ile yeterli düzeyde eksprese edilememesi ile de ilişkili olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Sonuç olarak, otoimmün hastalıkların tanısında öncelikle IIF test sonuçlarının belirlenmesi daha sonra immüno blot bant profili ve klinik bulguların bir arada değerlendirilmesinin önemi ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Antinükleer antikorlar (ANA), indirekt immüno floresan (IIF) testi, ANA immüno blot



## Kaynaklar

1. KLİMUD. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği Otoantikorların Laboratuvar Tanısı Rehberi (Ver.3). 2020.
2. Güdücüoğlu H, Yaman G, Çıkman A, Çalışır U, Berktaş M. Retrospective evaluation of immunoblotting (IB) test results in anti-nuclear antibody positive patients. Turkish J Clin Lab. 2011;2:59-62.
3. Çelikkbilek N, Özdem B, Cibali-Açıkgöz Z. Evaluation of Anti-Nuclear antibody test results in clinical practice. J Microbiol Infect Dis. 2015;5(2):63-8.  
<https://doi.org/10.5799/ahinjs.02.2015.02.0178>
4. Karakeçe E, Atasoy A.R, Çakmak G, ve ark. Bir üniversite hastanesinde antinükleer antikor pozitiflikleri. Turk J Immunol. 2014;2(1):5-8.  
<https://doi.org/10.5606/tji.2014.269>
5. Aktar GS, Ayaydın Z, Onur AR, Vural DG, Temiz H. Bir eğitim ve araştırma hastanesinde İFA yöntemiyle çalışılan otoantikor sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. Turk J Immunol. 2017;5(3):77-81.  
<https://doi.org/10.25002/tji.2017.633>
6. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH, et al. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. Arthritis Rheum. 2002;47(4):434-44.  
<https://doi.org/10.1002/art.10561>
7. Özen-Barut B, Emre U, Demir AS, Ünal A, Tekin İ. Nörolojik hastalıklarda antinükleer antikor (ANA) incelemesinin önemi. Nobel Med. 2013;9(2):74-8.
8. Afşar İ, Şener AG, Vural A, Hızlı N, Türker M. Anti nükleer antikorların pozitif saptandığı hastalarda immunoblotting test sonuçlarının değerlendirilmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2007;37(1):39-42.
9. Yumuk Z, Çalışkan Ş, Gündeş S, Willke A. Anti-nükleer antikorların araştırılması ve saptanmasında kullanılan teknikler. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2005;35(1):40-44.
10. Berkem R, Gümüş T, Karakoç E, Acar N. Antinükleer antikorların tespitinde indirekt immunfloresan antikor ve immunoblot assay yöntemlerinin karşılaştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2004;34(2):124-30.
11. Wei Q, Jiang Y, Xiao M, et al. Comparison of chemiluminescence microparticle immunoassay, indirect immunofluorescence assay, linear immunoassay and multiple microbead immunoassay detecting autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Scand J Immunol. 2019;00:e12849.  
<https://doi.org/10.1111/sji.12849>
12. Hoffman IE, Peene I, Veys EM, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative antinuclear antibody immunofluorescence screening tests. Clin Chem. 2002; 48:2171-6.  
<https://doi.org/10.1093/clinchem/48.12.2171>
13. Avaniss-Aghajani E, Berzon S, Sarkissian A. Clinical value of multiplexed bead-based immunoassays for detection of autoantibodies to nuclear antigens. Clin Vaccine Immunol. 2007;14(5):505.  
<https://doi.org/10.1128/cvi.00034-07>

# Ankara'da Bir Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Pandemi Başlangıcından Bugüne PCR Laboratuvarı Süreçlerindeki Değişim

Mustafa Kocaağa, Filiz Kaya

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

✉ mustafagltstry@gmail.com

## Giriş

Koronavirüsler (CoV), Coronaviridae ailesinde yer alan tek zincirli, zarflı RNA virüsleridir. Çeşitli alt tipleri ile soğuk algınlığı gibi kendi kendini sınırlayan hafif enfeksiyon tablosunun yanı sıra, "Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)" ve "Middle East Respiratory Syndrome (MERS)" gibi daha ciddi enfeksiyonlara da neden olabilmektedirler<sup>(1,2)</sup>.

Aralık 2019'da Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından Çin'in Hubei eyaletinin Wuhan şehrinde etiyo-lojisi bilinmeyen pnömoni vakaları bildirilmiş ve hastaların alt solunum yolu örneklerinde yeni bir koronavirüs tespit edilmiştir. Bu yeni koronavirüs daha sonra şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırılmıştır<sup>(3,4)</sup>. DSÖ, salgının başladığı Çin dışında 100'den fazla ülkede Covid-19 vakalarının görüldüğü, virüsün hızlı yayılımı ve şiddeti nedeniyle 11 Mart'ta küresel salgın (pandemi) ilan etmiştir.

Türkiye'de ilk Covid-19 vakası da 11 Mart 2019'da görülmüştür<sup>(5)</sup>. Ülkemiz, virüsün hızlı yayılımı neticesinde nisan ayı sonunda dünyada en çok vaka görülen ülkeler arasında üst sıralara yükselmiştir<sup>(6)</sup>. Bu dönemde salgının kontrol altına alınabilmesi için tanı testlerinin yaygınlaştırılarak hasta kişilerin hızla tespit edilmesi, hasta ile temaslarının izolasyonlarının sağlanması büyük önem taşımıştır.

Ülkemizde Covid-19 vakalarının görülmeye başlamasının ardından, nisan ayında Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi (AEAH) Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı bünyesinde Covid-19 PCR Tanı Laboratuvarı kurulmuştur. Başlangıçta az sayıda personel ve teknik yetersizliklerle kurulan laboratuvar hızla bir yapılandırılmaya gidilerek çalışma koşulları optimal seviyeye çıkarılmıştır.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda Nisan-Aralık 2019 tarihleri arasındaki sekiz aylık dönemde laboratuvar test kapasitesi ve süreleri ile pozitiflik oranlarındaki değişimlerin bildirilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

AEAH Covid-19 PCR Laboratuvarı'nda Nisan-Aralık 2019 tarihleri arasında çalışılan testlere ait istatistiksel veriler Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Laboratuvar Bilgi Yönetim Sistemi (LBYS) üzerinden retrospektif olarak elde edilmiştir. Elde edilen veriler Nisan'dan Aralık ayına kadar 15'er günlük dönemler halinde değerlendirilmiş, numune gönderen kurum sayısı, çalışılan test sayısı, istek-onay arası süre, kabul-onay arası süre ve PCR pozitiflik oranları belirlenmiştir (Tablo 1).

## Bulgular

Elde edilen istatistiksel verilere göre laboratuvarımızda Covid-19 PCR çalışmaya başlanan ilk 15 günlük dönemde toplam 1115 test çalışılmış olup istek-onay arası süre or-

Tablo 1. Covid-19 PCR Laboratuvarı'na numune gönderen kurum sayısı, çalışılan test sayısı, istek-onay arası ve kabul-onay arası süreler.

| Tarih         | Test Sayısı | İstek Onay Süresi | Kabul Onay Süresi | Kurum Sayısı |
|---------------|-------------|-------------------|-------------------|--------------|
| 6-15 NİSAN    | 1115        | 14,17             | 6,52              | 3            |
| 16-30 NİSAN   | 2599        | 12,53             | 8,21              | 1            |
| 1-15 MAYIS    | 2929        | 11,41             | 7,31              | 2            |
| 16-31 MAYIS   | 2585        | 12,18             | 7,55              | 1            |
| 1-15 HAZİRAN  | 2701        | 13,14             | 8,43              | 1            |
| 16-30 HAZİRAN | 2654        | 12,16             | 8,24              | 1            |
| 1-15 TEMMUZ   | 3013        | 13,44             | 8,43              | 8            |
| 16-31 TEMMUZ  | 4103        | 15,35             | 9,54              | 24           |
| 1-15 AĞUSTOS  | 12091       | 28,55             | 10,51             | 69           |
| 16-31 AĞUSTOS | 27765       | 53,12             | 30,53             | 81           |
| 1- 15 EYLÜL   | 38697       | 31,16             | 24,31             | 73           |
| 16-30 EYLÜL   | 32108       | 11,56             | 6,34              | 29           |
| 1-15 EKİM     | 21958       | 10,25             | 4,43              | 9            |
| 16-31 EKİM    | 26563       | 9,43              | 4,57              | 42           |
| 1-15 KASIM    | 24299       | 9,1               | 5,42              | 15           |
| 16-30 KASIM   | 23175       | 5,49              | 3,16              | 8            |

talama 14.17 saat, kabul onay arası süre 6.52 saat olarak belirlenmiştir.

Haziran ayına kadar benzer oranlar görülmekle birlikte bu ayın ikinci yarısında pozitiflik oranı başlangıca göre 2 kat artış göstermiştir.

Temmuz ayının sonuna kadar çalışılan test sayıları arttıkça pozitiflik oranı ile birlikte istek-onay ve kabul-onay süreleri de artış göstermiştir. Teknik alan yetersizliği, teknik personel deneyimsizliği, hastanelerden düzensiz örnek akışı gibi nedenlerle istek-onay ve kabul-onay arası süreler kısaltılamamıştır. Bu döneme kadar günlük çalışma süresi toplam 12 saattir.

Ağustos ayında toplam çalışılan test sayısı nisan ayına oranla yaklaşık on kat, istek-onay arası süre de yaklaşık iki kat artış göstermiştir. Ağustos ayında artan test yükü, uzayan sonuç verme süreleri nedeniyle 7/24 çalışmaya geçilmiştir. Ancak örnek akışının düzensiz ve topluca olması, personel sayısının yetersizliği, teknik alan kaynaklı sıkıntılar nedeniyle sonuç verme süreleri uzamıştır.

Hastanemizde laboratuvar yükünün en fazla arttığı dönem eylül ayı olup 15'er günlük test sayıları 30 binin üzerine çıkmıştır. Ekim ve kasım ayları boyunca bu sayı 20-25 bin aralığında seyretmiştir. Eylül ayında, yeni bir laboratuvar alanı oluşturulması ile teknik alt yapı iyileştirilmiş ve kapasiteye uygun hale getirilmiştir. Personel sayısı hızla artırılarak artan test yükünü karşılayabilecek sayıya çıkarılmıştır. Bu sayede sonuç verme sürelerinin kısaltılması sağlanmıştır. Kasım ayı itibarı ile istek-onay arası süre 5.49, kabul-onay arası süre ise 3.16'ya düşürülmüştür (Tablo 1).

### Sonuç

Pandemi başlangıcından bu yana SARS-CoV-2 virüsü dünya çapında milyonlarca insanın enfekte olmasına, yüzbinlerce insanın ise ölümüne neden olmuş ve tüm hayatı olumsuz yönde etkilemiştir<sup>(7)</sup>.

Covid-19 salgınının kontrol altına alınmasında hastalara en kısa sürede tanı konulması, hasta ile temaslı kişilerin hızla tespit edilerek izolasyona alınması çok büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla viral RNA'nın varlığının gösterilmesi esasına dayanan RT-PCR testleri salgının başlangıcından

bu yana mikrobiyoloji uzmanları, biyologlar ve tüm laboratuvar çalışanlarının yoğun gayretleri ile yapılmaktadır<sup>(8)</sup>. Sağlık Bakanlığı Ulusal Rehberi'nde de akut enfeksiyonu ve asemptomatik taşıyıcılığı tespit etmede ilk tercih edilmesi gereken tanı aracı olarak gösterilen RT-PCR testleri, karmaşık, zaman alıcı, deneyimli personel, ekipman ve özel işlemler gerektiren yöntemlerdir<sup>(9,10)</sup>. Bu testlerin en verimli ve hızlı şekilde çalışılabilmesi; laboratuvar teknik alt yapısının oluşturulması, uygun sarf malzeme temininin sağlanması, eğitilmiş ve yeterli sayıda teknik personel çalıştırılması, numune transferinin düzenli ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesi ile mümkün olmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Covid-19, Coronavirus, RT-PCR

### Kaynaklar

1. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* 2020;42(1):3-11.
2. Dos Santos Bezerra R, Valença IN, de Cassia Ruy P, et al. The novel coronavirus SARS-CoV-2: From a zoonotic infection to coronavirus disease 2019. *J Med Virol.* 2020;92(11):2607-15 <https://doi.org/10.1002/jmv.26072>
3. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2020;1-14. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
4. Zehender G, Lai A, Bergna A, et al. Genomic characterization and phylogenetic analysis of SARS-COV-2 in Italy. *J Med Virol.* 2020;92(9):1637-40. <https://doi.org/10.1002/jmv.25794>
5. <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/39551/0/covid19rehberigenelbilgilerepidemiolojivetanipdf.pdf> (Erişim tarihi: 07.Ocak.2021)
6. Çöl M, Güneş M COVID-19 salgınına genel bir bakış. In: Memikoğlu KO, Genç V. (Eds). COVID-19. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2020:1-8
7. Li H, Burm SW, Hong SH, et al. A comprehensive review of coronavirus disease 2019: Epidemiology, transmission, risk factors, and international responses. *Yonsei Med J.* 2021;62(1):1-11. <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.1.1>
8. Öcal D, Vezir S, Karahan ZC. Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri. In: Memikoğlu KO, Genç V.(eds). COVID-19. Ankara Üniversitesi Basımevi. 2020:17-26.
9. T.C. Sağlık Bakanlığı. Covid-19 (Sars-Cov-2 Enfeksiyonu) Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı, Ankara, 7 Aralık 2020.
10. İslam KU, Iqbal J. An update on molecular diagnostics for COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:560616. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.560616>

# Kan Bankacılığında İyi laboratuvar Uygulamalarına Temel Oluşturmak Üzere Hepatit B Tarama Testleri İçin İç Kalite Kontrol Serumlarının Geliştirilmesi

F. Yüce Ayhan<sup>1</sup>, Selda Erensoy<sup>2</sup>, Rüçhan Sertöz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>S.B.Ü. İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, İzmir

✉ yayhan@yahoo.com

## Giriş

Kan transfüzyonu ile hepatit B virüsü (HBV) bulaşı ilk kez 1943 yılında tanımlanmış, transfüzyon ile ilişkisi nedeniyle uzun yıllar “Serum Hepatiti” olarak adlandırılmıştır<sup>(1)</sup>. Ancak 1963 yılında Blumberg ve ark. tarafından bir Aborjin yerlisinin kanında bulunan ve “Avustralya Antijeni” olarak adlandırılan antijenin HBsAg olarak tanımlanmasının ardından hastalık Hepatit B olarak adlandırılmış ve tanısı olanaklı hale gelmiştir<sup>(2)</sup>. Kan bağışçılarının hepatit B yönünden taranmasına ise 1969 yılında başlanmıştır. O günden bu zamana dek geçen 50 yılda bilim dünyasında virüsün biyolojisinin anlaşıldığı, enfeksiyonun tanısına ve tedavisine yönelik ilerlemelerin sağlandığı, bağışıklama yoluyla korunmanın yaygınlaştığı bir döneme tanıklık edilmiştir<sup>(3)</sup>.

Avrupa Parlamentosu ve Konseyi’nin 2002 98/EC direktifi ile kan bağışçılarında serolojik tarama testlerine ilişkin gerekliliklerin tanımlanmasının ardından transfüzyon öncesi serolojik tarama testleri AB ülkeleri açısından bir yasal zorunluluk haline gelmiştir<sup>(4,5)</sup>.

Bu testler transfüzyon güvenliğini sağlamadaki etkin rolleri yanında toplum sağlığı açısından da büyük önem taşımaktadırlar. AB/ Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi HIV eliminasyonu için ve viral hepatitle etkili mücadele için belirlediği 2030 yılı hedefine ulaşmada ülkelere HIV, HBV ve HCV için ulusal düzeyde bütünlük test stratejilerini ya da programlarını geliştirmelerini tavsiye etmektedir<sup>(6)</sup>.

Genel anlamda tarama testlerinin en önemli performans ölçütü geniş bir topluluk içerisindeki gerçek hastaları saptayabilmesi olarak kabul edilmektedir. Bu da testin duyarlılığının yüksek olması beklentisini yaratmaktadır. Çoğunlukla tarama testlerinde %95’den yüksek bir duyarlılık olması istenmektedir<sup>(7)</sup>.

Ancak kan bağışçılarının serolojik taramasında kullanılan testlerde sadece analitik duyarlılığın yüksek olması transfüzyon güvenliği açısından yeterli değildir. Bu testlerin uygulanması sırasındaki süreçlerde kalite güvencesinin sağlanması ve sürdürülebilirliği önemli ve gereklidir.

Analitik sürecin düzgün biçimde tamamlandığını güvence altına almada önemli araçlardan birisi de kalite kontrol numuneleridir. Bunlar hasta numunelerine benzer ve belirli bir konsantrasyonda analitik madde içeren örneklerdir. Test kiti üreticileri, tedarik ettikleri test kiti ile birlikte kontrol

örneklerini de sağlamaktadırlar. Ancak tıbbi laboratuvarlar için geçerli standartları tanımlayan ISO 15189 kapsamında tıbbi laboratuvarların iç kalite kontrol (İKK) örneklerini kit tedarikçisinden bağımsız olarak sağlamaları önerilmektedir. Bu şekilde laboratuvardaki analitik sürecin daha nesnel ve gerçekçi bir biçimde değerlendirilmesi mümkündür. Bağımsız İKK örnekleri kit üreticilerinden farklı ticari kaynaklardan sağlanabilmekle birlikte bu maliyet artırıcı bir unsurdur. Bu açıdan laboratuvarların kendi bağımsız İKK örneklerini hazırlaması uygun bir çözüm olarak gözükmemektedir. İKK örneği hazırlamada en önemli aşama analite denk özellikte bir serum örneği elde etmektir. Bu da İKK örneği olarak hazırlanan ürünün bizzat kendisinin bir kalite yönetim süreciyle hazırlanmasını gerektirmektedir.

## Gereç ve Yöntem

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Hastanesi kan merkezine kan bağışında bulunmak üzere başvuran kişilerden uygun bulunanlardan toplanan kanlar otomatik hücre ayırıcı bir sistem (Reveos® Automated Blood Processing System, Terumo BCT, Japonya) kullanılarak bileşenlerine ayrıldı.

Bağışçı kanlarında zorunlu mikrobiyolojik tarama testleri -hepatit B virüsü yüzey antijeni (HBsAg), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) 1-2 antijen ve antikor, hepatit C virüs antikor (anti-HCV) ve sifiliz etkeni olan *Treponema pallidum* antikor (anti-TP)- kemilüminesans mikropartikül immünoassay (CMIA) yöntemiyle (Architect i2000, Abbott Laboratories, ABD) araştırıldı. HBsAg reaktivitesi saptanan plazmalar çalışma amacıyla ayrıldı. HBsAg reaktivitesi yanında diğer tarama testlerinde reaktivite saptanmış plazmalar çalışma dışında bırakıldı.

HBsAg S/CO değeri >1000 bulunan plazmalar -40°C’de dondurularak saklandı. Plazma numunelerinde gerçek zamanlı PCR yöntemiyle (Bosphore HBV Quantification Kit, Anatolia Geneworks, Türkiye) kantitatif HBV DNA analizi yapıldı.

Dondurulmuş HBsAg reaktif plazmalar (n=14) plazma eritme cihazında (Barkey, Almanya) eritildi, havuzlanarak homojenize edildi.

Havuzlanmış plazmaların koagule edilmesi için Proskch ve ark.<sup>(8)</sup> tarafından uygulanmış kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>) yöntemi esas alınarak bazı modifikasyonlarla işlemler gerçekleştirildi. Steril bir behere konan 1.1 gr CaCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, Japonya) üzerine 200 ml havuzlanmış plazma ka-

riştirilerek 37°C'de 1 saat bekletildi. Liyofilize sığır trombinini (Q.F.A.Thrombine, HemosIL, Instrumentation Laboratory, ABD) steril su ile sulandırılarak çözelti haline getirildi. 100 NIH/ml sığır trombinini içeriğine sahip 2 ml'lik çözelti oda ısısında CaCl<sub>2</sub>-plazma karışımına eklendi. Oda ısısında 20 dakika bekletilen karışım tüplere dağıtıldı. 4500 g'de, 10°C'de 20 dakika santrifüjasyon uygulandı. Üst sıvı steril bir şişede toplanarak serum havuzu oluşturuldu.

Serumdan lipidlerin uzaklaştırılması Proskch ve ark.'nca<sup>(8)</sup> uygulanmış presipitasyon yöntemi ile gerçekleştirildi. 3 gr toz dekstran sülfat (OmniPur® Dextrane Sulfate, Calbiochem, Japonya) 100 ml steril distile su içerisinde çözündürülerek %10'luk solüsyon hazırlandı. 45 ml havuzlanmış serum 5 ml %10'luk dekstran sülfat solüsyonu eklenmiş tüpler oda ısısında 30 dakika bekletilerek 10°C'de ve 4500 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Steril bir şişede toplanan üst sıvı tüplere dağıtılarak 10°C'de, 4500 g'de 40 dakika tekrar santrifüj edildi. Üst sıvı tüplere dağıtılarak bir gece 4°C'de bekletildi ve ertesi gün 10°C'de, 4500 g'de 40 dakika santrifüj edildi. Berrak üst sıvı toplanarak İKK örneklerinin hazırlanacağı serum havuzu oluşturuldu. Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) (RTA Laboratuvarları, Türkiye) ile 1/100 ve 1/1000 oranında sulandırılmış serumlar sırasıyla İK100 koduyla orta reaktif İKK, İK1000 koduyla düşük reaktif İKK olarak etiketlendi. Sulandırılmamış serum ise yüksek reaktif İKK olarak İK1 koduyla etiketlendi. İKK örnekleri kriyotüple- re dağıtıldı ve -40°C'de saklanmak üzere donduruldu.

Farklı günlerde dondurucudan çıkarılarak çözölen İKK numuneleri rutin HBsAg analizleri sırasında kontrol numunesi olarak kemilüminesans mikropartikül immünoassay (CMIA) cihazında (Architect i2000, Abbott Laboratories, ABD) eşzamanlı test edildi. Her çalışmada her seriden (İK1, İK100 ve İK1000) birer tüp kullanılmak üzere 21 farklı çalışmada analiz gerçekleştirildi ve S/CO değerleri kaydedilerek Levey-Jennings grafikleri oluşturuldu.

Tanımlayıcı ve analitik istatistikler için PASW (versiyon18.0) yazılımı (SPSS Inc. Hong Kong) kullanıldı. İKK örneklerinin S/CO ortalamaları, standart sapmaları ve değişim katsayıları belirlendi. Ölçüm değerlerinin normallik sınaması Kolmogrov-Smirnov testi ile yapıldı. Levey-Jennings grafikleri Westgard kurallarına göre sistematik hata ve rastgele hata yönünden incelendi. Kan bağışçılarının HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA konsantrasyonları arasında korelasyon Pearson korelasyon analizi ile araştırıldı.

## Bulgular

HBsAg reaktivitesi S/CO ölçümünde 1000 ve üzerinde S/CO değeri saptanan ve HBsAg reaktivitesi nedeniyle bağışladıkları kan transfüzyon için uygun bulunmayan kan bağışçılarının (n=14) toplanan sıvı plazmalarda HBV DNA konsantrasyonu 65.6 ile 135300 IU/ml arasında bulundu. Kan bağışçılarının HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA konsantrasyonları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı (R=-0.2129, p=0.46).

Yüksek reaktif İKK (İK1) serumlarında S/CO değerleri ortalaması 3323.75 bulunurken değişim katsayısı ise %8.1 olarak belirlendi.

Orta Reaktif İKK (İK100) serumlarında ortalama 1725.57

olarak bulunurken değişim katsayısı ise %12.2 olarak belirlendi.

Düşük Reaktif İKK (İK1000) serumlarında ortalama 219.57 olarak bulunurken değişim katsayısı ise %7.6 olarak belirlendi.

Kolmogrov-Smirnov testi ile her üç seri için ölçüm değerlerinin % 95 güven aralığında normal dağılım gösterdiği görüldü (p=0.200).

Levey-Jennings grafiklerinin incelenmesinde yüksek ve düşük reaktif İKK örneklerinin tümünde ölçüm değerlerinin  $\pm 2SD$  içerisinde yer aldığı görüldü. Orta reaktif İKK örneklerinde -2SD dışına çıkan bir değer nedeniyle Westgard'ın 12s kuralının ihlal edildiği saptandı. Uyarıcı özellikteki bu kural ihlali dışında her üç seride de rastgele hata veya sistematik hataya işaret eden bir kural ihlali saptanmadı.

## Sonuç

HBsAg'nin 1970'lerde ABD'inde kan bağışçılarında zorunlu tarama testi olarak kabulünün ardından transfüze edilecek kan ve kan bileşenlerinde enfeksiyon göstergelerinin araştırılması yaygınlaşmıştır. Avrupa Parlamentosu ve Konseyi'nin 2002 98/EC direktifi ile kan bağışçılarında serolojik tarama testlerine ilişkin gerekliliklerin tanımlanmasının ardından transfüzyon öncesi tarama testleri AB ülkeleri açısından bir yasal zorunluluk oluşturmuştur<sup>(4,5)</sup>. Ülkemiz mevzuatında da karşılığını bulan bu gereklilik nedeniyle kan bağışçılarında HBV, HCV, HIV ve sifilize yönelik enfeksiyon göstergelerinin taranması zorunludur<sup>(9)</sup>.

Zaman içerisinde nükleik asit test yöntemlerinin ve kan bileşenlerinde patojen azaltmaya yönelik teknolojilerin geliştirilmesi, serolojik tarama testlerinin geleceğini tartışmaya açsa da daha epeyce bir süre serolojik tarama testlerinden vaz geçilmesi olası gözükmemektedir. Yaygınlaşan hepatit B aşılaması ve geliştirilen antiviral tedavilere karşın hastalık ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak önemini sürdürmekte ve tüm gelişmelere karşın transfüzyon ile HBV bulaşma riski bulunmaktadır. ABD'de on yıllık bir süredeki kan bağışlarını ele alan bir çalışmada HBV sıklığı 100 bin kan bağışında 7.58 olarak bildirilmiş ve pencere dönemi esas alınarak HBV enfeksiyonu için 18.5 günlük bir risk periyodu hesaplanmıştır. Amerikan Kızılhaçı tarafından toplanan kanlarda rezidüel HBV riski yaklaşık 1.5 milyonda 1 olarak bildirilmiştir<sup>(5)</sup>. Global olarak ise HBV için rezidüel risk düşük endemik ülkelerde bir milyonda 1.4'e varan oranlarda, yüksek endemik ülkelerde ise milyonda 100'e ulaşan oranlarda hesaplanmaktadır<sup>(10)</sup>.

HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA düzeylerini karşılaştıran lineer regresyon modellerinde bu iki ölçüm değeri arasında anlamlı pozitif bir korelasyon saptanmış olsa da HBV DNA ve HBsAg'nin hızla arttığı akut enfeksiyonun erken döneminde bu durum beklenen bir sonuçtur. Çalışmamızda HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA konsantrasyonları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmaması ise HBsAg reaktivitesi gösteren plazmaların aktif enfeksiyonu bulunmayan taşıyıcı özelliğindeki kan bağışçılarının sağlanmasıyla açıklanabilir. Ayrıca çalışmamızda homojenize bir plazma havuzu elde etmek amacıyla kan bağışçı sayısının kısıtlanması da bir etken olabilir. Kan bağışçılarında HBsAg



ile HBV DNA arasında korelasyon eksikliğine dikkat çeken başka çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada HBsAg reaktif kan bağışçılarının %6'sında HBV DNA saptanamadığı bildirilmiştir<sup>(11)</sup>.

Hasta numunelerine benzer ve belirli konsantrasyonda analitik madde içeren örnekler olan İKK numuneleri analitik sürecin düzgün biçimde tamamlandığını güvence almaya yarar. Kit üreticileri, çalışılan testlerin kalite güvencesini sağlamak üzere tedarik ettikleri test kiti ile birlikte İKK örneklerini de sağlamaktadırlar. Ancak ISO 15189 kapsamında da teşvik edildiği üzere laboratuvarın bağımsız İKK örnekleri ile çalışması tercih edilmelidir. Kit tedarikçisinden bağımsız olarak İKK örnekleri farklı ticari kaynaklardan sağlanabilmekle birlikte bu laboratuvarlar açısından ek maliyet anlamına gelmektedir. Bu açıdan laboratuvarların kendi bağımsız İKK örneklerini hazırlaması uygun bir çözüm olarak görülmektedir<sup>(12,13)</sup>.

Hazırladığımız İKK örneklerinin performansında sistematik hata saptanmamış olması bunların rutin uygulamada kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Testlerde analitik duyarlılıkların artması, nükleik asit testlerinin yaygınlaşması, kan bileşenlerinde patojen azaltma teknolojilerinin gelişmesi olumlu gelişmeler olmakla birlikte yakın gelecekte immünoassay temelli tarama testlerinden vaz geçilmesini sağlayacak bir durum yaratmayacaktır. Bu durumda bu testlerin kalite güvencesini sağlamaya yönelik girişimlerimizin de devam etmesi gerektiği açıktır. Kan hizmet birimlerinde kan toplama - kan bileşeni hazırlama döngüsünde işlenen önemli miktarda hücre ve plazmanın bir kısmının bağımsız kalite kontrol materyallerinin hazırlanmasında kullanılması hem kaynakların doğru kullanımı açısından hem de transfüzyon güvenliği açısından yararlı olacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** HBsAg; Kan Bağışçısı; İç Kalite Kontrol; Tarama Testleri

#### Kaynaklar

1. Dwyre DM, Holland PV. Hepatitis viruses. In: Barbara JAJ, Regan FAM, Contreras MC(Eds.), In: Transfusion Microbiology. Cambridge University Press, 2008:9-24.
2. Gerlich WH, Glebe D, Schüttler CG. Deficiencies in the standardization and sensitivity of diagnostic tests for hepatitis B virus. J Viral Hepat. 2007;14(Suppl 1):16-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2007.00912.x>
3. Thomas E, Yoneda M, Schiff ER. Viral hepatitis: past and future of HBV and HDV. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015;5(2):a021345. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021345>
4. Fiedler SA, Oberle D, Chudy M, et al. Effectiveness of blood donor screening by HIV, HCV, HBV-NAT assays, as well as HBsAg and anti-HBc immunoassays in Germany (2008–2015). Vox Sang. 2019;114(5), 443-50. <https://doi.org/10.1111/vox.12770>
5. Dodd RY, Nguyen ML, Krysztof DE, Notari EP, Stramer SL. Blood donor testing for hepatitis B virus in the United States: is there a case for continuation of hepatitis B surface antigen detection? Transfusion. 2018;58(9):2166-70. <https://doi.org/10.1111/trf.14784>
6. ECDC. Public Health Guidance on HIV, Hepatitis B and C Testing in the EU/EEA. An Integrated Approach. European Centre for Disease Prevention and Control, 2018.
7. Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. Cumitech 31A, Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. Coordinating ed, Sharp SE. ASM Press, Washington, ABD, 2009.
8. Proksch GJ, Bonderman DP. Preparation of optically clear lyophilized human serum for use in preparing control material. Clin Chem. 1976;22(4):456-60.
9. Örücü NE, Yenicesu İ. Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama, Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi. Avrupa Birliği'nin IPA-I finansal desteği ile "Kan Tedarik Sisteminin Güçlendirilmesi Teknik Destek Projesi. T. C. Sağlık Bakanlığı, 2016. <https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/Yayin/523> (Erişim tarihi: Aralık.2020)
10. Candotti D, Laperche S. Hepatitis B virus blood screening: need for reappraisal of blood safety measures? Front Med (Lausanne). 2018;5:29. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00029>
11. Kuhns MC, Kleinman SH, McNamara AL, Rawal B, Glynn S, Busch MP. Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. Transfusion. 2004;44(9):1332-9. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.04055.x>
12. Sepulveda JL. Variation, errors, and quality in the clinical laboratory. In: Dasgupta A, Sepulveda JL (Eds). Accurate Results in the Clinical Laboratory. Elsevier, 2019:3-9.
13. Public Health England. Quality assurance in the diagnostic virology and serology laboratory. Standards Unit Microbiology Services. Q2(7), 2015.

## Aspergillus ve Candida Türlerinin Antifungal Duyarlılıkları

Ferhat Genç, Fatma Günbey, Sümeyra Kayalı, Merve Ayyıldız, Zülal Aşçı Toraman

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

✉ ferhatgenc2344@hotmail.com

### Giriş

Bir küf mantarı olan *Aspergillus* cinsi mantarlar, doğada yaygın bulunan ve sporlarının inhalasyonu ile özellikle bronkopulmoner enfeksiyona neden olan saprofit fırsatçı mikroorganizmalardır<sup>(1)</sup>. *Candida* türleri ise, ölümcül enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı patojen maya mantarlarıdır. 15 farklı *Candida* türü arasında; *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Candida krusei* insanda hastalığa neden olan en yaygın türlerdir<sup>(2)</sup>.

Kandidemi, son yıllarda güçlü antifungal ilaçların kullanılmasına rağmen, artmış hasta bakım maliyeti ve hastanede yatış süresinin uzaması ile birlikte morbidite ve mortalite artışlarına hala önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır<sup>(3)</sup>.

*Candida albicans*, kandidemiye neden olan en yaygın türdür, ama sıklığı giderek azalmaktadır. *C. albicans* dışındaki diğer türler dünyada artan sıklıklarda bildirilmektedir. Bunlar arasında *C. glabrata* ve *C. krusei* enfeksiyonları sıklıkla bildirilmekte (dünya çapında kandaki *Candida* izolatlarının %15-25'i) ve azol grubu antifungal ajanlara olan düşük duyarlılıklarından dolayı tedavi edilmesi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır<sup>(3)</sup>.

Flukonazole dirençli olduğu bilinen *C. krusei*'nin kan kültürlerindeki saptanma sıklığı çeşitli çalışmalarda %2 ile %7 arasında bildirilmektedir<sup>(4)</sup>. Bu nedenle de *Candida* türlerinin tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıkların belirlenmesi önem arz etmektedir.

*Aspergillus*; bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda yaşamı tehdit eden invaziv enfeksiyonlara, bağışıklık sistemi sağlıklı kişilerde kronik enfeksiyonlara ve hipersensitivite reaksiyonlarına eğilimli kişilerde ise alerjik reaksiyonlara neden olabilen fırsatçı bir patojendir. *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu enfeksiyonlar maligniteli hastalarda 1990'lı yıllardan beri en sık görülen invazif küf enfeksiyonlarıdır ve *Aspergillus fumigatus* ile *Aspergillus flavus* bu enfeksiyonlara en sık neden olan türlerdir<sup>(5)</sup>.

Antifungal kullanımı sırasında kültürde üreyen *Aspergillus* cinsinin tür düzeyinde tanımlanması amfoterisin B'ye doğal dirençli *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus nidulans* gibi türlerin ayırt edilebilmesi için son derece önemlidir<sup>(6)</sup>. Son dönemlerde *A. fumigatus* türlerinde CYP51A nokta mutasyonuna bağlı olarak gelişen itraconazol yada çoklu azol direncinde dramatik artış, tür tanısıyla birlikte antifungal duyarlılıklarının belirlenmesinin önemini artırmıştır<sup>(6)</sup>.

Etkenin kesin olarak belirlenebilmesi ve tanımlanabilmesi için kültürde üretilmesi gerekmektedir. Bu nedenle kül-

tür duyarlılığın düşük olması, doğru tanının konulmasını zorlaştırmaktadır<sup>(6)</sup>.

Her iki cins mantarların özellikle immün sistemi baskılanmış olgularında morbidite ve mortalite nedeni olduklarından erken tanı konulup doğru tedavinin yapılması gerekmektedir. Bu nedenle de *Aspergillus* ve *Candida* türlerinin tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının dilüsyon yöntemiyle Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi önem arz etmektedir.

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerin kültürlerinde üreyen küf/maya mantarlarının antifungal direnç ve duyarlılık oranlarının tespiti amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

2019-2020 yılları arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen 42 hastanın [*Aspergillus* (n=25), *Candida* (n=17)] çeşitli klinik örneklerinin kültürlerinde üreyen küf/maya mantarı değerlendirilmeye alındı. Küf/maya kolonileri direkt mikroskopi, gram boyama veya laktofenol pamuk mavisi boyası ile incelemeye alındı. Küf kolonilerinin identifikasyonu plak veya lam kültürü yöntemleri uygulanarak tür düzeyinde tanımlandı. Lameller laktofenol pamuk mavisi ile boyanarak direkt boyalı mikroskopi yöntemiyle, maya kolonilerinin identifikasyonu ise Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) otomatize sistem kültür cihazı ve mısır unu tween 80 agarda plak ya da lam kültürü yöntemleri uygulanarak tür düzeyinde tanımlandı. *Aspergillus* ve *Candida* türlerinde antifungal duyarlılık testleri, Sensititre Yeast One panels (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, ABD) kiti kullanılarak mikrodilüsyon yöntemiyle üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı ve mikroyaplaklar Şekil 1'de gösterilen şablona göre değerlendirildi.

### Bulgular

Çalışmaya toplam 42 (*Candida* n=25, *Aspergillus* n=17) *Candida/Aspergillus* suşu dahil edildi. *Aspergillus* türlerinin; 7'si eklem sıvısı, 6'sı yara, 2'si bronşial lavaj, 1'i balgam, 1'i de trakeobronşial aspirat örneklerinden; *Candida* türlerinin; 11'i idrar, 8'i trakeobronşial aspirat, 4'ü bronşial lavaj, 2'si kan örneğinden izole edildi. *Aspergillus* türlerinin antifungal duyarlılık/direnç sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Toplamda 17 adet *Aspergillus* suşunun %47'si (n=8) *A. fumigatus*, %11,7'si (n=2) *A. flavus*, %11,7'si (n=2) *Aspergillus niger*, %29, 4'ü (n=5) *Aspergillus* spp olarak tespit edilmiştir. *A. fumigatus* flukonazole dirençli iken vorikanozala duyarlı olarak tespit edilmiştir. Flukonazol ve 5-flusitozine karşı *Aspergillus*'un tüm suşlarında direnç saptanmıştır.

**Tablo 1. *Aspergillus* türlerinin antifungal duyarlılık ve direnç sonuçları.**

| Mantar türü         | n  | Amp-B | Flu   | Kaspa | Anidulo | 5-Flu | Mika  | İtra  | Posa  | Vor   |
|---------------------|----|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Aspergillus</i>  |    | Du/Di | Du/Di | Du/Di | Du/Di   | Du/Di | Du/Di | Du/Di | Du/Di | Du/Di |
| <i>A. fumigatus</i> | 8  | 6/2   | 0/8   | 4/4   | 4/4     | 1/7   | 4/4   | 7/1   | 7/1   | 8/0   |
| <i>A. flavus</i>    | 2  | 2/0   | 0/2   | 2/0   | 2/0     | 0/2   | 2/0   | 2/0   | 2/0   | 2/0   |
| <i>A. niger</i>     | 2  | 2/0   | 0/2   | 1/1   | 1/1     | 0/2   | 1/1   | 1/1   | 2/0   | 1/1   |
| <i>A. spp</i>       | 5  | 3/2   | 1/4   | 1/4   | 0/5     | 0/5   | 1/4   | 4/1   | 5/0   | 4/1   |
| TOPLAM (N)          | 17 | 13/4  | 1/16  | 8/8   | 7/10    | 1/16  | 8/8   | 14/2  | 16/1  | 15/2  |

Amp-B: Amfoterisin B, FLU: Flukonazol, Kaspa: Kaspafungin, Anidulo: Anidulofungin, 5-Flu: 5-Flusitozin, Mika: Mikanozol, İtra: İtrakonazol, Posa: Posakonazol, Vor: Vorikonazol, Du: Duyarlı, Di: Dirençli

**Tablo 2. *Candida* türlerinin antifungal duyarlılık ve direnç sonuçları.**

| Mantar türü            | n  | Amp-B | Flu   | Kaspa | Anidulo | 5-Flu | Mika  | İtra  | Posa  | Vor   |
|------------------------|----|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Candida</i>         |    | Du/Di | Du/Di | Du/Di | Du/Di   | Du/Di | Du/Di | Du/Di | Du/Di | Du/Di |
| <i>C. albicans</i>     | 13 | 10/3  | 9/4   | 11/2  | 11/2    | 11/2  | 11/2  | 10/3  | 11/2  | 11/2  |
| <i>C. glabrata</i>     | 2  | 2/0   | 0/2   | 2/0   | 2/0     | 1/1   | 2/0   | 0/2   | 0/2   | 0/2   |
| <i>C. dublinensis</i>  | 2  | 2/0   | 2/0   | 2/0   | 2/0     | 2/0   | 2/0   | 2/0   | 2/0   | 2/0   |
| <i>C. keyfr</i>        | 2  | 0/2   | 2/0   | 2/0   | 2/0     | 0/2   | 2/0   | 2/0   | 2/0   | 2/0   |
| <i>C. parapsilosis</i> | 3  | 3/0   | 3/0   | 3/0   | 3/0     | 3/0   | 3/0   | 3/0   | 3/0   | 3/0   |

Amp-B: Amfoterisin B, FLU: Flukonazol, Kaspa: Kaspafungin, Anidulo: Anidulofungin, 5-Flu: 5-Flusitozin, Mika: Mikanozol, İtra: İtrakonazol, Posa: Posakonazol, Vor: Vorikonazol, Du: Duyarlı, Di: Dirençli.

*Candida* türlerinin antifungal duyarlılık/direnç sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. Toplamda 25 adet *Candida* türünün %52'si (n=13) *C. albicans*, %8'i (n=2) *C. glabrata*, %8'i (n=2) *Candida dublinensis*, %8'i (n=2) *Candida keyfr*, %12'si (n=3) *Candida parapsilosis*, %12'si (n=3) *Candida spp* olarak tespit edilmiştir. *C. dublinensis* ve *C. parapsilosis* tüm antifungalare karşı duyarlı tespit edilmiştir.

## Sonuç

*Aspergillus* türleri doğada yaygın olarak bulunurlar ve çok farklı klinik tablolara yol açabilirler. Öncelikli hedefleri bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar olsa da, konağın özelliklerine bağlı olarak farklı klinik formlar ortaya çıkabilmektedir<sup>(1)</sup>.

Küf enfeksiyonları arasında en sık etken olarak *A. fumigatus* yer alır<sup>(1)</sup>. Dünyada yapılan çeşitli çalışmalar diğer *Aspergillus* türlerinin de artan sıklıkta enfeksiyona neden olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada invazif aspergillozda etken olan türlerin sıklığı araştırılmış; *A. fumigatus* %54.2, *A. flavus* %7.4, *A. niger* %6.5 ve *A. terreus* %3.2 olarak bildirilmiştir<sup>(7)</sup>. Dünyada görülen bu tür dağılımı ülkemizde de aynı şekildedir. Öz ve ark.<sup>(8)</sup> çalışmalarında toplam 110 *Aspergillus* izolatının % 60'ının *A. fumigatus*, %21'inin *A. niger* ve %9'unun da *A. flavus* olduğunu bildirmişlerdir. 2019-2020 tarihleri arasındaki laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerin dahil edildiği çalışmamızda da toplam 17 adet *Aspergillus* suşunun %47'si (n=8) *A. fumigatus*, %11.7'si (n=2) *A. flavus*, %11.7'si (n=2) *A. niger*, %29.4'ü (n=5) *Aspergillus spp* olarak tespit edilmiştir.

*Aspergillus* türlerine bağlı enfeksiyonların tedavisinde antifungaller (poliyenler, azoller ve ekinokandinler) kullanılmaktadır. İlk seçenek olarak da azol grubu antifungaller önerilir. İnvasiv *Aspergillus* olgularında ilk tedavi seçeneği olarak vorikonazol, kronik pulmoner aspergilloz olgularında ise itrakonazol veya vorikonazol önerilmektedir<sup>(9)</sup>. Öz ve ark.<sup>(8)</sup> klinik örneklerden tanımladıkları *Aspergillus* izolatlarının amfoterisin B, itrakonazol ve vorikonazol duyarlılığını değerlendirmişler ve en etkili antifungalın vorikonazol olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında, *A. flavus* izolatlarına karşı amfoterisin B ve vorikonazol için *A. fumigatus* izolatlarından daha yüksek MİK değerleri elde edildiğini bildirmişlerdir. Arıkan ve ark.<sup>(10)</sup> 82 *Aspergillus* türünde in vitro etkinliği en yüksek olan antifungalın vorikonazol olduğunu bunu sırasıyla posakonazol, itrakonazol ve amfoterisin B'nin takip ettiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da yapılan diğer çalışmalara uygun olarak vorikonazole duyarlılık tespit edilmiştir.

Antifungal direnç, primer yani antifungal ilaçla karşılaşmaksızın ve doğal direnç şeklinde olabildiği gibi, sekunder (kazanılmış,) yani enfekte eden suşun ilaca maruz kalması nedeniyle gelişen direnç şeklinde de olabilmektedir. Antifungal direncin saptanması için etken küf klinik örnekten üretilebilmeli ve antifungal duyarlılık testi yapılmalıdır<sup>(11)</sup>.

Profilaksi, ampirik veya tedavi amaçlı antifungallerin uzun süreli ve sıklıkla kullanılması, antifungal direnç gelişimini etkileyebilmektedir. *A. fumigatus*'un azollere olan direnci %1-20 arasında değişmektedir<sup>(11)</sup>.





**Anahtar kelimeler:** *Candida*, *Aspergillus*, antifungal, mikrodilüsyon

#### Kaynaklar

1. Vanden Bergh MF, Verweij PE, Voss A. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999;34(3):221-27. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(99\)00026-7](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(99)00026-7)
2. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical practice guideline for the Management of Candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):e1-50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
3. Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One*. 2016;25,11(1):e0146909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>
4. Samonis G, Kofteridis DP, Saloustros E, et al. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infection in patients in a tertiary hospital: an analysis of microbiological data. *Scand J Infect Dis*. 2008;40(5):414-9.
5. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect*. 2006;63(3):246-54. <https://doi.org/10.1080/00365540701765657>
6. Lass-Flörl C, Kofler G, Krophshofer G, et al. In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42(4):497-502. <https://doi.org/10.1093/jac/42.4.497>
7. Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(4):293-300. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.01>
8. Öz Y, Akşit F, Aslan M, Kaşifoğlu N, Kiraz N. Klinik *Aspergillus* izolatları: tür dağılımı ve antifungal duyarlılık sonuçlarının değerlendirilmesi. *ANKEM Derg*. 2012;26(2):69-73. <https://doi.org/>
9. De-Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;46(12):1813-21. <https://doi.org/10.1086/588660>
10. Ankan S, Sancak B, Alp S, Haşçelik G, McNicholas P. Comparative in vitro activities of posaconazole, voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* and *Rhizopus*, and synergy testing for *Rhizopus*. *Med Mycol*. 2008;46(6):567-73. <https://doi.org/10.1080/13693780801975576>
11. Chong GM, Van der Beek MT, Von dem Borne PA, et al. PCR-based detection of *Aspergillus fumigatus* Cyp51A mutations on bronchoalveolar lavage: a multicentre validation of the AsperGenius assay® in 201 patients with haematological disease suspected for invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(12):3528-35. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw323>
12. Çıkman A, Parlak M, Ceylan MR, Gündüoğlu H, Berktaş M. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan kandidaların tür dağılımı ve antifungal direnci. *Van Tıp Derg*. 2014;21(1):1-5.
13. Jung SI, Shin JH, Song JH, et al. Multicenter surveillance of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates in South Korea. *Med Mycol* 2010;48(4):669-741. <https://doi.org/10.3109/13693780903410386>
14. Gültekin B, Eyigör M, Telli M, Aksoy M, Aydın N. Yedi yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin retrospektif olarak incelenmesi. *ANKEM Derg* 2010;24(4):202-8.
15. Öztürk T, Özseven AG, Sesli Çetin E, Kaya S. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *Kocatepe Tıp Derg*. 2013;14(1):17-22.
16. Sütçü M, Acar M, Erköse Genç G, ve ark. Pediatrik invaziv kandidiyazis olgularında *Candida* türlerinin ve antifungal duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Türk Pediatri Ars*. 2017;52:145-53. <https://doi.org/10.5152/TurkPediatriArs.2017.5291>
17. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımının ve antifungal duyarlılıklarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *ANKEM Derg*. 2015;29(3):105-13. <https://doi.org/10.5222/ankem.2015.0105>
18. Wang H, Xiao M, Chen SC, et al. In vitro susceptibilities of yeast species to fluconazole and voriconazole as determined by the 2010 National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIFNET) study. *J Clin Microbiol*. 2012;50(12):3952-59. <https://doi.org/10.1128/JCM.01130-1>
19. Kurtaran B, İnal AS, Candevir A, ve ark. Nozokomiyal kandida enfeksiyonları: Mikrobiyolojik ve klinik özellikleri. *Flora Derg*. 2009;14(1):58-66.
20. Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, et al. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med*. 2007;356(24):2472-82. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066906>



## Penicillium Keratiti Olgusu

Zülal Aşçı Toraman<sup>1</sup>, Fatma Günbey<sup>1</sup>, Ferhat Genç<sup>1</sup>, Merve Ayyıldız<sup>1</sup>, Sümeyra Kayalı<sup>1</sup>,  
Onur Çatak<sup>2</sup>, Mehmet Canlıleblebici<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ

✉ zülalasci@gmail.com

### Giriş

*Penicillium* cinsi; havada, toprakta yaygın olarak bulunan, bazı türleri toksin üretebilen, laboratuvarlarda kontaminasyona neden olabilen küf mantarlarıdır. İn vitro besiyerlerinde önce beyaz, sonra yeşil-mavi tozumsu koloniler yaparak hızlı ürerler<sup>(1,2)</sup>. *Penicillium* türleri monomorfiktir. Ancak *Penicillium marneffe* dimorfik olup, insanda ve hayvanda primer patojen olan ve en iyi bilinen türdür<sup>(1)</sup>.

Diğer *Penicillium* türlerine bağlı enfeksiyonlar daha nadir görülmektedir. İmmün sistemi baskılanmış ve AIDS'li olgularda bu mantarların neden olduğu keratit olguları sıklıkla görülmektedir<sup>(3)</sup>.

Bu çalışmada nadir keratit etkenlerinden *Penicillium spp.* nedenli fungal keratit olgusunun klinik ve laboratuvar özelliklerini sunmayı amaçladık.

### Gereç ve Yöntem

Fırat Üniversitesi Hastanesi Göz Hastalıkları Kliniği'nde fungal keratit şüphesiyle takip edilen hastadan kornea kazıntı ve sürüntü örnekleri alındı ve mikoloji laboratuvarına gönderildi. Bu örneklerin direkt boyasız ve boyalı mikroskopik incelemeleri ve koyun kanlı agar, Eozin Metilen Blue (EMB) agar, çikolatamsı agar ve Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyerlerine ekimleri yapıldı. Bu besiyerlerinin uygun koşullarda ve sürelerde inkübasyonları gerçekleştirildi.

### Bulgular

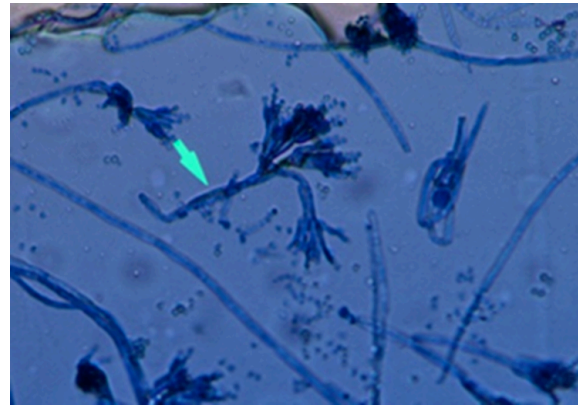
52 yaşında kadın hasta, Fırat Üniversitesi Hastanesi Göz Hastalıkları Polikliniği'ne sol gözünde ağrı ve akıntı şikayetiyle başvurdu. Meme kanseri ve immünsüpresif tedavi alma öyküsü mevcuttu. Anamnezinde yaklaşık 40 sene önce sol gözüne darbe aldığını ve bu sebeple sol gözünün az gördüğünü bildirdi. Sol gözünde yüzey düzensizliği olması nedeniyle ağrısı olduğunu ve kontakt lens kullandığını belirtti. Antiglokmatöz tedavi ve suni gözyaşı damlasını topikal olarak kullandığını ve kontakt lensini beş gün önce çıkarttığını ifade etti.

Hastanın yapılan sağ göz muayenesinde, görme keskinliği 0.8 saptandı ve minimal katarakt harici doğal olduğu görüldü. Sol gözün görme keskinliği ise ışık hissi seviyesindeydi. Sol pupil üst yarısı defektifti (Şekil 2). Biyomikroskopik muayenede sol gözde stromal kirli beyaz renkli yer yer tüysü uzantılar gösteren keratit mevcuttu ve epitel defekti

yoktu. Her iki gözde göz tansiyonu parmakla normaldi ve ultrason ile arka segmentte patoloji saptanmadı. Hasta Göz Hastalıkları Kliniği'nde yatırılarak takip edildi.

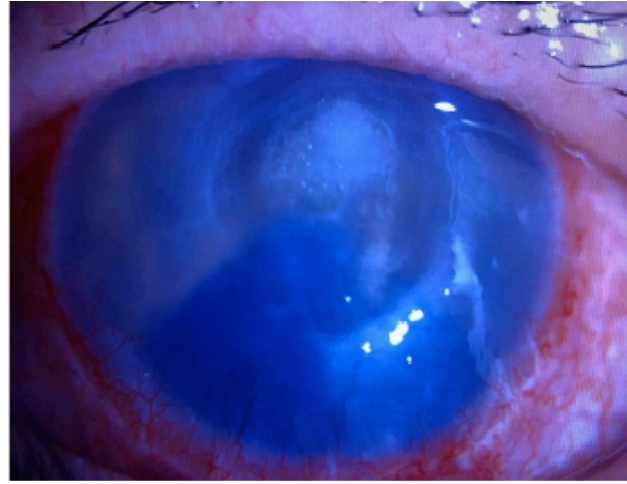
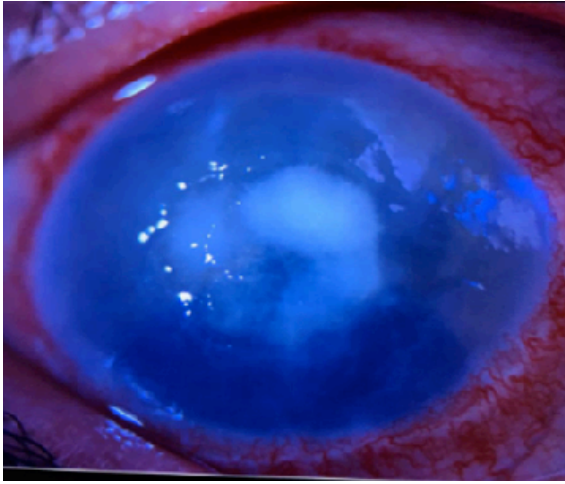
Sol göze ait numunelerin mikoloji laboratuvarında direkt boyasız ve boyalı mikroskopik incelemelerinde mantar hif ve sporları saptanırken, hücresel ve bakteriyel etkenler saptanmadı. Rutin bakteriyolojik ve mantar kültürlerinde ise üreme saptanmadı.

Sol gözden tekrar numune alınarak laboratuvara gönderildi ve bir hafta sonra örneğe ait SDA besiyerinde küf kolonisinin ürediği görüldü. Kültürde üreyen kolonilerin görüntüsü başlangıçta beyazımsı renkliydi, daha sonra tüylü-yünlüden taneli sarımsı-yeşile döndü. Koloniden selofan bant yöntemiyle örnek alınarak laktofenol pamuk mavisi boyası ile preparatlar hazırlanarak 10X, 20X ve 40X büyütme mikroskopta incelendi. Mikroskopik incelemede fırçaya benzer bir görünüme sahip, metüller üzerinde üretilen filoyidler üzerinde taşınan tek hücreli konidyum zincirleri görüldü ve *Penicillium spp.* olarak tanımlandı (Şekil 1).



Şekil 1. *Penicillium spp.* (40X büyütme mikroskopik görüntüsü)

Hastadan kültür örneği alındıktan sonra ampirik tedavi olarak saat başı topikal vankomisin ve seftazidim damla fortifiye ile iki saatte bir vorikonazol damla fortifiye başlandı. Klinik örneğin mikroskopi sonucuna göre fungal tedavi takibi yapıldı. Takiplerinin 10. gününde tedaviye yanıt alınamaması ve kültürlerinde üreme görülmemesi üzerine tedaviye bir gün ara verilerek tekrar kültür alındı ve vorikonazol amfoterisin B fortifiye damla ile değiştirildi. Alınan kültür örneğinde *Penicillium spp.* üremesi üzerine hastaya oral ketokonazol tablet 2x1 başlandı. Oral tedavi sonrası



Şekil 2. Sırasıyla antifungal tedavi öncesi ve sonrası sol göz.

takiplerinde hastanın keratiti regrese olarak infiltrat gidecek küçüldü (Şekil 2).

#### Sonuç

Kornea hastalıkları görme kaybının önemli nedenlerinden biridir. Kornea enfeksiyonuna (keratit) bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler neden olmakta ve en sık bakteriyel sonrasında fungal etkenler görülmektedir<sup>(4)</sup>. Fungal keratitlerin klinik ve laboratuvar tanısındaki zorluklar önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Tedavi başarısı, gecikmeden fungal keratit ön tanısının klinik olarak konması ve etkenin laboratuvar izolasyonu ile yüksek ilgilidir<sup>(5)</sup>.

Fungal keratit gelişimindeki risk faktörlerinden bazıları; travma, uzun süre geniş spektrumlu antibiyotik ve steroid kullanımı, geçirilmiş göz ameliyatı, kontakt lens kullanımı, oküler yüzey hastalıkları, immün yetmezlik durumları ve diyabet hastalığıdır<sup>(6)</sup>.

Fungal keratit etkenleri arasında en sık görülenler filamen-töz funguslardan *Aspergillus* ve *Fusarium* türleridir, *Penicillium* türleri kaynaklı keratit insidansı ise oldukça düşüktür<sup>(7)</sup>. Literatürde *Penicillium* keratiti olguları farklı bölgelerden bildirilmiştir<sup>(8,9)</sup>. Ülkemizden Horasanlı ve ark.<sup>(10)</sup> tarafından 1998 yılında *penicillium* cinsi mantarların neden olduğu kornea apsesi olgusu bildirilmiştir.

Sonuç olarak fungal keratit tedavisinde tanısal mikolojinin rolü büyüktür. Ayrıca bu enfeksiyon etkenlerinin cins ve tür düzeyinde tanımlanması doğru antifungal tedavi uygulanması açısından oldukça önemlidir. Sunduğumuz olguda da klinik şüphe ve doğru mikolojik tanı ile hasta başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Keratit, laktofenol pamuk mavis, *Penicillium*

#### Kaynaklar

1. Richardson MD. *Aspergillus* and *Penicillium* species. In: Collier L, Balows A, Susman M, eds. Topley & Wilson Microbiology and Microbial Infections, Vol.4 Medical Mycology. New York: Arnold, 1998:281-312.
2. Kwon-Chung KJ, Bennet JE. Medical Mycology. Philadelphia: Lea-Febiger, 1992:201-47.
3. Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. Clinical Mycology. New York: Oxford University Press, 2003.
4. Şekeroğlu TH, Yar K, Erdem E, ev ark. Sitolojik olarak tanısı konulmuş fungal keratitler: Klinik özellikleri ve tedavi sonuçları. TJO 2010;40(5):255-9.
5. Sharma S, Srinivasan M, George C. The current status of *Fusarium* species in mycotic keratitis in South India. Indian J Med Microbiol. 1993;11(2):140-7.
6. Reddy PS, Satyendran OM, Satapathy M, Kumar HV, Reddy PR. Mycotic keratitis. Indian J Ophthalmol. 1972;20(3):101-8.
7. Pérez-Balbuena AL, Vanzini-Rosano V, Valadéz-Virgen Jde J, Campos-Möller X. *Fusarium* keratitis in Mexico. Cornea. 2009;28(6):626-30. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31819bc2ea>
8. Anutarapongpan O, Thanathane O, Suwan-Apichon O. *Penicillium* keratitis in a HIV-infected patient. BMJ Case Rep. 2016;2016:bcr2016216139. <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-216139>
9. Vyawahare CR, Misra RN, Gandham NR, Angadi KM, Paul R. *Penicillium* keratitis in an immunocompetent patient from Pune, Maharashtra, India. J Clin Diagn Res. 2014;8(7):DD01-DD2. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7996.4647>
10. Horasanlı S, Erturan Z, Kiraz M, Eroğlu F, Gürler N. *Fusarium* ve *Penicillium* cinsi mantarların etken olduğu iki kornea apsesi olgusu. İnfek Derg. 1998;12:427-31.

## COVID-19 Hastalarında *Aspergillus* Enfeksiyonu Birlikteliği

Muhammed Alper Özarslan<sup>1</sup>, Hüseyin Aytaç Erdem<sup>2</sup>, Pervin Korkmaz Ekren<sup>3</sup>,  
Mehmet Sezai Taşbakan<sup>3</sup>, Hüsnü Pullukçu<sup>2</sup>, Nailm Ceylan<sup>4</sup>, Dilek Yeşim Metin<sup>1</sup>,  
Süleyha Hilmioğlu Polat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

<sup>4</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, İzmir

✉ alperozarslan@hotmail.com

### Giriş

İlk kez Aralık 2019'da Çin'in Hubei eyaletine bağlı Wuhan şehrinde ortaya çıkan Yeni Koronavirüs hastalığı (COVID-19), heparan sülfat ve anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) aracılığı ile duyarlı olduğu dokulara giren, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'den (SARS-CoV-2) kaynaklanır<sup>(1,2)</sup>. Risk faktörleri [yaş, cinsiyet, komorbid hastalıklar (diyabet, kanser, KOAH, kardiyovasküler hastalıklar) gibi] hastalığın seyrinde çok önemlidir<sup>(2-5)</sup>. Eşlik eden bu tür risk faktörleri, klinik tabloyu kötüleştirebilecek ko-enfeksiyonların ve süperenfeksiyonların ortaya çıkmasını da kolaylaştırmaktadır. COVID-19'da en uygun tedavinin ne olduğu ve yayılmanın nasıl önleneceği belirsizliğini korumakta; eklenen enfeksiyonların hastalığın seyrini olumsuz etkileyebileceği endişesi de bulunmaktadır. Bugüne kadar birçok bakteri ve virüs, olası COVID-19 hastaları arasında ko-patojen olarak rapor edilmiştir. Ancak gelişen süperenfeksiyonlar arasında daha nadir bildirilen mantar etkenleri giderek artan şekilde yeni ortaya çıkan bir tehdit olarak kabul edilmektedir<sup>(2,6,7)</sup>.

Alta yatan iyi tanımlanmış bağışıklık sistemini baskılayan hastalık olmamasına rağmen viral enfeksiyon nedeniyle akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) olan hastalar, invazif aspergilloz gibi ikincil fırsatçı enfeksiyonlara eğilimlidir<sup>(1,8,9)</sup>. Bu nedenle COVID-19 hastalarının takibinde pulmoner aspergilloz gelişimi konusunda dikkatli olunmalı, erken tanı için özellikle solunum yolu örneklerinden mikolojik inceleme istenmelidir<sup>(6)</sup>.

Bu çalışmada 1 Ağustos-10 Aralık 2020 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları servisi ve yoğunbakımda COVID-19 pnömonisi nedeni ile izlenen ve solunum yolu örneklerinde *Aspergillus* türleri üreyen hastaların ko-enfeksiyon yönünden retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Göğüs Hastalıkları servisi ve yoğun bakım ünitesinden 1 Ağustos – 10 Aralık 2020 tarihleri arasında mikrobiyolojik inceleme için gönderilen ve solunum yolu örneklerinde mantar üremesi olan hastaların klinik, laboratuvar ve radyolojik bulguları *Aspergillus* enfeksiyonu açısından retrospektif olarak

değerlendirilmiş ve Tablo 1'de gösterilmiştir.

Hastalarda SARS-CoV-2 tespiti RealTime-PCR (RT-PCR) yöntemiyle; Hasta-1 ve Hasta-2'de SARS-CoV-2 RT-PCR kiti (Biospeedy, Bioeksen, Türkiye), Hasta-3'de SARS-CoV-2 RT-PCR kiti (Diagnovital, a1lifestyles, Türkiye), Hasta-4'de SARS -CoV-2 RT-PCR kiti (Coronex, Gensutek, Türkiye) kullanılarak yapılmıştır.

Hastaların solunum yolu örneklerinin (DTA, Balgam, BAL) mikolojik kültürleri, iki adet Sabouraud dekstroa agar (SDA) besiyerinde, 26°C ve 35°C'de 10 gün enkübe edilmek üzere yapıldı. Kültüründe küf mantarı üreyenlerin makroskobik ve mikromorfolojik özellikleri değerlendirilerek tür tayini yapıldı. Ayrıca serumu gönderilen hastalarda galaktomanan anitjeni [PLATELIA™ ASPERGILLUS Ag (BIO-RAD, ABD)] arandı. Besiyerlerinde üreyen *Aspergillus*'un kolonizasyon, kontaminasyon ya da enfeksiyon etkeni mi olduğunu değerlendirmek için klinik ve radyolojik bulgular da göz önüne alındı.

Hızlı ilerleyen ve mortalitesi yüksek COVID-19 pnömonisi olan hastalarda İPA'nın tanımlanması ve sınıflandırılmasında EORTC/MSG kriterleri yerine Blot SI ve ark.<sup>(10)</sup>'nın önerdiği AspiCU algoritması kullanıldı. Bu algoritmaya göre İPA'lar "kesin İPA" ve "varsayılan İPA" şeklinde sınıflandırıldı<sup>(11)</sup>.

### Bulgular

COVID-19 ön tanısıyla Göğüs hastalıkları servisi ve yoğun bakım ünitesinde izlenen hastalardan gönderilen 217 solunum yolu örneğinin (Balgam:100, DTA:107, BAL:4, BASP:6) 11'inde mantar üremesi (*Candida* türü: 6, *Aspergillus* türü: 5) saptanmıştır. *Aspergillus* üremesi saptanan hastaların dört tanesi AspiCU algoritması dahilinde *Aspergillus* koenfeksiyonu olarak, bir tanesi kolonizasyon/kontaminasyon lehine değerlendirilmiştir. Hastalara ait değerlendirme kriterleri tabloda özetlenmiştir.

### Sonuç

Viral pnömoni sonrası ARDS gelişen hastalar, önceden bağışıklıkları baskılanmış olmasa bile, invazif aspergilloza eğilimli olabilirler. Radyolojik görüntülemelerdeki buzlu cam opasiteleri ve yaygın infiltrasyon COVID-19'un yanı sıra İPA'ya da işaret eder. Bu nedenle yapılacak kapsamlı

**Tablo 1. Hastalara ait değerlendirme kriterleri.**

| İPA hastalarının özellikleri                                                           | HASTA-1                                 | HASTA-2                                             | HASTA-3                                                                          | HASTA-4                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Cinsiyet                                                                               | Erkek                                   | Kadın                                               | Erkek                                                                            | Erkek                                                    |
| Yaş                                                                                    | 59                                      | 76                                                  | 78                                                                               | 83                                                       |
| Altta yatan hastalık*                                                                  | Yeni tanı B-ALL                         | HT, RA                                              | Geçirilmiş akciğer tüberkülozu HT                                                | Tip-2 DM, HT, KAH                                        |
| Kortikosteroid tedavisi**                                                              | +                                       | +                                                   | +                                                                                | +                                                        |
| Varsayılan İPA (AspICU algoritması) ile uyumlu belirti ve semptomlar ***               | 1, 2, 3                                 | 2, 3                                                | 2, 3                                                                             | 1, 2, 3                                                  |
| Horowitz-İndeksi (mmHg) ARDS seviyesi <sup>(11)</sup>                                  | 94 mm Hg Şiddetli ARDS                  | 153 mm Hg Orta şiddette ARDS                        | 153 mm Hg Orta şiddette ARDS                                                     | 115 mm Hg Orta şiddette ARDS                             |
| Varsayılan İPA düşündüren radyoloji (akciğer grafisi)                                  | Bilateral infiltrasyonların progresyonu | Bilateral infiltrasyonların progresyonu             | Bilateral infiltrasyonların progresyonu                                          | Bilateral infiltrasyonların progresyonu                  |
| COVID-19 tanısı sırasında akciğer BT bulgusu                                           | Bilateral buzlu cam görünümü            | Bilateral buzlu cam görünümü                        | Bilateral buzlu cam görünümü                                                     | Bilateral buzlu cam görünümü                             |
| Serum <i>Aspergillus</i> Ag test sonucu (0.5<):<br>Direkt mikroskopi<br>Mantar kültürü | Bakılmadı                               | POZİTİF (0.59)                                      | Bakılmadı                                                                        | Bakılmadı                                                |
|                                                                                        | (-)<br><i>Aspergillus niger</i> (DTA)   | Hif (+)<br><i>Aspergillus terreus</i> [DTA (2 kez)] | Hif (+)<br><i>Aspergillus flavus</i> (DTA)<br><i>Aspergillus fumigatus</i> (DTA) | Hif (+)<br><i>Aspergillus fumigatus</i> (DTA)            |
| EORTC/MSG Kriterleri                                                                   | Sınıflandırılmaz (Konak kriteri yok)    | Sınıflandırılmaz (Konak kriteri yok)                | Sınıflandırılmaz (Konak kriteri yok)                                             | Sınıflandırılmaz (Konak kriteri yok)                     |
| AspICU algoritması                                                                     | Varsayılın İPA                          | Varsayılın İPA                                      | Varsayılın İPA                                                                   | Varsayılın İPA                                           |
| COVID-19 PCR kiti ve sonuç Ct'si                                                       | Biospeedy ve 16,20                      | Biospeedy ve 25,09                                  | Diagnovital ve 20.39                                                             | Coronex ve 24,18                                         |
| Antiviral tedavi                                                                       | Favipiravir                             | Favipiravir                                         | Favipiravir                                                                      | Favipiravir                                              |
| Antifungal tedavi                                                                      | Anidulafungin                           | Vorikonazol                                         | Vorikonazol                                                                      | Flukonazol (idrarda üreyen <i>Candida albicans</i> için) |
| Sonuç                                                                                  | Öldü                                    | Taburcu                                             | Öldü                                                                             | Öldü                                                     |

\*: HT: Hipertansiyon, RA: Romatoid artrit, DM: Diyabetes mellitus, KAH: Koroner arter hastalığı

\*\* : Hasta 1 ek olarak kemoterapi alıyor, 4 hasta da prednizon [ $> 20$  mg / gün ve eşdeğeri] tedavisi aldı

\*\*\*: Varsayılan İPA (AspICU algoritması) ile uyumlu belirti ve semptomlar:

Dirençli ateş: 1, Dispne şikayetinde artış: 2, Uygun antibiyotik tedavisine rağmen solunum yetmezliğinde progresyon: 3.

mikrobiyolojik değerlendirme İPA tanısının atlanmaması için önemlidir. Ayrıca EORTC/MSG'nin konakçı ve risk faktörü kriterlerinin katı olması COVID-19 hastalarında İPA tanısını kaçırma riskini arttırmaktadır. Bu nedenle AspiCU algoritmasıyla hasta spektrumunu genişletmek erken tedavi açısından fayda sağlayacaktır<sup>(1)</sup>.

Bu çalışmada değerlendirilen beş hastanın ko-enfeksiyon kabul edilen dört tanesinde COVID-19 pnömonisinin *Aspergillus* ko-enfeksiyonu riskini arttırdığı ve İPA'lı hastalarda ölümü daha da hızlandırdığı gözlemlendi. Hasta örneklerinin direkt bakısında hif görülmesi, ardışık kültürlerde küf mantarının üremesinin yanında, solunum yolu örneklerinde (BAL, DTA) *Aspergillus* PCR ve *Aspergillus* serum antijen testi yapılması, erken tanı ve tedavi için çok önemli basamaklardır<sup>(1)</sup>. Bu çalışmada, *Aspergillus* cinsi küf mantarı beş hastanın ikisinde ardışık örneklerde üremiştir. Üç tanesinin direkt bakısında hif görülmüş, yalnızca bir tanesine galaktomannan antijeni bakılabilmektedir. Elde edilen verilerle AspiCU algoritmasına göre dört hasta Varsayılan İPA olarak değerlendirilirken, bir hastanın bulgularının kolonizasyon ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

Sonuç olarak COVID-19 enfeksiyonlarında, progresyon durumunda etken olarak mantarlar da mutlaka akla gelmelidir. Bu tür hastalarda zamanında yapılacak mikolojik değerlendirme hayati önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Aspergillus*, SARS -CoV -2, İnvazif pulmoner aspergilloz, Galaktomannan antijen testi

#### Kaynaklar

1. Koehler P, Cornely OA, Böttiger BW, et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. 2020;63(6):528-34. <https://doi.org/10.1111/myc.13096>
2. Costantini C, Veerdonk FLVD, Romani L. Covid-19-associated pulmonary aspergillosis: The other side of the coin. *Vaccines(Basel)* 2020;8(4):713. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040713>
3. Mallapaty S. The coronavirus is most deadly if you are older and male-New data reveal the risks. *Nature*. 2020;585(7823):16-7. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02483-2>
4. Scully EP, Haverfield J, Ursin RL, Tannenbaum C, Klein SL. Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. *Nature Rev Immunol*. 2020;20(7):442-7. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0348-8>
5. Holman N, Knighton P, Kar P, et al. Risk factors for COVID-19-related mortality in people with type 1 and type 2 diabetes in England: A population-based cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(10):823-33. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30271-0](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30271-0)
6. Lai CC, Yu WL. COVID-19 associated with pulmonary aspergillosis: A literature review. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;S1684-1182(20)30238-3 <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.09.004>
7. Hoegl M. Invasive fungal disease complicating COVID-19: When it rains it pours. *Clin Infect Dis*. 2020;ciaa1342. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1342>
8. Koehler P, Bassetti M, Kochanek M, Shimabukuro-Vornhagen A, Cornely OA. Intensive care management of influenza-associated pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(12):1501-9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.031>
9. Schauwvlieghe AFAD, Rijnders BJA, Philips N, et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2018;6(10):782-92. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30274-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30274-1)
10. Blot SI, Taccone FS, Van den Abele AM, et al. A clinical algorithm to diagnose invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(1):56-64. <https://doi.org/10.1164/rccm.201111-1978OC>
11. Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012;307(23):2526-33. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669>



## Alerjik Rinit ve Astım Hastalarında Nazofaringeal Mikrobiyotanın Araştırılması

Cengiz Çavuşoğlu<sup>1</sup>, Hasan Yüksel<sup>2</sup>, Adem Yaşar<sup>2</sup>, Tarık İnci<sup>3</sup>, Furkan Polat<sup>1</sup>,  
Ayça Aydın Uysal<sup>1</sup>, Ayça Aykut<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir

<sup>4</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir

✉ aycaydin07@gmail.com

### Giriş

Alerjik astım, hava yollarının IgE aracılı kronik inflamatuvar hastalığıdır. IgE aracılı diğer “atopik” hastalıklar atopik dermatit, alerjik rinit ve gıda alerjisidir. Bu hastalıklar tipik olarak erken çocukluk döneminde ortaya çıkmakta ve birçok insanda ömür boyu devam etmektedir. Astım yüksek prevalansı ve yol açtığı mortalite nedeniyle en sorunlu atopik bozukluktur<sup>(1-4)</sup>.

Astımın altında yatan neden, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık bir sonucudur. İnsan genetiğinin astım patogenezi katkıda bulunduğu açıktır, ancak astım prevalansındaki hızlı yükselme, değişen çevresel faktörlerin de gelişmekte olan insan bağışıklık sistemini bu aşırı duyarlılık hastalıklarına doğru yönlendirdiğini göstermektedir<sup>(5-8)</sup>. Çokça çalışmada, kırsal bölgelerde yetişen çocuklarda astım gelişme olasılığının azaldığı, daha yüksek seviyelerde çevreye özgü endotoksinlere yaşamın erken döneminde maruz kalmanın, doğal bağışıklığın aktivasyonunda ve inflamatuvar tepkileri bastırma kabiliyetinde önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür. Ayrıca sezaryen doğum ile çocukluk çağı astımı arasında bir ilişki olduğu, tersine emzirme ve solunum sağlığı arasında yararlı bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür<sup>(9)</sup>. Hava yolu mikrobiyotası ile astım arasında nedensel bir ilişki olup olmadığını belirlemek için birçok çalışmada, üst solunum yolu mikrobiyotası belirlenmeye çalışılmıştır<sup>(9,10)</sup>.

Nazal mikrobiyom disbiyozu ve alerjik rinit gelişiminin ilişkisi hakkında araştırmalar sınırlı olmasına rağmen, nazal mikrobiyomun, lokalize immün yanıtların modülasyonunda, patofizyolojide ve alerjik rinit gelişiminde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir<sup>(11)</sup>.

Bu çalışmada sağlıklı, astımlı ve alerjik rinitli çocukların nazofaringeal bakteriyel mikrobiyotasının karşılaştırılması, astım ve alerjik rinitli hastalarında olası mikrobiyal disbiyozisin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

**Hastalar ve kontrol grubu:** Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Alerji ve Astım polikliniğine başvuran olgular alındı. Mikrobiyom analizi için kontrol grubu olarak herhangi bir kronik ve atopik hastalığı olmayan allerjen deri prick testi negatif olan ve son 3 ay içinde

antibiyotik, sistemik ya da inhale steroid almayan 5 olgu, hasta grubu olarak ARIA<sup>(12)</sup> kriterlerine göre alerjik rinokonjunktivit tanısı konmuş allerjen deri prick testi pozitif 5 olgu ile GINA<sup>(13)</sup> tanı kriterlerine göre astım tanısı konmuş allerjen deri prick testi pozitif olan 5 olgu dahil edildi.

**Nazofaringeal örneklerin alınması:** Olgulara baş-geri tekniği kullanılarak nazal lavaj yapıldı. Örnekler steril test tüpüne aktarıldı. Örnekler daha sonraki analizler için -80°C’de saklandı.

### Yeni nesil dizileme çalışmaları

Yeni nesil dizileme çalışmaları kitin üreticisinin tanımladığı şekilde yapıldı<sup>(14)</sup>. Nazofaringeal sürüntü örneklerinden “PureLink Microbiome DNA Purification Kit” kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Örneklerden izole edilen DNA’ların miktar tayinleri yapıldı ve DNA’lar dizileme yapılarına kadar -20°C’de saklandı. Ion 16S™ Metagenomics Kit kullanılarak örneklerden elde edilen DNA’ların 16S değişken bölgeleri amplifiye edildi. Amplifiye edilen ürünler temizlendikten sonra Ion 16S™ Metagenomics Kit ile kütüphane hazırlandı. Ion Universal Library Quantitation Kit kullanılarak kütüphaneler kantite edildi. Ion Chef™ Instrument kullanılarak kalıp hazırlandı ve Ion S5 system dizileme işlemi gerçekleştirildi. Dizileme sonuçları <https://www.thermofisher.com/account-center/cloud-signin-identifier.html> adresindeki OTU’ler incelenerek değerlendirildi.

**İstatistiksel analiz:** İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 24.0 programı kullanıldı.

### Bulgular

**Çalışmaya alınan hastalar:** Çalışmaya medyan yaşı 12 (7-17 yaş) olan, yedisi erkek, sekizi kız çocuğu olmak üzere toplam 15 olgu alınmıştır. Çalışmaya alınan olgular alerjik astım, alerjik rinit ve sağlıklı kontrol grubu olmak üzere beşerli üç gruba ayrılmıştır. Çalışmaya alınan olguların demografik bilgileri, doğum şekilleri, anne sütü alma süreleri ve mikrobiyotayı etkileyebilecek diğer özellikleri Tablo 1’de özetlenmiştir.

**Çalışmaya alınan olguların 16S metagenomik sonuçları:** Çalışmaya alınan olguların nazofaringeal sürüntü örneklerinden üst solunum yolu mikrobiyotası ve mikrobiyotada yer alan mikroorganizma tipleri ve göreceli bollukları belirlenmiştir. Astım hastalarında üst solunum yolu mikrobi-

**Tablo 1. Çalışmaya alınan hastaların demografik bilgileri ve mikrobiyotayı etkileyebilecek diğer özellikler.**

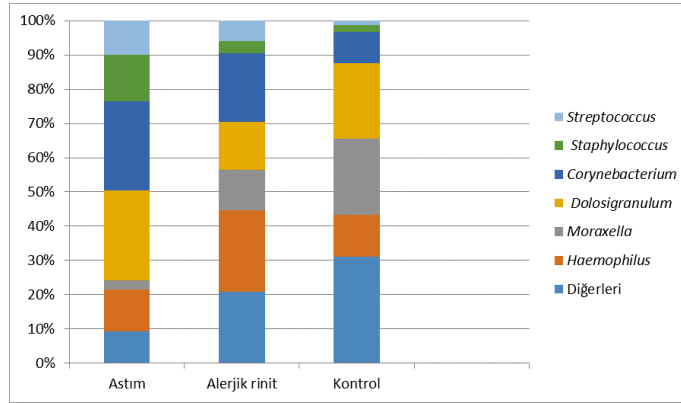
| Hastalar | Yaş | Cinsiyet | Doğum şekli | Anne sütü | Evde sigara | Evcil hayvan | Yaşam yeri | Sık antibiyotik kullanımı |
|----------|-----|----------|-------------|-----------|-------------|--------------|------------|---------------------------|
| KONT1    | 17  | E        | Normal      | 24 ay     | Evet        | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| KONT2    | 12  | K        | Sezarye     | 16 ay     | Hayır       | Var          | Köy        | Yok                       |
| KONT3    | 10  | K        | Normal      | 9 ay      | Hayır       | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| KONT4    | 8   | K        | Normal      | 14 ay     | Hayır       | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| KONT5    | 7   | E        | Sezarye     | 6 ay      | Hayır       | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| ASTIM1   | 12  | K        | Normal      | 24 ay     | Evet        | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| ASTIM2   | 10  | K        | Normal      | 14 ay     | Hayır       | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| ASTIM3   | 14  | E        | Normal      | 18 ay     | Evet        | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| ASTIM4   | 12  | K        | Sezarye     | 24 ay     | Evet        | Var          | Merkez     | Yok                       |
| ASTIM5   | 10  | E        | Sezarye     | 18 ay     | Hayır       | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| AR1      | 14  | K        | Normal      | 6 ay      | Evet        | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| AR2      | 13  | E        | Normal      | 24 ay     | Evet        | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| AR3      | 14  | K        | Sezarye     | 18 ay     | Hayır       | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| AR4      | 10  | E        | Sezarye     | 25 ay     | Hayır       | Yok          | Merkez     | Yok                       |
| AR5      | 12  | K        | Normal      | 2 ay      | Hayır       | Yok          | Merkez     | Yok                       |

**Tablo 2. Çalışmada incelenen olgu gruplarında saptanan yaygın nazofaringeal bakterilerin göreceli bolluğu.**

| Taksa                    | Astım (N=5)   | Alerjik rinit (N=5) | Kontrol (N=5) | p     |
|--------------------------|---------------|---------------------|---------------|-------|
| Proteobacteria           | %21.6 (1-53)  | %49 (1-81)          | %57 (8-93)    | >0.05 |
| • <i>Haemophilus</i>     | %12.4 (0-30)  | %23.8 (0-61)        | %12.2 (0-61)  | >0.05 |
| • <i>Moraxella</i>       | %2.6 (0-7)    | %11.8 (0-32)        | %22.2 (0-80)  | >0.05 |
| Firmicutes               | %51.2 (30-81) | %25.6 (8-60)        | %29.4 (4-78)  | >0.05 |
| • <i>Staphylococcus</i>  | %13.6 (0-48)  | %3.6 (0-11)         | %1.8 (0-7)    | >0.05 |
| • <i>Streptococcus</i>   | %10 (0-31)    | %6 (0-15)           | %1.4 (0-5)    | >0.05 |
| • <i>Dolosigranulum</i>  | %26.2 (5-49)  | %14 (0-55)          | %22 (0-54)    | >0.05 |
| Actinobacteria           | %26.8 (6-56)  | %24.2 (3-44)        | %11 (2-38)    | >0.05 |
| • <i>Corynebacterium</i> | %26 (5-55)    | %20 (3-43)          | %9.2 (0-38)   | >0.05 |
| Bacteroidetes            | %0 (0-0)      | %0.6 (0-3)          | %0.6 (0-2)    | >0.05 |
| Diğer filumlar           | %0.4 (0-1)    | %0.6 (0-1)          | %2 (0-10)     | >0.05 |
| Ornek başına dizileme    | 210928        | 206521              | 236766        | >0.05 |
| Shannon averaj           | 2.02          | 2.1                 | 1.62          | >0.05 |

yotasında en baskın filumun Firmicutes (%51.2) olduğu, bunu *Actinobacteria* (%26.8) ve *Proteobacteria* (%21.5)'nin izlediği saptanmıştır. Kontrol grubunda ve alerjik rinit grubunda ise sırasıyla %57 ve %49 ile en baskın filum *Proteobacteria* olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında astım hastalarında *Moraxella* cinsinin oranının azaldığı, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Corynebacterium* cinsinin oranının arttığı saptanmıştır. Ayrıca kontrol grubunda mikrobiyotanın %90.8'inin altı baskın cins oluştururken, bu oranın alerjik rinit grubunda %79.2, kontrol grubunda ise %68.8 olduğu saptanmıştır.

On iki aydan daha uzun süreyle anne sütü alan çocuklarda üst solunum yolu mikrobiyotasında *Dolosigranulum*'un göreceli oranı %27, *Corynebacterium*'un %24 olarak belirlenirken anne sütünü 12 aydan az süreyle alan çocuklarda *Dolosigranulum*'un göreceli oranı %4 *Corynebacterium*'un ise %3 olarak saptanmıştır. Ayrıca normal doğum ile doğan çocuklarda *Dolosigranulum*'un göreceli oranı %27, *Corynebacterium*'un %21 olarak belirlenirken sezaryen ile doğan çocuklarda *Dolosigranulum*'un göreceli oranı %11 *Corynebacterium*'un ise %14 olarak saptanmıştır. Çalışmaya alınan olguların üst solunum yolu mikrobiyotası ve mikrobiyotada yer alan mikroorganizma tipleri ve göreceli bollukları Tablo 2 ve Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Çalışmada incelenen olgu gruplarında saptanan yaygın nazofaringeal bakterilerin cins düzeyinde göreceli bolluğu.

## Sonuç

Hava yolu mikrobiyotası ile astım arasında nedensel bir ilişki olup olmadığı bilinmemektedir<sup>(9)</sup>. Teo SM ve ark.<sup>(15)</sup> erken çocukluktan geç ergenliğe kadar olan dönemde *Moraxella*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Haemophilus* ve *Alloicoccus*'dan oluşan altı baskın cinsin üst hava yolu mikrobiyotasını oluşturduğunu belirlerken, Lappan R ve ark.<sup>(16)</sup> sağlıklı çocuklarda nazofaringeal örneklerde baskın cinsleri sırasıyla *Moraxella*, *Dolosigranulum*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* ve *Staphylococcus* olarak bulmuştur. Bizim çalışmamızda sağlıklı kontrol grubunda üst hava yolu mikrobiyotasında en baskın cinsin *Dolosigranulum* olduğu bunu sırasıyla *Moraxella*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* cinslerinin izlediği saptanmıştır.

Teo SM ve ark.<sup>(15)</sup> sağlıklı çocuklarda üst hava yolu mikrobiyotasını oluşturan filumların Proteobacteria (%48), Firmicutes (%38), Actinobacteria (%13), Bacteroidetes (%1) olduğunu saptamıştır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da sağlıklı kontrol grubunda üst hava yolu mikrobiyotasını oluşturan en baskın filumun Proteobacteria (%57) olduğu, bunu Firmicutes (%29), Actinobacteria (%11) ve Bacteroidetes (%1)'in izlediği saptanmıştır.

Birçok çalışmada doğum şeklinin solunum mikrobiyotasının gelişimini ve solunum sağlığını etkileyebileceği öne sürülmüştür<sup>(9,17)</sup>. Sezaryen ile doğan yenidoğanlarda, nazofaringeal mikrobiyota dengesizliğinin yanı sıra hisiltılı solunum veya astım yokluğu ile ilişkili bakteri olan *Corynebacterium* ve *Dolosigranulum* ile kolonizasyonun azaldığı, 3 aydan daha uzun süre emzirmenin uzun süreli artmış Dolosigranulum ve Corynebacterium miktarı ile ilişkili olduğu ve böylece gelişen hava yolunda daha fazla mikrobiyota stabilitesi sağladığı belirtilmiştir<sup>(9,17)</sup>. Çalışmamızda normal doğan ve 12 ay üzerinde emzirilen 7-17 yaş çocuklarda hava yolu mikrobiyotasında Dolosigranulum ve Corynebacterium miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiş ancak solunum sağlığı ile arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Bu çalışma astım ve alerjik rinitli çocuklarda nazofaringeal mikrobiyotanın araştırıldığı ülkemizde yapılan ilk çalışma

olmuştur. Gruplardaki olgu sayısının az oluşu çalışmanın en önemli kısıtlılığı olmuştur. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar diğer çalışmalardan elde edilen bulgularla kısmen uyum göstermekte kısmen de çelişmektedir. Ayrıca, yapılan diğer çalışmaların sonuçları arasında da tam bir uyum görülmemektedir. Bu bulgular ışığında astım ve sağlıklı mikrobiyotayı ayıracabilecek kesin bir profil olmadığı, astım hastalığında kompozisyonu değişen mikrobiyotanın tek sorumlu olmadığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak nazofarinks mikrobiyotasının astım patofizyolojisini nasıl etkilediğini belirlemek ve astım hastalarında nazal disbiyozisi hedef alan kişiye özel tedavi seçenekleri geliştirmek için, olguların immünogenetik özelliklerinin ve epitel yanıtlarının incelendiği, çevre ve mikrobiyota arasındaki kompleks etkileşimleri dikkate alan, 16S metagenomiksin ötesinde transkriptomik ve metabolomik analizlerin de yapılacağı, geniş gruplarla yürütülecek iyi planlanmış boyamsal çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** Astım, alerjik rinit, nazofaringeal mikrobiyota, yeni nesil dizileme

## Kaynaklar

1. Stiemsma LT, Turvey SE. Asthma and the microbiome: defining the critical window in early life. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2017;13:3. <https://doi.org/10.1186/s13223-016-0173-6>
2. WHO. Asthma. World Health Organization. [ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/> ]. Erişim Tarihi: 10 Eylül 2016.
3. CDC. Fact sheet: asthma's impact on the nation. Centres for Disease Control and Prevention. 2015.
4. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet.* 1998;351(9111):1225-32.
5. Paaso EM, Jaakkola MS, Lajunen TK, Hugg TT, Jaakkola JJ. The importance of family history in asthma during the first 27 years of life. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(5):624-6. <https://doi.org/10.1164/rccm.201212-2236LE>
6. Burke W, Fesinmeyer M, Reed K, Hampson L, Carlsten C. Family history as a predictor of asthma risk. *Am J Prev Med.* 2003;24(2):160-9.

- [https://doi.org/10.1016/s0749-3797\(02\)00589-5](https://doi.org/10.1016/s0749-3797(02)00589-5)
7. Sears MR. Growing up with asthma. *Br Med J*. 1994;309(6947):72-3.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.309.6947.72>
  8. Stiemsma L, Reynolds L, Turvey S, Finlay B. The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies. *Immunotargets Ther*. 2015;4:143-57.  
<https://doi.org/10.2147/ITT.S61528>
  9. Aguilera AC, Dagher IA, Kloefer KM. Role of the microbiome in allergic disease development. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2020;20(9):44.  
<https://doi.org/10.1007/s11882-020-00944-2>
  10. ver Heul A, Planer J, Kau AL. The human microbiota and asthma. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;57:350-63.  
<https://doi.org/10.1007/s12016-018-8719-7>
  11. Dimitri-Pinheiro S, Soares R, Barata P. The microbiome of the nose-Friend or Foe? *Allergy Rhinol (Providence)*. 2020;11:2152656720911605.  
<https://doi.org/10.1177/2152656720911605>
  12. Brożek JL, Bousquet J, Agache I, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(4):950-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.050>
  13. Global Strategy For Asthma Management and Prevention. [https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report\\_final\\_wms.pdf](https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_final_wms.pdf). (Erişim tarihi: 05.Aralık.2020)
  14. IonTorrent User Guide. Ion 16S™ Metagenomics Kit Catalog Number A26216 Publication Number MAN0010799 Revision C.0
  15. Teo SM, Mok D, Pham K, et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):704-15.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.008>
  16. Lappan R, Imbrogno K, Sikazwe C, et al. A microbiome case-control study of recurrent acute otitis media identified potentially protective bacterial genera. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):13.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-018-1154-3>
  17. Bosch A, Levin E, van Houten MA, et al. Development of upper respiratory tract microbiota in infancy is affected by mode of delivery. *EBioMedicine*. 2016;9:336-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.031>

# Probiyotikli Yoğurt Tüketiminin Çölyak Hastalarına Etkisinin Değerlendirilmesi

Büşra Çalışır<sup>1</sup>, Ali Kudret Adiloğlu<sup>2</sup>, Rukiye Bertem<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kastamonu Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kastamonu

<sup>2</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

✉ busraozeycalisir@gmail.com

## Giriş

Çölyak hastalığı (ÇH), genetik yatkınlığı olan bireylerde glutene karşı kronik duyarlılık ile kendini gösteren, proksimal ince barsağın immün aracılı kronik inflamatuvar hastalığıdır<sup>(1,2)</sup>. ÇH kesin tanısı yetişkinlerde serolojik ve genetik belirteçlerle birlikte, ince bağırsak biyopsisi ile konur. ÇH tanısında kullanılan serolojik testler; anti-deamide gliadin peptid antikor (anti-DGP), anti-endomisyum antikor (EMA) ve anti-doku transglutaminaz (anti-tTG) antikorlarıdır. Serolojik testler, glutensiz beslenmeye uyumu izlemede ve ÇH açısından risk altında olan bireylerin taranmasında kullanılır<sup>(3)</sup>.

Probiyotikler, yeterli miktarlarda kullanıldığında sağlığa faydalı etkileri olan canlı mikroorganizmalardır<sup>(4)</sup>. Probiyotiklerin, hücreler arası bariyer fonksiyonunu onararak, gliadinin hidrolizini indükleyerek, antiinflamatuvar etki göstererek ve irritabl barsak sendromu (İBS) semptomlarını azaltarak ÇH iyileşmesine katkı sağladığı bazı klinik çalışmalarda gösterilmiştir<sup>(5-7)</sup>. Bu çalışmada ÇH tanısı almış GD ile beslenen hastalarda üç ay düzenli *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus acidophilus* probiyotik bakterilerini içeren yoğurt tüketiminin çölyak hastalığının serolojik parametrelerine, biyokimyasal değerlerine ve klinik bulgularına etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, 1 Aralık 2018-31 Ağustos 2019 tarihleri arasında SBÜ Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi (AEAH) Erişkin Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran anti-tTG IgA değeri pozitif olan çölyak hastaları değerlendirilmeye alındı. Çalışma prospektif olarak yapıldı. Bu çalışmaya 18-72 yaş arası 50 hasta alındı. Hastalar iki gruba ayrıldı. Birinci gruba sadece glutensiz diyet tavsiye edildi. İkinci gruba glutensiz diyetin yanında kendi ürettiğimiz probiyotikli yoğurtlardan maya olarak kullanılmak üzere verildi. Düzenli olarak bu yoğurt mayasını çoğaltarak yoğurt yapıp her gün 200 mL yoğurt tüketmesi önerildi. Hasta gruplarının yaş ve cinsiyetleri kaydedildi. Başlangıç ve 3.ay hemoglobin (Hb), ALT, AST, ALP, albumin, kalsiyum, demir, ferritin, B12 vitamini, folat, D vitamini, anti-tTG, anti-DGP ve EMA değerleri ile klinik semptomları (ishal, kabızlık, karın ağrısı, şişkinlik, reflü) değerlendirildi.

**Probiyotik Yoğurt Seçimi:** 200 gramında ortalama toplam  $4 \times 10^{11}$  *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus acidophilus* probiyotik bakterilerini içeren probiyotikli yoğurt kullanıldı. Probiyo-

tikli yoğurt üretmek için BÜYÜYO Probiyotik Yoğurt Mayası (Danem Süt ve Süt Ürünleri Ltd. Şti, Süleyman Demirel Üniversitesi Teknokent Binası, Isparta, Türkiye) temin edildi. Bu maya ile yapılan yoğurt, maya olarak kullanılmak üzere hastalara hazır bir şekilde verildi ve hastalar yoğurtlarını evde bu yoğurdu üreterek kendileri yaptılar.

**Serolojik Testlerin Çalışılması:** Anti-tTG IgA ve anti-DGP IgA antikorlarını belirlemeye yönelik, enzim immunoassay esasına dayanan Delta Biologicals (İtalya) ticari kitleri kullanılarak Mago Touch (İtalya) marka açık sistem EIA cihazında otomatize olarak çalışıldı. Anti-endomisyum IgA antikoruna IIF yöntemiyle çalışıldı. Substrat olarak primat karaciğer hücresi kullanıldı. IF sprinter cihazında IIFT: Liver (monkey) IgA kiti (Almanya) kullanılarak otomatize olarak çalışıldı.

**Biyokimyasal Testlerin Çalışılması:** Hastaların başlangıç ve 3.ay ALT, AST, ALP, albumin, kalsiyum, demir, ferritin, B12 vitamini, folat, D vitamini, TSH, hemoglobin ve trombosit değerleri kaydedildi. Hemoglobin ve trombosit değerleri Sysmex XN-2000 cihazıyla spektrometrik olarak analiz edildi. ALT, AST, ALP, albumin, kalsiyum ve demir değerleri Roche/Hitachi Cobas sisteminde kullanılan Cobas 8000 modülünde (Roche Laboratory Systems, Almanya) sırasıyla ALT, AST, ALP2, ALB2, CA2, IRON2 kitleri ile analiz edildi. TSH, ferritin, B12 vitamini, D vitamini ve folat değerleri Roche/Hitachi Cobas sisteminde kullanılan Cobas 6000 modülünde (Roche Laboratory Systems, Almanya) sırasıyla Elecsys TSH, Elecsys Ferritin, Elecsys Vitamin B12 II, Elecsys Vitamin D total II ve Elecsys Folate III kitleri (Roche Laboratory Systems, Almanya) ile analiz edildi.

**İstatistiksel Değerlendirme:** Çalışmadan elde edilen veriler SPSS for Windows 22.0 (Statistical Package for Social Sciences Inc, Chicago, IL, ABD) programı ile analiz edildi. İstatistiksel olarak  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Takip verilerinin gruplar arasındaki değişimi ANOVA testi ile belirlendi.

## Bulgular

**Örneklerin Toplanması:** Aralık 2018-Ağustos 2019 tarihleri arasında Erişkin Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran 50 çölyak hastası araştırmaya alındı. Probiyotik yoğurt+glutensiz diyet (GD) grubu ve Glutensiz diyet (GD) grubundaki hastalara ait demografik veriler Tablo 1'de görülmektedir.



**Tablo 1. Çalışma gruplarının demografik özellikleri (Ankara, 2019).**

|          |       | Probiyotik yoğurt +<br>GD grubu (n=25)<br>Ortalama ± SD | GD grubu<br>(n=25)<br>Ortalama ± SD | P<br>( $<0,05$ ) |
|----------|-------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Cinsiyet | Kadın | 18                                                      | 18                                  | 1,000            |
|          | Erkek | 7                                                       | 7                                   |                  |
| Yaş      |       | 37,6±12,6                                               | 34,5±12                             | 0,382            |
| Boy      |       | 164,2±9,4                                               | 165,5±7,8                           | 0,582            |
| Kilo     |       | 64,4±10,5                                               | 62,8±12,2                           | 0,622            |
| BKI      |       | 23,8±3,3                                                | 22,9±4,5                            | 0,425            |

GD: Glutensiz diyet

**Serolojik Bulgular:** Probiyotik yoğurt+GD ve GD grubunun 0. ay ve 3. ay anti-tTg IgA, anti-DGP IgA ve EMA değerleri Tablo 2'de görülmektedir. Her iki grupta da üç ayın sonunda çölyak belirteçlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş saptandı ( $p<0.001$ ). Her iki gruptaki çölyak belirteçlerinin 0. ay-3. ay değişimi karşılaştırıldığında EMA değerinde probiyotik yoğurt+GD grubunda, GD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş saptanırken ( $p=0.025$ ), anti-tTg IgA ve anti-DGP IgA değerlerinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0.05$ ).

**Biyokimyasal Bulgular:** Probiyotik yoğurt+GD ve Glutensiz diyet (GD) grubunda 0.ay-3.ay folat, B12 vitamini, D vitamini, ferritin ve demir değerleri belirgin olarak artmasına rağmen her iki grup arasındaki değişim farkı istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ).

**Klinik Bulgular:** Probiyotik yoğurt+GD ve GD grubundaki 0. ay ve 3. ay gastrointestinal semptomların (ishal, kabızlık, karın ağrısı, şişkinlik, reflü) görülme sıklığı azaldı. Her iki grup arasında karın ağrısı semptomunda istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı.

## Sonuç

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ilk defa 20. yüzyılın başlarında, Rus bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından araştırılmış, Bulgar köylülerinin düzenli olarak fermente süt ürünleri tükettikleri için daha sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını tespit edilmiştir<sup>(8)</sup>. Sağlıklı bir yaşam ile fermente gıdalar arasındaki bu ilişki bugün de geçerliliğini korumakta olup, fermente ürünler üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Bu çalışmada *S. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. acidophilus* probiyotik bakterilerini içeren yoğurdu üç ay boyunca düzenli tüketmenin çölyak hastalarının çölyak belirteçlerine, biyokimyasal değerlerine ve klinik semptomlarına olan etkisini değerlendirdik.

Sugai E. ve ark.nın<sup>(9)</sup> yaptığı bir çalışmada, çölyak hastalarının GD sonrası antikor değişimleri incelenmiştir. Üç ay GD sonrası anti-tTG IgA %62 ve anti-DGP IgA %56 oranında azalmıştır. Bir yıllık GD sonrası da, anti-tTG IgA %73 ve anti-DGP IgA %77 oranında azalmıştır. Bizim çalışmamızda probiyotik yoğurt+GD grubunda 0.-3. ay karşılaştırmasında anti-tTG IgA %75, anti-DGP IgA %52 ve EMA %53 oranında azaldı. GD grubunda ise üç aylık GD sonrası anti-tTG IgA %63, anti-DGP IgA %52 ve EMA %33 oranında azaldı. Çalış-

**Tablo 2. Probiyotik yoğurt+Glutensiz diyet (GD) ve Glutensiz diyet grubunun çölyak belirteçlerinin değişimleri (Ankara, 2019)**

|              | Probiyotik yoğurt + GD<br>grubu (n=25)<br>Ortalama ± SD |           | GD grubu (n=25)<br>Ortalama ± SD |           | p ( $<0.05$ ) |
|--------------|---------------------------------------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|---------------|
|              | 0. ay                                                   | 3. ay     | 0. ay                            | 3. ay     |               |
| Anti-tTG IgA | 207.7±88.7                                              | 48.1±34.6 | 245.5±101.8                      | 83.8±68.2 | 0.839         |
| Anti-DGP IgA | 140.7±89.0                                              | 57.9±48.2 | 146.4±84.5                       | 66.0±49.0 | 0.854         |
| EMA          | 3.4±0.9                                                 | 1.7±1.0   | 3.6±0.6                          | 2.5±1.1   | 0.025         |

mamız yukarıdaki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. GD'e bağlılık; probiyotik bakteri takviyesi olsun veya olmasın çölyak parametrelerinde anlamlı düşüşe neden oldu.

Çölyak hastalığında vitamin ve minerallerin emiliminin bozulmasına bağlı malabsorpsiyon semptomları sık görülmektedir. Deora ve ark.nın<sup>(10)</sup> yaptığı bir çalışmada çölyak hastalarında GD sonrası vitamin değerlerinde artış görülmektedir. Bunun yanında, probiyotik takviyesinin de demir, B12 vitamini ve folat miktarlarını artırdığı gösterilmiştir<sup>(11)</sup>. Bizim çalışmamızda probiyotik yoğurt+GD grubunda üç ayın sonunda D vitamini ve ferritin değerlerinde anlamlı artış saptandı. Folat, B12 vitamini ve demir değerlerinde de artış olmasına rağmen 0.ay-3.ay arasındaki fark anlamlı bulunmadı. GD grubunda üç ayın sonunda D vitamini, folat ve demir değerlerinde anlamlı artış saptandı. B12 vitamini ve ferritin değerlerinde de artış olmasına rağmen 0.ay-3. ay arasındaki fark anlamlı bulunmadı. Her iki grubun D vitamini, folat, B12 vitamini, ferritin ve demir düzeylerinin üç aylık değişimi karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark bulunmadı.

Gastrointestinal sistem disbiyozisi, GD ile beslenen çölyak hastalarında da görülmüştür. Disbiyozisin bu hastalardaki persistan gastrointestinal semptomlarla ilişkisi olduğu düşünülmektedir probiyotik tedavisinin yararlı olacağına dair çalışmalar yapılmıştır<sup>(12)</sup>. Francavilla ve ark.nın<sup>(12)</sup> yaptığı bir çalışmada, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ve *Bifidobacterium brevis* probiyotik karışımının kalıcı İBS semptomları olan GD uyumlu çölyak hastalarının İBS semptomlarına etkisi araştırılmıştır. Altı hafta sonunda probiyotik grubundaki semptomların plaseboya göre anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda hem probiyotik yoğurt+GD grubunda hem de GD grubunda üç ay sonrası semptomlarda anlamlı azalma görüldü. Bu durum çölyak hastalarının semptomlarının tedavisinde GD'nin önemli rolü olduğunu doğrulamaktadır<sup>(8)</sup>. Her iki grup karşılaştırıldığında karın ağrısı semptomunda probiyotik yoğurt+GD grubunda, GD grubuna göre anlamlı azalma saptandı. İshal, kabızlık, şişkinlik ve reflü semptomlarındaki azalmanın iki grup arasındaki farkı anlamlı düzeyde değildi.

Sonuç olarak; çölyak hastalarında hem GD ile beslenme hem de probiyotik yoğurt ve GD ile beslenme çölyak belirteçlerini düşürmede etkili bulunmuştur. Probiyotik yoğurt ve GD ile beslenme sadece GD ile beslenmeyle karşılaştırıldığında EMA düzeylerinin azalmasına istatistiksel olarak anlamlı katkı sağladığı bulunmuşken, anti-tTG IgA ve anti-DGP IgA düzeylerindeki değişim yogurt kullanan grupta

daha düşük seviyede saptanmasına rağmen anlamlı bulunmamıştır. Çölyak hastalarında GD ile beslenmenin folat, D vitamini ve demir değerlerini arttırdığı; probiyotik yoğurt ve GD ile beslenmenin ise ferritin ve D vitamini değerlerini arttırdığı bulunmuştur. Çölyak hastalarında hem GD ile beslenmenin hem de probiyotik yoğurt ve GD ile beslenmenin İBS tipi semptomları azalttığı bulunmuştur. Probiyotik yoğurt ve GD ile beslenme sadece GD ile beslenmeyle karşılaştırıldığında çölyak hastalarındaki İBS semptomlarından karın ağrısının azalmasına istatistiksel olarak anlamlı katkı sağladığı bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Çölyak, probiyotikler, mikrobiyota, serolojik belirteç

#### Kaynaklar

1. Ensari A. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): controversies in diagnosis and classification. Arch Pathol Lab Med. 2010;134(6):826-36. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-134.6.826>
2. Tonutti E, Bizzaro N. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. Autoimmun Rev. 2014;13(4-5):472-6. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.043>
3. Leffler DA, Schuppan D. Update on serologic testing in celiac disease. Am J Gastroenterol. 2010;105(12):2520-4. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.276>
4. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clin Microbiol Rev. 2003;16(4):658-672. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.658-672.2003>
5. Orlando A, Linsalata M, Notarnicola M, Tutino V, Russo F. *Lactobacillus* GG restoration of the gliadin induced epithelial barrier disruption: the role of cellular polyamines. BMC Microbiol. 2014;14:19. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-19>
6. Martinello F, Roman CF, Souza PA. Effects of probiotic intake on intestinal *Bifidobacteria* of celiac patients. Arq Gastroenterol. 2017;54(2):85-90. <https://doi.org/10.1590/S0004-2803.201700000-07>
7. De Angelis M, Rizzello CG, Fasano A, et al. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. Biochim Biophys Acta. 2006;1762(1):80-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2005.09.008>
8. Hitchins AD, McDonough FE. Prophylactic and therapeutic aspects of fermented milk. Am J Clin Nutr. 1989;49(4):675-84. <https://doi.org/10.1093/ajcn/49.4.675>
9. Sugai E, Nachman F, Vázquez H, et al. Dynamics of celiac disease-specific serology after initiation of a gluten-free diet and use in the assessment of compliance with treatment. Dig Liver Dis. 2010;42(5):352-8. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.07.011>
10. Deora V, Aylward N, Sokoro A, El-Matary W. Serum vitamins and minerals at diagnosis and follow-up in children with celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2017;65(2):185-9. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001475>
11. Valentini L, Pinto A, Bourdel-Marchasson I, et al. Impact of personalized diet and probiotic supplementation on inflammation, nutritional parameters and intestinal microbiota - The "RISTOMED project": Randomized controlled trial in healthy older people. Clin Nutr. 2015;34(4):593-602. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.09.023>
12. Francavilla R, Piccolo M, Francavilla A, et al. Clinical and microbiological effect of a multispecies probiotic supplementation in celiac patients with persistent IBS-type symptoms: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. J Clin Gastroenterol. 2019;53(3):e117-25. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001023>
13. Kaukinen K, Lindfors K, Collin P, Koskinen O, Mäki M. Coeliac disease--a diagnostic and therapeutic challenge. Clin Chem Lab Med. 2010;48(9):1205-16. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.241>

## Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakillerinde Mikrobiyotanın Etkisi: Engrafman ve GVHH

Ekin Ece Gürer<sup>1</sup>, Fatma Savran Oğuz<sup>2</sup>, Sevgi Kalayoglu Beşışık<sup>3</sup>, Zerrin Aktaş<sup>4</sup>,  
Kader Çalışkan<sup>5</sup>, Mustafa Oral Öncül<sup>6</sup>, Zafer Gülbaş<sup>5</sup>

<sup>1</sup>*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

<sup>2</sup>*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Doku tiplleme laboratuvarı, İstanbul*

<sup>3</sup>*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları hematoloji Bilim Dalı, İstanbul*

<sup>4</sup>*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

<sup>5</sup>*Anadolu Sağlık Merkezi, Hematolojik Onkoloji Kliniği, İstanbul*

<sup>6</sup>*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

✉ ekinecegurer@gmail.com

### Giriş

İnsan mikrobiyotası, konakçının belirli yüzeylerinde (barsak, deri, ağız vb.) konumlanmıştır ve  $10^{13}$  ile  $10^{14}$  kadar mikroorganizmaya ev sahipliği yapmaktadır. Barsak mikrobiyotası ürettikleri kısa zincirli yağ asitleri (KZYA)'lar ile insan fizyolojisinde, barsak mukozal bariyerinin yapısal bütünlüğünü koruyarak patojenlerin kolonizasyonunu engellemek, barsak-beyin eksenini iletişimine katılmak, bağışıklık sistemini hazırlamak ve besin sindirime katkıda bulunmak gibi rollere sahiptir<sup>(1)</sup>. Sağlıklı insan barsak flora-sına genelde *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* ve *Verrucomicrobia* filumları hakimdir. İlk iki filum, barsak mikrobiyotasının yaklaşık %90'ını oluşturur. *Clostridium*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* *Firmicutes* sınıfındayken, *Bacteroides* ve *Prevotella* ise *Bacteroidetes* sınıfında yer alır. *Bifidobacterium* ise *Actinobacteria* sınıfındadır<sup>(2)</sup>. *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus* ve *Ruminococcus* mikrobiyotadaki diğer baskın enterotiplerdir<sup>(3)</sup>. Hematopoietik Kök Hücre Transplantasyonu (HSCT), malign hematolojik hastalıklar veya malign olmayan konjenital ve edinilmiş hastalıklar dahil olmak üzere birçok durum için en iyi bilinen tedavi yöntemidir (Gratwohl ve ark., 2013)<sup>(4)</sup>. Akut Graft Versus Host Hastalığı (aGVHH), allojenik hematopoetik kök hücre nakli (Allo-HKHN) sonrası ortaya çıkabilecek en önemli komplikasyonlardan biridir. En şiddetli ve yaşamı tehdit eden vakalarda, cilt, bağırsak ve karaciğer tutulumu üçlü-süne gastrointestinal (GI) GVHH hakimdir<sup>(5)</sup>. Allo-HKHN sırasında mikroorganizma çeşitliliği azalır ve barsağın mikrobiyal bileşiminde önemli değişiklikler gözlemlenebilir, bu da hazırlık rejimlerinin veya transplantasyonun barsak disbiyozuna neden olduğunu gösterir<sup>(6,7,8)</sup>. KHN hastalarında görülen barsak çeşitliliğinin kaybı, genellikle diyet liflerinden KZYA ürettiği bilinen *Clostridia* türlerinin kaybı ile ilişkilidir<sup>(9)</sup>. Akut GVHH gelişimi, HLA uyumlu kardeş donörlere kıyasla HLA özdeş olmayan veya akraba olmayan donörlerden yapılan KHN'lerinde daha sık görülür ve daha şiddetlidir<sup>(10)</sup>. Bağırsak mikrobiyotasının GVHH'yi etkilediğine dair ilk ipucu 1970'lerin başlarına dayanır. Kemirgen modellerinde yapılan çalışmada, mikrobiyota modülasyonu GVHH'nin azaldığını ve antibiyotikle tedavi edilen veya allo-HKHN uygulanan farelerde

sağkalımın uzadığını gösterilmiştir<sup>(11,12)</sup>. Baskın *Enterococcus* popülasyonu, ciddi akut GVHH ile önemli ölçüde ilişkilidir. Ayrıca, transplantasyonu takiben, MHC-uyumsuz murin modelinde *Enterococcus faecalis*'in oral uygulaması sonucu aGVHH'yi şiddetlendirerek akut GVHH patogeneğinde *Enterococcus spp.* varlığının önemli bir rolü olduğunu işaret etmektedir<sup>(13)</sup>. HLA (Human Leukocyte Antigen) genleri, MHC (Major Histocompatibility Complex) gen kompleksi içinde yer almaktadır. Bu kompleks 6. kromozomun kısa kolu üzerinde (6p21.31) lokalize olup, 3.78 Mb büyüklüğünde bir alanı kapsamaktadır. Gen açısından oldukça zengin olan bu bölgede 240'dan fazla lokus tanımlanmıştır. HLA gen lokusu, kodlanan proteinlerin özellikleri, dokulardaki dağılımı ve fonksiyonuna göre sınıf I, sınıf II ve sınıf III olarak bölümlere ayrılmıştır<sup>(14)</sup>. Konakçının bağışıklık sistemi bir ekosistem yöneticisi gibi çalışır ve mikrobiyal bileşimin çeşitliliğini kontrol etmede kritik bir rol oynar. HLA genleri de dahil olmak üzere konağın immün sistemi ile ilişkili genetik faktörleri, barsak mikrobiyal kompozisyonu üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. HLA allelleri, genom ilişkili çalışmalarda belirlenen diğer genetik faktörlerden daha fazla hastalık riski (Çölyak, Behçet, Üveit gibi) taşır<sup>(15)</sup>. MHC genlerinin evrim süreciyle ilgili hipotezler, patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların MHC'ler ile ilişkili olduğu yönündedir. Bununla birlikte, vücuttaki bazı organizmalar, yaşamları boyunca konakçılara temel metabolik hizmetler sağlayan<sup>(16)</sup> ve enfeksiyona karşı direnci artıran canlılar olarak var olmaktadır<sup>(17)</sup>. MHC'lerde heterozigot avantajı ise, MHC heterozigotlarının MHC homozigotlarından daha etkili bir bağışıklık tepkisine sahip olduğu ve sonuç olarak enfeksiyona karşı direncin arttığı argümanına dayanan patojen merkezli bir MHC evrim modelidir<sup>(18)</sup>. Hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalarda, MHC polimorfizmi ve mikrobiyota bileşimi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. İlk çalışmalarda, KZYA profilleri karşılaştırılmıştır. MHC'leri farklı konjenik murinlerin dışkı bakteri florasının bileşiminde farklılıklar görülmüştür<sup>(19)</sup>. Klasik olmayan MHC Sınıf Ib (MHC Ib) moleküllerinin, T hücrelerine eşleştirilmiş antijenleri sunmak için işlev görebildiğine ve dolayısıyla konakçı ile mikrobiyotası arasındaki etkileşimde doğrudan aracı olduklarına dair doğrudan kanıt sağlanmıştır<sup>(20)</sup>.

## Gereç ve Yöntem

Araştırmaya Anadolu Sağlık Merkezi, Onkolojik Hematoloji Polikliniği'nde kan hastalıklarından en az birinin tanısını almış 25 hasta dahil edildi. Kontrol grubu olarak hastaların donörleri seçildi. Hastalardan nakil öncesi hazırlık rejimleri başlamadan önce ve nakli takiben 3.haftada olmak üzere toplam 2 kere dışkı örneği alınmıştır. Donörlerden de nakil için gerekli aşılama rejimi başlamadan dışkı örnekleri alınmıştır. Hastaların dışkı örnekleri kemik iliği vaka sorumlusu ve kemik iliği transplantasyon (KİT) yatan katı hemşireleri tarafından steril swap kabına alınmıştır. Kaplardaki örnekler çalışmaya başlanana kadar uygun şartlarda (-80 °C) saklandı.

Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun çalışmaya dahil edilme kriterleri arasında ilk olarak mikrobiyotayı etkileyen faktörler göz önünde bulundurulmuştur.

**Mikrobiyotayı etkileyen faktörler:** Gıda alerjisi olmaması, malabsorpsiyon olmaması, invaziv enfeksiyona sahip olmaması, 3 ay öncesine kadar antibiyotik kullanmamış olması, 4 hafta öncesine kadar kortikosteroid kullanmamış olması, immünsüpresif ilaç hiç kullanmamış olması, sülfosalazin, meselazin kullanıyor ise 4 hafta öncesine kadar bırakmış olması, son 6 ay içerisinde prebiyotik/probiyotik tedavisi almamış olması, çalışmadan üç ay öncesine kadar kolon temizliği yapılmamış olması.

Diğer kriterler ise; Gönüllüler için aktif bir hastalık geçiriyor olmak, hamile olmamak, 18 yaşından büyük olmak; Hastalar için kan hastalıklarından birine sahip olmak, hamile olmamak, 18 yaşından büyük olmak.

**Mikrobiyota analiz yöntemleri:** (1) Dışkıdan Nükleik Asit İzolasyonu (2) HRM (High Resolution Melting) Analizi (3) NGS (Next Generation Sequencing)

Numunelerden ilk aşamada dışkıdan mikroorhanizma nükleik asidi (NA) izole edilmiştir. NA izolasyonu için spin column yöntemi kullanılmıştır. Bu aşamada RNA kontaminasyonunu engellemek için silika kolonlar kullanılmıştır. Elde edilen nükleik asitlerin yoğunluk ve konsantrasyon ölçümleri spektrofotometre ile yapılmıştır.

Bu çalışmada HRM analizi için V3 ve V4 bölgeleri kullanılmıştır. 16S rRNA bölgelerinin çoğaltımı PCR ile gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA bölgesi Bact342f (5'-CCTACGGGAGGAGCAG-3') ve Bact534r (5'-ATTACCGGCTGCTGG-3') primer çifti ile hedeflenmiştir. PCR; preinkübasyon 300 sn 95°C; 40 döngü, 20 sn 95°C; 40 döngü, 20 saniye 53°C; 40 döngü, 30 saniye 60°C koşullarında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar Biospeedy® HRM Master Mix (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak Biorad CFX Connect Sistemi'nde (Bio-Rad, ABD) gerçekleştirilmiştir. Hasta örnekleri hem birbirleriyle hem de kontrol grubu örnekleriyle çapraz karşılaştırması yapılarak dendrogramlar oluşturulmuştur. PCA ordinasyonlarının hesaplanması ve sonrasında gerçekleştirilecek korelasyon analizleri için de Minitab 17 yazılımı kullanılmıştır.

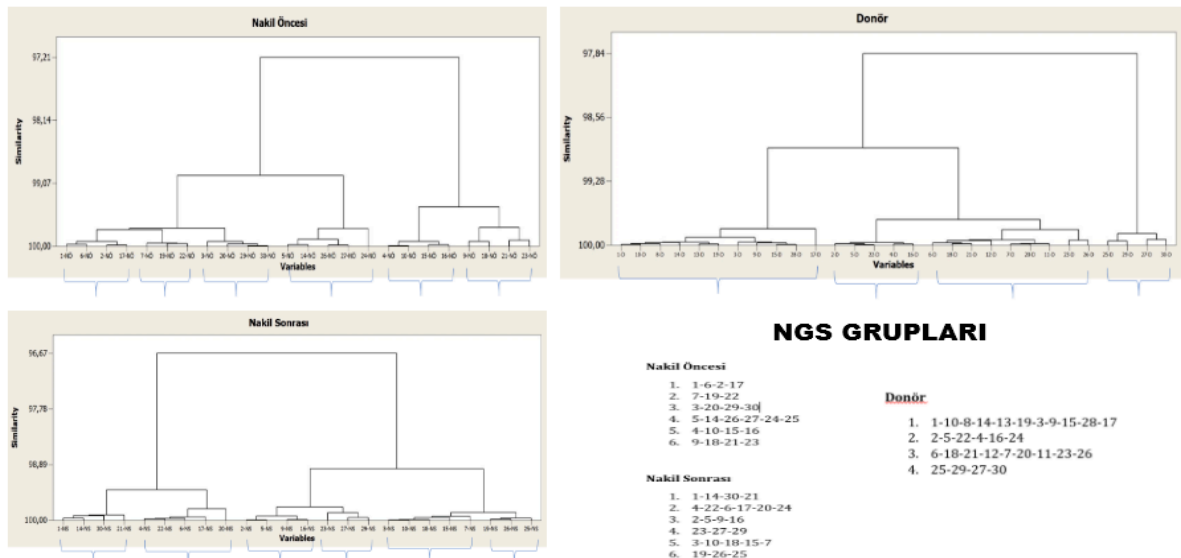
Devam eden bir çalışma olup, HRM analizi ile gruplandırılan örnekler NGS aşaması için İngiltere Novagen'e gitmiştir. Metagenomik analiz için Mothur ve Galaxy programı kullanılacaktır. Kütüphane Silva Bacteria veri datası kullanılacaktır. Şekiller için ise Krona yazılımı kullanılacaktır.

**Klasik PCR ile direnç tespiti:** Hastaların nakil sonrası dışkı örneklerinde *OXA-48*, *KPC*, *NDM* ve *CTXM* gen taraması klasik PCR yöntemiyle yapıldı (Tablo 1).

## Bulgular

Çalışma grubunda akut myeloid lösemi en fazla bulunan kan hastalığı oldu. Toplam 25 hastanın yaş ortalaması 46.24±14.86 yıl (18-71), vericilerin ise 43.40±13.20 yıl (11-62) olarak saptandı. Cinsiyet dağılımı hastalarda E/K: 15/10

## HRM ANALİZİ SONRASI DENDROGRAM ANALİZLERİ



Şekil 1. HRM analizleri.

**Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler.**

| Primer Adı | Primer Dizisi                  | Primer Büyüklüğü |
|------------|--------------------------------|------------------|
| blaCTXM-1  | F: 5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'     | 550 bp           |
|            | R: 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3'     |                  |
| blaNDM     | F: 5'-TCTCGACATGCCGGTTTCGG-3'  | 475 bp           |
|            | R: 5'-ACCGAGATTGCCGAGCGACTT-3' |                  |
| OXA-48     | F: 5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3   | 743 bp           |
|            | R: 5'-GAGCACTTCTTTGTGTATGGC-3  |                  |
| KPC        | F: 5'-TGTCACGTATATCGCGGT-3'    | 900 bp           |
|            | R: 5'-CTCAGTGTCTACAGAAAAC-3'   |                  |

vericilerde E/K: 17/8 idi. Kök hücre kaynağı %87 oranında çevre kanı idi. Hastalar ve verici HLA uyumu 10/10 idi. Allo-HKHN ile ilişkili ilk 100 günlük GVHH oranı %16 ve relaps %20 olarak bulundu. Hem hasta hem de kontrol grubunda en çok görülen kan grubu O RH+ olarak belirlenmiştir.

HRM dendrogram analiz sonuçlarına göre, donör ve hasta mikrobiyota profillerinde fark olduğu, allo-HKHN'ye bağlı olarak hastaların nakil öncesi ve nakil sonrası mikrobiyota floralarının değişmiş olduğu, relaps olan, GvHH geliştiren ve engrafman sağlanan hastalarda da benzer floraların olduğu gözlemlendi (Şekil 1). NGS çalışmaları sürmektedir ve NGS sonuçlarına göre değerlendirmeler ayrıca yapılacaktır. Değerlendirme sonuçlarına göre, gerekirse gruplandırmalar yapılmadan, hasta örnekleri ayrı ayrı tekrar çalışılabilir.

En sık görülen alleller HLA-A\*02:01, HLA-B\*51:01, HLA-C\*06:02, HLA-DRB1\*15:01, HLA-DQB1\*03:01 idi. Ön analiz sonuçlarına göre hastalarda ve vericilerde baskın mikrobiyota florası ile ilişkili en sık görülen alel HLA-DQB1 (p=0.001) olmuştur.

Hastalarda KPC ve NDM genleri bulunmadı.%16 CTXM geni,%16 CTXM/OXA-48 birlikteliği saptandı.

### Sonuç

İntestinal flora izlemi GvHH koruma ve/veya tedavisinde yönlendirici veri sağlayabilir. HLA polimorfizmi ile mikrobiyota arasında genetik temelli bir bağlantı olduğu kanıtlanabilir. Çalışmamız allo-HKHN olgularında mikrobiyota değişimini belirleyen ön çalışmadır ve NGS çalışmaları sürmektedir.

Ön analiz verilerine göre mikrobiyota ile hastalığın seyri ile nakil sonrası GvHH gelişimi arasında ilişki kurulmuştur. Engrafman ve değişen mikrobiyota arasında bağlantı kurulmuştur. Hastalara donörleri ile doku uyumu tespiti için Doku Tipleme Testi yapılmıştır. Yapılan testlerdeki doku tipi sonuçlarına göre mikrobiyota çeşitliliği istatistiksel olarak ilişkilendirilmiştir. Hastalığın tedavisi ve engellenmesi için fekal transplantasyon, pre-probiyotik desteği ve gut mikrobiyotanın regülasyonu ile terapötik tedavilere umut doğmuştur. Tüm bu çalışma, lösemi ve lenfoma hasta grubunda, kök hücre nakli öncesi ve sonrası takipli ve karşılaştırmalı olacak şekilde ilk defa yapılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** İntestinal mikrobiyota, allojenik hematopoetik kök hücre nakli, kan hastalıkları, GvHH, engrafman, HLA.

### Kaynaklar

1. Koren O, Goodrich KJ, Cullender CT, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 2012;150(3):470-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.008>
2. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-80. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
3. Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*. 2015;7(1):17-44. <https://doi.org/10.3390/nu7010017>
4. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf MD, et al. Global hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) at one million: An achievement of pioneers and foreseeable challenges for the next decade. A report from the Worldwide Network For Blood and Marrow Transplantation (WBM T) Blood. 2013;122(21):2133. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00028-9)
5. Leisenring WM, Martin PJ, Petersdorf EW, et al. An acute graft-versus-host disease activity index to predict survival after hematopoietic cell transplantation with myeloablative conditioning regimens. *Blood*. 2006;108(2):749-55. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0254>
6. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: Loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(5):640-5. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.01.030>
7. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;124(7):1174-82. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-554725>
8. Chiusolo P, Metafuni E, Paroni Sterbini F, et al. Gut microbiome changes after stem cell transplantation. *Blood*. 2015;126:1953. <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.1953.1953>
9. Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD, Martin PM, Singh N. Transporters and receptors for short-chain fatty acids as the molecular link between colonic bacteria and the host. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(6):869-874. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.006>
10. Przpiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:825.
11. Jones JM, Wilson R, Bealmeas PM. Mortality and gross pathology of secondary disease in germ free mouse radiation chimeras. *Radiat Res*. 1971;45:577-88. <https://doi.org/10.2307/3573066>
12. van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, van der Waaij D. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst*. 1974;52:401-4. <https://doi.org/10.1093/jnci/52.2.401>
13. Stein-Thoeringer C, Peled JU, Lazrak A, et al. Domination of the gut microbiota with *Enterococcus* species early after allogeneic bone marrow transplantation is an important contributor to the development of acute graft-versus-host disease (GVHD) in mouse and man. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24:S40-1. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.12.594>
14. Shiina T, Blancher A, Inoko H, Kulski JK. Comparative genomics of the human, macaque and mouse major histocompatibility complex. *Immunology*. 2017;150:127-38.



- <https://doi.org/10.1111/imm.12624>
15. Gough SC, Simmonds MJ. The HLA region and autoimmune disease: Associations and mechanisms of action. *Curr Genomics*. 2007;8:453-65.  
<https://doi.org/10.2174/138920207783591690>
  16. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota masters of host development and physiology. *Nature Rev Microbiol*. 2013;11(4):227-38.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
  17. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Rev Immunol*. 2013;13(11):790-801.  
<https://doi.org/10.1038/nri3535>
  18. Rodriguez-Concepcion M, Boronat A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*. 2002;130(3):1079-89.  
<https://doi.org/10.1104/pp.007138>
  19. Toivanen P, Vaahtovuori J, Eerola E. Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. *Infect Immun*. 2001;69(4):2372-7.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2372-2377.2001>
  20. Linehan LJ, Harrison JO, Han Ji-S, et al, Non-classical immunity controls microbiota impact on skin immunity and tissue repair. *Cell*. 2018;172(4):784-96.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.033>

# ***Helicobacter pylori* Dış Zar İnflamatuvar Protein A (Oipa)’Nın Homolog Rekombinasyon Yöntemi Kullanılarak Silinmesi ile $\Delta$ oipA *H. pylori* G27 Suşunun Elde Edilmesi**

**Sümeyye Akçelik Deveci<sup>1</sup>, Nesteren Mansur Özen<sup>1</sup>, Sinem Öktem Okullu<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Medikal Biyoteknoloji Doktora programı

<sup>2</sup>Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

✉ sumeyye.akcelik@live.acıbadem.edu.tr

## **Giriş**

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 1. sınıf karsinogen olarak tanımlanan *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), dünya nüfusunun yarısından fazlasını yaşamlarının bir döneminde enfekte eden Gram negatif, spiral şeklinde ve mikroe-rofilik patojen bir bakteridir. Yaklaşık olarak 3 mikrometre uzunluğunda ve 0,5 mikrometre çapında olan bakterinin, 2 ile 6 arasında değişen ve hareket etmesine yardımcı olan kamçıları vardır<sup>(1)</sup>.

*H. pylori* enfekte ettiği canlıların mide epitelinin mucus tabakasında kolonize olarak kronik gastrit, peptik ülser, mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoması (MALT) gibi kronik mide enfeksiyonlarına yol açmaktadır<sup>(2)</sup>. 1994 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı<sup>(3)</sup>’nın (World Health Organization International Agency for Research on Cancer), *H. pylori*’yi insanlarda kanserojen veya kansere neden olan bir ajan olarak sınıflandırması ile birlikte yıllar içinde yapılan çalışmalar bu bakteri üzerine yoğunlaşmış ve bakterinin mide kanserinin önemli bir sebebi olduğu sayısı giderek artan çalışmalar ile kabul edilmiştir. Dünyada görülen kanserler arasında sıklık yönünden 5. sırada, kansere bağlı ölümlerde ise 3. sırada gelen mide kanserinin önemli sebeplerinden biri olarak görülen *H. pylori*’nin küresel prevalansı %50’ den fazladır<sup>(4)</sup>. Gelişmiş ülkelere göre gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek olduğu belirlenen *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansı yaş, etnisite, cinsiyet, coğrafya ve sosyoekonomik durum ile yakından ilişkilidir. Bakterinin ülkemizdeki prevalansı ise erişkin bireyler için yaklaşık %70-80, çocuklar için ise %40 olarak belirlenmiştir<sup>(5)</sup>.

*H. pylori* ile enfekte bireylerin büyük çoğunluğu asemptomatik bulgular gösterirken, sadece %20 sinde semptomatik bulgular gerçekleşmektedir. Bunun sebebi konağın bağışıklık yanıtı, çevresel faktörler ve özellikle bakterinin sahip olduğu farklı virülans faktörleri ile yakından ilişkilidir. Enfeksiyona sebep olan bakterinin virülans faktörleri ve bu virülans faktörleri ile bakterinin neden olduğu enfeksiyonun konakta neden olduğu değişimler ile ilgili bilgi sahibi olmak bakterinin sebep olduğu semptomların prognozu konusunda fikir edinilmesini sağlayacak önemli bir faktördür.

Bakterinin patogenezi mide dokusuna girişi ile başlar; mide mukoza yüzeyine tutunması ve çoğalması ile devam eder<sup>(6)</sup>. Bakterinin spiral yapıda olması ve kamçıları sayesinde mucus tabakası içinde yüzebilir ve mide epiteline tutunabi-

li. *H. pylori* salgıladığı üreaz enzimi yardımı ile midenin asidik ortamında var olan üreyi amonyak ve karbondioksit dönüştürür. Amonyak oluşan reaksiyonda açığa çıkan su ile birleşip amonyuma dönüşürken, H<sup>+</sup> iyonları olarak çevresini alkalileştirir ve böylece bakteriyi mide asidinin zararlı etkisinden korur. Ürettiği bu enzimin yardımı ile enfeksiyonunun ilk adımı olan mide dokusuna girişi gerçekleştirmiş olur<sup>(7)</sup>. Patogenezin ikinci basamağı ve başarılı bir kolonizasyonun ilk basamağı olan bakterinin mide mukoza yüzeyine tutunmasında bakterinin sahip olduğu dış zar proteinleri görev almaktadır<sup>(8)</sup>. İfade edilen bu proteinler bakterinin mide yüzeyine tutunmasını sağlayarak sıvı akışı, peristaltik hareketler ve mukoza yüzeyinin dökülmesi gibi mide- de gerçekleşen temizleme mekanizmalarından korunmasını sağlar<sup>(9)</sup>.

*H. pylori*’nin dış zar proteinleri bakterinin mide epitel yüzeyine bağlanması ve uzun süreli kolonizasyonuna yardımcı olması nedeni ile bakteriye bağlı gelişen enfeksiyonda oldukça önemli olduğu bilinmektedir<sup>(8)</sup>. Dış zar inflamatuvar proteini olan OipA (outer membrane inflammatory protein A) *H. pylori*’nin dış zar proteinlerinden birisidir. OipA başlangıçta tip 4 salgılama sistemi (T4SS)’den bağımsız bir şekilde in-vitro IL-8 salgılanmasını destekleyen ve in-vivo olarak mide enflamasyonunu arttıran bir yüzey proteini olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda OipA’nın *H. pylori* enfeksiyonunun erken evrelerinde *H. pylori* ile indüklenen fokal adhezyon kinaz aktivasyonu ve gastrik epitelial hücrelerin sitoskeletal reorganizasyonunda rol oynadığı, bu proteinin birçok virülans faktörü ile etkileşime girip bakteri patogenezinde rol aldığı belirlenmiştir. Yine son yapılan birkaç çalışmada *H. pylori* dış zar proteinlerinden BabA ve OipA’yı ifade eden suşlar ile enfekte canlılarda daha şiddetli mukozal hücrel inflamasyon gözlemlendiği, peptik ülser hastalığı ve mide kanseri gibi klinik sonuçlar ile karşılaşma riskini artırdığı ortaya konmuştur<sup>(10)</sup>. OipA 34kDa luk bir proteindir. *oipA* geninin 5’ ucunda “kayan iplik tamir (slipped strand mispair repair) mekanizması” ve çerçeve kayması mutasyonları olmaktadır. Proteini kodlayan *oipA* genin sinyal-peptid kodlama bölgesindeki CT dinükleotid tekrar motifinde faz değişimi (yani “açık” “on” veya “kapalı” “off” desenler) tarafından düzenlenir. OipA’nın “on” durumu daha şiddetli seyreden ülser ve mide kanseri durumları, ciddi nötrofil infiltrasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bunun sebebinin OipA’nın on durumunda bakterinin mide mukozasına bağlanmasını sağlaması ve buna bağlı olarak kolonizasyonunu güçlendirmesi olarak gösterilmiştir<sup>(11)</sup>.

Bu çalışmada, OipA proteinin *H. pylori* enfeksiyon mekanizmasında aldığı rolün tam olarak belirlenebilmesi ve OipA proteinine sahip olan ve olmayan suşlar ile oluşturulacak enfeksiyon modellerinin karşılaştırılabilmesi için *oipA* geni silinmiş *H. pylori* suşunun ( $\Delta$ oipA *H. pylori* G27) elde edilmesi hedeflenmiştir.

## Gereç ve Yöntem

### *H. pylori* G27 Kökeninin Üretilmesi

Zürich Üniversitesi Moleküler Kanser Araştırmaları Enstitüsü'ndeki Prof. Dr. Anne Müller'den temin edilmiş olan ve tüm virülans genlerine sahip olduğu bilinen *H. pylori* G27 suşu üniversitemiz araştırma laboratuvarında bulunan Anaerob Kavonoz Sistemi (Don Whitely Scientific) ile mikroaerofilik ortam içerisinde 37°C derecede büyütülmüştür. Gen silme deneyleri için seçici besiyeri kanamisin (20 µg/mL) eklenerek hazırlanmıştır. Bakterinin sıvı besiyeri içerisinde üretilmesi gereken durumlarda brucella sıvı besiyeri %10 FBS (fetal bovine serum) ile zenginleştirilerek mikroaerofilik kavanozda, 37°C dereceye ayarlı çalkalamalı etüv içerisinde büyütülmüştür. Üreyen mikroorganizmaların ışık mikroskopunda hareketlilikleri kontrol edilmiştir.

### *oipA* Geninin Silinmesi

Gen silme işlemi için homolog rekombinasyon yöntemi kullanılmıştır. Genomda doğal olarak bulunan alelin yerine mutasyon içeren alelin geçmesiyle gerçekleştirilen bu yöntem için gereken DNA kaseti 'splicing by overlap extension PCR (SOE PCR)' tekniği ile hazırlanmıştır. Farklı DNA parçalarının birleştirilmesi için kullanılan bu polimeraz zincir tepkimesi (PZT) için Biyoteknoloji Bilgileri Ulusal Merkezi (NCBI) bilgi bankası kullanılarak silinmek istenen bölgeye özel primerler tasarlanmıştır. Gen silme işleminde hedef bölgeye yerleştirilecek olan DNA kaseti tasarlanırken kanamisin direnç geni silinmesi hedeflenen *oipA* geni yerine seçici antibiyotik olarak kullanılmak üzere kanamisin direnç geni yerleştirilmiştir (Şekil 1). Kanamisin direnç gen bölgesi, geni içeren bir klonlama vektörü içerisinde bölgeye özel tasarlanan K1 ve K2 primerleri kullanılarak yapılan PZT yöntemi ile çoğaltılmıştır. DNA kasetinin baş ve sonu olarak tasarlanan, *oipA* geni üzerinde akış yukarı ve akış aşağı DNA parçaları oluşturan P1-P2, P3-P4 primer çiftleri kullanılarak PZT yapılmış ve P2-P3 primerlerinin 5' sonları, K1-K2 primerlerinin 5' sonları ile komplementer bölgeler oluşturacak DNA parçaları oluşturulmuştur. Elde edilen DNA'lar %1.5'lük agaroz jelde Sybr gold boyası ile yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 2a).

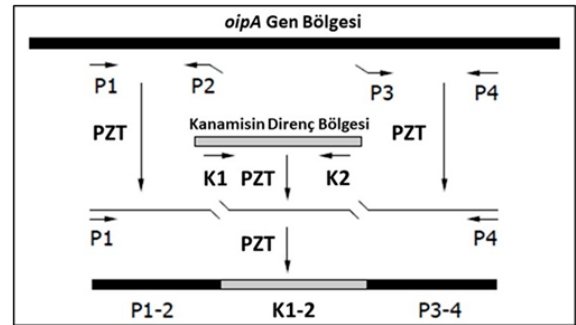
Homolog rekombinasyon için tasarlanan DNA kasetinin oluşturulduğu SOE PCR iki aşamadan oluşan bir PZT yöntemidir. İlk aşama sıcaklık değişimiyle komplementer olan bölgelerin kaynaşmasını kapsar. İkinci aşama ise dış primerler (P1 ve P4) varlığında kaynaşan DNA parçalarının polimeraz aktivitesi ile bir bütün haline getirilmesidir. İlk aşama için konsantrasyonları ölçülen K1-2, P1-2 ve P3-4 DNA parçaları PZT solüsyonu içerisinde son konsantrasyonları 0.6 pmol olacak şekilde karıştırılmış ve kaynaşma işlemi için PZT cihazına yerleştirilmiştir. Primer olmadan gerçekleştirilen ilk aşama bitiminde örneklerin sıcaklıklarının dış primerlerin bağlanma sıcaklığına düşmesi beklendikten sonra dış primerler solüsyonda son konsantrasyonları 0.5 pmol olacak miktarda eklenmiştir. İkinci aşama tamamlan-

dıktan sonra oluşan PZT ürünleri %1'lik agaroz jelde Sybr gold boyası ile yürütülerek kontrol edilmiştir. Deneyin tüm basamaklarında dış primerler ve PZT işlemi için pozitif kontrol olarak *H. pylori* G27 DNA'sı ve negatif kontrol olarak su kullanılmıştır (Şekil 2b).

Hazırlanan DNA kaseti bakterinin içerisine doğal transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Doğal transformasyon yöntemi için 36 saat katı besiyerinde büyütülen *H. pylori* kültürü 200 µl brucella broth sıvı besiyerine toplanmıştır. Solüsyonun 100 µl'si CBA katı besiyerine 8-10 mm çapında damlacıklar şeklinde ekilmiş ve 5 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası yaklaşık 2 µg SOE PCR yöntemi ile oluşturulmuş DNA kaset solüsyonu inkübe edilen kültür üzerine yayılmış ve kültür 12 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Transformasyon yapılmış kültür toplanıp seçici antibiyotikli katı besiyerine ekildikten sonra bir haftalık inkübasyon uygulanmıştır. Bir hafta sonunda seçici besiyerinde koloniler görülmüştür. Oluşan kolonilerden tek koloni seçimi yapılarak sıvı besiyerine alınmıştır. Büyütülen kültürlerden DNA izolasyonları yapılmış ve elde edilen DNA'lar kullanılarak Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) işlemi ile doğrulama deneyleri yapılmıştır (Şekil 2c).

Homolog rekombinasyon ile bakteri içerisine atılan gen kasetinin birden fazla gen bölgesine entegre olma ihtimaline karşı gerçek zamanlı PZT kullanılarak kanamisin gen ifadeleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada G27 genomunda sabit gen sayısına sahip olan *ureA* geni kontrol olarak kullanılmıştır. ***ureA* gen primerleri ile kanamisin gen primerleri aynı örnekler için iki tekrarlı olacak şekilde çalışılmış ve genomda bulunan kopya sayısı *ureA* kopya sayısına en yakın olan  $\Delta$ oipA G27 kültürü seçilmiş ve tüm genom dizileme işlemine gönderilmiştir.**

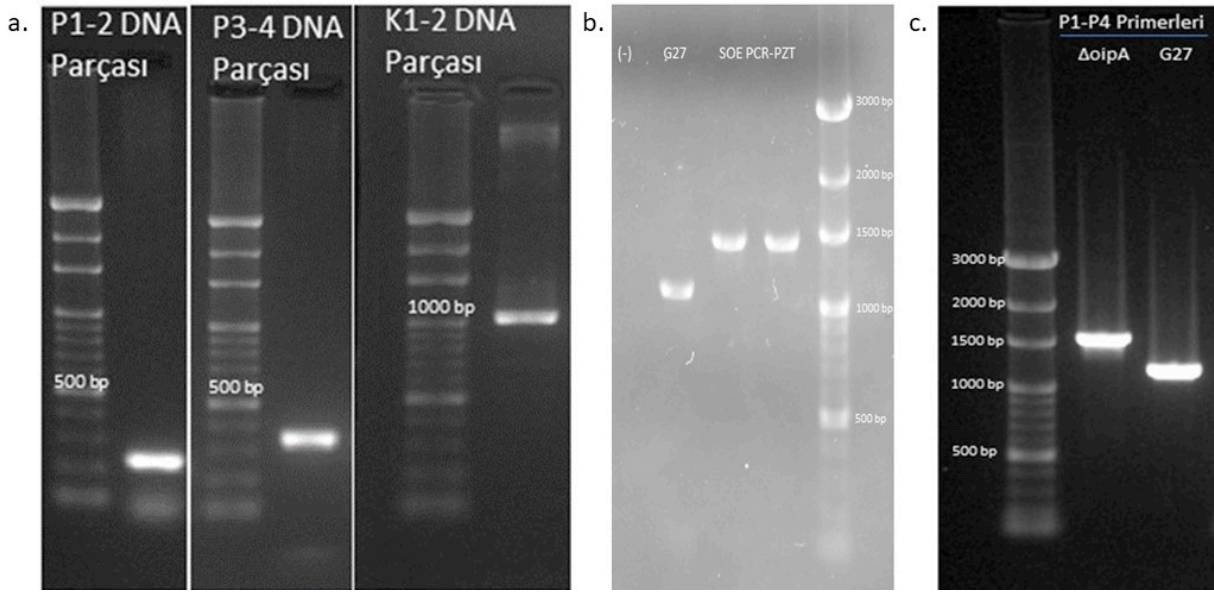
## Bulgular



Şekil 1. *oipA* geninin homolog rekombinasyon yöntemi ile silinmesi için tasarlanan ve hedef gen bölgesine yerleştirilmek üzere kanamisin direnç geni taşıyan DNA kasetinin SOE PCR yöntemi ile oluşturulması.

## Sonuç

PZT işlemi kullanılarak yapılan doğrulamanın sonucunda elde edilen kolonilerin kanamisin geni bulundurduğu gözlemlenmiş ve DNA kasetinin transforme edildiği anlaşılmıştır. *H. pylori* G27 suşunda *oipA* geni başarılı bir şekilde silinmiştir ve  $\Delta$ oipA *H. pylori* G27 suşu elde edilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen  $\Delta$ oipA *H. pylori* suşu



**Şekil 2.** Çalışma boyunca yapılan PZT işlemleri sonucunda elde edilen PZT ürünlerinin %1 agaroz jelde yürütülmüş ve sybr gold ile boyanmış görüntüleridir. Şekil II.a, gen silme işlemi için tasarlanan ve SOE PCR yöntemi ile birleştirilecek olan DNA parçalarının oluşturulduğu konvansiyonel PZT ürünleri sırasıyla soldan birinci P1-2 DNA parçası (172bç), ikinci P3-4 DNA parçası (325bç) ve üçüncüsü K1-2 DNA parçası (990bç). Şekil II.b, Hazırlanan DNA parçalarının birleştirildiği SOE PCR sonucu, sırasıyla DNA merdiveni sonrası ilk örnek konvansiyonel PZT çalışmasıyla elde edilen K1-2, P1-2 ve P3-4 DNA parçaları ile yapılan SOE PCR (1444 bç), ikinci örnek *H. pylori* G27 gDNA'sı ile yapılan SOE PCR (1093 bç) ve son olarak su (negatif kontrol) kullanılarak yapılan SOE PCR ürünü. Şekil II.c, SOE PCR sonucunda elde edilen DNA kasetinin doğal transformasyon ile *H. pylori* G27 kültürüne aktarılması sonrası büyütülen  $\Delta oipA$  *H. pylori* G27 kültürden elde edilen gDNA ve *H. pylori* G27 kültürden elde edilen gDNA'ların P1-P4 primerleri ile yapılan kontrol PZT deneyi sonucu.

OipA'nın *H. pylori* patogenezindeki rolünün aydınlatılması için yapılacak olan enfeksiyon modelleri üzerinde gerçekleştirilecek ve bu gen hedef alınarak geliştirilebilecek tedavi yaklaşım çalışmalarında kullanılacaktır.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 119S127 numaralı proje kapsamında yapılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** gen silme, *H. pylori*, homolog rekombinasyon, OipA, Polimeraz zincir tepkimesi

#### Kaynaklar

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;1(8390):1311-5. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91816-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91816-6)
2. Doig P, Exner MM, Hancock RE, Trust TJ. Isolation and characterization of a conserved porin protein from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 1995;177(19):5447-52. <https://doi.org/10.1128/jb.177.19.5447-5452.1995>
3. The Global Cancer Observatory (GCO). International Agency for Research on Cancer <https://gco.iarc.fr/databases.php>
4. Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(8):1808-25. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01393.x>
5. Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, Pritchard DM.

*Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Dis Model Mech*. 2017;10(2):89-104.

<https://doi.org/10.1242/dmm.027649>

6. Khan S, Karim A, Iqbal S. *Helicobacter urease*: Niche construction at the single molecule level *J Biosci*. 2009;34(4):503-11. <https://doi.org/10.1007/s12038-009-0069-4>
7. Testerman TL, McGee DJ, Mobley HLT. Adherence and colonization. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL (Eds). *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Chapter 34. Washington (DC): ASM Press; 2001.
8. Oleastro M, Ménard A. The role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in adherence and pathogenesis. *Biology*. 2013;2(3):1110-34. <http://doi.org/10.3390/biology2031110>
9. Magalhães A, Reis CA. *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells is mediated by glycan receptors. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(7):611-8. <http://doi.org/10.1590/s0100-879x2010007500049>
10. Matsuo Y, Kido Y, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* outer membrane protein-related pathogenesis. *Toxins*. 2017;9(3):101. <http://doi.org/10.3390/toxins9030101>
11. Kudo T, Nurgalieva ZZ, Conner ME, et al. Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and oipA gene switch status. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):2279-81. <http://doi.org/10.1128/jcm.42.5.2279-2281.2004>

## Menenjit ve Ensefalitli Hastalarda Hızlı Sendromik Moleküler Panelin Prospektif Değerlendirilmesi

Furkan Polat<sup>1</sup>, Ayşın Zeytinoğlu<sup>1</sup>, Selda Erensoy<sup>1</sup>, Feriha Çilli<sup>1</sup>, Dilek Yeşim Metin<sup>1</sup>, Tuğba Bozdemir<sup>1</sup>, Murat Ersel<sup>2</sup>, Eylem Ulaş Saz<sup>3</sup>, Neşe Çelebisoy<sup>4</sup>, Candan Çiçek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Acil Servis Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

<sup>4</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İzmir

✉ drfurkanpolat24@gmail.com

### Giriş

Enfeksiyöz menenjit ve ensefalit, çok ciddi sonuçları olabilen klinik durumlardır. Yüksek mortalite ve morbidite oranlarına sahip olduklarından hızlı ve doğru tanı büyük önem arz etmektedir. Bu klinik tablolarda en iyi sonuçlar, uygun antimikrobiyal tedavinin hızla başlatılmasıyla elde edilebilmektedir<sup>(1,2)</sup>. Ek olarak, bu enfeksiyonlarla ilişkili maliyetler, hastaneye yatış ve tedaviyle ilgili olarak önemlidir<sup>(3,4)</sup>. Son yıllarda tüm bilimsel ortamda olduğu gibi konvansiyonel yöntemlerin yerini artık moleküler yöntemler almaktadır. Özellikle hızlı ve doğru tanı açısından moleküler yöntemler büyük yarar sağlamaktadır<sup>(5)</sup>. Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran menenjit/ensefalit tanılı hastalarda bakteriyel, fungal ve viral patojenlerin sıklığı ve hızlı sendromik panelin etkinliği değerlendirilmiştir.

### Gereç ve Yöntem

Haziran 2018-Ocak 2020 tarihleri arasında santral sinir sistemi enfeksiyonu ön tanısı olan 776 hastadan beyin omurilik sıvısı (BOS) örnekleri toplandı. Hastaların 395'i (%50.7) erkek, 384'ü (%49.3) kadındı. Hastaların yaş aralığı 19 gün-91 yaş (ortanca:37 yıl, ortalama:36.08±2.4 yıl) arasındaydı. Tüm örnekler aynı anda 14 patojeni (bir mantar, altı bakteriyel ve yedi viral hedef) tanımlayan FilmArray Menenjit/Ensefalit Paneli (BIOFIRE, Salt Lake City, UT, ABD) ile test edildi<sup>(6,7)</sup>. BOS kültürü ve tanımlaması da geleneksel mikrobiyolojik testler kullanılarak gerçekleştirildi. Örnek miktarı yeterli olan ve pozitif viral etken bulunan tüm BOS örnekleri başka bir viral multipleks PCR kiti (FTD Neuro 9, (Fast Track Diagnostic Siemens,Lüksemburg),; EliteIngenius, EliteGroup) ile tekrar çalışıldı.

### Sonuçlar

Test edilen 776 örnek arasından 58'i (%7.4) pozitif, 718'i (%92.6) negatif bulundu. Pozitif bulunan 58 örneğin 15'i (%1.9) HSV-1, 13'ü (%1.8) *Streptococcus pneumoniae* ve 30'u diğer (yeni HHV-6, iki VZV, üç *Neisseria meningitidis*, beş Enterovirüs, dört CMV, bir Human parechovirus, iki *Streptococcus agalactiae*, iki *Cryptococcus neoformans/gattii*, iki *Haemophilus influenzae*, bir *Escherichia coli*) patojenlerdi. Hastaların birinde üçlü etken pozitifliği vardı. FilmArray ile saptanan mikroorganizmaların sayıları ve dağılımları

Şekil 1'de özetlendi.

34 tekli virüs pozitif numuneden 24'ü başka bir multipleks PCR testi ile doğrulandı ve klinik olarak desteklendi. FilmArray ME Panel tarafından HSV-1 için pozitif olan üç numune, diğer viral multipleks PCR testi ve klinik olarak (Serebral enfarktüs ve MS) negatif bulunmuştur. HHV-6 pozitifli beş örnek diğer testle doğrulanmıştır ancak bu hastalar klinik olarak desteklenmemiştir (MS, sepsis ve metabolik hastalık). FilmArray ME Panel ile enterovirüs için pozitif olan iki örnek, diğer viral multipleks PCR testi ile ve klinik olarak negatif bulunmuştur.

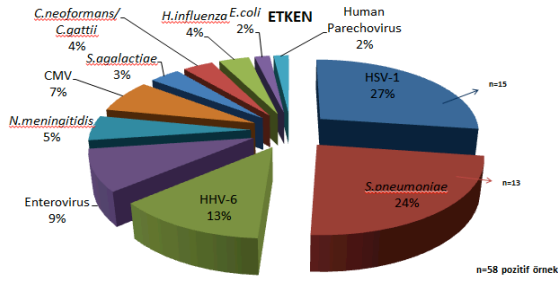
Biri dışında bakteriyel ve fungal patojenleri (n=23) olan tüm hastalarda pürülan menenjit ve BOS anormallikleri saptanmıştır. FilmArray ME Panel ile *H. influenzae* için pozitif bir örnek, kültür ve klinik olarak negatif bulunmuştur. Yirmi bir pozitif bakteriyel patojenin 4'ü bakteri kültürü ile doğrulanmıştır. *C. neoformans/gattii* pozitiflikleri antijen testi (Dynamiker Biotechnology Co.Ltd., Tianjin, Çin) geleneksel yöntemler ve klinik durum ile doğrulanmıştır. FilmArray M/E paneli ile pozitif saptanan örneklerin diğer yöntemlerle ve klinik durumla karşılaştırması Tablo 1'de özetlenmiştir.

FilmArray M / E Paneli ile, 4 saat gibi kısa bir süre içinde menenjit/ensefalit vakalarının doğru ve hızlı tanısı sağlandı. Üç HSV-1, iki enterovirüs ve bir *H. influenzae* pozitif FilmArray ME sonucu karşılaştırılan yöntemlere göre yanlış pozitif olarak kabul edildi.

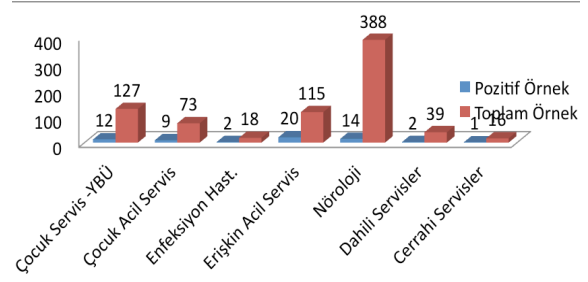
58 pozitif örneğin altısı yanlış pozitif olarak değerlendirildi. Beş hastada HHV-6 bystander olarak değerlendirildi Toplam pozitif saptanan 58 örneğin 47'si diğer yöntemlerle ve klinik olarak doğrulandı. Bu durumda gerçek pozitiflik oranı %6.1 olarak bulundu.

Çalışmaya dahil edilen örneklerin servislere göre dağılımı Şekil 2'de gösterilmiştir. Şekil 2'de görüldüğü gibi örneklerin büyük bölümü Nöroloji servisi ve polikliniğinden gönderilmiştir. Nöroloji AD'ye başvuran, özellikle kronik nörolojik hastalıkların ilk tanısı sırasında SSS enfeksiyonunu dışlamak amacıyla hızlı moleküler M/E panel isteği yapılmakta ve bu durum da pozitiflik oranını (%3.6) düşürmektedir. Bu örnekler hariç bırakıldığında toplam 388 örneğin 44'ü (%11.3) pozitif olarak bulunmuştur. Pozitif saptanan 44





Şekil 1. FilmArray M/E Paneli ile saptanan mikroorganizmaların dağılımları.



Şekil 2. Gelen örneklerin servislere göre dağılımı.

Tablo 1. FilmArray M/E Panel sonuçlarının diğer testler ve klinik durum ile karşılaştırılması.

| Virüs Etken                     | FilmArray M/E Panel Pozitif Örnek Sayısı | Diğer Yöntemlerle Doğrulanmış Örnek Sayısı | Klinik ve BOS biyokimyası uyumlu |
|---------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
| HSV-1                           | 15                                       | 12                                         | 12                               |
| Enterovirüs                     | 5                                        | 3                                          | 3                                |
| HHV-6                           | 7                                        | 7                                          | 2                                |
| Diğer Etkenler                  | 7                                        | 7                                          | 7                                |
| Toplam                          | 34                                       | 29                                         | 24                               |
| Bakteriyel/Mikolojik Etken      |                                          |                                            |                                  |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 13                                       | 1                                          | 13                               |
| <i>Neisseria meningitidis</i>   | 3                                        | 1                                          | 3                                |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>  | 2                                        | 2                                          | 2                                |
| <i>Haemophilus influenza</i>    | 2                                        | 1                                          | 1                                |
| Diğer etkenler                  | 4                                        | -                                          | 4                                |
| Toplam                          | 24                                       | 5                                          | 23                               |

BOS örneğinin 40 (%10.3) tanesi klinik olarak ve diğer yöntemlerle pozitiflikleri doğrulanmıştır.

Enfeksiyon hastalıklarından gelen örnek sayısının düşük olmasının sebebi ise hastaların öncelikle acil servise başvurusu ve test isteklerinin acil servis tarafından yapılmasıdır. Menenjit / ensefalit tanısı alan ve sonrasında enfeksiyon hastalıkları servisine yatırılan hastalardan tedavilerinin ardından kontrol amaçlı olarak bu panel istenebilmekte bu da pozitiflik oranının düşmesine sebep olmaktadır.

Hastalardan birinde üç etken (*N. meningitidis*, enterovirüs ve HHV-6) pozitif olarak saptandı. Hastanın BOS örneği pürülan menenjit tablosuyla uyumluydu. *N.meningitidis* etken kabul edilirken, Enterovirüs'ün sekonder etken olabileceği düşünüldü. HHV-6 ise latent enfeksiyon lehine değerlendirildi.

Virüs etken pozitifliklerinin EitelIngenius ile yapılan doğrulama testlerinde HHV-6 pozitif olan bir örnekte <250 kopya/ml kantitatif olarak saptandı. Bu da FilmArray M/E Paneli'nin alt saptama sınırının ne kadar düşük olduğunu göstermesi sebebiyle önemli bir bulgu olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak santral sinir sistemi enfeksiyonu şüphesi olan hastalara Biofire FilmArray M/E Paneli ile 4 saatten kısa bir sürede büyük oranda doğru tanı konulmuş ve hızlı en doğru tedaviyi almaları sağlanmıştır. Böylece mortalite ve morbidite oranları azaltılabilmektedir. Hızlı ve doğru tanı konulmasıyla hastaların hastanede yatış süreci kısaltılabilmekte ve gereksiz maliyetlerin de önüne geçilebilmektedir. Fakat bu testlerin klinik olarak şüphelenilen hastalardan istenmesi ve doğru yerde doğru şekilde kullanılmaları, maliyet etkinlik açısından önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Menenjit, ensefalit, hızlı sendromik moleküler panel

#### Kaynaklar

1. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, et al. Multicenter evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for detection of bacteria, viruses, and yeast in cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol. 2016;54(9):2251-61. <https://doi.org/10.1128/JCM.00730-16>
2. 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>
3. Wright C, Wordsworth R, Glennie L. Counting the cost of meningococcal disease: scenarios of severe meningitis and septicemia. *Paediatr Drugs*. 15(1):49-58.  
<https://doi.org/10.1007/s40272-012-0006-0>
  4. Portnoy A, Jit M, Lauer J, et al. Estimating costs of care for meningitis infections in low- and middle-income countries. *Vaccine* 2015;33(Suppl 1):A240-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.11.061>
  5. DeBiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(4):903-25.
  6. Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, Rogatcheva M, Kanack KJ, Bourzac KM. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 2015;53(3):915-25.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02674-14>
  7. FilmArray Meningitis/Encephalitis (ME) Panel instruction booklet RF-Y-ASY-0118. BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, 2015.

# Kistik Ekinokokkoz Ön Tanılı Hastalarda Anti-*Echinococcus granulosus* Antikorlarının Farklı Serolojik Yöntemlerle Araştırılması

Sidre Erganiş<sup>1</sup>, Funda Doğruman Al<sup>2</sup>, Fakhriddin Sarzhanov<sup>3</sup>, Kayhan Çağlar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kars Harakani Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kars

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara,

<sup>3</sup>Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Kazak Türk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Türkistan

✉ sdrerganis@gmail.com

## Giriş

Kistik ekinokokkoz (KE), *Echinococcus granulosus*'un larval formunun koyun ve insan gibi memelinin dokularında yerleşen bir hastalıktır<sup>(1,2)</sup>. KE'li olguların çoğunluğunun asemptomatik olması, klinik belirtilerin karakteristik olmaması, kist gelişiminin yavaş olması nedeniyle bilinenden daha yaygın olduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde KE'nin tanısı daha çok radyolojik tanı yöntemleriyle konulmaya çalışılmaktadır<sup>(3,4)</sup>. Kistlerin tümör, apse, basit kist gibi diğer yer kaplayan yapılarla ayırıcı tanısının yapılabilmesi ve tedavi sonrası nüks takibinin sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için, ön tanının serolojik tanı yöntemleriyle desteklenmesi gerekmektedir<sup>(5)</sup>.

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na KE ön tanısı ile gelen hasta serumlarında indirekt hemaglutinasyon (İHA), immünfloresan antikor testi (İFAT) ve enzyme linked immunosorbent linked assay (ELISA) testlerini kullanarak *E. granulosus*'a özgü IgG antikorlarını saptamayı ve Western Blot (WB) doğrulama testi sonucunda elde edilen verilerin doğrultusunda yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Etik Komisyonu'nun (06.02.2018 tarihli 01 sayılı toplantısı 77082166-302.08.01- sayılı karar) izni alınarak yapılmıştır.

Çalışmamızda, Haziran 2018-Haziran 2019 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na farklı kliniklerden klinik ve radyolojik olarak KE ön tanısı ile gönderilen 151 hastaya ait serum örnekleri incelendi.

Serum örneklerinde anti-*Echinococcus granulosus* antikorları iki farklı ticari İHAT (Siemens Cellognosts, Almanya; Fumouze, Fransa), ELISA (Euroimmun IgG, Almanya), İFAT (Euroimmun IgG, IgM, IgA, Almanya) ile araştırıldı ve doğrulama testi olarak WB testi (Euroimmun IgG, Almanya) kullanıldı. Siemens Cellognost İHAT için 1/128 titredeki çökelti sınır değer, 1/256 ve üzeri sulandırımardaki titreler pozitif; Fumouze İHAT için 1/160 titredeki çökelti sınır değer, 1/320 ve üzeri titreler pozitif olarak değerlendirildi. İFA testinde serumlar 1/100, 1/320 ve 1/1000 titrelerinde sulandırıldı, 1/100 ve üzerindeki titrelerde protoskoleks morfolojisine uyan yeşil floresan veren yapılar pozitif olarak kabul edildi. WB çalışılan örneklerde ise p7, p16/18, p21, Em18 ve Em95 bantlarından en az birinin görülmesi *Echinococcus* sp pozitif olarak kabul edildi. Rekombinant EgAgB bantının pozitif olması ve en azından p21, p7

veya p16/18 bantının birinin de pozitif olması *E. granulosus*, Em18 veya Em95 bantlarından birinin pozitif olması ise *Echinococcus multilocularis* seropozitifliğini göstermiştir. Tüm testler üretici firmaların önerileri doğrultusunda çalışıldı.

Verilerin istatistiksel analizinde ki-kare testi ve lojistik regresyon analizi kullanıldı. Güven aralığı %95 olarak belirlendi ve p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi. Testlerin birbiriyle tutarlılıklarının saptanmasında Screening Testi (Tarama Testi) ile elde edilen kappa (κ) değeri kullanıldı.

## Bulgular

Toplam 151 hastanın serum örneklerinin 92 (%61)'si kadın, 59 (%39)'u erkek hastaya aitti. Hastalar 3-86 yaş aralığında, yaş ortalaması 41 idi. Test sonuçları yaş gruplarına ve cinsiyete göre analiz edildiğinde; kadın-erkek yaş grup dağılımlarının seropozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (p>0.05).

Çalışmamızdaki Siemens marka İHAT ile hastaların 89 (%59)'u farklı titrelerde pozitif, 13 (%86.2)'ü şüpheli, 49 (%32.4)'u negatif; Fumouze marka İHAT ile 70 (%46.4) hastanın serumu farklı titrelerde pozitif, 11 (%7.2) hastanın serumu şüpheli, 70 (%46.4) hastanın serumu ise negatif; ELISA testi ile hastaların 93 (%61.6)'ü pozitif, 3 (%2)'ü şüpheli (ara değer), 55 (%36.4)'i negatif; İFAT ile 95 (%63)'i pozitif, 56 (%37)'si negatif bulunmuştur. Doğrulama amacıyla kullanılan WB testi ile 93 (%61.6) serum pozitif, 49 (%32.4) serum negatif, 9 (%6) serum sınır değerde saptanmıştır (Tablo 1).

Çalışılan 151 serumdan 85'inin beş testle de sonucu birbiriyle tutarlıydı. Bunlardan 54'ü tüm testlerle pozitif, 31'i ise tüm testlerle negatif olarak saptandı. Pozitif saptanan 54 örneğin WB ile 45'i *E. granulosus*, dördü *E. multilocularis* olarak tür düzeyinde tanımlanmış, beş örneğin ise tür düzeyinde tanımlanamamıştır.

Çalışılan 66 serumun ise sonuçlarında tutarsızlık belirlenmiş, bu serumların 39'u WB ile pozitif, 18'i WB ile negatif ve 9'u da WB ile sınır değerde saptanmıştır.

WB testi ile pozitif bulunan 93 serumun diğer testlerle bulunan sonuçları Tablo 2'deki gibidir. WB testini altın standart yöntem olarak kullandığımız için WB ile sınır değer bulunanlar istatistiksel hesaplama katılmamıştır. Çalışmamızda kullandığımız dört yöntemin de sonuçları, WB yönteminin sonuçları ile karşılaştırılmış ve yapılan c<sup>2</sup> istatistik analizi ile anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05).

Tablo 1. Çalışılan testlere göre hasta sonuçlarının dağılımı.

|                | IHAT    |      |         |      | ELISA | IFAT   |      | WB                            |
|----------------|---------|------|---------|------|-------|--------|------|-------------------------------|
|                | SIEMENS |      | FUMOUEZ |      |       | titre  | sayı |                               |
|                | titre   | sayı | titre   | sayı |       |        |      |                               |
| Pozitif        | 1/256   | 13   | 1/320   | 20   | 93    | 1/100  | 42   | <i>E.granulosus</i> ---69     |
|                | 1/512   | 19   | 1/640   | 13   |       | 1/320  | 41   | <i>E.multilocularis</i> ---10 |
|                | 1/1024  | 23   | 1/1280  | 14   |       | 1/1000 | 12   | Pozitif---14                  |
|                | >1/1024 | 34   | >1/1280 | 23   |       |        |      |                               |
| Toplam pozitif | 89      |      | 70      |      | 93    | 95     |      | 93                            |
| Şüpheli        | 1/64    | 4    | 1/160   | 11   | 3     | -      |      | 9                             |
|                | 1/128   | 9    |         |      |       |        |      |                               |
| Toplam şüpheli | 13      |      | 11      |      | 3     | -      |      | 49                            |
| Negatif        | 49      |      | 70      |      | 53    | 56     |      | 54                            |
| Toplam         | 151     |      | 151     |      | 151   | 151    |      | 151                           |

Tablo 2. WB doğrulama testine göre pozitif ve negatif çıkan testlerin diğer çalışılan İHA, ELISA ve İFA testleri ile karşılaştırılması.

|               |                | WB      |         | $\chi^2$ değeri | p değeri |
|---------------|----------------|---------|---------|-----------------|----------|
|               |                | Pozitif | Negatif |                 |          |
| İHA (Siemens) | Pozitif (n=87) | 77      | 10      | 59.4            | <0.001   |
|               | Negatif (n=46) | 10      | 36      |                 |          |
|               | Ara değer (9)  | 6       | 3       |                 |          |
|               | Toplam (n=142) | 93      | 49      |                 |          |
| İHA (Fumouze) | Pozitif (n=69) | 63      | 6       | 45.7            | <0.001   |
|               | Negatif (n=64) | 23      | 41      |                 |          |
|               | Ara değer (9)  | 7       | 2       |                 |          |
|               | Toplam (n=142) | 93      | 49      |                 |          |
| ELISA         | Pozitif (n=91) | 83      | 8       | 74.4            | <0.001   |
|               | Negatif (n=48) | 9       | 39      |                 |          |
|               | Ara değer (3)  | 1       | 2       |                 |          |
|               | Toplam (n=142) | 93      | 49      |                 |          |
| İFA           | Pozitif (n=91) | 85      | 6       | 87.35           | <0.001   |
|               | Negatif (n=51) | 8       | 43      |                 |          |
|               | Toplam (n=142) | 93      | 49      |                 |          |

Siemens marka İHAT'ın duyarlılığı %88.51, özgüllüğü %78.28; Fumouze marka İHAT'ın duyarlılığı %73.26, özgüllüğü %87.23; ELISA testinin duyarlılığı %90.22, özgüllüğü %82.98; İFAT'ın duyarlılığı %91.4, özgüllüğü %87.76 hesaplanmıştır.

Hastaların hastane kayıtlarında sadece 76'sının radyoloji raporuna ulaşılabilmiştir. Buna göre radyolojik bulguları olup WB test sonucu negatif çıkanlar 27 iken, bunlardan altısının sonucu diğer testlerde pozitif/sınır değerinde bulunmuştur. Radyoloji bulgusu ve WB sonucu pozitif olanların sayısı 42, radyoloji bulgusu olup WB sonucu sınır değerinde bulunanların sayısı ise altı olarak saptanmıştır.

Hastaların 22'sinin patoloji raporuna ulaşılmıştır ve bunlardan 13'ünün serolojik bulguları ve patolojik inceleme sonucunun KH lehine pozitif olduğu saptanmıştır. Ancak 2 hastanın WB testi negatif bulunmuştur. Bu iki serumdan birincisi İHAT, ELISA ve İFAT ile pozitifken ikincisi İHAT ve İFAT ile pozitif,

ELISA ile negatif saptanmıştır. Patoloji raporu olup sonuç raporunda KH düşünülmeden 9 olgunun seroloji bulguları ise 4'ünün tüm testleri negatif, 4'ünün tüm testleri pozitif ve 1'inin de serolojik testlerden sadece WB test sonucu sınırı değer, diğer testleri negatif olarak belirlenmiştir. Patoloji raporuna ulaşılabilen 22 hastanın 19'unun radyoloji raporları da KE lehine yorumlanmıştır. Bir hastanın hem patoloji hem radyoloji sonucu KE düşündürmemiş, seroloji testleri de negatif bulunmuştur. Diğer iki hastanın ise radyoloji raporuna ulaşılabilmiştir fakat serolojik ve patolojik bulguları KE lehine değerlendirilmiştir.

#### Sonuç

Günümüzde KE'nin tanısı için çeşitli yöntemler mevcuttur, ancak kabul görmüş evrensel bir altın standart tanı yöntemi bulunmamaktadır. KE tanısı daha çok klinik bulgulara, görüntüleme yöntemlerine ve serolojiye dayanmaktadır<sup>(6)</sup>.

KE sıklığı kadın ve erkekte istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir<sup>(1)</sup>. Birçok araştırmanın sonucunda da çalışmaya alınan kadın ve erkek sayılarının eşit olmamasına rağmen istatistiksel hesaplamaların sonucunda cinsiyet açısından anlamlı ilişki bulunmamıştır<sup>(7-9)</sup>. Bizim çalışmamızda da cinsiyetler arasında istatistiksel fark ( $p>0.05$ ) saptanmamıştır.

KE her yaşta görülebilmektedir. Malatya ve çevresindeki olguların farklı zamanlarda araştırıldığı iki çalışmada da KE olgulu kişilerin daha çok 20-39 yaş aralığında olduğu bildirilmiştir<sup>(10,11)</sup>. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nda ve Konya'da yapılan iki ayrı çalışmada pozitif olgular en sık %43.4 ve %45 oranında 40-59 yaşları arasında saptanmıştır<sup>(12,13)</sup>. Çalışmamızda da en yüksek seropozitifliğin (%20.5) 50-59 yaşlarında olduğu izlenmiştir.

Akisu ve ark.<sup>(14)</sup> akciğer KE olduğu cerrahi olarak kanıtlanmış 31 hasta, KE dışında akciğer hastalığı olan 18 hasta ve 10 sağlıklı insanı dahil ettikleri çalışmalarında İHA, ELISA ve WB testlerini kullanılmışlar ve İHA, ELISA ve WB testlerinin duyarlılığını sırasıyla %96.7, %87.1 ve %100, özgüllüklerini ise sırasıyla %82.2, %89.2 ve %85.7 olarak saptamışlardır. Ayrıca akciğer KE harici akciğer hastalığı olan dört hastada WB testinde yalancı pozitiflik belirlenmişlerdir. Deininger ve Wellinghausen<sup>(15)</sup> şüpheli ve kanıtlanmış KE hastalarında ticari bir line blot (LB) ile WB testlerini karşılaştırmışlar, WB testinin yalancı pozitif/negatif sonuç verebileceğini ve *E. granulosus* - *E. multilocularis* tür ayrımının yapılmasında zorluk yaşanabileceğini belirtmişlerdir.

Sarı ve ark.<sup>(16)</sup>, KE olduğu doğrulanmış 40 hasta ve 40 kontrol grubunda İHA, ELISA ve İFA testlerinin duyarlılığını sırasıyla %90, %87.5 ve %82.5; özgüllüğü %97.5, %100 ve %100 olarak tespit etmişlerdir. Kontrol grubuna dahil olan tenyazisli bir (%2.5) olguda çapraz tepkime tespit edilmiştir.

Akgün ve ark.<sup>(9)</sup> KE ön tanılı 163 hastanın serumunda İHA, ELISA ve İFA testlerinin duyarlılığını WB referans alındığında sırasıyla %88.76, %78.65 ve %89.89 özgüllüklerini sırasıyla %94.59, %100 ve %93.24 olarak saptamışlardır. Çalışmamızın sonuçlarının bu çalışmayla uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Testlerdeki duyarlılık ve özgüllük farklılığının, test yöntemlerinin çeşitliliğine, kullanılan antijenin özelliğine, antijen kaynağına ve hastanın antikor yanıtına bağlı olduğu düşünülmektedir<sup>(5,16)</sup>.

Çalışmamızda WB ile tutarlılığı en yüksek test olarak ELISA ( $\kappa=0.73$ ) ve İFAT ( $\kappa=0.78$ ) bulunmuştur. İFAT'ın duyarlılık ve özgüllüğü diğer üç teste göre daha yüksek saptanmıştır. Ancak İFAT'ın değerlendirilmesinde deneyim gerekliliğinin yanı sıra kararlık oda ve immünofloresan mikroskopuna ihtiyaç duyulması ve laboratuvarların bütçe olanakları nedeniyle her laboratuvarın rutin işleyişine dahil edilememektedir. Bu sebeple uygulama kolaylığı, daha az deneyim gerektirmesi ve spektrofotometrenin rutin laboratuvarlarda yaygın olarak bulunduğu göz önüne alınırsa en azından İHA ve ELISA testlerinin KE tanısında birlikte kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Rutin testlerle negatif sonuç elde edilen fakat klinik ve/veya radyolojik olarak şüpheli olgularda duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle WB yönteminin tanı testi olarak da kullanılabileceği belirtilmiştir<sup>(17)</sup>. Ancak WB testinin de yalancı pozitif/negatif sonuçlar verebildiği de bildirilmiştir. Bu nedenle de duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek doğrulama testlerine ihtiyaç vardır<sup>(15,17)</sup>.

**Anahtar kelimeler:** Kistik ekinokokkoz, serolojik tanı, anti-*Echinococcus* IgG

#### Kaynaklar

- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. The Lancet. 2003;362(9392):1295-304. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14573-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14573-4)
- Yıldız F. *Echinococcus* infection: The effects of echinococcosis on public health and economy. IJAR. 2019;2(2):51-9.
- Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. Int J Infect Dis. 2009;13(2):125-33. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.03.037>
- Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21<sup>st</sup> century. Clin Microbiol Rev. 2019;32(2):e00075-18 <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-18>
- Siles-Lucas M, Casulli A, Conraths F, Müller N. Laboratory diagnosis of *Echinococcus* spp. in human patients and infected animals. Advances in parasitology. Adv Parasitol. 2017;96:159-257. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.09.003>
- Barnes TS, Deplazes P, Gottstein B, et al. Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease. Acta Trop. 2012;123(1):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.02.066>
- Kilimcioglu AA, Girginkardesler N, Korkmaz M, et al. A mass screening survey of cystic echinococcosis by ultrasonography, Western blotting, and ELISA among university students in Manisa, Turkey. Acta Tropica. 2013;128(3):578-83. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.010>
- Cengiz ZT, Yılmaz H, Beyhan YE, et al. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına 2005-2013 yılları arasında gönderilen kan örneklerinde kistik ekinokokkozis seropozitifliği: retrospektif değerlendirme. Türkiye Parazit Derg. 2015;39:209-11. <https://doi.org/10.5152/tpd.2015.3995>
- Akgün S, Sayiner HS, Karşilgil T. Kistik Ekinokokkoz'un serolojik tanısında indirekt hemaglutinasyon, indirekt Floresan Antikor ve Enzim İmmüno Assay testlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi. J Contemp Med. 2018;8(1):14-9. <https://doi.org/10.16899/gopctd.305543>
- Karaman Ü, Daldal N, Atambay M, Ayçan ÖM. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 1999-2002 tarihleri arasında incelenen hidatik kist ön tanılı olguların serolojik sonuçları. 2002;9(4):133-5.
- Daldal Ü, Atambay M, Ayçan T, Yıldız N, Kaya Ö. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı seroloji laboratuvarı'na kistik ekinokokkozis şüphesiyle başvuran hastaların değerlendirilmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi. 2012;3(11):19-25.
- Kılıç S, Babür C, Taylan Özkan A. Kist hidatik ön tanılı olgularda indirekt hemaglutinasyon ve ELISA yöntemleri ile alınan sonuçların karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2007;41(4):571-7.
- Bilge UE, Ozdemir M, Baykan M. Kistik ekinokokkozis tanısında ticari indirekt floresan antikor (IFA), indirekt hemaglutinasyon (İHA) testleri ve laboratuvarımızda hazırladığımız İFA testinin karşılaştırılması. Türkiye Parazit Derg. 2009;33(3):195-8.
- Akisu C, Bayram Delibas S, Yuncu G, et al. Akciğer hidatidozunun tanısında İHA, ELISA ve Western Blot testlerinin değerlendirilmesi. Tuberk Toraks. 2005;53(2):156-60.
- Deininger S, Wellinghausen N. Evaluation of a new combined Western and line blot assay (EUROLINE-WB) for diagnosis and species identification of *Echinococcus* infection in humans. GMS Infect Dis. 2019;7:Doc01. <https://doi.org/10.3205/id000041>
- Sarı C, Ertuğ S, Yaman Karadam S, Özgün H, Karaoğlu AÖ, Ertavbaklar H. Kistik ekinokokkozis tanısında ELISA (Enzym Lynked Immunosorbent Assay), indirekt hemaglutinasyon testi (İHA) ve indirekt floresan antikor testi (İFAT)'nin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi. Türkiye Parazit Derg. 2009;33(1):73-6.
- Güreser A, Duman G, Sarzhanov F, Karasartova D, Dogruman AI F, Taylan Ozkan A. Western blot assay of anti-*Echinococcus* granulosus antibody positive serum samples by indirect haemagglutination method. Turk Hij Den Biyol Derg. 2019;76(2):195-202. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.03779>



## *Pelargonium sidoides*'in *Leishmania infantum* ve *Leishmania tropica* Promastigot Formlarına İn Vitro Etkisi

Erdener Balıkçı, Nurdan Güngör, Fetye Kolaylı, Murat Hökelek

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli

✉ erdener-b@hotmail.com

### Giriş

Leishmaniasis, bir protozoa türü olan *Leishmania* spp.'nin neden olduğu ve vektör dişi kum sineğinin (*Phlebotomus* sp.) ısırması ile bulaşan bir hastalıktır. *Leishmania* Trypanosomatidae familyasında Kinetoplastida takımında yer alan bir cinsdir<sup>(1,2)</sup>. Leishmaniasis, Amerika, Afrika, Asya ve Avrupa'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde 97 ülkede görülmektedir<sup>(3)</sup>. Klinik olarak Viseral Leishmaniasis (VL), Kutanöz Leishmaniasis (KL) Mukokutanöz Leishmaniasis (MCL) ve Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) olmak üzere dört ana formu bulunur<sup>(4)</sup>. Her yıl dünyada 700.000 ila 1.500.000 yeni leishmaniasis vakası olduğu tahmin edilmekte ve 26.000 ila 65.000 insanın ölümüne sebep olmaktadır<sup>(5)</sup>. Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ihmal edilmiş bir tropikal hastalık olarak kabul edilmektedir<sup>(6)</sup>. Leishmaniasisin tedavisinde beş değerli antimon bileşikler, amfoterisin B ve lipozomal amfoterisin B, miltefosin, paromomisin ve pentamidin kullanılmaktadır<sup>(7)</sup>. Günümüzde 5 değerli antimon bileşikler tedavi için altın standart olarak kabul edilmektedir<sup>(8)</sup>. Leishmaniasis tedavisinde ilaçların çok sınırlı olması ve ilaçlara direnç gelişmesi büyük bir problem oluşturmaktadır. Mevcut ilaçların toksisitesi, yüksek maliyette olması ve ilaç direnci gelişmesi nedeniyle yeni tedavi seçenekleri araştırılmaktadır<sup>(9)</sup>. Bu kapsamda son yıllarda alternatif bir tedavi seçeneği olarak bitkisel ekstratlar üzerinde durulmaktadır<sup>(10)</sup>.

Bu çalışmada Afrika kökenli bir bitki olan *Pelargonium sidoides* ekstraktının *Leishmania infantum* ve *Leishmania tropica* promastigotları üzerine etkinliğinin *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

**Leishmania spp. suşlarının temini ve kültürü:** Çalışmada kullanılan *Leishmania infantum* suşu Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Parazitoloji Referans Laboratuvarından, *Leishmania tropica* suşu Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

NNN besiyerinin hazırlanmasında; 500 mL şişe içinde 230 mL distile suya 3.5 g Bakteriyojik Agar (Oxoid) 2.5 g sodyum klorür (Carlo Erba reagenti) karıştırıldı ve ısıtılarak agarın erimesi sağlandı. Otoklavda (ALP) 121°C'de 20 dakika sterilize edildi ve sıcak su banyosunda (Nüve ST30) 55°C'ye soğutuldu. Besiyerine 0.6 mL penicilin G, streptomisin sülfat ve 70 ml aseptik olarak alınmış defibrine edilmiş at kanı eklendi. Nihai konsantrasyon penisilin G 200 IU/mL ve streptomisin sülfat 200 µg/mL dir. Steril konikal santrifüj tüplerine (Isolab) 4.5 mL olarak dağıtıldı ve 10° eğik pozis-

yonda besiyerinin donması sağlandı ve +4°C'de saklandı. Temin edilen *Leishmania* suşlarının NNN besiyerine ekimi yapıldı ve 24°C inkübasyona bırakıldı. İlk promastigot formunun üremesi gerçekleşikten sonra NNN besiyerinden, içerisinde %10 Fetal Bovine Serum, HEPES ve gentamisin ilave edilmiş RPMI 1640 (Sigma R8755-1L, Almanya) bulunan hücre kültür flasklarına pasaj yapıldı. Flasklar promastigot canlılığı açısından inverted mikroskopda (Leica S40/0.45, Almanya) kontrol edildi. Üreyen *L. infantum* promastigotlarının logaritmik faza 3. günde *L. tropica* promastigotları ise 2. günde ulaştığı gözlemlendi ve çalışmaya *L. infantum* promastigotları 3. günde *L. tropica* promastigotları 2.günde çalışmaya alındı.

Çalışmaya başlamadan önce başlangıçtaki promastigot sayısı, Thoma lamı (Witeg, Almanya) kullanılarak sayıldı ve Hemocytometer Sidekick uygulaması ile *L. infantum* 5X10<sup>4</sup>, *L. tropica* 1.5X10<sup>5</sup> olarak hesaplandı. IC50 değeri AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) yazılımı kullanılarak hesaplandı.

**Bitkisel Ekstrakt:** Çalışmada *Pelargonium sidoides* (Ps) kök sıvı ekstraktı olarak EPs 7630 standart solüsyonu (Dr. Willmar Schwabe, GmbH&Co. KG, Almanya) kullanıldı. Ana stok çözeltisi olan 800 µg/mL dilüe edilerek 400, 200 ve 100 µg/mL bitkisel ekstrakt solüsyonları hazırlandı. *Leishmania* türlerine etkin olduğu bilinen Lipozomal Amfoterisin B (L-AmB) (Gilead Sciences, ABD), çalışmada pozitif kontrol olarak kullanıldı. *Leishmania* promastigotlarının pipetaj sırasında zarar görmemesi için dilüsyon işlemi konikal santrifüj tüplerinde yapıldı.

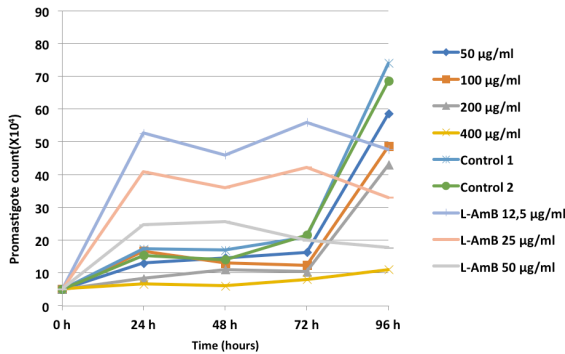
Bu çalışmada, 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plakları (Deltalab S.L., İspanya) kullanıldı. Dokuz çalışma grubu tasarlandı. İlk olarak daha önce hazırlanan promastigotları içeren hücre kültür flasklarından tüm kuyucuklara 100 µL konuldu. Daha sonra bu kuyucuklara gruplara göre her birine 100'er µL Ps ve L-AmB'nin belirlediğimiz konsantrasyonlarını sağlayacak şekilde eklendi. Grupların dağılımı ve miktarlar tabloda özetlenmiştir (Tablo1). Hücre kültür plaklarının etrafı plastik filmle (Parafilm, 3M) sarılarak 24°C etüvde (NUVE N500) inkübasyona bırakıldı.

Çalışma *L. infantum* ve *L. tropica* suşları üzerinde Ps bitkisel ekstraktı üç tekrarlı olarak çalışıldı.

**Hemositometri yöntemi:** Etüvde 24°C'de inkübe edilen hücre kültür plakları 24, 48, 72 ve 96. saatlerde aynı sıra takip edilerek her kuyucuktan 10 µL alınıp, Thoma lamı (Witeg, Almanya) kullanılarak sayıldı ve Hemocytometer Sidekick uygulaması ile hesaplanarak kaydedildi.

**Tablo 1.** Gruplara uygulanan *Pelargonium sidoides*, lipozomal amfoterisin B ve çözücü konsantrasyonları.

| Gruplar |           | <i>Leishmania infantum</i><br>(Başlangıç sayısı: $5 \times 10^4$ ) | <i>Leishmania tropica</i><br>(Başlangıç sayısı: $1.5 \times 10^5$ ) |
|---------|-----------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1       | Ps        | 50 µg/mL                                                           | 50 µg/mL                                                            |
| 2       | Ps        | 100 µg/mL                                                          | 100 µg/mL                                                           |
| 3       | Ps        | 200 µg/mL                                                          | 200 µg/mL                                                           |
| 4       | Ps        | 400 µg/mL                                                          | 400 µg/mL                                                           |
| 5       | Kontrol 1 | Promastigotlu besiyeri                                             | Promastigotlu besiyeri                                              |
| 6       | Kontrol 2 | Promastigotlu besiyeri + çözücü<br>(11 µl/ml %70'lik alkol)        | Promastigotlu besiyeri + çözücü<br>(11 µl/ml %70'lik alkol)         |
| 7       | L-AmB     | 12.5 µg/mL                                                         | 12.5 µg/mL                                                          |
| 8       | L-AmB     | 25 µg/mL                                                           | 25 µg/mL                                                            |
| 9       | L-AmB     | 50 µg/mL                                                           | 50 µg/mL                                                            |



**Şekil 1.** *Pelargonium sidoides* ekstraktının *Leishmania infantum* promastigotları üzerine etkisi

Gruplar one-way analysis of variance (ANOVA) testi ile karşılaştırılarak etkinlik değerlendirildi.

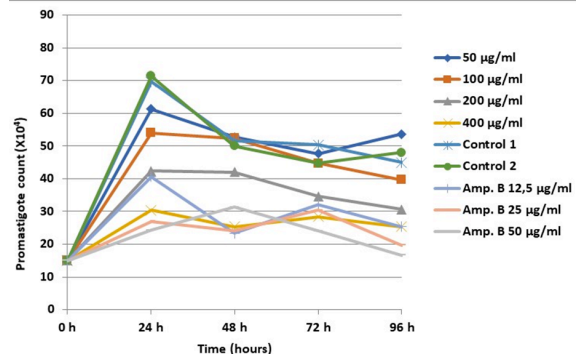
### Bulgular

Kuyucuklardan 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örnekler sayıldı ve üreme miktarları belirlendi (Tablo 1).

Etüvde 24°C'de 96 saatlik inkübasyon sonunda, Ps'in 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonunda kontrol gruplarına göre *L. infantum* promastigotlarının üremesini inhibe etmediği gözlemlendi ( $p > 0.05$ ) (Şekil 1).

Ps'in 96 saatlik inkübasyon sonunda 200 µg/mL ve 400 µg/mL konsantrasyonda ise kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde üremeyi engellediği görüldü ( $p < 0.05$ ) (Şekil 1).

Ps'in 24°C'de 96 saatlik inkübasyon sonunda, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonunda *L. tropica* promastigotların kontrol ve pozitif kontrol grubuna göre üremesini inhibe etmediği gözlemlendi ( $p > 0.05$ ) (Şekil 2).



**Şekil 2.** *Pelargonium sidoides* ekstraktının *Leishmania tropica* promastigotları üzerine etkisi.

Ps'in 96 saatlik inkübasyon sonunda 200 µg/mL ve 400 µg/mL konsantrasyonlarda üremeyi anlamlı olarak engellediği görüldü ( $p < 0.05$ ) (Şekil 2).

Ps'in *L. infantum* promastigotları üzerine  $IC_{50} = 217.0018$  µl/ml, *L. tropica* promastigotları üzerine  $IC_{50} = 199.6707$  µl/ml olduğu hesaplanmıştır.

EPs'in çözünmesinde kullanılan çözücülerin promastigotlar üzerinde inhibitör etkiye katkısı analiz edilmiş ve çözücünün promastigotlar üzerine anlamlı inhibitör etkisi saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ).

### Sonuç

Sonuç olarak EPs 7630'un *L. infantum* ve *L. tropica* promastigotlarına karşı doğrudan anti-leishmanial aktivitelerinin varlığı tespit edilmiştir. Kolay tolere edilebilir olması ve sentetik ilaçlara oranla yan etkilerinin az olması sebebiyle bitkisel kaynaklar tedavide önem kazanmaktadır. Biyo-bileşiklerin multimoleküler bitki özlerinden ayırma ve saf-

laştırılması çok zaman, planlama ve maliyet gerektirmesine rağmen, bu alanda hastaları etkili bir şekilde tedavi etmek için ileriye yönelik daha fazla umut vadetmektedir. Çalışmalara göre, fitoterapötikler yeni, güvenli ve etkili antileishmanial ajanlar için etkili, geniş ve umut verici bir bakış açısı sağlar<sup>(11)</sup>. EPs 7630 solüsyonu *Leishmania* promastigotlarına doğrudan etkinliği bu çalışma ile belirlenmiştir. Rutin kullanımda birçok ilaçtan daha az toksik olması sebebiyle ileride alternatif tedavi seçeneği olabileceği düşünülmüştür.

*Pelargonium sidoides*'in antileishmanial etkisinden sorumlu olan madde(ler)i belirlemek ve diğer antileishmanial bileşikleri ile kombine uygulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Daha sonra yapılacak in vivo modellerin geliştirilmesinin klinik çalışmalara basamak olması açısından yararlı olabileceği düşünülmüştür.

#### Teşekkür

Bu araştırmada *Leishmania* suşlarını sağladıkları için Dr. Cahit Babür ve Prof.Dr.Seray Töz'e çok teşekkür ederiz.

**Anahtar kelimeler:** *Pelargonium sidoides*, Leishmaniasis, in vitro, Anti-leishmanial ajan

#### Kaynaklar

1. Maxfield L, Crane JS. Leishmaniasis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531456/?report=classic> (Erişim tarihi: Aralık 2020).
2. Lévéque MF, Lachaud L, Simon L, Battery E, Marty P, Pomares, C. Place of serology in the diagnosis of zoonotic leishmaniases with a focus on visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:67.

- <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00067>
3. Thakur S, Joshi J, Kaur S. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. J Parasit Dis. 2020;44(2):253-72. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>
4. Serban G. Future prospects in the treatment of parasitic diseases: 2-Amino-1,3,4- Thiadiazoles in leishmaniasis. Molecules. 2019;24(8):1557. <https://doi.org/10.3390/molecules24081557>
5. Battista T, Colotti G, Ilari A, Fiorillo A. Targeting trypanothione reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against leishmaniasis and trypanosomiasis. Molecules. 2020;25(8):1924. <https://doi.org/10.3390/molecules25081924>
6. Basmacıyan L, Casanova M. Cell death in Leishmania. Parasite. 2019;26:71. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019071>
7. Moraes Neto RN, Setúbal RFB, Higino TMM, Brelaz-de-Castro MCA, da Silva LCN, Aliança ASDS. Asteraceae plants as sources of compounds against leishmaniasis and chagas disease. Front Pharmacol. 2019;10:477. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00477>
8. Moafi M, Rezvan H, Sherkat R, Taleban R. *Leishmania* vaccines entered in clinical trials: A review of literature. Int J Prev Med. 2019;10:95. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM\\_116\\_18](https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18)
9. Karamysheva ZN, Guarnizo, SAG, Karamyshev AL. Regulation of translation in the protozoan parasite *Leishmania*. Int J Mol Sci. 2020;21(8):2981. <https://doi.org/10.3390/ijms21082981>
10. Narayan S, Thakur CP, Bahadur S, et al. *Cedrus deodara*: In vitro antileishmanial efficacy & immunomodulatory activity. Indian J Med Res. 2017;146(6):780-7. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_959\\_16](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_959_16)
11. Soosaraei M, Fakhari M, Hosseini Teshnizi S, Ziaei Hezarjaribi H, Banimostafavi ES. Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: A systematic review and meta-analysis. Ann Med Surg (Lond). 2017;21:63-80. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2017.07.057>

# Konya'da İnsan ve Hayvan Kistik Ekinokokkozu: Moleküler Tanımlama ve Türkiye'de İnsan Konakçıdan İlk *Echinococcus equinus*'un Raporu

Salih Macin<sup>1</sup>, Serra Örsten<sup>2</sup>, Rugıyya Samadzade<sup>1</sup>, Bayram Çolak<sup>3</sup>, Hakan Cebeci<sup>4</sup>,  
Duygu Fındık<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu, Ankara

<sup>3</sup>Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Konya

<sup>4</sup>Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, Konya

✉ mr.rukiye@mail.ru

## Giriş

Kistik echinococcosis *Echinococcus* cinsi sestodların larval evresinin sebep olduğu yaygın zoonotik bir enfeksiyondur<sup>(1)</sup>. Koyun, sığır gibi otçul hayvanlarda ve insanlarda karaciğer ve akciğer gibi çeşitli organlarda *Echinococcus granulosus* larva şeklinin lokalize olması ile gelişen klinik tablo kistik echinococcosis (KE) olarak adlandırılır. Günümüzde dünya çapında gelişmiş ülkelerin çoğunda rastlanmayan KE, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sıklıkla görülmektedir<sup>(2)</sup>.

Hidatik kist Türkiye'de de hem hayvanlarda hem de insanlarda rastlanan yaygın bir hastalıktır. Ülkemizde önemli bir sağlık sorunu oluşturmamasının yanında, önemli ekonomik kayıplara da yol açmaktadır<sup>(3)</sup>. Ülkemizde hidatik kistin oluşturduğu ekonomik kayba, başlıca olarak insanlarda hastalığın tanı ve tedavi için kullanılan giderler gösterilebilir. Çiftlik hayvanlarında ise kistin gelişimi sırasında organlardaki yayılıma bağlı olarak; yün kalitesinde düşüklük, kısırılık oranında artış, et ve süt veriminde azalma gibi faktörler en önemli ekonomik kayıplardır<sup>(4)</sup>.

Bu çalışma ile KE moleküler epidemiyolojisi açısından kısıtlı veri bulunan, baskın genotip veya genotipler belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada elde edilen veriler ile bölgesel bulaş kontrolü ve eradikasyon çalışmaları açısından önemli bilgilerin sağlanabileceği öngörülmektedir.

## Gereç ve Yöntem

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Radyoloji bölümlerine başvuran hastalardan 01.03.2018-01.07.2019 tarihleri arasında alınmış kist sıvısı örnekleri Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışılmıştır. Hayvan örneklerinin toplanması için ise Konya ilinde bulunan mezbanhane hayvan kesimleri takip edilerek kist örnekleri toplanmıştır. Araştırma süresinde toplam 100 örnek; (40 insan ve 60 hayvan kist sıvısı) toplanmıştır.

Hem insanlardan, hem de hayvanlardan toplanmış örnekler ilk önce direkt mikroskopiye tabi tutularak, parazitin protoskoleksi veya kancası varsa tespit edilmiştir. Kist sıvısı örnekleri moleküler tanı için (*Cox1*-PCR, 828 baz çift) Hacettepe Üniversitesi'ne gönderilmiştir. 02.09.2019-

16.12.2020 tarihleri arasında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda PCR ürünlerinden genotip belirlenmesi için sekans analizi (Beckman Coulter 8800 ve ABI 310 cihazlarında) yapılmıştır. Elde edilen diziler, NCBI veri tabanındaki mevcut dizilerle karşılaştırılarak BLAST algoritmasında değerlendirilmiştir.

## Bulgular

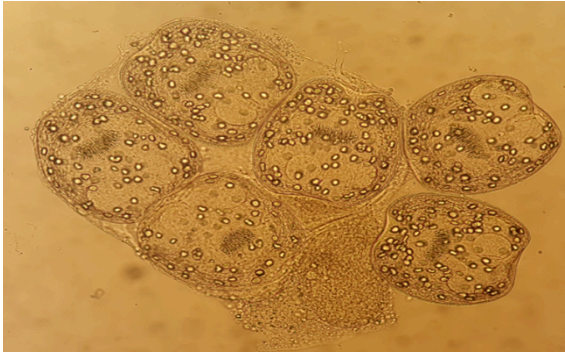
Araştırma sonuçlarına göre 40 insan örneğinin 18'nin (% 45) direkt mikroskopisinde pozitiflik saptanmıştır. Büyükbaşlardan elde edilen kistlerin 45'i karaciğer ve 15'i akciğerden elde edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre toplam 60 hayvan örneğinin direkt bakısında 54'de (% 90) pozitiflik, 6'da (%10) ise negatiflik saptanmıştır. Pozitiflik saptanmış hayvan örneklerinin; 12'sinin (% 22.22) akciğer ve 42'sinin (% 77.78) karaciğer örneği olduğu tanımlanmıştır.

Toplanan 100 izolata uygulanan *Cox1*-PCR sonucu 83 (% 83) izolat pozitif olarak kaydedilmiştir. Bunların 26'sı (% 31.32) insan ve 57'si (% 68.68) büyükbaş kaynaklı olmuştur. Büyükbaşlardan elde edilen kistlerin 45'i (% 75) karaciğer ve 15'i (% 25) akciğerden elde edilmiştir.

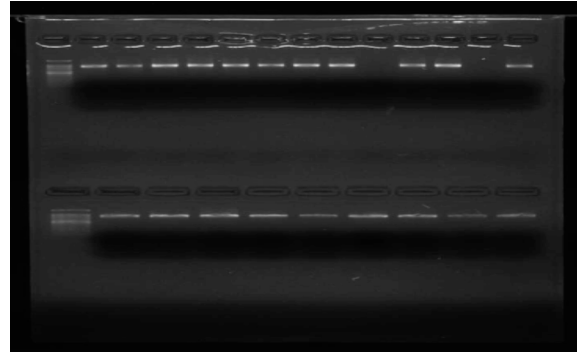
BLAST algoritmasına göre insan kaynaklı izolatların 25'i (% 96.15) *E. granulosus* sensu stricto (23 (% 92)-G1 genotipi, 2 (% 8) - G3 genotipi) olduğu tespit edilmiştir. Kalan bir insan izolatı ise *Echinococcus equinus* (G4 genotipi) olarak tanımlanmıştır. Elde edilen *E. equinus* dizisi GenBank'a gönderilmiştir (Erişim 109 Numarası: MT621047). Büyükbaş kaynaklı izolatların tamamının *E. granulosus* s.s. [46 (% 80.70)- G1 genotipi, 11 (% 19.3)- G3 genotipi]] olduğu tespit edilmiştir.

## Sonuç

Bu çalışma kapsamında, çeşitli ara konaklardan elde edilen hidatik kistlerin moleküler karakterizasyonu amacıyla *cox1* mitokondriyal gen PCR'i uygulanmıştır. Türkiye'de de çeşitli ara konaklardan elde edilen hidatik kistlerin moleküler karakterizasyonunu temel alan birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların ortak sonucu olarak Türkiye'de baskın türün *E. granulosus* s.s. (G1/G3 genotipleri) olduğu görülmektedir<sup>(5,6,7,8,9)</sup>.



Şekil 1. Hayvan karaciğer kist sıvısında direkt bakısında saptanmış kist protoskolekleri.



Şekil 2. *Echinococcus* spp.'lerin elektforez jel görüntülenmesi.

Çalışmamız literatür ile uyumlu olup, en fazla G1 genotipi ve ardından G3 genotipi tespit edilmiştir. Bu çalışmada bir tane insan kaynaklı izolata yapılan dizi analizi sonucu G4 genotipi veya güncel adıyla *E. equinus* ile uyumlu bulunmuştur. *E. granulosus* s.l.'nin moleküler karakterizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, PCR-RFLP yöntemi ile ve *E. equinus*'u ilk kez insandan rapor edilmiştir<sup>(10,11)</sup>. Bu çalışmada kapsamında Türkiye'de ilk kez sekans ile doğrulanmış *E. equinus* insanlarda rapor edilmiş olacaktır.

*Echinococcus equinus*, koyun suşlarından morfolojik ve epidemiyolojik farklılıkları nedeniyle *E. granulosus*'un farklı bir alt türü olarak karakterize edilmiştir. Sonraki çalışmalar, at kaynaklı izolatlara ve diğerleri arasındaki biyolojik farklılıklar olduğunu doğrulamıştır<sup>(12)</sup>. Bu ayırım, otuz yıl önce atlardan (İngiltere ve İspanya) ve bir eşekten (İrlanda) elde edilen üç hidatik kist izolatından *cox1* geninin kısmi sekanslanması yoluyla doğrulanmıştır<sup>(13)</sup>. Günümüzde, dünya çapında farklı ara konakçılardan *E. equinus*'un varlığına işaret eden birçok rapor bulunmaktadır<sup>(14,15)</sup>. Türkiye'den gelen raporlara göre katır ve eşekten *E. equinus* tespit edilmiştir<sup>(16)</sup>. Yapılan çalışmaların verilerine göre, *E. equinus* genellikle ara konakçılarda steril küçük kistler halinde gelişir ve diğer çalışmalar oldukça yüksek oranda doğurganlık ve iyi gelişmiş hidatik kistler bildirmektedir<sup>(17)</sup>.

*Echinococcus equinus* izole edilmiş hastanın klinik bulguları kaydedilerek, abdominal ultrasonografi ve bilgisayarlı tomografide sınırlı gerilmiş 3 kistik lezyon saptanmıştır. Hasta PAIR (ponksiyon, aspirasyon, enjeksiyon ve reaspirasyon) ve perkütan kateterizasyon teknikleri ile tedavi edilmiştir. Hastaya tedaviden önce üç hafta boyunca günde 10 mg / kg dozunda oral albendazol verilmiştir. Tedavi sonrası 1. 6. ve 12. aylarda takip ultrasonografi incelemeleri yapılmıştır. Hastada lezyonlar tamamen iyileşmesi ve rekürrens gözlemlenmiştir. Kist hidatik için hemaglutinasyon inhibisyon testi pozitif bulunmuştur. Mikroskopik inceleme zamanı kist steril saptanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma *E. equinus*'un Türkiye'deki insan konakçıdan türetilen hidatik materyalin sekanslanması yoluyla moleküler doğrulanması üzerine ilk rapordur ve dünya çapında ikinci rapordur. Ancak, *E. equinus*'un Türkiye'de insanlarda da hayat döngüsü olduğuna dair kanıtlar olmasına rağmen, bulaşmanın nasıl gerçekleştiğine dair kesin bir yorum yapılamamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *E. granulosus*, *E. equinus*, kistik echinococcosis, *cox1* geni, protoskoleks

#### Kaynaklar

1. Cadona GA, Carmena D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic *Echinococcus* in production animals. *Vet Parasitol.* 2013;192(1-3):10-32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.027>
2. Rojas AC, Romig T, Lightowlers WM. *Echinococcus granulosus* sensu-lato genotypes infecting humans-review of current knowledge. *Int J Parasitol.* 2014;44(1):9-18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.08.008>
3. Demir P, Mor N. Kars belediye mezbanasında kesilen sığırlarda kistik *Echinococcosis*'in yaygınlığı, mevsimsel dağılımı ve ekonomik önemi. *Türkiye Parazit Derg.* 2011;35(4):185-8. <https://doi.org/10.5152/tpd.2011.48>
4. Balkaya İ, Şimşek S. 2010. Erzurum' da kesilen sığırlarda hidatidosis ve fasciolosis'im yaygınlığı ve ekonomik önemi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 2010;16(5):793-7. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2010.1597>
5. Schneider R, Gollackner B, Edel B, et al. Development of a new PCR protocol for the detection of species and genotypes (strains) of *Echinococcus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Int J Parasitol.* 2008;38(8-9):1065-71. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.008>
6. Simsek S, Balkaya I, Ciftci AT, Armagan EU. Molecular discrimination of sheep and cattle isolates of *Echinococcus granulosus* by SSCP and conventional PCR in Turkey. *Vet Parasitol.* 2011;178(3-4):367-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.033>
7. Eryıldız C, Sakru N. Molecular characterization of human and animal isolates of *Echinococcus granulosus* in the Thrace region, Turkey. *Balkan Med J.* 2012;29(3):261-7. <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2012.072>
8. Bakal U, Simsek S, Kazez A. Surgical and molecular evaluation of pediatric hydatid cyst cases in eastern Turkey. *Korean J Parasitol.* 2015;53(6):785-8. <https://doi.org/10.3347/kjp.2015.53.6.785>
9. Orsten S, Boufana B, Ciftci T, et al. Human cystic echinococcosis in Turkey: a preliminary study on DNA polymorphisms of hydatid cysts removed from confirmed patients. *Parasitol Res.* 2018;117(4):1257-63. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5807-9>
10. Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int J Parasitol.* 2013;43(12-13):1017-29. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.002>
11. Romig T, Deplazes P, Jenkins D, et al. Ecology and life cycle patterns of *Echinococcus* species. *Adv Parasitol.* 2017;95:213-



314.  
<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.002>
12. Kumaratilake LM, Thompson RCA, Eckert J. *Echinococcus granulosus* of equine origin from different countries possess uniform morphological characteristics. *Int J Parasitol.* 1986;16(5):529-40.  
[https://doi.org/10.1016/0020-7519\(86\)90089-5](https://doi.org/10.1016/0020-7519(86)90089-5)
13. Bowles J, Blair D, Mcmanus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mole and Biochem Parasitol.* 1992;54(2):165-74.  
[https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90109-w](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90109-w)
14. Thompson RA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.* 2002;18(10):452-7.  
[https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02358-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02358-9)
15. Boufana B, Stidworthy MF, Bell S, et al. *Echinococcus* and *Taenia* spp. from captive mammals in the United Kingdom. *Vet Parasitol.* 2012;190(1-2):95-103.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.023>
16. Simsek S, Cevik A. First detection and molecular characterization of *Echinococcus equinus* in a mule in Turkey. *Acta Parasitol.* 2014;59(4):773-7.  
<https://doi.org/10.2478/s11686-014-0308-1>
17. Varcasia A, Garippa G, Pipia AP, et al. Cystic echinococcosis in equids in Italy. *Parasitol Res.* 2008;102(4):815-8.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-007-0862-7>

## ***Toxoplasma gondii* ve Nörodejeneratif Hastalıklar Arasındaki Olası İlişki**

**Rugıyya Samadzade<sup>1</sup>, Salih Maçın<sup>1</sup>, Ahmed Moustapha Nsangou<sup>1</sup>, Neriman Akdam<sup>3</sup>,  
Figen Güney<sup>4</sup>, Sevil Kurban<sup>5</sup>, Haluk Gümüş<sup>2</sup>, Duygu Fındık<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Konya

<sup>3</sup>Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyostatistik Anabilim Dalı, Konya

<sup>4</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Konya

<sup>5</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya

✉ mr.rukiye@mail.ru

### **Giriş**

*Toxoplasma gondii* zoonotik parazitoz hastalıkları arasında dünyada en yaygın etkenlerden biridir. Dünyada ortalama %25-30 insanın toksoplazma ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. *T. gondii*'nin neden olduğu toksoplazmozis insan vücudundaki tüm hayati organları tutabilen, akut döneminde özellikle, kan, tükürük, BOS, idrar gibi tüm vücut sıvılarında saptanabildiği, transplasental bulaş ile kalıcı fetal anomalilere, hamileliğin erken evrelerinde düşüklere neden olan bir enfeksiyondur<sup>(1)</sup>. Parazit çiğ veya az pişmiş kontamine et, iyi yıkanmamış, kabuğu soyulmamış kontamine sebze-meyve yenmesi, çiğ süt ve çiğ yumurta tüketimi, kontamine su içilmesi, kan, organ nakli ve transplasental geçiş gibi pek çok yolla bulaşabilir. Bulaşma yolları çok fazla olduğu için de hastalık dünyada oldukça yaygın prevalansa sahiptir<sup>(2)</sup>.

Toksoplazma enfeksiyonunun tanısında serolojik, moleküler ve histolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler direkt ve indirekt olarak sınıflandırılabilir. İndirekt yöntemler olarak tanımlanan serolojik yöntemler rutin tanıda daha çok kullanılmaktadır. Serolojik yöntemlerle enfeksiyona karşı oluşan antikor varlığı araştırılırken, moleküler bir yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) testleri ile parazit DNA'sının gösterilmesi hedeflenmektedir<sup>(3)</sup>. Sağlıklı kişilerde *T. gondii*'ye karşı oluşmuş antikorlar, aylar ve hatta yıllar boyunca yüksek titrede pozitif kalabilmesi, yöntemlerin yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuç verme olasılıkları, birden fazla yöntemin kullanılmasını zorunlu kılmıştır. Real-time PZR yönteminin, toksoplazmanın moleküler tanısını birçok konvansiyonel yöntemlere göre daha kısa sürede saptayabilmesi ve hastalığın evresi ve seyri hakkında bilgi verilebilmesi gibi önemli avantajları vardır<sup>(4)</sup>.

Nörodejeneratif hastalıklar nöronlardaki ilerleyici kayba bağlı olarak sinir sistemi fonksiyonlarının yitimine neden olan bir grup hastalıktır. Ayrıca, nöron kaybının yanısıra nöron hücreleri içinde iplikli yapılar ile karakterizedirler. Hirano, Lewy, Pick cisimcikleri ve nörofibriler yumaklar (neurofibrillary tangles: NFT) gibi bir dizi hücre-içi birikimler nöropatologlar tarafından tanımlanmaktadır<sup>(5)</sup>. Nörodejeneratif hastalıklar genetik faktörlerin, çevresel tetikleyici faktörlerin, eksitotoksisitenin, oksidatif stresin ve yaşlan-

manın etkisiyle olduğu gibi, doğum sırasında oluşan bir hasara bağlı olarak ortaya çıkabilir. Alzheimer(AH) ve parkinson (PH) hastalıklarının 40 yaş altında nadir görülmesi yaşlanmanın bu hastalıklar için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Multiple skleroz (MS) ise erken yaşta ortaya çıkan nörodejeneratif hastalıktır<sup>(6)</sup>.

Nörodejeneratif hastalıklar, rölatif olarak sık görülmekte, hem sosyal hem de sağlık açısından önemli sorunlar yaratmaktadırlar. Günümüzde bu hastalıkların tedavisi sadece semptomatik tedavi ile sınırlıdır. MS ve Parkinson hastalıklarının semptomatik tedavisi rölatif olarak başarılıdır. Ancak mevcut tedaviler Alzheimer hastalarında etkinlik açısından son derece sınırlıdır<sup>(7)</sup>.

Türkiye'de *T. gondii* geniş yayılım gösteren zoonotik bir enfeksiyon olmasına rağmen nörodejeneratif hastalıklar da seroprevalansı hakkında bilgiler sınırlıdır. Bu nedenle yaptığımız çalışmayla ülkemizde geniş bir yayılım gösteren *T. gondii*'nin çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer, Parkinson, MS) seroprevalansının araştırılmasıyla aralarındaki prevalans (pozitif veya negatif) ilişkisinin saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, parkinson, alzheimer ve multiple sklerozis ile *T. gondii* arasındaki olası ilişkinin, sosyodemografik özelliklerle birlikte değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

### **Gereç ve Yöntem**

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayıyla (18.04.2018; 2018/63) Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji polikliniğine ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Nöroloji polikliniğine Haziran 2018-Haziran 2019 tarihleri arasında başvuru yapan parkinson, alzheimer ve multiple skleroz tanısı almış 100'er hasta (toplam 300) ve nörodejeneratif hastalık öyküsü bulunmayan, sağlıklı 100 gönüllü kontrol grubu dahil edilmiştir. Nörodejeneratif hastalık tanı kriterlerini karşılayan hastalara ve sağlıklı gönül grubuna çalışmanın amacı, tanımı ve ayrıntıları hakkında bilgi verilmiştir. Bilgilendirme sonucunda hastalara Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu imzalatılıp, sonra rutin tetkiklerden artan serumlar çalışmaya dahil edilmiştir.

Tanıda, elektrokemilüminesans (ECL) yöntemine dayanan Roche firması tarafından üretilen Toxo IgM ve Toxo IgG kitleri kullanılmıştır. Sonuçlar, yazılım tarafından numunenin reaksiyon ürününden elde edilen elektrokemilüminesans sinyali ile daha önce kalibrasyonla elde edilen eşik değerinin sinyali karşılaştırılarak otomatik olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın işleyişi sırasında hem hastalara hemde kontrol grubundaki kişilere, kedi ile temas, çiğ/az pişmiş et tüketimi, hijyen (temizlik) alışkanlıkları ve diğer sosyodemografik özellikleri içeren bir sorgulama formu uygulanmıştır. Her bir grup için *T. gondii* ile kedi besleme, et ürünlerinin tüketimi ve hijyen arasında ilişki olup olmadığını test etmek için ki-kare Testi ve Fisher Exact testi uygulanmıştır. Her bir hastalığın kontrol grubu için ilişkiler Odds Ratio güven ara-

lığı ile test edilmiştir. Analizler %5 anlam seviyesinde (% 95 güven seviyesi) aralığında değerlendirilmiştir.

### Bulgular

Hasta ve kontrol grubuna ait toplam 400 örnek (300 hasta örneği ve 100 kontrol örneği) çalışmaya alınmıştır. 300 hastanın 146'sı erkek 156'sı kadındır. Kontrol grubunda ise 33 erkek 67 kadın çalışmaya alınmıştır. Toksoplazma IgM ve Toksoplazma IgG'den en az birinin pozitif olması halinde Toksoplazma pozitif olarak kabul edilmiştir. 400 serumun 218'inde (%54.5) Toksoplazma IgM ve/veya Toksoplazma IgG pozitif bulunmuştur. Bu örneklerin 207'sinde (%51.75) Toksoplazma IgG pozitif olarak saptanmıştır.

**Tablo 1. Nörodejeneratif hastalıklarda (Parkinson, Alzheimer, Multiple Skleroz) *Toxoplasma gondii* seropozitifliği.**

|                               |         |   | Grup                |         | Toplam | p-<br>değeri | Grup                |         | Toplam | p-<br>değeri        | Grup                 |         | Toplam | p-<br>değeri |
|-------------------------------|---------|---|---------------------|---------|--------|--------------|---------------------|---------|--------|---------------------|----------------------|---------|--------|--------------|
|                               |         |   | Parkinson           | Kontrol |        |              | Alzheimer           | Kontrol |        |                     | Multiple<br>Skeloroz | Kontrol |        |              |
| Toksoplazma                   | Pozitif | n | 62                  | 36      | 98     | 0.000        | 72                  | 36      | 108    | 0.000*              | 44                   | 36      | 80     | 0.248        |
|                               |         | % | 63.3                | 36.7    | 100    |              | 66.7                | 33.3    | 100    |                     | 55                   | 45      | 100    |              |
|                               | Negatif | n | 38                  | 64      | 102    |              | 28                  | 64      | 92     |                     | 56                   | 64      | 44     |              |
|                               |         | % | 37.3                | 62.7    | 100    |              | 30.4                | 69.6    | 100    |                     | 46.7                 | 53.3    | 100    |              |
|                               | Toplam  | n | 100                 | 100     | 200    |              | 100                 | 100     | 200    |                     | 100                  | 100     | 100    |              |
| OR (% 95 OR<br>Güven Aralığı) |         |   | 2.901 (1,633-5.151) |         |        |              | 4.571 (2.515-8.311) |         |        | 1.397 (0.792-2.465) |                      |         |        |              |

\* $p < 0.05$  değişkenler arası ilişki istatistikli olarak anlamlı

**Tablo 2. Kontrol grubunda *Toxoplasma gondii* seropozitifliği ile kedi besleme, et ürünlerinin tüketimi ve hijyen alışkanlıklarına göre dağılımı.**

|             |         |   | Kontrol      |       |        |          | Kontrol                 |            |        |          | Kontrol  |      |        |                    |
|-------------|---------|---|--------------|-------|--------|----------|-------------------------|------------|--------|----------|----------|------|--------|--------------------|
|             |         |   | Kedi Besleme |       | Toplam | p-değeri | Et Ürünlerinin Tüketimi |            | Toplam | p-değeri | Hijyen   |      | Toplam | p-değeri           |
|             |         |   | Evet         | Hayır |        |          | Az Pişmiş               | Çok Pişmiş |        |          | İyi-Orta | Kötü |        |                    |
| Toksoplazma | Pozitif | N | 23           | 41    | 64     | 0.154    | 14                      | 50         | 64     | 0.309    | 63       | 1    | 64     | 1.000 Fisher Exact |
|             |         | % | 35.9         | 64.1  | 100    |          | 21.9                    | 78.1       | 100    |          | 98.4     | 1.6  | 100    |                    |
|             | Negatif | N | 19           | 17    | 36     |          | 12                      | 24         | 36     |          | 35       | 1    | 36     |                    |
|             |         | % | 52.8         | 47.2  | 100    |          | 33.3                    | 66.7       | 100    |          | 92.7     | 2.8  | 100    |                    |
|             | Toplam  | N | 42           | 58    | 100    |          | 26                      | 74         | 100    |          | 98       | 2    | 100    |                    |

\* $p < 0.05$  değişkenler arası ilişki istatistikli olarak anlamlı

Hasta grubundan alınan 300 serum örneğinin 172'sinde (%57.3) Toksoplazma IgG pozitif olarak bulunmuştur. Hasta örneklerinde saptanan Toksoplazma IgG antikorlarının; 42'si (%24.4) multiple skleroz hastalarından, 60'ı (%34.9) parkinson hastalarından, 70'i (%40.7) alzheimer hastalarından alınan örneklerde saptanmıştır. Hasta örneklerinde anti-Toksoplazma IgM antikor varlığı 300 serumun toplam 11'inde (%3.6) pozitif olarak bulunmuştur. 9 (%3) hastada ise hem IgM hem de IgG pozitifliği saptanmıştır. Kontrol grubundan alınan serumlarda anti-Tokso IgM antikor pozitifliği saptanmamıştır.

## Sonuç

Bu çalışma verilerine göre, parkinson ve alzheimer hasta gruplarının sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, *T. gondii* varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bununla birlikte multiple skleroz hastalarında *T. gondii* seropozitifliği arasında ise anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Parkinson, multiple skleroz ve kontrol grubunun *T. gondii* seropozitifliği ile kedi besleme, et tüketim durumu (az veya çok pişmiş) ve hijyen alışkanlıkları arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Alzheimer hastalarının *T. gondii* seropozitifliği ile kedi ile temas arasında anlamlı bir ilişki bulunmasına rağmen, et tüketimi durumu (az veya çok pişmiş) ve hijyen alışkanlıkları arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Miman ve ark.<sup>(8)</sup> tarafından yapılan çalışmada PH ve kontrol gruplarında Toksoplazma IgG antikorları sırasıyla 52 hasta da % 42.3 ve 40 kontrol grubunda % 22.5 olarak saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p = 0.006). Fallahi ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada PCR testinin sonuçlarına göre, toksoplazma enfeksiyonunun prevalansı PH'da % 19.3, kontrol gruplarında % 10.4 olduğundan istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.002). Araştırma sonuçlarına göre, toksoplazma enfeksiyonunun sadece PH'ı için bir risk faktörü olmadığını, aynı zamanda PH'da enfeksiyon edinme riskinin daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır<sup>(9)</sup>. Parkinson hastalığı ile *T. gondii* arasındaki ilişkiyi araştırmak için yapılan çalışmalarda ortak sonuç olarak; *T. gondii* tarafından üretilen dopamin, dopamin üreten nöronların dejenerasyonuna ve nörojenik iltihabına sebep olarak parkinson hastalığının oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Kusbeci ve ark.<sup>(10)</sup> yaptıkları araştırmada, sonuçlara göre Toksoplazma IgG pozitif titresi ile AH'ı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür. Pearce ve ark.<sup>(11)</sup>, Çelik ve ark.<sup>(12)</sup> tarafından yapılmış çalışmalarda toksoplazma enfeksiyonundan sonra salınan IFN- $\gamma$  gibi bazı enflamatuvar sitokinler dopamin üreten nöronların dejenerasyonuna yol açarak, alzheimer neden olduğu öne sürülmüştür. Yapılan bu çalışmalar göstermiştir ki Alzheimer bakteriyel, parazital ve viral patojenleri de içerebilen çok faktörlü bir hastalıktır.

Epidemiyolojik veriler parazit enfeksiyonlarının MS gibi otoimmün hastalıkların patogenezi ile de düşük olsa da ilişkili olabileceğine dair kanıt sunmaktadır. Bu fenomen ilk kez, 1989'da Strachan tarafından, "hijyen hipotezi" ile önerilmiştir. Bu hipotezle, çocukluk döneminde bulaşıcı ajanlarla tekrar tekrar maruz kalmanın alerji ve otoimmünite gelişmesine karşı koruma sağlayabileceğini ileri

sürülmüşlerdir<sup>(13)</sup>. Yapılan bu çalışmalar parazit enfeksiyonlarının otoimmün hastalıklara karşı koruyucu etkileri olabileceğini öneren hijyen hipotezini büyük oranda desteklemektedir.

Yaptığımız bu çalışma ülkemizde *T. gondii* ile nörodejeneratif hastalıklar arasındaki olası ilişkini araştıran ilk geniş kapsamlı çalışmalardandır. Çalışmamızda hasta gruplarında ECL yöntemi ile hasta grubunda (parkinson, alzheimer, multiple skleroz) elde ettiğimiz yüksek *T. gondii* pozitifliğinin, daha gelişmiş mikrobiyolojik yöntemler (örneğin, PCR) kullanılması zamanı daha yüksek oranda saptanması öngörülmektedir. Benzeri yapılacak çalışmalarla MS ve diğer otoimmün hastalıklar için potansiyel immün modüle edici tedavilerin gelişimine katkı sağlayacaktır. Ayrıca, yapılacak in vivo çalışmalarla nörodejenarasyonun immünolojik mekanizmalarının açıklanmasının, alzheimer gibi geridönüşü olmayan hastalıkların tedavisinde yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Toxoplasma gondii*, Multiple skleroz, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, elektrokemilünimnesans

## Kaynaklar

1. Florence RG, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012;25(2):264-96. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
2. Çetinkaya Z, Yazar S, Gecici O, Namlı MN. Anti-Toxoplasma gondii antibodies in patients with schizophrenia - preliminary findings in a Turkish sample. Schizophr Bull. 2007;33(3):789-91. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbm021>
3. Zaniolo LM, Da Silva AV, Sant'Ana DM, Araujo EJA. Toxoplasma gondii infection causes morphological changes in caecal myenteric neurons. Exp Parasitol. 2012;130(2):103-9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.12.008>
4. Fischer S, Agmon LN, Shapira Y, et al. Toxoplasma gondii: bystander or cofactor in rheumatoid arthritis. Immunol Res. 2013;56 (2-3):287-92. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8402-2>
5. Frisoni GB, Fox NC, Jak CR, Scheltens P, Thompson PM. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. Nat Rev Neurol. 2010;6(2):67-77. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2009.215>
6. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7(3):270-9. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008>
7. Bu X, Yao XQ, Jiao SS, et al. A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease. Eur J Neurol. 2015;22(12):1519-25. <https://doi.org/10.1111/ene.12477>
8. Miman O, Kusbeci YO, Aktepe OC, Cetinkaya Z. The probable relation between Toxoplasma gondii and Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2010;475(3):129-31. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.03.057>
9. Fallahi S, Rostami A, Birjandif M, Zebardast N, Kheirandish F, Spotin A. Parkinson's disease and Toxoplasma gondii infection: Sero-molecular assess the possible link among patients. Acta Trop. 2017;173:97-101. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.002>
10. Kusbeci OY, Miman O, Yaman M, Aktepe OC, Yazar S. Could

- Toxoplasma gondii have any role in Alzheimer disease? Alzheimer Dis Assoc Disord. 2011;25(1):1-3.  
<https://doi.org/10.1097/WAD.0b013e3181f73bc2>
11. Pearce BD, Kruszon MD, Jones JL. The relationship between Toxoplasma gondii infection and mood disorders in the third National Health and Nutrition Survey. Biol Psychiatry. 2012;72(4):290-5.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.01.003>
  12. Çelik T, Kamisli O, Babur C, Çevik MÖ, Öztuna D, Altınayar S. Is there a relationship between Toxoplasma gondii infection and idiopathic Parkinson's disease? Scand J Infect Dis. 2010;42(8):604-8.  
<https://doi.org/10.3109/00365541003716500>
  13. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. BMJ. 1989;299(6710):1259-60.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.299.6710.1259>



## HIV Enfeksiyonunda QuantiFERON-TB Gold Plus Yönteminin Performansının Değerlendirilmesi

Melike Yaşar-Duman<sup>1</sup>, Cengiz Çavuşoğlu<sup>2</sup>, İmre Altuğlu<sup>2</sup>, Ayşın Zeytinoğlu<sup>2</sup>,  
Ayşe Deniz Gökengin<sup>3</sup>, Tansu Gülbahar Aydoğan<sup>2</sup>, Mehmet Nurullah Orman<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Kastamonu Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Kastamonu

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

<sup>4</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, İzmir

✉ yasar.melike@hotmail.com

### Giriş

Dünya nüfusunun yaklaşık 1/4'ünün *Mycobacterium tuberculosis* ile latent olarak enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Latent tüberküloz enfeksiyonu (LTBE) olan bireylerde yaşam boyu aktif tüberküloz (TB) gelişme riski %5-10'dur ve olguların çoğu enfeksiyondan sonraki ilk 5 yıl içinde ortaya çıkmaktadır<sup>(1-5)</sup>. CD4 T hücreleri sayısında belirgin bir azalmanın olmadığı antiretroviral tedavi (ART) altında olan HIV enfeksiyonunda bile aktif hastalığa ilerleme riski olduğu bildirilmektedir<sup>(6-8)</sup>. LTBE yeni aktif TB hastaları için kaynak oluşturduğundan, yalnız aktif TB'nin tedavi edilmesi hastalığın eliminasyonunda yeterli olmamaktadır. HIV pozitif LTBE'li bireylerde ise INH profilaksisi ile TB insidansı %62 azalmaktadır<sup>(9)</sup>. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) yüksek ve orta gelirli ülkelerde aktif TB gelişimi için risk taşıyan HIV ile enfekte bireylerde, LTBE'nin tanısını ve profilaktik tedavisini önermektedir<sup>(1)</sup>.

LTBE tanısında altın standart bulunmamakla birlikte, son yıllara *M. tuberculosis* enfeksiyonu tanısında interferon gama salınım testleri yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>(10)</sup>. QuantiFERON®-TB Gold Plus [QFT-Plus] (Qiagen, Hilden, Almanya) testinde, *M. tuberculosis* genomunun "region of difference-1 (RD1)" bölgesi tarafından kodlanan ESAT-6 ve CFP-10 antijenleriyle uyarılmış periferik kan mononükleer hücrelerindensalınan interferon gama (IFN- $\gamma$ ) ölçülmektedir. QFT-Plus testinde ESAT-6 ve CFP-10 peptit antijenleri içeren iki TB antijen tüpü (TB1 ve TB2) bulunmaktadır. QFT-Plus TB1 tüpünde, CD4 T hücrelerini uyaran göreceli olarak uzun peptitler bulunurken, TB2 tüpünde CD4 T hücrelerinin yanı sıra CD8 T hücrelerinden de IFN- $\gamma$  salımını sağlamak ayrıca kısa ESAT-6 ve CFP-10 peptitlerinden oluşan antijen kokteyli bulunmaktadır. CD8 T hücreleri, *M. tuberculosis*'e karşı konak bağışıklığının ve kontrolünün önemli bir bileşenidir. CD8 T hücrelerinin uyarılması için peptitlerin dahil edilmesinin, CD4 T hücreleri tükenmiş hastalarda latent ve aktif TB enfeksiyonunun saptanmasında testin duyarlılığını artırması beklenmektedir<sup>(10-13)</sup>.

Sunulan çalışmada, bölgemizdeki HIV pozitif hastalarda LTBE prevalansının belirlenmesi ve HIV enfeksiyonunda QFT-Plus testinin performansını etkileyebilecek olası faktörlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Şubat 2016-Aralık 2019 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvar'na QFT-Plus testi gönderilen 18 yaş üzeri 132 HIV pozitif ve dahil edilme kriterlerini karşılayan 133 HIV negatif olgu alındı. HIV negatif olguların dahil edilme kriterleri arasında lenfosit sayılarının normal sınırlar içerisinde olması, eşlik eden immünsüpresyonun olmaması, immün süpresif tedavi altında olmaması ve aktif TB olmaması yer almaktadır. HIV pozitif ve HIV negatif hastaların bilgilerine laboratuvar kayıtlarından ve hastane veri tabanında ulaşıldı. QFT-Plus testi üreticinin önerileri doğrultusunda çalışıldı ve değerlendirildi<sup>(14)</sup>.

**İstatistiksel analiz:** İstatistiksel analizler IBM-SPSS 25.0 paket programda yapıldı. Kategorik değişkenler için çapraz tablolar oluşturuldu ve ki-kare analizleri yapıldı. Numerik değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro-Wilk test ile kontrol edildi. Normal dağılım göstermeyen değişkenler için iki grup karşılaştırması Mann-Whitney test ile yapıldı. Kategorik değişkenler sayı ve %, numerik değişkenler medyan (min., maks.) olarak özetlendi. İstatistik anlamlılık olarak  $p < 0.05$  alındı.

### Bulgular

QFT-Plus sonuçları, medyan yaşı 32 (19-67 yaş) olan 132 HIV pozitif hasta (117 erkek ve 15 kadın) ve medyan yaşı 39 (19-55 yaş) olan 133 HIV negatif vaka (65 erkek ve 68 kadın) için değerlendirilmiştir. Çalışmaya kayıtlı 132 HIV pozitif hastadan 119'unun ART aldığı belirlenmiş, 13 hastanın ise takipte kaybedildiği veya başka hastanelere sevk edildiği için bilgilerine ulaşılamamıştır. Medyan lenfosit sayısı HIV negatiflerde 1865/mm<sup>3</sup> ve HIV pozitif grupta 1825/mm<sup>3</sup> saptanırken HIV pozitif grupta, CD4 lenfosit sayısının medyan değeri 381/mm<sup>3</sup> ve CD8 lenfosit sayısının medyan değeri 882/mm<sup>3</sup> olarak bulunmuştur. HIV pozitif hastaların QFT-Plus sonuçları ile medyan lenfosit sayılarının ilişkisi Tablo 1'de özetlenmiştir.

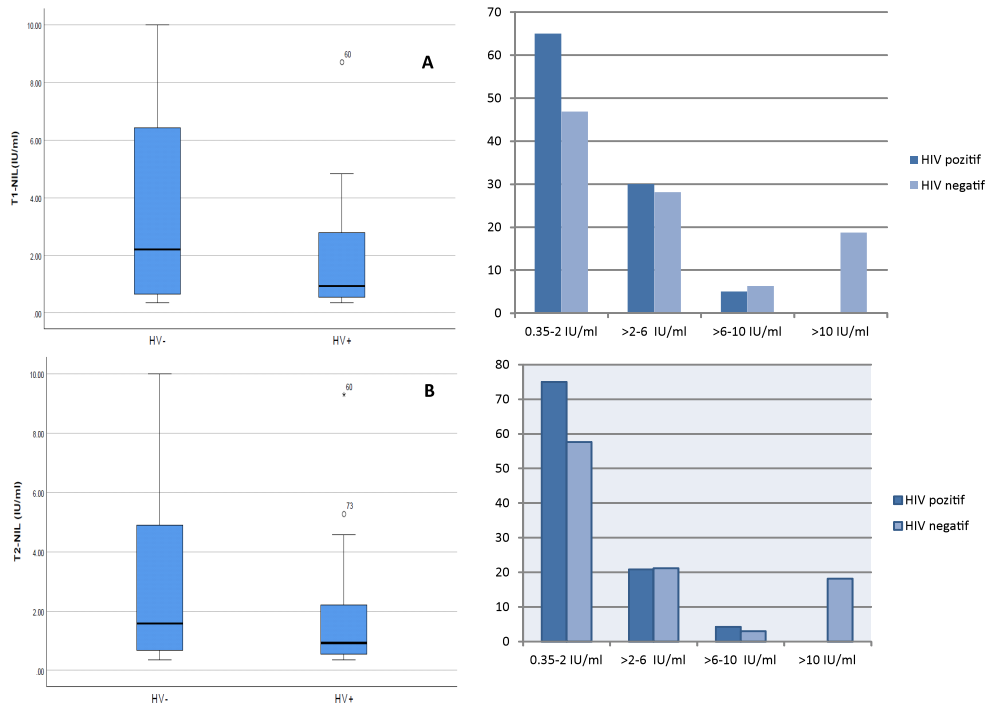
QFT-Plus testi, HIV pozitiflerin %21.2 (28/132)'sinde, HIV-negatiflerin %30.1 (40/133)'inde pozitif saptanırken, HIV pozitiflerin %4.5 (6/132)'inde ve HIV negatif olguların %3 (4/133)'ünde belirsiz sonuç alınmıştır. Belirsiz sonuç alınan

**Tablo 1. HIV pozitif hastaların QFT-Plus sonuçları ile medyan lenfosit sayılarının ilişkisi.**

| Özellik                                            | QFT-Plus sonuçları |             |             |         |          |
|----------------------------------------------------|--------------------|-------------|-------------|---------|----------|
|                                                    | Pozitif            |             |             | Negatif | Belirsiz |
|                                                    | TB1+TB2 Pozitif    | TB1 Pozitif | TB2 Pozitif |         |          |
| Medyan lenfosit sayısı (hücre/mm <sup>3</sup> )    | 1700               | 1700        | 1950        | 1835    | 720      |
| Medyan CD4 T hücre sayısı (hücre/mm <sup>3</sup> ) | 409                | 273         | 397         | 401     | 43       |
| Medyan CD8 T hücre sayısı (hücre/mm <sup>3</sup> ) | 1006               | 1112        | 1149        | 880     | 244      |

**Tablo 2. 132 HIV pozitif ve 133 HIV negatif hastanın TB1 ve TB2 tüplerinde saptanan QFT-Plus sonuçları.**

| HIV pozitif |          |         |         |          |        |
|-------------|----------|---------|---------|----------|--------|
| Tüp         |          | TB2     |         |          |        |
|             |          | Pozitif | Negatif | Belirsiz | Toplam |
| TB1         | Pozitif  | 16      | 4       | 0        | 20     |
|             | Negatif  | 8       | 98      | 0        | 106    |
|             | Belirsiz | 0       | 0       | 6        | 6      |
|             | Toplam   | 24      | 102     | 6        | 132    |
| HIV negatif |          |         |         |          |        |
| Tüp         |          | TB2     |         |          |        |
|             |          | Pozitif | Negatif | Belirsiz | Toplam |
| TB1         | Pozitif  | 25      | 7       | 0        | 32     |
|             | Negatif  | 8       | 89      | 0        | 97     |
|             | Belirsiz | 0       | 0       | 4        | 4      |
|             | Toplam   | 33      | 96      | 4        | 133    |



**Şekil 1. HIV pozitif ve HIV negatif hastalarda TB1(A) ve TB2(B) tüpünden salgılanan IFN- $\gamma$  düzeyleri.**

altı HIV pozitif hastanın beşinde CD4 lenfosit sayısının 200/mm<sup>3</sup>'ün altında olduğu, medyan lenfosit sayısının (43/mm<sup>3</sup>) anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır (Mann-Whitney test, p=0.008). Belirsiz sonuçlar dışlandıktan sonra pozitiflik oranları HIV pozitif olgularda %22.2 (28/126), HIV negatif hastalarda %31 (40/129) idi (ki-kare testi, p=0.113). 132 HIV pozitif ve 133 HIV negatif hastanın TB1 ve TB2 tüplerinde saptanan QFT-Plus sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir.

TB1 tüpü pozitif 32 HIV negatif ve 20 HIV pozitif hastada, TB1 tüpünden salgılanan medyan IFN- $\gamma$  değeri sırasıyla 2.2 IU/ml ve 0.94 IU/ml olarak bulunurken (Mann-Whitney, p=0.094), TB2 tüpü pozitif 33 HIV negatif ve 24 HIV pozitif hastada TB2 tüpünden salgılanan medyan IFN- $\gamma$  değeri sırasıyla 1.6 IU/ml ve 0.93 IU/ml olarak saptanmıştır (Mann-Whitney, p=0.077). Altı HIV negatif hastanın TB1 ve TB2 tüplerinde IFN- $\gamma$  seviyeleri >10 IU/ml saptanırken, HIV pozitif hastaların hiçbirisinde 10IU/ml'nin üzerinde bir değer saptanmamıştır.

### Sonuç

Sonuç olarak, HIV negatiflerle karşılaştırıldığında HIV pozitiflerde, QFT-Plus pozitiflik oranının ve salgılanan IFN- $\gamma$  düzeylerinin daha düşük, belirsiz sonuç oranlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. HIV pozitiflerde CD4 lenfosit ortalamasının normal sınırlar içinde olmasına karşın, düşük QFT-Plus pozitiflik oranları ve IFN- $\gamma$  düzeylerinin, bu hastalarda CD4 lenfosit sayısı yeterli olmasına rağmen, CD4 lenfositlerin antijen yanıtındaki azalmadan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca QFT-Plus testine eklenen TB2 tüpünün hem HIV pozitif hem de HIV negatif LTBE'de testin duyarlılığına katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** QuantiFERON TB gold plus, aktif tüberküloz, insan immün yetmezlik virüsü, latent tüberküloz enfeksiyonu, *Mycobacterium tuberculosis*

### Kaynaklar

1. WHO. Global tuberculosis report 2019: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) (Erişim tarihi: Aralık 2020)
2. Houben RM, Dodd PJ. The global burden of latent tuberculosis infection: A re-estimation using mathematical modelling. *PLoS Med.* 2016;13(10):e1002152. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002152>
3. Fitzgerald DW, Sterling TR, David W. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds). *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious*

Diseases, 8th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2015:2787-23.

4. Petruccioli E, Chiacchio T, Navarra A, et al. Effect of HIV-infection on QuantiFERON-plus accuracy in patients with active tuberculosis and latent infection. *J Infect.* 2020;80(5):536-46. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.009>
5. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K; IGRA Expert Committee; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection-United States, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59(RR-5): 1-25.
6. Girardi E, Sabin CA, d'Arminio Monforte A, et al. Incidence of tuberculosis among HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy in Europe and North America. *Clin Infect Dis.* 2005;41(12):1772-82. <https://doi.org/10.1086/498315>
7. Lawn SD, Myer L, Edwards D, Bekker LG, Wood R. Short-term and long-term risk of tuberculosis associated with CD4 cell recovery during antiretroviral therapy in South Africa. *AIDS.* 2009;23(13):1717-25. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832d3b6d>
8. Tiberi S, Carvalho AC, Sulis G, et al. The cursed duet today: tuberculosis and HIV-coinfection. *Presse Med.* 2017;46(2 Pt 2):e23-39. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.01.017>
9. WHO. Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241500708\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241500708_eng.pdf) (Erişim tarihi: Aralık.2020).
10. Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, et al. Interferon- $\gamma$  release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2011;204(Suppl 4):S1120-9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir410>
11. Rozot V, Vigano S, Mazza-Stalder J, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8<sup>+</sup> T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *Eur J Immunol.* 2013;43(6):1568-77. <https://doi.org/10.1002/eji.201243262>
12. Day CL, Abrahams DA, Lerumo L, et al. Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J Immunol.* 2011;187(5):2222-32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101122>
13. Sutherland JS, Young JM, Peterson KL, et al. Polyfunctional CD4(+) and CD8(+) T cell responses to tuberculosis antigens in HIV-1-infected patients before and after anti-retroviral treatment. *J Immunol.* 2010;184(11):6537-44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000399>
14. QuantiFERON®-TB Gold Plus, ELISA package insert, quiagen. <http://www.quantiferon.com/irm/content/PI/QFT/PLUS/2PK-Elisa/UK.pdf>

## Aktif Tüberküloz Hastalarında QuantiFERON®-TB Gold Plus Testinin Performansının Değerlendirilmesi

Cengiz Çavuşoğlu<sup>1</sup>, Melike Yaşar-Duman<sup>2</sup>, Mehmet Sezai Taşbakan<sup>3</sup>,  
Meltem Işıkgöz-Taşbakan<sup>4</sup>, Mehmet Nurullah Orman<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>Kastamonu Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Kastamonu

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İzmir

<sup>4</sup>Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>5</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Ana Bilim Dalı, İzmir

✉ yasar.melike@hotmail.com

### Giriş

Dünya nüfusunun yaklaşık 1/4'ünün *Mycobacterium tuberculosis* ile latent olarak enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Latent tüberküloz enfeksiyonulu (LTBE) bireylerde yaşam boyu aktif tüberküloz (TB) gelişme riski %5-10'dur ve çoğu enfeksiyondan sonraki ilk 5 yıl içerisinde ortaya çıkmaktadır<sup>(1-4)</sup>. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre 2018 yılında dünyada yaklaşık 10 milyon yeni TB olduğu ve 1.2 milyonu HIV negatif ve 251.000'i HIV pozitif olmak üzere toplam 2 milyon kişinin TB nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmiştir<sup>(5)</sup>. Türkiye'de 2017 yılında TB insidansı 14.6/100.000 olup, %66.1'i pulmoner TB (PTB) ve %33.9'u ekstrapulmoner TB (EPTB) olmak üzere toplam 12.046 yeni TB vakası tespit edilmiştir<sup>(6)</sup>. LTBE yeni aktif TB hastaları için kaynak olduğundan, aktif TB'nin tedavisi hastalığın ortadan kaldırılmasında tek başına yeterli değildir<sup>(7)</sup>. Bu nedenle DSÖ, yüksek ve orta gelirli ülkelerde aktif tüberküloz gelişme riski olan bireylerde LTBI tanısı ve profilaktik tedavisini önermektedir<sup>(5)</sup>.

LTBE tanısında altın standart olmamasına rağmen, QuantiFERON®-TB Gold Plus [QFT-Plus] (Qiagen, Hilden, Almanya) gibi interferon gama salım testleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda, QuantiFERON®-TB Gold in Tube (QFT-GIT) testinde bazı modifikasyonlar yapıldı ve QuantiFERON®-TB Gold Plus [QFT-Plus] (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanıma sunuldu. [QFT-Plus] testi, *M. tuberculosis* genomunun "Region of Difference-1" (RD1) bölgesi tarafından kodlanan ESAT-6 ve CFP-10 antijenleri ile uyarılan periferik kan mononükleer hücrelerinden salınan interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) düzeylerinin ölçülmesi prensibine dayanır. QFT-Plus'ta ESAT-6 ve CFP-10 peptid antijenleri içeren iki TB antijen tüpü (TB1 ve TB2) vardır. QFT-Plus TB1 tüpü, CD4+T hücrelerini uyaran nispeten uzun peptitler içerirken, TB2 tüpü, CD8+ ve CD4+ T hücrelerinden IFN- $\gamma$  salınımını sağlamak için kısa ve uzun ESAT-6 ve CFP-10 peptitlerinden oluşan bir antijen kokteyli içerir. CD8+T hücrelerini uyarmak için peptitlerin eklenmesinin, azalmış CD4+T hücrelerine sahip hastalarda LTBI ve aktif TB enfeksiyonunun saptanmasında testin duyarlılığını artırması beklenmektedir.

Bu çalışmada kültür pozitif aktif-TB hastalarında QFT-Plus

testinin duyarlılığının ve duyarlılığı etkileyen olası faktörlerin değerlendirilmesi, aktif TB hastalarında negatif ve belirsiz sonuçların olası nedenlerinin araştırılması ve aktif-TB hastalarının ve LTBE vakalarının QFT-Plus sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Ocak 2016-Aralık 2019 tarihleri arasında, yapılan kültürlerinde *M. tuberculosis* kompleks üreyen 46 aktif TB hastası ve lenfosit sayısı normal sınırlarda, immünsüpresif ilaç kullanmayan ve immünkompromizasyona yol açan hastalığı olmayan 64 LTBE hastası alındı. Mikroskopik inceleme için auramin-rodamin floresan boyama yöntemi, mikobakteriyel kültür için otomatik BACTEC MGIT 960 (BD, ABD) sistemi kullanıldı. Kültürde üreyen izolatların genotiplendirilmesi ve tanımlanması spoligotiplendirme yöntemiyle (Spoligotyping Kit; Isogen LifeScience, Hollanda) yapıldı. QFT-Plus testi üreticinin önerileri doğrultusunda çalışılarak değerlendirildi<sup>(8)</sup>.

**İstatistiksel analiz:** İstatistiksel analiz IBM-SPSS 25.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Kategorik değişkenler için çapraz tablolar oluşturuldu ve ki-kare analizleri yapıldı. Sayısal değişkenlerin normal dağılımı uygun olup olmadığı Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Normal dağılım göstermeyen değişkenler için iki grubun karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Kategorik değişkenler sayı ve %, sayısal değişkenler medyan (min., maks.) olarak özetlendi. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

### Bulgular

Medyan yaşı 55 (19-83 yaş) olan toplam 46 kültür pozitif aktif TB hastasının (27 erkek ve 19 kadın) QFT-Plus sonuçları ve medyan yaşı 59 (22-91 yıl) olan toplam 64 LTBI vakası (45 erkek ve 19 kadın) değerlendirilmiştir. Kırk altı TB hastasının 24'ünde immünsüpresyon, 10'unda solid organ nakli, 5'inde hematolojik malignite, 3'ünde kronik böbrek yetmezliği, ikisinde HIV pozitif, ikisinde steroid kullanımı, birinde kronik karaciğer yetmezliği ve birinde lenfopeni olduğu belirlenmiştir. Takip sırasında hastaların beşi ölmüştür.

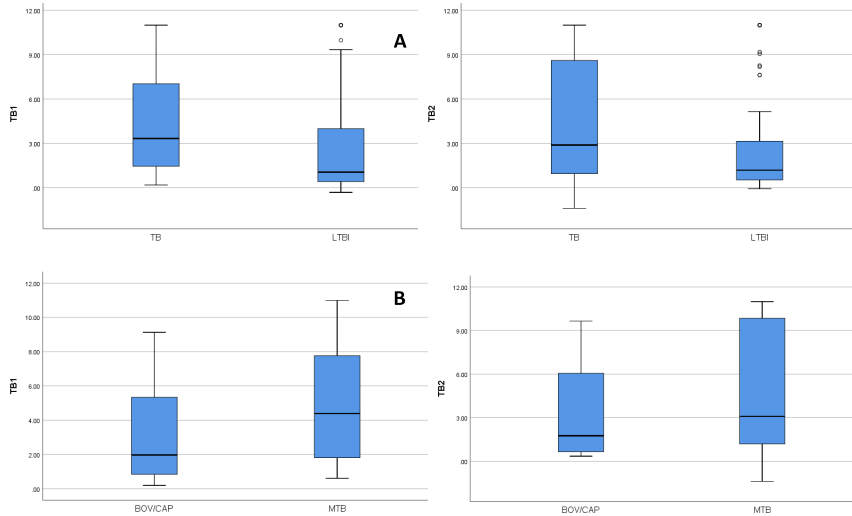
Çalışmaya dahil edilen TB hastalarının 35'inde (%76.1) QFT-Plus pozitif saptanırken, dokuz (%19.6) hastada negatif, iki (%4.3) hastada ise belirsiz sonuçlar elde edilmiştir. Belirsiz sonuç saptanan iki hastada lenfopeni ( $260/\text{mm}^3$  ve  $860/\text{mm}^3$ ) ve böbrek nakli olduğu saptanmıştır. Belirsiz sonuçlar çıkarıldığında testin duyarlılığı tüm kültür pozitiflerde %79.5 (35/44), immünsüpresiflerde %72.7 (16/22) ve immünsüpresif olmayan hastalarda %86.4 (19/22) olarak saptanmıştır. QFT-Plus testinin duyarlılığı, asidorezistan boyama (ARB) pozitif hastalarda %69.2 (9/13), ARB-negatif hastalarda %83.9 (26/31) (Fisher exact testi,  $p=0.414$ ); Pulmoner-TB'de %70.6 (12/17), ekstrapulmoner-TB'de %82.6 (19/23) (ki-kare testi,  $p=0.478$ ) olarak belirlenmiştir. Aktif-TB ve LTBE hastalarında pozitif QFT-Plus sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1. Aktif TB ve LTBE hastalarında pozitif QFT-Plus sonuçlarının karşılaştırılması.**

|          | QTF sonucu (n, %) |       |             |      |             |          |
|----------|-------------------|-------|-------------|------|-------------|----------|
|          | TB1+TB2 pozitif   | p     | TB1 pozitif | p    | TB2 pozitif | Toplam   |
| Aktif TB | 32 (%91.4)        | 0.016 | 2 (%5.7)    | 0.38 | 1 (%2.9)    | 35 (100) |
| LTBE     | 45 (%70.3)        |       | 7 (%10.9)   |      | 12 (%18.8)  | 64 (100) |

Aktif-TB hastalarında TB1 ve TB2 tüpünde salınan medyan IFN- $\gamma$  konsantrasyonu, sırasıyla 3.33 IU/ml ve 2.89 IU/ml olarak saptanmıştır. QFT-Plus testinde salınan IFN-konsantrasyonları üzerindeki immünosüpresyonun etkisini değerlendirmek için, aktif TB hastaları immünkompromize ve non-immünkompromize hastalar olarak iki gruba ayrılmıştır. Hem TB1 hem TB2 tüplerinde salınan medyan IFN- $\gamma$  değerleri (TB1 tüpünde 4.51'e 1.36 IU/ml,  $p=0.038$ ; TB2 tüpünde 6.54'e 0.77 IU/ml,  $p=0.031$ ) non-immünkompromize hastalarda, hastalardan daha yüksek bulunmuştur. LTBE ile karşılaştırıldığında, kültür-pozitif TB hastalarının hem TB1'de (3.33'e 1.06 IU/ml,  $p=0.02$ ) hem TB2 tüpünde (2.89'a 1.19 IU/ml,  $p=0.017$ ) daha yüksek IFN- $\gamma$  konsantrasyonlarına sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 1A).

Mikobakteriyel kültürlerde 42 hastanın 37'sinde *M. tuberculosis*, 7 hastada *Mycobacterium bovis* ve 2 hastada *Mycobacterium caprae* saptanmıştır. Kültürde *M. tuberculosis* üreyen hastaların %77.1'inde (27/35) ve *M. bovis* veya *M. caprae* üreyen hastaların %88.9'unda (8/9) QFT-Plus pozitif olarak saptanmıştır. Spoligotipleme yapılan 37 *M. tuberculosis* suşunun 11'inin T, 5'inin H, 2'sinin LAM7TUR ve 19'unun diğer ailelerden olduğu saptanmıştır.



**Şekil 1. A. QFT-Plus pozitif aktif-TB ve LTBE vakalarının TB1 ve TB2 tüplerinde salınan medyan IFN- $\gamma$  konsantrasyonları. B. QFT-Plus pozitif *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium bovis/caprae* vakalarının TB1 ve TB2'sinde salınan medyan IFN- $\gamma$  konsantrasyonları.**

*M. tuberculosis* genotipleriyle QFT-Plus'ta salınan IFN- $\gamma$  konsantrasyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Buna karşın *M. tuberculosis* suşları ile enfekte olan hastaların hem TB1 hem TB2 tüplerinden salınan medyan IFN- $\gamma$  konsantrasyonlarının *M. bovis/caprae* ile enfekte olan hastalardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kültüründe *M. tuberculosis* üreyen hastalardan, 6'sının TB1 tüplerinde ve 7'sinin TB2 tüplerinde  $>10\text{IU/ml}$  IFN- $\gamma$  konsantrasyonları tespit edilirken, *M. bovis/caprae* üreyen hastalarda  $>10\text{IU/ml}$  IFN- $\gamma$  konsantrasyonları tespit edilmemiştir (Şekil1B).

## Sonuç

Sonuç olarak çalışmamızda aktif TB ile karşılaştırıldığında

LTBE'de daha düşük IFN- $\gamma$  düzeyleri görüldüğü, immünkompromizasyonun salgılanan IFN- $\gamma$  düzeylerini ve testin duyarlılığını azalttığı, belirsiz sonuçları artırdığı, *M. tuberculosis* klonları arasında salgılanan IFN- $\gamma$  düzeyleri arasında fark olmadığı, ancak zoonotik suşlarla karşılaştırıldığında *M. tuberculosis* suşlarıyla enfekte hastalarda yüksek IFN- $\gamma$  düzeyleri olduğu, TB2 tüpünün LTBE'de duyarlılığı artırdığı ancak aktif TB'de duyarlılığına katkısının olmayabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** QuantiFERON TB Gold Plus, Aktif Tüberküloz, Spoligotiplendirme, Latent Tüberküloz Enfeksiyonu



## Kaynaklar

1. Houben RM, Dodd PJ. The global burden of latent tuberculosis infection: A re-estimation using mathematical modelling. *PLoS Med.* 2016;13(10):e1002152. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002152>
2. Fitzgerald DW, Sterling TR, David W. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds). *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2015:2787-23.
3. Petruccioli E, Chiacchio T, Navarra A, et al. Effect of HIV-infection on QuantiFERON-plus accuracy in patients with active tuberculosis and latent infection. *J Infect.* 2020;80(5):536-46. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.009>
4. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K; IGRA Expert Committee; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection-United States, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59(RR-5): 1-25.
5. WHO. [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) (Erişim tarihi: Aralık.2020)
6. TC Sağlık Bakanlığı, Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Artı6 Medya Tanıtım Matbaa Ltd. Şti. 2. Baskı, Ankara, 2019.
7. WHO.. Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011.
8. Sutherland JS, Young JM, Peterson KL, et al. Polyfunctional CD4(+) and CD8(+) T cell responses to tuberculosis antigens in HIV-1-infected patients before and after anti-retroviral treatment. *J Immunol.* 2010;184(11):6537-44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000399>

# Klinik Örneklerde İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Türlerinin *gyrB* PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi

Alper Togay<sup>1</sup>, Banu Bayraktar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SBÜ İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

<sup>2</sup>SBÜ Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul

✉ togayalper@yahoo.com

## Giriş

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) biribiri ile yakın ilişkili türlerden oluşmuştur<sup>(1)</sup>. Bu çalışmada epidemiyolojik özellikleri, patojeniteleri, coğrafik dağılımları ve ilaç direnci farklılıkları gösteren bu türlerin tanımlanmasında *gyrB* PCR-RFLP yönteminin rutin laboratuvar testi olarak kullanılabilirliğini değerlendirmek amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na üç yıllık süreçte tüberküloz şüphesi ile gönderilen 1896 hastaya ait klinik örnekten 136'sında MGIT kültür sistemi ile mikobakteri izole edilmiştir. Bu örneklerden elde edilen 117 MTBC suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Tanımlama için MGIT PNB, niasin testi, hsp65 PCR-RFLP ve *gyrB* PCR-RFLP yöntemleri kullanılmıştır. *gyrB* PCR-RFLP yöntemi için, uygun hedef DNA bölgesinin görüldüğü örnekler; RsaI, TaqI, SmaII enzimleri ile kesimler yapılarak tanımlama yapılmıştır.

## Bulgular

hsp65 PCR-RFLP ile 136 mikobakteri suşunun 117'si MTBC, 19'u tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) olarak tanımlanmıştır. MTBC türlerinin identifikasyonu için uygulanan *gyrB* PCR-RFLP yöntemi ile 113 suş *M. tuberculosis*, dört suş *Mycobacterium bovis* olarak saptanmıştır. Şekil 1'de RsaI, Şekil 2'de SmaII en-

zimleri ile yapılan kesim örnekleri verilmiştir.

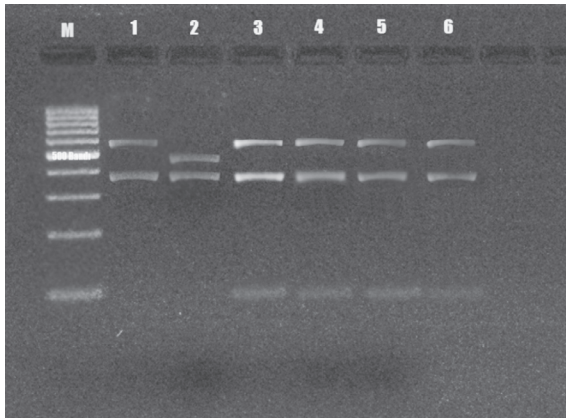
## Sonuç

MTBC'yi oluşturan, kliniği ve yayılımı daha iyi bilinen *M. tuberculosis*'in dışındaki türlerin tanımlanması bu etkenlerin klinik önemlerini ve yayılım şekillerini daha iyi anlamamızı sağlamaktadır. MTBC suşlarının tanımlanması ve bölgesel verilerinin oluşturularak ulusal referans laboratuvarları ile paylaşılması buna katkı sağlayacaktır. Hayvanlardan insanlara bulaşan bir zoonoz olan *M. bovis* enfeksiyonunun evcil hayvan sürülerinde taranması ve hasta hayvanların kesime gönderilmesi, insanlarda enfeksiyonun kontrol altına alınması ve bakterinin eradikasyonu açısından önemli bir noktadır. Biyokimyasal deneylere göre daha hızlı ve daha doğru tanımlama sağlayabilen, maliyeti diğer moleküler yöntemlere oranla oldukça düşük olan *gyrB* PCR-RFLP yönteminin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kullanılması fayda sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, *gyrB*, PCR-RFLP

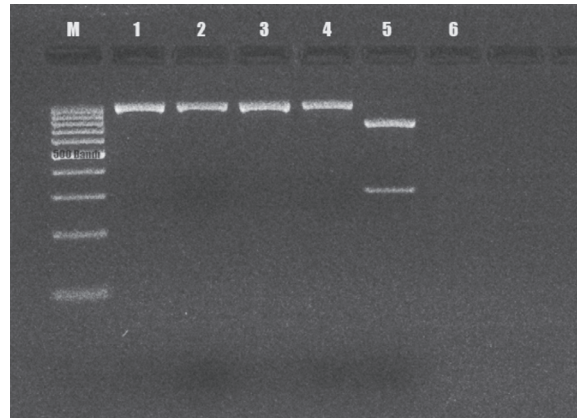
## Kaynaklar

1. Niemann S, Harmsen D, Rüsche-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 2000;38:3231-4. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3231-3234.2000>



Şekil 1. RsaI restriksiyon enzimiyle kesilen *gyrB* gen bölgesinin 1020 baz çiftlik bölümünün UV ışık altında görülen agaroz jel fotoğrafı.

M: 100 bp DNA marker, kolon 1, 3, 4, 5, 6: *Mycobacterium tuberculosis/Myco africanum* (360-560 bp); kolon 2: *Mycobacterium bovis/Myco caprae* (360-480 bp)



Şekil 2. SmaII restriksiyon enzimiyle kesilen *gyrB* gen bölgesinin 1020 baz çiftlik bölümünün UV ışık altında görülen agaroz jel fotoğrafı.

M: 100 bp DNA marker, kolon 1, 2, 3, 4: *Mycobacterium bovis* (1020 bp) (hasta örnekleri), kolon 5: *Mycobacterium caprae* (280-740 bp) (kontrol örneği).

## Yapay Zeka Modellemesi ile *Mycobacterium tuberculosis* Tanısı Yapılabilir mi?

Meryem Güvenir<sup>1</sup>, Abdullahi Umar İbrahim<sup>2</sup>, Emrah Güler<sup>3</sup>, Sertan Serte<sup>4</sup>,  
Mehmet Özsoz<sup>2</sup>, Kaya Süer<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşa

<sup>2</sup>Yakın Doğu Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği, Lefkoşa

<sup>3</sup>Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşa

<sup>4</sup>Yakın Doğu Üniversitesi, Elektrik ve Elektronik Mühendisliği, Lefkoşa

<sup>5</sup>Yakın Doğu Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşa

✉ meryemguvenir@hotmail.com

### Giriş

Yapay zeka, insanların veya diğer doğal sistemlerin yapabildikleri geçmiş verilerden yararlanma, algılama, ayırt etme ve organizasyon, sayısal mantık yürütebilme, sesleri tanıma gibi bilişsel etkinlikleri yapabilen sistemleri inceleyen bilim dalıdır<sup>(1)</sup>. Yapay Sinir Ağları ise sisteme verilen örneklerden olaylar arasındaki ilişkileri öğrenerek daha sonra hiç görmediği örnekler hakkında karar veren sistemlerdir<sup>(2)</sup>. Yapay Sinir ağlarında kullanılan derin öğrenme ise, beynimizdeki nöronlar gibi çalışır ve kendi kuralları vardır. Derin öğrenme sistemleri ile hangisinin muz hangisinin üzüm olduğu gibi iki ayrı nesne ayrımı yapılabilir<sup>(3)</sup>. Sağlık alanında yapılan yapay zeka uygulamaları ile erken ve doğru tanı, doğru tedaviye yönelik destekleyici sistemler olduklarını yapılan çalışmalar ile görmekteyiz.

Tüberküloz hastalığı, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks basillerinin hava yolu ile sağlıklı kişilere bulaşması ile oluşmaktadır. Akciğer, plevra, larinks ve miliyer tüberküloz şüpheli hastalardan üç balgam örneği alınarak tüberküloz tanısı bakteriyolojik yöntemler ile konulabilir. Bu yöntemler ise mikroskopik inceleme ile basilin görülmesi ve kültür esasına dayanır. Altın standart kültür yöntemi olmasına rağmen *M. tuberculosis* basillerinin üretilmesi 6-8 hafta sürmesi bu yöntemin dezavantajı olarak bilinmektedir. Bu nedenle kültür ile birlikte mikroskopik inceleme tanıda eş zamanlı olarak tercih edilmektedir. Aside dirençli boyama yöntemi ile yapılan mikroskopik inceleme yöntemi hızlı, basit, ucuz ve kolay bir yöntem olmasına rağmen pozitif sonuç için örnekte yüksek basil miktarının olması ve duyarlılığının (%20-85) düşük olması bu yöntemin dezavantajıdır<sup>(4)</sup>.

Bu çalışmamızın amacı yapay zeka modeli kullanılarak rutin laboratuvarlarda kullanılan aside dirençli boyama yönteminin duyarlılığının artırılması ile doğru tanının yapılması ve laboratuvar iş yükünün azaltılması hedeflenmiştir.

### Gereç ve Yöntem

**Örneklerin Hazırlanması:** Tüberküloz tanısı konmuş hastalardan ve rutin mikrobiyolojik inceleme için gönderilen hastalardan alınan balgam örnekleri kullanılmıştır.

Hazırlanan lamlar mavi yanan bek alevinden üç kez geçirilerek tespit edildikten sonra karbolfuksin ile kaplanarak 3-5 dk süreyle buhar çıkacak şekilde alttan bir alev yardımı ile ısıtılmıştır. Daha sonra su ile yıkanıp %3'lük asit alkol çözeltisi ile kaplanmıştır. Lamlar tekrar su ile yıkanmıştır. Lamların üzerine metilen mavisini ile kaplanarak 20-30 sn bekletilip havada kurutulmuştur.

**Örneklerin İncelenmesi:** Aside dirençli boyanan preparatlar, ışık mikroskopu kullanılarak 100X objektifte incelenmiştir. Mikroskopik inceleme esnasında aside dirençli basil görülen (pozitif) ve görülmeyen (negatif) örneklerden ışık mikroskobuna yerleştirilen aparat (Resim 1) yardımı ile resimler çekilmiştir.



Resim 1. Mikroskop fotoğraf çekme aparatı.

### Bulgular

**Yapay Zeka Modelinin Eğitilmesi:** Yapay zeka modelinin eğitilmesi üç aşamada (Deney A, B, C) tamamlanmıştır ve tablo 1'de yer alan örnek sayıları kullanılmıştır. Her deney sonrasında örnek sayıları artırılarak yapay zeka modelimizin öğrenme yüzdesi artırılmıştır.

**Yapay Zeka Modelinin Test Edilmesi:** Eğitilen yapay zeka modellerimizi deneyimli laboratuvar personeli ve deneyimi

**Tablo 1. Yapay zeka modellerinin eğitilmesinde kullanılan örnek sayıları.**

|                                | Deney A | Deney B | Deney C |
|--------------------------------|---------|---------|---------|
| <i>M. tuberculosis</i> Pozitif | 526     | 1312    | 1320    |
| <i>M. tuberculosis</i> Negatif | 524     | 1132    | 1144    |
| Toplam                         | 1050    | 2444    | 2464    |

olmayan laboratuvar personeli ile oluşturduğumuz iki grup ile karşılaştırmak için 50 tane aside dirençli boyalı balgam preparatları kullandı. Yapay zeka modelinin birinci test çalışması sonucunda % 90.15 doğruluk elde etmiştir. Modelin yorumlayamadığı 5 görüntü araştırıldı. Yanlış yorumlanmış görüntüler dahil edildi ve yapay zeka modellerini yeniden eğitildi. Eğitilme sonrasında ikinci test çalışması için daha önce hiç veri tabanına girilmemiş aside dirençli boyama yöntemi ile hazırlanmış 50 balgam preparatı görüntüsü kullandı ve modelimiz, Tablo 2’de gösterildiği gibi deneyimsiz laboratuvar personellerinden duyarlılığının daha yüksek olduğu görülmüştür.

#### Sonuç

1990’larda bilgisayar destekli sistemler geliştirilerek aside dirençli boyanmış basilleri tespit etmek için kullanılmaya başlanmıştır. Evrimsel sinir ağları, biyolojik sinir ağlarına benzer şekilde stimüle etme yeteneğine sahiptirler ve oluşturulan algoritmaların eğitilme aşaması tamamlandıktan sonra tanı amaçlı kullanılabilen sistemlerdir<sup>(5)</sup>. Yapay zeka sinir ağlarının hayati tehdit eden tüberküloz gibi birçok hastalık için potansiyel teşhis aracı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Yapay zeka modeli oluşturularak mikrosokopi görüntüsü baz alınmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Xiong Yan ve ark.’larının<sup>(6)</sup> aside dirençli boyama yöntemi ile hazırlanmış doku örnekleri ile hazırlanmış oldukları algoritma sonucunda aside dirençli boyanan basilleri tanımda başarılı olduğu ancak mikroskop incelemesi sırasında artefakt ve diğer patojen olmayan basilleri ayırt etmede sorun yaşadıklarını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar klinisyene yardımcı olabilecek, düşük maliyetli ve duyarlılığı yüksek algoritmaların tüberküloz insidansı yüksek olan ülkelerde tüberküloz tanısında yardımcı olabileceği düşünülmektedir<sup>(7)</sup>.

Çalışmamız da aside dirençli boyanan balgam preparatları baz alınarak algoritmalar oluşturulmuştur. Oluşturulan algoritmaların deneyimsiz laboratuvar personeli ile karşılaştırıldığında duyarlılığının daha yüksek olduğu sonucuna

**Tablo 2. Yapay zeka modeli ile laboratuvar personellerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması.**

|                             | Duyarlılık (%) | Özgüllük (%) |
|-----------------------------|----------------|--------------|
| Yapay Zeka Modeli           | 93.94          | 86.36        |
| Deneyimsiz lab. Personeli-1 | 88.57          | 100          |
| Deneyimsiz lab. Personeli-2 | 86.11          | 100          |
| Deneyimli lab. Personeli-1  | 96.88          | 100          |
| Deneyimli lab. Personeli-2  | 100            | 100          |

varılmıştır. Bilindiği üzere, boyama aşamasını etkileyen faktörler arasında; (i) boyama tipi (ii) yaymanın kalınlığı (iii) enfekte olan mikobakteri türü yer almaktadır<sup>(8)</sup>. Bu nedenle çalışmamızın kısıtlılığı olarak; tek merkezli bir çalışma olması ve hazırlanan preparatların tek bir kişi tarafından hazırlanması olarak belirlenmiştir. Çalışmamızı çok merkezli bir çalışmaya dönüştürmek için hazırlanmış olduğumuz algoritmayı içeren bir web sitesi üzerine çalışmalarımız devam etmektedir. Bu web sitesi üzerinden diğer mikobakteriyoloji laboratuvarları ile yapacağımız ortak çalışmalar ile yapay zeka modelimizin duyarlılık ve özgüllüğünün araştırılmasını hedeflemekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Tüberküloz, yapay zeka modeli, tanı

#### Kaynaklar

1. Uzun T. Yapay zeka ve Sağlık Uygulamaları. İzmir Katip Çelebi Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi 2020; 3(1):80-92.
2. Yapay zeka nedir alt dalları nelerdir? <https://www.emre.net/yapay-zeka-nedir-alt-dallari-nelerdir/> (Erişim tarihi: 1. Nisan.2019)
3. Arıkan M. Mediaclick, 2017. <https://www.mediatick.com.tr/blog/yapay-zeka-nedir> (Erişim tarihi: 28.Mart.2019)
4. T.C. Sağlık Bakanlığı Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. 2. Baskı, Ankara, 2019.
5. Matsugu M, Mori K, Mitari Y, et al. Subject independent facial expression recognition with robust face detection using a convolutional neural network. Neural Netw. 2003;16(5-6):555-9. [http://doi.org/10.1016/S0893-6080\(03\)00115-1](http://doi.org/10.1016/S0893-6080(03)00115-1)
6. Xiong Y, Ba X, Hou A, Zhang K, Chen L, Li T. Automatic detection of mycobacterium tuberculosis using artificial intelligence. J Thorac Dis. 2018;10(3):1936-40. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.01.91>
7. Khan MT, Kaushik AC, Ji L, Malik SI, Ali S, Wei DQ. Artificial neural networks for prediction of tuberculosis disease. Front. Microbiol. 2019;10:395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00395>
8. Sarıgül N. Direkt mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 11-12 Haziran 2003, Samsun.

# Van ve Çevre İllerden İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarının Inhouse PCR Yöntemleriyle Moleküler Epidemiyolojik Tiplendirilmesi

Elif Aydın<sup>1</sup>, Gülnur Tarhan<sup>2</sup>, Sami Eren<sup>3</sup>, Funda Şahin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tavşanlı Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Kütahya

<sup>2</sup>Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman

<sup>3</sup>Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Van

✉ elifkn@hotmail.com

## Giriş

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)'nin sebep olduğu, dünya çapında ilk 10 ölüm nedeninden biri olan, önemli bir halk sağlığı sorunu olan bulaşıcı bir hastalıktır. 2019 yılında, HIV pozitif (0.2 milyon) bireyler dahil olmak üzere yaklaşık 10 milyon yeni olgu TB olup, 1.4 milyon kişi bu hastalıktan ölmüştür<sup>(1)</sup>.

Hızlı ve güvenilir tanı testlerinin geliştirilmesi, doğru tedaviyi erken zamanda sağlamak ve TB olgu sayısını azaltma hedefine ulaşmak açısından son derece önemlidir<sup>(2)</sup>. TB teşhisi için kullanılan, Ziehl-Neelsen ile boyanmış balgam yaymalarının doğrudan mikroskobu, nispeten hızlı, ucuz ve özgüllüğü yüksek olan bir yöntemdir. Fakat, bu yöntemin duyarlılığı düşüktür<sup>(3)</sup>. Günümüzde TB hastalığının tanısında altın standart olarak kabul edilen yöntem kültür yöntemidir. Kültür yöntemlerinin avantajı canlı mikobakterilerin saptanması, basillerin izolasyonu ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılabilmesidir<sup>(4)</sup>. Kültür ile doğru izolasyon, TB'un kesin tanısı için en önemli adımdır. Yanlış pozitif kültürler kontamine klinik ekipman, preanalitik ve analitik süreçteki hataları veya örneklerin çapraz kontaminasyon nedeniyle oluşur. MTB'nin hızlı tanısı moleküler yöntemlerle tür düzeyinde klinik örnekten direkt olarak veya kültürden yapılabilir. Ayrıca moleküler yöntemler ilaç direncinin saptanması ve TB epidemiyoloji araştırmaları için de kullanılmaktadır<sup>(5)</sup>. TB'da ilaç direnç surveansı, TB kontrol programının önemli bir bileşenidir<sup>(6)</sup>. Türkiye çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) açısından yüksek hastalık yüküne sahip 30 ülke arasında değildir. Küresel TB 2018 Raporunda Türkiye'de tahmini RD/ÇİD-TB oranı yeni TB olgularında %3.3; önceden tedavi görmüş olgularda ise %14 olarak verilmiştir<sup>(7)</sup>. Moleküler genotiplendirme yöntemleri, laboratuvarındaki MTB izolatlarının epidemiyolojik tiplendirmesinde yaygın kullanılmaktadır. Bakteri kökenleri arasındaki ilişkinin araştırılması; enfeksiyon kaynağının belirlenmesi ve gerekli kontrol önlemlerinin alınması bakımından önem taşımaktadır. Epidemiyolojik tiplendirme amacı ile kullanılan moleküler yöntemler, IS6110 RFLP, spoligotyping, MIRU-VNTR ve MST'dir<sup>(8-12)</sup>. Bunlar arasında altın standart olarak kabul gören yöntem IS6110 RFLP yöntemidir. Bu yöntemler alt yapı, maliyet ve deneyimli personel gerektirmesi sebebi ile her yerde uygulanamamaktadır. Bu amaçla inhouse PCR dayalı epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri (ERIC-PCR, OUT-PCR,

RAPD-PCR) küçük çaplı epidemiyolojik köken tanımlama ve laboratuvar içi çapraz bulaşların tanımlanması amacıyla kullanılmaktadır<sup>(9-13)</sup>.

Çalışmamızda, tüberküloz ön tanısıyla laboratuvarımıza gönderilen numunelerinin 2010 numunenin, direct mikroskopi (aside dirençli basil) vektör (Löwenstein-Jensen) sonuçlarının karşılaştırılması ve MTB üreten olgularda anti TB ilaç direnç oranlarının belirlenmesi ve MTB izolasyonu yapılan 31 izolatın kökenleri arasındaki epidemiyolojik ilişkinin house PZR tekniğine dayalı üç tiplendirme yöntemi (ERIC-PZR, RAPD-PZR, OUT-PZR) ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda Van ili ve çevresinden Ocak 2019 ile Aralık 2019 tarihleri arasında Van Halk Sağlığı Laboratuvarı Tüberküloz Laboratuvarımıza gönderilen tüberküloz ön tanı 2010 adet çeşitli klinik numunenin sonuçları incelenerek pozitif sonuçlar çalışmaya dahil edilmiştir. İnceleme sonucu toplam 2010 numunenin mikroskopi ve kültür pozitif sonuçları kaydedilmiştir. Bunlar, 131 balgam, 1 idrar, 4 açlık mide sıvısı (AMS), 4 bronko alveolar lavaj (BAL), 1 beyin omurilik sıvısı (BOS) numunelerinden oluşmaktadır. Çalışmada tüberküloz laboratuvarı numune kayıt defteri ve Tüberküloz Laboratuvarı Sürveyans Ağı (Tulsa) kullanılmıştır. Epidemiyolojik tiplendirme testleri Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD'nde gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin yayma ARB ve kültür sonuçları karşılaştırılması, kontaminasyon oranı, pozitif numunelerin anti tüberküloz ilaçlara duyarlılık sonuçları ve epidemiyolojik tiplendirmeleri değerlendirildi.

**Mikroskopi ve kültür yöntemleri:** Balgam, AMS, BAL sıvısı gibi steril olmayan klinik örneklerin homojenizasyon ve dekontaminasyonu, N-asetil-L-sistein ve %4'lük sodyum hidroksit yöntemine dayanan ticari kitler kullanılarak yapıldı. Steril klinik örneklerde kontaminasyon işlemi uygulanmadı. Klinik örneklerden hazırlanan direk ve işlem görmüş yaymalar, Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak, ARB varlığı açısından, ışık mikroskobunda incelendi. Hazırlanan örneklerden, katı besiyeri olarak Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine ekim yapıldı ve inkübasyona bırakıldı. LJ besiyerlerinin üremeleri, sekiz hafta boyunca haftada bir kez kontrol edildi. Bu süre sonun-



**Tablo 1. Sonuçların yaş ve cinsiyetlere göre dağılımı.**

| Cinsiyet            | Sayı | Yaş ortalaması |
|---------------------|------|----------------|
| Erkek (15 Yaş altı) | 2    | 14             |
| Kadın (15 Yaş altı) | 11   | 14             |
| Erkek (15 Yaş üstü) | 82   | 40             |
| Kadın (15 Yaş üstü) | 45   | 43             |
| Toplam              | 140  |                |

**Tablo 2. Pozitif örneklerin ARB ve kültür dağılımları n (%).**

|             | Kültür Pozitif | Kültür Negatif | Toplam       |
|-------------|----------------|----------------|--------------|
| ARB Negatif | 27 (%1.34)     |                |              |
| ARB Pozitif | 54 (%2.68)     | 59 (%2,93)     | 113 (% 5.67) |
| Toplam      | 81(% 4.02)     |                |              |

**Tablo 3. Anti-tüberküloz ilaç duyarlılık test sonuçlarının dağılımı.**

| Anti-TB ilaç              | Dirençli İzolat n | Toplam İzolat n | Dirençli İzolat n (%) |
|---------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| Streptomisin (S)          | 1                 | 34              |                       |
| İsoniazid (INH)           | 2                 | 34              | 2.94                  |
| Rifampisin (R)            | 0                 | 34              | 5.88                  |
| Etambutol (E)             | 0                 | 34              | -                     |
| Pirazinamid (PZA)         | 0                 | 34              | -                     |
| İsoniazid (INH) kritik    | 2                 | 34              | -                     |
|                           |                   |                 | 5.88                  |
| <b>Tekli ilaç direnci</b> |                   |                 |                       |
| Streptomisin (S)          | 1                 | 34              | 2.94                  |
| İsoniazid (INH)           | 0                 | 34              | -                     |
| Rifampisin                | 0                 | 34              | -                     |
| Etambutol                 | 0                 | 34              | -                     |
| <b>İki ilaca direnç</b>   |                   |                 |                       |
| INH/R                     | 0                 | 34              | -                     |
| INH/E                     | 0                 | 34              | -                     |
| INH/S                     | 0                 | 34              | 5.88                  |
| INH/INH KRİTİK            | 2                 | 34              | -                     |
| RE                        | 0                 | 34              | -                     |
| RS                        | 0                 | 34              | -                     |
| ES                        | 0                 | 34              | -                     |

da üreme olmayan örnekler, negatif olarak değerlendirildi. Üreme olan besiyerleri kayıt altına alındı.

**İlaç duyarlılık testleri:** Çalışmada MTK olarak tanımlanan izolatlarda doğrulamave İDT için Sağlık Bakanlığı Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'na gönderildi. İNH, RİF, etambutol (ETM), streptomisin (SM) gibi birinci seçenек anti-TB ilaçlara direnç oranları ve direnç olan örneklerin diğer ilaçlara (PZA ve İNH kritik) karşı duyarlılıklarıTulsa'dan alınmıştır.

## Bulgular

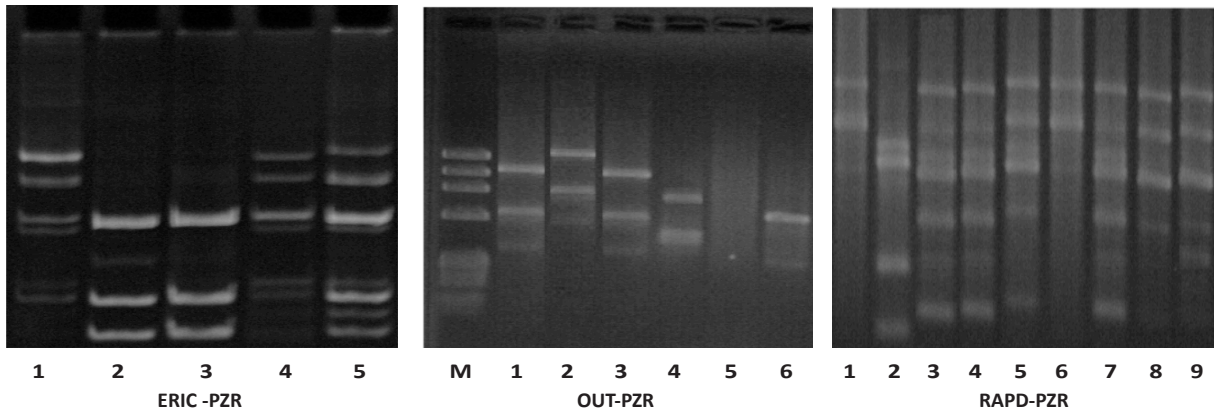
Çalışma kapsamına alınan pozitif hastaların yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1'e bakıldığında pozitif hastaların 13 (%9.2)'ü 15 yaş altında ve 15 yaş altı hastaların ise 2 (%15)'si erkek, 11 (%85)'i ise kadın hastalardan oluşmuştur.15 yaş üzeri hastaların 82 (%64.5)'si erkek, 45 (%43.5)'i ise kadın olduğu tespit edilmiştir. Pozitif numunelerin kadın hastalarda yaş ortalaması 43 iken, erkek hastalarda yaş ortalaması ise 40 olarak saptanmıştır. Pozitif örneklerin %92.9 (131)'u balgam, %2.84 (4)'ü BAL, %2.84 (4)'ü AMS, %0.71 (1)'i idrar örneğini, %0.71 (1)'i BOS örneği olarak incelenmiştir. Yaymada ARB ve kültür pozitifliği en sık balgam örneklerinde saptanmıştır. Çalışma kapsamına alınan pozitif örneklerin

ARB ve kültür dağılımlarına bakıldığında, pozitif örnekler arasında yaymada ARB pozitifliği oranı % 5.67 (114/2010) ve kültür pozitifliği oranı %4.02 (81/2010) olarak saptanmıştır. Pozitif örneklerin, %2.68 (54)'inde hem yaymada ARB pozitif ve hem kültür pozitifliği, %2.93 (59) 'unda yaymada ARB pozitif ve kültür negatif, %1.34 (27)'sinde yaymada ARB negatif ve kültür pozitifliği tespit edilmiştir (Tablo 2). Örneklerin %0.04 (1/2010)'ü ise kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen kültür pozitif tespit edilen 33 izolatta, primer anti-TB ilaçlara karşı herhangi bir direnç gözlenmezken 3'ünde (%9.09) bir veya daha fazla primer anti-TB ilaca karşı direnç gözlemlendi.İzolatların 1 (%3.03)'inde tekli ilaç direnci saptanmış olup, 2 (6.06) sinde izolatta da aynı anda İNH ve İNH kritik ilaçlara direnç tespit edildi (Tablo 3).

Çalışmamızda kültür pozitif izolatlarda in house PZR tekniğine dayalı üç tiplendirme yöntemi (ERIC-PZR, RAPD-PZR, OUT-PZR) yapıldı. İncelenen 44 MTBC izolatının 14 ünde DNA miktarları az olduğu için değerlendirilemedi. ERIC-PZR, RAPD-PZR ve OUT-PZR testleri için 2 AMS,2 BAL ve 27 balgam örneği olmak üzere toplam 31 izolat çalışıldı. İzolatlardan ve control suşlarından DNA ekstraksiyonu katı faz absorpsiyon yöntemine göre yapıldı (QIAamp DNA Mini Kiti, Qiagen, Valencia, CA, ABD). Her numunenin DNA



Şekil 1. PCR sonuçları.

ekstraktı -20°C'de saklandı. OUT-PCR için; CGG GGG TTC CCGGAC III (I: Inosine) (İontek, Bursa) IS6110'un dış bölgesinde amplifikasyonunu sağlayan tek primer kullanıldı. PCR reaksiyonu 40 döngü amplifikasyona tabi tutuldu. (3 dak.94°C, 1 dakika 94°C, 1 dakika 62°C'de); 72°C de bu minimum 1 dakikalık uzatma ile takip edildi.

ERIC-PCR için; ERIC1R (Tb-2) 5'ATG TAA GCT CCT GGG GAT-TCA C ve ERIC2 (Tb-3) AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G (İontek-Bursa) primer çiftleri kullanılmıştır. PCR karışımının (50µl) bileşimi 5µl 10x Taq PCR tamponuydu (500mMKCl, 100mMTris-HCl, pH: 8.3), Master AmpTM, 5µl 10x PCR Enhancer (Merkez, Teknolojiler), 3µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 5µldNTP (mix2mM), 0.75µl ERIC1R (87 pmol/µl) primer, 0.9µl ERIC2 (73 pmol/µl) primer veTaq polimeraz 1U (0.2µl) ve 10µl şablon DNA. PCR reaksiyonu, 35 döngü amplifikasyon (94°C'de 2 dakika, 94°C'de 45 saniye, 52°C'de 1 dakika) ve son uzatma 72°C son 20 dakika gerçekleştirildi. Amplifiye edilmiş ürünün varlığı %1.4 Nuisieve agaroz jeli (Sigma, St Louis, MO, ABD) ile doğrulandı. DNA bant analizi için; UVI yumuşak, UVI bandı, Windows Uygulama V99.06 (BioRad, İngiltere) program kullanıldı. ERIC-PZR ile 3, OUT-PZR 5 ve RAPD-PZR ise 6 gruba ayrıldı (Şekil 1).

## Sonuç

Çalışmamızda MTB en sık balgam örneğinden izole edilmiştir. Yöre insanlarında alınan pozitiflik oranları ülkemizin diğer pek çok yöresine göre düşük bulunmuştur. Bu düşük pozitifliğin, tanı anında çalışılan numune oranının düşük olmasına, antibiyotik başlanıp basil yükü düşen hasta numunelerinin çalışılmasına, yayma/kültür pozitif akciğer tüberküloz hastalarının tedavi takip sürecinde alınan mükerrer numunelerinin negatif olmasına ve hastaların il dışı tanılı olmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. ERIC-PZR, RAPD-PZR ve OUT-PZR gibi moleküler teknikler MTB'in epidemiyolojik tiplendirilmesinde kökenler arasındaki ayırım ve benzerliklerin değerlendirilmesinde kolay uygulanabilir, basit, hızlı ve ucuz yöntemler olup tanımlama için yararlıdır. Gelecekte, ERIC-PZR, RAPD-PZR ve OUT-PZR gibi farklı moleküler tiplendirme araçları, MTB izolatlarını karakterize etmedeki etkinliği ve etkililiğini incelemek için karşılaştırılabilir.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacteriumtuberculosis*, aside rezistan basil, in House PZR tekniği, ERIC-PZR, RAPD-PZR, OUT-PZR

## Kaynaklar

1. WHO. Global Tuberculosis Report 2020. Geneva: World Health Organization, 2020. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf]. (Erişim Tarihi: 15.11.2020).
2. Dheda K, Ruhwald M, Theron G, Peter J, Yam WC. Point-of-care diagnosis of tuberculosis: Past, present and future. *Respirology*. 2013;18(2):217-32. <https://doi.org/10.1111/resp.12022>
3. Perkins MD, Cunningham J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. *J Infect Dis*. 2007;196(Suppl 1):S15-27. <https://doi.org/10.1086/518656>
4. Alp A. Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. *Hacet Tıp Derg*. 2011;42:28-33.
5. T.C. Sağlık Bakanlığı. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi, 2. Baskı. Artı 6 Medya Tanıtım Matbaa Ltd. Şti, Ankara, 2019.
6. Dündar D, Sönmez-Tamer G. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi izolatlarının primer anti tüberküloz ilaçlara direnç oranları. *Klinik Derg*. 2009;22:52-4
7. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Tüberküloz Dairesi Başkanlığı. Türkiye'de Verem Savaşı 2019 raporu, Yayın No: 1168, Ankara, 2020.
8. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: A users guide. *J Appl Microbiol*. 2003;94(5):781-91. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01918.x>
9. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J ClinMicrobiol*. 1997;35(4):907-14. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.4.907-914.1997>
10. Martin A, Herranz M, Lirola MM, et al. Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories. *BMC Microbiol*. 2008;8:30-3. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-30>
11. Martinez M, Garcia V, Alonso M, et al. Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2967-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.00754-06>
12. Tarhan G, Ocak F, Ceyhan I. Comparison of ERIC-PCR, OUT-PCR and spoligotyping methods to diagnose of cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Biotech & Micro*. 2016;1(3):555564 <https://doi.org/10.19080/AIBM.2016.01.555564>
13. Fomukong N, Beggs M, el Hajj H, Templeton G, Eisenach K, Cave MD. Differences in the prevalence of IS6110 insertion sites in *M. tuberculosis* strains: low and high copy number of IS6110. *Tub Lung Dis*. 1998;78(2):109-16. [https://doi.org/10.1016/s0962-8479\(98\)80003-8](https://doi.org/10.1016/s0962-8479(98)80003-8)

# Solunum Virüslerinin Saptanmasında Hızlı Moleküler Yöntem ile Rutin Mültipleks PCR Yönteminin Karşılaştırılması

Mehmet Soylu, Roza Çağlı, Furkan Polat, Candan Çiçek

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

✉ drmehmetsoylu@hotmail.com

## Giriş

Moleküler tanı tekniklerinin son yıllardaki hızlı gelişimi ile klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında büyük değişiklikler olmuştur. Bireysel hasta bakımının yaygınlaşması, sürekli yeni keşfedilen virüsler, dünya çapında görülen salgınlar, bağışıklık sistemi baskılanmış hasta sayısındaki artış bu gelişimi tetikleyen unsurlardır. Klinik uygulamalarda enfeksiyon hastalığına neden olan etkenin bir an önce tanımlanması beklenmektedir. Örneklerin toplanması ile organizmanın tanımlanması arasındaki pencerede, klinisyen tedavi edilmemiş enfeksiyonların ciddi sonuçlarından kaçınmak için hastaya geniş spektrumlu ampirik antimikrobiyaller vermektedir. Bu yüzden klinik örnekte bulunması olası mikroorganizma(ları) aynı anda hızlı bir şekilde saptama ve ayırt etme yeteneğine sahip hızlı tanı testlerinin hasta yönetimini olumlu yönde etkilemesi beklenmektedir. Eğer çok hızlı bir şekilde etken mikroorganizmalar belirlenirse bu durum hastanın yatış kararını ve yatış süresini, antibakteriyel veya antiviral tedavi alma durumunu değiştireceği ve enfeksiyon kontrol önlemlerini olumlu yönde etkileyeceği düşünülmektedir.

Bu çalışma ön çalışma olarak planlanmış ve küçük gruplarda akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastaların bir kısmında hızlı moleküler yöntemler, bir kısmında normal sürede ve rutin olarak uygulanan moleküler yöntemlerle, testlerin sonuçlanma sürelerinin hasta yönetimi üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Mart-Nisan 2019'da Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran ve hızlı moleküler yöntem ile pozitif bulunan 30 olgunun yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımı, etken patojen dağılımı, antiviral ve antibiyotik kullanımı, mevcut ise bunların maliyet ortalaması, hastanın servisteki toplam yatış gün sayısı ve bahsi geçen yatış döneminde varsa yoğun bakım yatış gün sayısı, örneğin laboratuvara kabulünden sonuç verilmesi kadar geçen süre sonuçları ile 2018 yılı Ekim ayında yine hastanemize başvuran ve laboratuvarında rutin olarak

kullanılan multipleks PCR'da pozitif bulunan 12 olgunun aynı verileri baz alınarak karşılaştırılmıştır.

## Bulgular

Hızlı moleküler yöntemin (HMY) (Biofire FilmArray Respiratory Panel, BioMérieux, ABD) uygulandığı 30 olguda 39 solunum virüsü pozitif bulunmuştur. Etken patojen dağılımında 30 etkenin yanında 9 olguda da ikincil bir patojen hızlı moleküler yöntem ile saptanmıştır. 30 olguda saptanan etkenler; 11 Respiratuar sinsisyal virüs (RSV), 8 Human rhinovirus (HRV), 7 Human metapneumovirus (hMPV), 7 Adenovirus (AD), 3 Coronavirus NL63 (HCoV-NL63), 2 Coronavirus 229E (HCoV-229E), 2 Coronavirus OC43 (HCoV-OC43) şeklinde sıralanmaktadır (Tablo 1).

HMY ile çalışılan 30 olguda (14 kadın, 16 erkek) yaş ortalaması 18.1 (min:1 yaş-max:83 yaş), ortalama hastane yatış gün sayısı 17.6 olarak kaydedilmiş, bu yatış gün sayısının ortalama 3.4 gününün yoğun bakımda geçtiği saptanmıştır. Örneğin laboratuvarımıza kabul edilmesinden sonuç vermeye kadar geçen ortalama süre 6 saat 3 dakika

Tablo 1. Her iki yöntemle saptanan solunum virüslerinin dağılımı.

| Virüsler     | Biofire FilmArray Respiratory Panel |                            | FTD Respiratory Pathogens 21 Panel |                            |
|--------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|
|              | Tek etken enfeksiyonu (n)           | Çift etken enfeksiyonu (n) | Tek etken enfeksiyonu (n)          | Çift etken enfeksiyonu (n) |
| AD           | 7                                   | -                          | -                                  | -                          |
| HCoV-229E    | 2                                   | -                          | -                                  | -                          |
| HCoV-NL63    | 3                                   | -                          | 1                                  | -                          |
| HCoV-OC43    | 1                                   | 1                          | 2                                  | -                          |
| hMPV         | 6                                   | 1                          | -                                  | -                          |
| HRV          | 2                                   | 6                          | 4                                  | -                          |
| RSV          | 10                                  | 1                          | -                                  | -                          |
| PIV 1-4      | -                                   | -                          | 4                                  | -                          |
| HEV          | -                                   | -                          | 1                                  | -                          |
| Genel Toplam | 30                                  | 9                          | 12                                 | -                          |

Tablo 2. Hızlı moleküler yöntem ile rutin moleküler yöntemin süre ve maliyetinin karşılaştırılması.

|                                     | Çalışmaya alınan olgu sayısı | Yaş ortalaması (min-max) | Ortalama sonuç verme süresi | Ortalama yatış gün sayısı | Ortalama yoğun bakım yatış gün sayısı | Ortalama hasta başı antimikrobiyal maliyeti |
|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|
| Biofire FilmArray Respiratory Panel | 30                           | 18.8 (1-83)              | 6 saat 3 dk.                | 17.6                      | 3.4                                   | 1007.3 TL                                   |
| FTD Respiratory Pathogens 21 Panel  | 12                           | 14 (1-75)                | 32 sa 13 dk.                | 23.3                      | 2.5                                   | 1962 TL                                     |

(min:1 saat 35 dakika-max:20 saat 5 dakika) olarak kaydedilmiştir. 30 olguya toplamda 30.220 TL karşılığı antibiyotik ve antiviral ilaç masrafı yapılmıştır, ortalaması alındığında hasta başı maliyet 1007.3 TL olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Kontrol grubu olarak laboratuvarımızda rutin olarak çalışılan solunum yolu etkenleri paneli multipleks PCR testinde (FTD Respiratory Pathogens 21 Panel, Lüksemburg) pozitif bulunan 12 olgunun sonuçları irdelenmiştir. 12 olgunun etken patojen dağılımı; 4 HRV, 2 Parainfluenza virus tip III (PIV3), 2 HCoV-OC43, 1 HCoV-229E, 1 Parainfluenza virus tip II (PIV2), 1 Parainfluenza virus tip IV (PIV4), 1 Human enterovirus (HEV) olarak saptanmıştır. Aynı hastada iki etken saptanmamıştır. Rutin multipleks PCR çalışılan 12 olgunun (4 kadın, 8 erkek) yaş ortalaması 14 (min:1 yaş-max:75 yaş) olarak saptanmıştır. Bu olguların ortalama yatış gün sayısı 23.3 gün kaydedilmiş bu sürenin ise 2.5 gününün yoğun bakımda geçtiği saptanmıştır. Örneğin laboratuvarımıza kabul edilmesinden sonuç vermeye kadar geçen ortalama süre 32 saat 13 dakika (min:4 saat 47 dakika-max:74 saat 5 dakika) olarak kaydedilmiştir. 12 olguya toplamda 21,585 TL karşılığı antibiyotik ve antiviral ilaç masrafı yapılmış, ortalaması alındığında hasta başı maliyet 1962 TL olarak bulunmuştur (Tablo 1, 2).

### Sonuç

Hızlı moleküler yöntem ile rutin moleküler yöntem sonuç-

ları karşılaştırıldığında; sonuç verme süresinin oldukça kısaldığı, hastanın yatış günün %20 oranında azaldığı ve antibiyotik maliyetinin yarı yarıya düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, solunum yolu etkenlerinin hızlı tanısı ile hastanın alması gereken doğru tedaviye hızla ulaşması sağlanmış, bu nedenle yatış süresi ve hastane maliyetleri azalmıştır. Hızlı moleküler testlerin, özellikle riskli gruplarda ve yoğun bakım hastalarında uygulanması ve hızla etken ayırımına gidilmesi, kliniklerdeki tedaviyi de doğru olarak yönlendirecektir.

**Anahtar kelimeler:** Hızlı moleküler testler, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu, pnömoni

### Kaynaklar

1. Poole S, Clark TW. Rapid syndromic molecular testing in pneumonia: The current landscape and future potential. *J Infect.* 2020;80(1):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.11.021>.
2. Gilbert DN, Leggett JE, Wang L, et al. Enhanced detection of community-acquired pneumonia pathogens with the BioFire® pneumonia FilmArray® panel. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020;99(3):115246. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115246>
3. Nelson RE, Stockmann C, Hersh AL, et al. Economic analysis of rapid and sensitive polymerase chain reaction testing in the emergency department for influenza infections in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(6):577-82. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000703>

# Türkiye’den Bildirilen SARS-CoV-2 Tüm Genom Sekanslarında, RT-PCR Tanı Kitlerinin Analiz Bölgelerindeki Nükleotid Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Alihan Bulgurcu<sup>1,2</sup>, Ayşe Banu Demir<sup>3</sup>, Özgür Appak<sup>4</sup>, Ayça Arzu Sayiner<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>İzmir Ekonomi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, İzmir

<sup>3</sup>İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı, İzmir

<sup>4</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı İzmir

✉ alihan.bulgurcu@ieu.edu.tr

## Giriş

Koronavirüsler, zarflı ve pozitif polariteli tek iplikli RNA genomuna sahip virüslerdir. Aralık 2019’da Çin’in Wuhan eyaletinde ortaya çıkıp tüm dünyayı etkileyen yeni tip koronavirus, filogenetik analiz sonucu SARS-CoV ile %82’den fazla benzer olduğu için SARS-CoV-2 adını almıştır<sup>(1,2)</sup>. Diğer koronavirüsler gibi SARS-CoV-2 de en az altı açık okuma çerçevesine (Open Reading Frame-ORF) ve birçok yardımcı gene sahiptir<sup>(3)</sup>.

Aktif enfeksiyonun virolojik tanısında en geçerli yöntem gerçek zamanlı ters transkripsiyonlu polimeraz zincir tepkimesidir (RT-qPCR). SARS-CoV-2’ nin RNA’sı solunum örneklerinden ekstrakte edilir ve ardından tamamlayıcı DNA’ya (cDNA) ters transkripsiyonu gerçekleştirilir. cDNA daha sonra, viral genomun seçilen bölgelerine spesifik primerler ve problarla gerçek zamanlı PCR amplifikasyonu için kullanılır<sup>(4)</sup>. RT-qPCR reaksiyonunda hedef bölge olarak, virüs genomundaki RNA’ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp), ORF1ab, helikaz (Hel), nükleokapsid (N), transmembran (M), zarf (E), ve “spike” glikoproteinleri (S) gibi çeşitli bölgeler belirlenmiştir. Testin en önemli bileşenleri kullanılan primer ve problar olup Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) başta olmak üzere birçok kurum, kullanılabilecek dizileri ve PCR protokollerini tanımlamışlardır<sup>(5,6)</sup>. PCR, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir yöntem olmakla birlikte örnek alımındaki hatalar ya da primer-prob bağlanma bölgelerindeki mutasyonlar nedeniyle, analitik duyarlılık etkilenebilmekte, yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir<sup>(7)</sup>. SARS-CoV-2’de, diğer RNA viruslarına kıyasla daha az olmakla birlikte, mutasyonlar gelişmektedir<sup>(8-10)</sup>.

Bu çalışmada, Türkiye’den izole edilip sekanslanan ve sekans verisi GISAID veri tabanına yüklenen toplam 194 SARS-CoV-2 tüm genomunun, Wuhan’da izole edilip sekanslanan ilk SARS-CoV-2 genomu esas alınarak incelenmesi ve Türkiye’deki SARS-CoV-2 izolatlarının sık kullanılan RT-qPCR primer/prob bağlanma bölgelerindeki mutasyonlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, Türkiye’deki COVID-19 vakalarından izole edilen ve 17 Mart - 14 Eylül 2020 tarihleri arasında, GISAID

veri tabanına yüklenen 194 [İstanbul (78), Ankara (58), Kars (47), Bursa (2), Adıyaman (2), Erciyes (1) ve Kocaeli (1)] SARS-CoV-2 tüm genom sekans verisi incelenmiştir<sup>(11,12)</sup>. Referans olarak Wuhan’da izole edilen SARS-CoV-2 viral genom sekansı (NC\_045512.1) kullanılmıştır.

Hazırlanan veri seti MAFFT programı kullanılarak hizalanmış ve AliView programı kullanılarak, sekansların aynı çerçevede olduğu manuel olarak kontrol edilmiştir. Nükleotid sayıları, sekans verilerinin 5’UTR bölgesinden başlayarak belirtilmiştir. Nükleotid pozisyonları, referans sekans nükleotid pozisyonları (NC\_045512.1) ile doğrulanmıştır. SARS-CoV-2 RT-PCR tanısında kullanılmak üzere tanımlanmış, yedi farklı enstitüye ait 13 PCR paneli seçilmiştir (<https://primerscan.ecdc.europa.eu/?assay=Overview>). Primer-prob bağlanma bölgeleri, AliView programı kullanılarak belirlenmiştir. Bu bölgelerdeki referans genoma göre değişiklik gösteren nükleotid değişimleri değerlendirilmiştir. İlgili bölgelerde en az bir nükleotid için sekans okuması eksik olan 14 örnek, teknik bir sorun olasılığı nedeniyle analiz dışında bırakılmıştır.

180 SARS-CoV-2 sekansının tüm genomundaki sekans çeşitliliği, Alignment Explorer internet sitesindeki pozisyonel nükleotid sayısal hesaplayıcı (Positional nucleotide numerical summary (PNNS)) ve Entropi hesaplayıcı modülleri ile belirlenmiştir. (<http://entropy.szu.cz:8080/EntropyCalcWeb/>). Her bir RT-qPCR paneli için, primer-prob bağlanma bölgelerindeki nükleotid ve entropi değişimleri incelenmiştir.

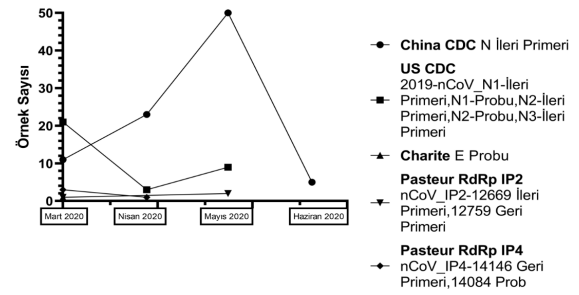
## Bulgular

SARS-CoV-2 RT-qPCR için tanımlanmış ve bu çalışmada değerlendirilen on üç adet PCR paneline ait primer/prob sekanslarının hedeflendiği bölgeler arasında zarf [envelope(E)], RNA polimeraz (RdRp), Nsp10, Nsp 14 ve Nükleokapsid (N) bölgeleri bulunmaktadır (Tablo 1). Panellerin yedi tanesi, nükleokapsid geninin bulunduğu bölgeye özgüdür. İncelenen 180 SARS-CoV-2 genomu üzerindeki primer-prob bağlanma bölgeleri analiz edildiğinde, bazı panellerin bağlanma bölgelerinde nükleotid değişimleri olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Entropi değişim analizlerinde de ilgili nükleotid değişimlerinin entropi değişimle-



**Tablo 1. COVID-19 RT-PCR panellerindeki primer-prob dizilerinin SARS-CoV-2 genomundaki bağlanma bölgeleri.**

| Enstitü              | İlgili Bölge | Nükleotid Pozisyonu |
|----------------------|--------------|---------------------|
| Charite              | E            | 26269-29357         |
| Charite              | RdRp         | 15431-15494         |
| Hong Kong University | N            | 29145-29196         |
| Hong Kong University | Nsp14        | 18778-18872         |
| China CDC            | N            | 28881-28979         |
| China CDC            | Nsp10        | 13342-13460         |
| US CDC (N1)          | N            | 28287-28358         |
| US CDC (N2)          | N            | 29164-29230         |
| US CDC (N3)          | N            | 28681-28752         |
| Pasteur (IP2)        | RdRp         | 12690-12797         |
| Pasteur (IP4)        | RdRp         | 14080-14367         |
| Thailand NIH         | N            | 28320-28356         |
| NIID Japan           | N            | 29125-29241         |



**Şekil 1. Analiz edilen 180 viral sekans içerisinde, farklı primer-prob panellerinin bağlanma bölgelerinde mutasyon taşıyan örnek sayılarının zaman içindeki değişimi.**

**Tablo 2. Hızlı moleküler yöntem ile rutin moleküler yöntemin süre ve maliyetinin karşılaştırılması.**

| Enstitü          | Primer/Prob                 | Bağlanma bölgesindeki nükleotid değişimi | Analiz edilen gruptaki sıklığı | Primer/Prob Dizisi (Kırmızı ile gösterilen bazlar, hedef bölgedeki mutasyon bölgeleri) | Hedef Bölge-Primer/Prob Yanlış Eşleşmeleri |
|------------------|-----------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| US CDC           | N1-İleri Primer             | 28.292 (C→A)                             | 4/180                          | 5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3'                                                       | A-G*                                       |
|                  | N2-İleri Primer             | 29.171 (C→T)                             | 2/180                          | 5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3'                                                       | T-G                                        |
|                  | N3-İleri Primer             | 28.688 (T→C)                             | 24/180                         | 5'-GGG AGC CTT GAA TAC ACC AAA A-3'                                                    | C-A                                        |
|                  | N3-İleri Primer             | 28.690 (G→T)                             | 1/180                          | 5'-GGG AGC CTT GAA TAC ACC AAA A-3'                                                    | T-C                                        |
|                  | N1-Prob                     | 28.311 (C→T)                             | 1/180                          | 5'-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-3'                                                  | T-G                                        |
|                  | N2-Prob                     | 29.197 (C→T)                             | 1/180                          | 5'-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-3'                                                   | T-G                                        |
| China CDC        | N-İleri Primer              | 28.881 (GGG→AAC)                         | 89/180                         | 5'-GGG GAA CTT CTC CTG CTA GAA T-3'                                                    | A-C, A-C, C-C*                             |
| Charite CDC      | E-Prob                      | 26.340 (C→T)                             | 1/180                          | 5'-ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG-3'                                               | T-G                                        |
|                  | RdRp IP2 12759 Geri Primer  | 12.781 (C→T)                             | 2/180                          | 5'-CTC CCT TTG TTG TGT TGT-3'                                                          | T-C                                        |
| Pasteur RdRp IP2 | RdRp IP2 12669 İleri Primer | 12.695 (C→T)                             | 1/180                          | 5'-ATG AGC TTA GTC CTG TTG-3'                                                          | T-G                                        |
| Pasteur RdRp IP4 | RdRp IP4 14084 Prob         | 14.120 (C→T)                             | 1/180                          | 5'-TCA TAC AAA CCA CGC CAG G-3'                                                        | T-G                                        |
|                  | RdRp IP4 14084 Prob         | 14.122 (G→T)                             | 1/180                          | 5'-TCA TAC AAA CCA CGC CAG G-3'                                                        | T-C                                        |
|                  | RdRp IP4 14146 Geri Primer  | 14178 (C→T)                              | 2/180                          | 5'-CTG GTC AAG GTT AAT ATA GG-3'                                                       | T-C                                        |

rine de sebep olduğu gösterilmiştir.

Primer/prob bağlanma bölgelerinde nükleotid değişimleri bulunan viral sekanslar incelendiğinde, değişimin en sık "China CDC" N-İleri primer ve "US CDC" N3-İleri primer bağlanma bölgelerinde bulunduğu, mutasyonlu sekans sayısının sırasıyla 89/180 (%49.4) ve 24/180 (%13.3) olduğu bulunmuştur. Toplam 196 viral sekansın GISAID veri tabanına yüklenme zamanlarına bakıldığında, yüklemelerin incelenen zaman aralığında mart ile haziran ayları arasında olduğu görülmektedir (Şekil 1).

Primer/prob bağlanma bölgelerinde gerçekleşen mutasyonlara ay bazında bakıldığında, toplam mutasyonlu viral sekansların ilgili aydaki toplam viral sekansa göre yüzdesi; Mart ayında %55.4, Nisan ayında %58.3, Mayıs ayında %61 ve Haziran ayında %71 olarak görülmektedir. Zamanla mutasyon oranları artmaktadır.

## Sonuç

Yedi farklı panele ait primer-prob bağlanma bölgelerinde nükleotid değişimi olduğu saptanmıştır. Bu nükleotid değişimleri, primer-prob bağlanma bölgelerinde yanlış eşleş-

melere neden olmaktadır. Yanlış eşleşmelerin etkileri ise pozisyonlarına, sayılarına ve primerlerin uzunluğuna göre farklılık gösterebilmektedir<sup>(13)</sup>. Örneğin, 3' ucuna yakın olan yanlış eşleşmelerin, PCR çoğalmasında önemli derecede etkilenen, orta kısımlardaki yanlış eşleşmelerin reaksiyon performansını orta ya da az derecede etkilediği ya da etkisinin olmadığı bilinmektedir. Aynı şekilde, pürin-pürin ve C-C yanlış eşleşmelerinin, pirimidin-pirimidin yanlış eşleşmelerine göre reaksiyon performansını daha çok etkileyeceği bildirilmektedir<sup>(14)</sup>. İncelenen 180 viral sekans 3'-OH ucuna yakın olan mutasyonlarla ve pürin-pürin, C-C yanlış eşleşmeleri de bulunmuş ve Tablo 2'de gösterilmiştir.

DNA polimerazlar nükleotidleri zincirin 3'-OH ucuna eklemektedir. Bu nedenle primer/probun 3' ucundaki yanlış eşleşmeler, DNA polimerazın işlevini daha çok etkileyebilmektedir. Primerin 3' ucuna doğru olan yanlış eşleşmelerin, belirlenen gen kopya sayısını 1000 kata kadar azaltabileceği gösterilmiştir. PCR verimliliği ve doğruluğu, primerlerin bağlanma derecesine, ikincil yapıların varlığına ve primerler ile hedeflenen DNA arasındaki uyuma bağlıdır. Hedef DNA ve primerler arasındaki yanlış eşleşme, DNA düpleks stabilitesini etkileyerek, DNA'nın çoğalmasını engelleyebilir<sup>(15)</sup>.

Türkiye’de Sağlık Bakanlığı tarafından satın alınarak yetkili laboratuvarlara dağıtılan üç farklı üreticinin ticari SARS-CoV-2 RT-PCR kiti vardır: BioSpeedy, Bioeksen AR&GE Teknolojileri; Diagnovital, RTA Laboratuvarları; Coronex, DS Bio ve Nano Teknoloji. Üç kitte de hedef bölge viral ORF1ab ve N genidir, ancak primer-prob dizileri tüm dünyadaki kit üreticilerinde olduğu gibi verilmemiştir. Bu çalışmada N genini hedef alan primer-prob bölgelerindeki yanlış eşleşmelerin diğer gen bölgelere göre daha sık olduğu görülmüştür. Saptanan nükleotid değişimlerinin PCR panellerinin çoğu için, performans açısından kritik etkisi olmayabilir. Ancak testin duyarlılığını etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır<sup>(16)</sup>. İdeal olarak, nükleik asit testlerinde viral genoma bağlanma bölgelerinde yanlış eşleşmelerin olmaması istenir. Yanlış eşleşmelerin pozisyonuna ve türüne bağlı olarak sonuçları farklı olmaktadır<sup>(17)</sup>. Yanlış eşleşmelerin varlığı, PCR deneylerinde saptanan gen kopya sayısının daha düşük olmasıyla bir yanlışlık da oluşturabilir. Primer/prob bağlanma bölgelerinin düzenli olarak kontrol edilmesi ve gerektiğinde güncellenmesi gerekmektedir. Ayrıca testlerin duyarlılık ve doğruluğunun gerçek izolatlarla kontrol edilmesi, olası yanlış negatif sonuçların önlenmesi açısından önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** SARS-CoV-2, COVID-19, mutasyon, RT-PCR

#### Kaynaklar

1. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiol.* 2020;5(4):536-44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
2. Chan JF, Kok K. Correction: Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):540. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1737364>
3. Malik YS, Sircar S, Bhat S, et al. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV)-current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. *Vet Q.* 2020;40(1):68-76. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1727993>
4. Xu Y, Xiao M, Liu X, et al. Significance of serology testing to assist timely diagnosis of SARS-CoV-2 infections: implication from a family cluster. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):924-7. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1752610>
5. WHO. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2> (Erişim tarihi: 05.Kasım.2020)
6. CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/List-of-Acceptable-Commercial-Primers-Probes.pdf> (Erişim tarihi: 13.Kasım.2020)
7. Mathuria JP, Yadav R, Rajkumar. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2-A review of current methods. *J Infect Public Health.* 2020;13(7):901-5. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.005>
8. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med.* 2020;18(1):179. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>
9. Wang C, Liu Z, Chen Z, et al. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. *J Med Virol.* 2020;92(6):667-74. <https://doi.org/10.1002/jmv.25762>
10. Kim JS, Jang JH, Kim JM, Chung YS, Yoo CK, Han MG. Genome-wide identification and characterization of point mutations in the SARS-CoV-2 genome. *Osong Public Heal Res Perspect.* 2020;11(3):101-11. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2020.11.3.05>
11. Shu Y, McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data - from vision to reality. *Eurosurveillance.* 2017;22(13):30494. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494>
12. Elbe S, Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID’s innovative contribution to global health. *Glob Chall.* 2017;1(1):33-46. <https://doi.org/10.1002/gch2.1018>
13. Khan KA, Cheung P. Presence of mismatches between diagnostic PCR assays and coronavirus SARS-CoV-2 genome: Sequence mismatches in SARS-CoV-2 PCR. *R Soc Open Sci.* 2020;7(6):200636. <https://doi.org/10.1098/rsos.200636>
14. Whitley DM, Sloots TP. Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *J Clin Virol.* 2005;34(2):104-7. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.02.010>
15. Bru D, Martin-Laurent F, Philippot L. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(5):1660-3. <https://doi.org/10.1128/AEM.02403-07>
16. Peñarrubia L, Ruiz M, Porco R, et al. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020;97:225-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.027>
17. Persson S, Karlsson M, Borsch-Reniers H, Ellström P, Eriksson R, Simonsson M. Missing the match might not cost you the game: Primer-template mismatches studied in different Hepatitis A virus variants. *Food Environ Virol.* 2019;11(3):297-308. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09387-z>

## Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonu Etkenlerinin Moleküler Yöntemlerle Tespiti ve Epidemiyolojisi

Sümeýra Kayalı, Merve Ayyıldız, Fatma Günbey, Ferhat Genç, Zülal Aşçı Toraman

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

✉ s\_kayali@hotmail.com

### Giriş

Santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları sekellere ve mortaliteye neden olabilen, acil tanı ve spesifik tedavi gerektiren hastalıklardır. Bakteriler ve virüsler en sık karşımıza çıkan patojenlerdir. Beyin omurilik sıvısının mikrobiyolojik incelemesi ile tedaviye yön verilmesi oldukça önemlidir. Moleküler yöntemler de bu amaçlarla kullanılmaktadır<sup>(1,2)</sup>.

BOS örneklerinden Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile saptanan viral ve bakteriyel etkenlerin yaşa, cinsiyete ve mevsimlere göre dağılımını incelemeyi ve epidemiyolojik veri elde etmeyi amaçladık.

### Gereç ve Yöntem

Temmuz 2017-Aralık 2020 tarihleri arasında laboratuvarımız Moleküler Mikrobiyoloji Birimi'ne SSS enfeksiyonu şüphesiyle gönderilen tüm BOS örnekleri dâhil edildi.

Çeşitli firmaların (BioGx, Fast Track Diagnostics, Qiagen) çeşitli bakteriyel ve viral etkenleri belirleyen multipleks PCR kitleri ile MTCTB (*Mycobacterium tuberculosis complex*), HSV-1 (*Herpes simplex virus-1*), HSV-2 (*Herpes simplex virus-2*), CMV (*Cytomegalovirus*), VZV (*Varicella-zoster virus*), HIV (*Human immunodeficiency virus*) ve EBV (*Epstein-Barr virus*) etkenlerini belirleyen real-time PCR kitleri kullanılarak elde edilmiş tüm sonuçlar dahil edildi. Versiyon farklılığından kaynaklı olarak multipleks PCR kitlelerin saptadığı; bakteriyel (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*) ve viral [HSV-1, HSV-2, HHV-6 (*Human Herpes simplex virus-6*), HHV-7 (*Human Herpes simplex virus-7*), VZV, EV (*Enterovirus*), HAdV (*Human adenovirus*), HPeV (*Human parechoviruses*), MuV (*Mumps virus*)] etkenler farklılık göstermekteydi.

### Bulgular

Pediyatrik yaş grubunun 188'i kadın 233'ü erkek; erişkin yaş grubunun ise, 264'ü kadın 241'i erkekti. Pediyatrik ve erişkin yaş grubunun yaş ortalamaları sırasıyla 4.2 ve 49.1 olarak hesaplandı. Toplam 55 BOS numunesinde 18 bakteriyel, 43 viral etken mevcuttu. Hiçbir numunede MTCTB saptanmadı. Saptanan etkenlerin cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 1 ve Tablo 2'de sunulmuştur.

Beş numunede birden fazla viral patojen saptandı. Bu numunelerin birinde CMV ve HIV, birinde HSV-1 ve HSV-2, birinde HAdV ve EBV, birinde HAdV ve HHV-6 diğeri ise

EV, HHV-6 ve HHV-7 birlikteliği mevcuttu.

Kit versiyonu ve klinik hekimlerinin tercihinine bağlı olarak her hasta numunesinde tüm etkenlerin varlığı araştırılmamıştır. Bu durum dikkate alındığında pediyatrik yaş grubunda (N=421); *S. pneumoniae* %3 (4/150), *H. influenzae* %1 (1/150), *N. meningitidis* %2 (2/150), *E. coli* %50 (3/6) HSV-1 %1 (2/183), VZV %2 (3/183), HSV-2 %1 (1/183), HAdV %6 (1/16), CMV %4 (1/27), EBV %6 (1/17), HHV-6 %11 (2/18), HHV-7 %11 (2/18), EV %3 (2/75) ve HPeV %5 (2/37) oranında saptanmıştır.

Erişkin yaş grubunda (N=505) ise; *S. pneumoniae* %3 (5/180), *H. influenzae* %2 (3/180), HSV-1 %6 (13/220), VZV %2 (4/220), HSV-2 %1 (3/220), HAdV %40 (2/5), CMV %2

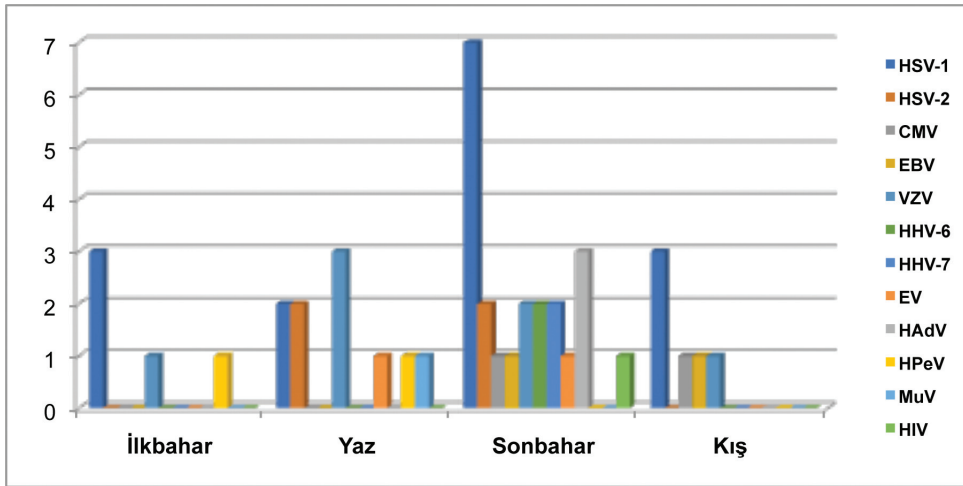
**Tablo 1. Bakteriyel etkenlerin cinsiyete ve yaş gruplarına göre dağılımı.**

|                                 | Erkek | Kadın | 0-2 yaş | 2-18 yaş | 19-59 yaş | 60 ve üzeri |
|---------------------------------|-------|-------|---------|----------|-----------|-------------|
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 4     | 5     | 2       | 2        | 3         | 2           |
| <i>Haemophilus influenzae</i>   | 3     | 1     | 1       | -        | 2         | 1           |
| <i>Escherichia coli</i>         | 3     | -     | 2       | 1        | -         | -           |
| <i>Neisseria meningitidis</i>   | 1     | 1     | -       | 2        | -         | -           |
| Toplam                          | 11    | 7     | 5       | 5        | 5         | 3           |

**Tablo 2. Viral etkenlerin cinsiyete ve yaş gruplarına göre dağılımı.**

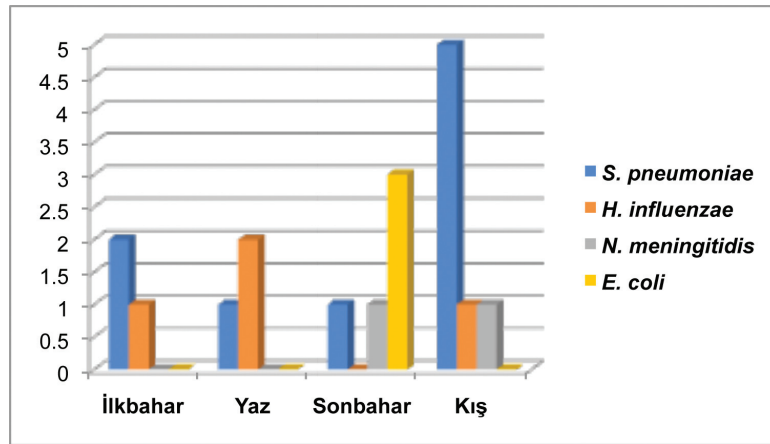
|        | Erkek | Kadın | 0-2 yaş | 2-18 yaş | 19-59 yaş | 60 ve üzeri |
|--------|-------|-------|---------|----------|-----------|-------------|
| HSV-1  | 8     | 7     | 1       | 1        | 9         | 4           |
| VZV    | 3     | 4     | 1       | 2        | 4         | -           |
| HSV-2  | 3     | 1     | -       | 1        | 2         | 1           |
| HAdV   | -     | 3     | 1       | -        | 2         | -           |
| CMV    | 1     | 1     | 1       | -        | 1         | -           |
| EBV    | 1     | 1     | -       | 1        | 1         | -           |
| HHV-6  | -     | 2     | 2       | -        | -         | -           |
| HHV-7  | 1     | 1     | 1       | 1        | -         | -           |
| EV     | 1     | 1     | 2       | -        | -         | -           |
| HPeV   | 1     | 1     | 1       | 1        | -         | -           |
| MuV    | 1     | -     | 1       | -        | -         | -           |
| HIV    | 1     | -     | -       | -        | 1         | -           |
| Toplam | 21    | 22    | 11      | 7        | 20        | 5           |

HSV-1 (*Herpes simplex virus-1*), HSV-2 (*Herpes simplex virus-2*), CMV (*Cytomegalovirus*), EBV (*Epstein-Barr virus*), VZV (*Varicella-zoster virus*), HHV-6 (*Human Herpes simplex virus-6*), HHV-7 (*Human Herpes simplex virus-7*), EV (*Enterovirus*), HAdV (*Human adenoviruses*), HPeV (*Human parechoviruses*), MuV (*Mumps virus*) HIV (*Human immunodeficiency virus*)



Şekil 1. Viral etkenlerin mevsimlere göre dağılımı.

HSV-1 (Herpes simplex virus-1), HSV-2 (Herpes simplex virus-2), CMV (Cytomegalovirus), EBV (Epstein-Barr virus), VZV (Varisella-zoster virus), HHV-6 (Human Herpes simplex virus-6), HHV-7 (Human Herpes simplex virus-7), EV (Enterovirus), HAdV (Human adenoviruses), HPeV (Human parechoviruses), MuV (Mumps virus) HIV (Human immunodeficiency virus)



Şekil 2. Bakteriye etkenlerin mevsimlere göre dağılımı.

(1/46) ve EBV %3 (1/29) oranında saptanmıştır. Erişkin yaş grubuna ait numunelerde *N. meningitidis* (n=180), *E. coli* (n=1), HHV-6 (n=6), HHV-7 (n=6), EV (n=89), HPeV (n=30) ve MuV (n=24) varlığı araştırılmış ancak hiçbir numunede saptanmamıştır.

Tespit edilen etkenlerin mevsimlere göre dağılımı Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir.

### Sonuç

Hem erişkin hem de pediatrik hastalarda bakteriyel etkenlerden en fazla *S. pneumoniae* görüldü ve tüm yaş gruplarında yaygın olarak görülmekteydi. Viral etkenlerden erişkinlerde HSV-1, pediatrik yaş grubunda VZV ilk sıradaydı. *E. coli* ve *N. meningitidis* sadece pediatrik yaş grubuna ait numunelerde görüldü.

Viral etkenlerden HSV-1, HSV-2 ve VZV 19-59 yaş grubunda

daha sık saptandı. HHV-6, HHV-7, EV, HPeV ve MuV sadece pediatrik numunelerden izole edildi.

Cinsiyete göre viral etkenlerin dağılımı incelendiğinde kadın erkek arasında anlamlı fark saptanmazken, bakteriyel etkenler erkeklerde kadınlara göre daha fazla görülmekteydi.

Mevsimlere göre etkenlerin dağılımı incelendiğinde; *S. pneumoniae* kış, viral etkenler ve *E. coli* sonbahar aylarında daha fazla görüldü.

Moleküler testlerin maliyetli olması, her laboratuvarında mevcut olmaması ve bakteriyel etkenlere antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılamaması gibi nedenlerle konvansiyonel yöntemlerin yerine geçmesi mümkün değildir. Ancak hızlı tanı koyma, viral patojenleri yüksek başarı oranında saptama, canlı olmayan bakterileri tespit etme ve birden fazla olası etkeni tek seferde saptama (multiplex)

leks PCR) gibi avantajları mevcuttur. Hastaların klinik bulguları ve ön tanıları dikkate alınarak test tercihi yapılmalıdır<sup>(3,4)</sup>.

**Anahtar kelimeler:** Beyin omurilik sıvısı (BOS), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), santral sinir sistemi enfeksiyonu

#### Kaynaklar

1. Kanra G, Ceyhan M, Kara A. Menenjit I: etiyopatogenez. Çocuk Sağlığı ve Hast Derg. 2003;46(1):57-66.
2. Read SJ, Kurtz JB. Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1352-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.5.1352-1355.1999>
3. Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH, et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. BMC Infect Dis. 2013;13:26. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-26>
4. Kahraman H, Tünger A, Şenol Ş, ve ark. Toplum kökenli santral sinir sistemi enfeksiyonlarında bakteriyel ve viral etiyolojinin moleküler yöntemlerle değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2017;51(3):277-85. <https://doi.org/10.5578/mb.57358>



# Akut Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Hastalarda Pandemi İnfluenza A Virüsünün Son 10 Yıldaki Sıklığının Araştırılması

Ayça Aydın Uysal<sup>1</sup>, Candan Çiçek<sup>1</sup>, Hüseyin Aytaç Erdem<sup>2</sup>, Eylem Ulaş Saz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

✉ aycaydin07@gmail.com

## Giriş

İnfluenza virüsleri Orthomyxoviridae ailesine mensup, zarflı, tek iplikli, negatif polariteli, genomu segmentli olan RNA virüsüdür<sup>(1)</sup>. İnfluenza A ve B virüsleri mortalite oranı yüksek olan epidemik solunum yolu hastalıklarının önemli bir kısmından sorumludur. İnfluenza C virüsü ise insanda nadiren enfeksiyon etkeni olmakla beraber bronşit ve pnömoni tablolarına sebep olabilmektedir<sup>(2)</sup>.

Virüsün tipi nükleoprotein antijeni tarafından belirlenir. Virion yüzeyindeki iki glikoprotein antijeni (hemaglütinin ve nöraminidaz) ise patogeneze ve epidemiyolojinin belirlenmesinden sorumludur. Hemaglütininin solunum yolu epiteline tutunmayı sağlarken nöraminidaz virüsün hücreye girişinde görev alır. İnfluenza kaynaklı epidemi ve pandemiler sürekli değişim halinde olan bu yüzey antijenlerindeki değişikliklerle (drift veya shift) bağlı olarak gerçekleşir<sup>(3)</sup>.

Son 20 yılda geniş insan topluluklarını etkileyen ve ülkemizin de etkilendiği iki influenza salgını olmuştur. İlk kez 1997 yılında Hong Kong'da kuşlardan direkt insanlara bulaşan İnfluenza A tip H5N1 (H5N1) salgını tanımlanmıştır. Daha sonra 2006 yılında ülkemizde H5N1 ile olgular görülmüştür<sup>(3,4)</sup>. Son influenza salgını ise 2009 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde başlayıp hızla dünyaya yayılan İnfluenza A virüsü H1N1 tipi ile olan pandemidir. Pandemi H1N1 virüsü (H1N1pdm09) diğer H1N1 virüslerinden yapı olarak farklı olduğu için mevsimsel grip aşırıyla koruma sağlanamamıştır. 12 Nisan 2009'dan 10 Nisan 2010'a kadar Amerika Birleşik Devletleri'nde H1N1pdm09 virüsüyle yaklaşık 60 milyon kişi enfekte olmuş, 274304 hastaneye yatış ve 12469 ölüm meydana gelmiştir<sup>(5)</sup>.

ABD'den dünyaya yayılan bu salgından ülkemiz de diğer tüm ülkeler gibi etkilenmiştir. Ülkemize ait ilk olgu 15 Mayıs 2009 tarihinde İstanbul Atatürk Hava Limanı'ndan giriş yaparken termal kameralarda belirlenen ve alınan nazal sürüntüsünde etken saptanan yabancı uyruklu bir kişi olarak kayıtlara geçmiştir. Bu olguyu 18 Haziran 2009 tarihinde belirlenen ilk yerli olgu izlemiştir. H1N1pdm09 virüs sebepli ilk ölüm ise 22 Ekim 2019 tarihinde gerçekleşmiştir<sup>(6)</sup>.

Bu çalışmada, 2009 yılı Nisan ayında Meksika'da başlayan ve sonrasında tüm dünyaya yayılan H1N1 virüsünün, bölgemizde pandemi sırasında ve pandemiyi takip eden son 10 yılda sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Ocak 2009 ve Aralık 2019 dönemleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Viroloji Laboratuvarına kabul edilen, akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalardan alınmış olan 11442 nazofarengeal sürüntü örneğinin solunum yolu multipleks PCR yöntemi ile değerlendirilmiş sonuçları retrospektif olarak incelendi. Cinsiyete göre gruplandırıldığında hastaların 4944 (%43.2) kadın, 6498 (%56.7) erkek olarak belirlendi. Yaş grubu dağılımına göre hastaların 8137'si (%71.1) çocuk (<18 yaş), 3305'i (%28.8) erişkin hastaydı. Örnekler gelmiş oldukları kliniklere göre incelendiğinde 1440'ı (%12.5) yoğun bakım hastalarından, 8609'u (%75.2) klinikte yatan hastalardan, 1393'ü (%12.1) poliklinik hastalarından gelmişti. Aynı hastanın yedi gün içerisinde birden fazla gelmiş olan örneği çalışmaya dahil edilmedi.

Değerlendirmeler her dönem için o dönem rutin laboratuvar uygulamasında kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kitlerinde saptanan influenza virüsler ve alt tiplerinin epidemiyolojik veriye dönüştürülmesi ile saptandı. Laboratuvar da dönemlere göre kullanılan solunum yolu örnekleri gerçek zamanlı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kitleri sırasıyla: Respiratuvar RealAccurateTM, PathoFinder, Hollanda (2007-2011), Invitrogen Co, ABD (2009-2010), Seeplex RV15-16 ACE Detection Kit Seegene, Güney Kore (2012-2015), FTD Respiratory Pathogens 21, Siemens, Lüksemburg (2016-2019) idi.

## Bulgular

Değerlendirilen 11442 örneğin 1350 (%11.7) tanesinde influenza virüsleri pozitif bulunmuştur. İnfluenza virüslerinin dağılımı: 767 (%56.8) influenza A (INF-A), 261 (%19.3) influenza B (INF-B), 197 (%14.6) influenza A (H1N1) pdm09 (H1N1), 80 (%5.9) influenza A human H1 (HH1), 43 (%3.1) İnfluenza A human H3 (HH3) şeklinde saptanmıştır. Yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde pediatrik hastalarda %10.5, erişkin hastalarda %14.7; örneğin geldiği kliniğe göre değerlendirildiğinde yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda %8.1, klinikte yatan hastalarda %10.7, poliklinik hastalarından %21.6 oranında influenza virüsleri pozitif bulunmuştur. Yapılan testlerin 607'si pandemi döneminde (Nisan 2009 ile Mart 2010) uygulanmış ve bu testlerin 172'si (%28.3) influenza virüs pozitif bulunmuştur. Pandemi dönemi influenza virüslerinin 18'i (%10.4) INF-A, 6'sı (%3.4)

**Tablo 1. İnfluenza virüsleri pozitif olan hastaların yaş, klinik ve influenza alt tiplerine göre dağılımı.**

|        | 2009 Nisan-2010 Mart |           |              |          |                   |   | Nisan 2009-Aralık 2019 |           |              |            |                   |         |
|--------|----------------------|-----------|--------------|----------|-------------------|---|------------------------|-----------|--------------|------------|-------------------|---------|
|        | Poliklinik n (%)     |           | Klinik n (%) |          | Yoğun bakım n (%) |   | Poliklinik n (%)       |           | Klinik n (%) |            | Yoğun bakım n (%) |         |
|        | Ç                    | E         | Ç            | E        | Ç                 | E | Ç                      | E         | Ç            | E          | Ç                 | E       |
| INF-A  | 7 (9.7)              | 8 (16.3)  | 0            | 3 (21.4) | 0                 | 0 | 81 (48.2)              | 60 (45.1) | 333 (57.8)   | 217 (61.1) | 85 (72.6)         | 1 (100) |
| INF-B  | 0                    | 0         | 3 (8.1)      | 3 (21.4) | 0                 | 0 | 15 (8.9)               | 18 (13.5) | 132 (22.9)   | 74 (20.8)  | 22 (18.8)         | 0       |
| H1N1   | 65 (90.2)            | 41 (83.6) | 34 (91.8)    | 8 (57.1) | 0                 | 0 | 66 (39.2)              | 42 (31.5) | 55 (9.5)     | 23 (6.4)   | 3 (2.5)           | 0       |
| HH1    | 0                    | 0         | 0            | 0        | 0                 | 0 | 3 (1.7)                | 7 (5.2)   | 40 (6.9)     | 26 (7.3)   | 5 (4.2)           | 0       |
| HH3    | 0                    | 0         | 0            | 0        | 0                 | 0 | 3 (1.7)                | 6 (4.5)   | 16 (2.7)     | 15 (4.2)   | 2 (1.7)           | 0       |
| Toplam | 72                   | 49        | 37           | 14       | 0                 | 0 | 168                    | 133       | 576          | 355        | 117               | 1       |

INF-B ve 148'i (%86) H1N1 olarak tiplendirilmiştir. Bu dönemde klinikte yatarak izlenen hastaların %19.6'sında, poliklinik hastalarının %34.3'ünde influenza virüsleri pozitif bulunmuştur. Klinikte yatan hastalarda 3 (%6) INF-A, 6 (%12) INF-B, 42 (%82) H1N1; poliklinik hastalarında 15 (%12.3) INF-A, 106 (%87.6) H1N1 saptanmıştır (Tablo 1).

## Sonuç

Pandemi döneminde H1N1'in akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda 10 yıllık sürecin tamamı ele alındığında oldukça yüksek oranlarda (%11.7 karşılık %28.3) saptandığı görülmüştür. Yine bu dönemde H1N1 polikliniğe başvuran ve klinikte yatan pediatrik hastalarda benzer oranlarda görülürken; erişkin hastalarda polikliniğe başvuran hastalarda daha yüksek oranda saptanmıştır. Bu durum pandemi döneminde enfeksiyonu erişkin hastaların hastalığı ayaktan geçirme oranının daha yüksek olduğunu düşündürmektedir. Pandemiye takip eden yıllarda, H1N1 sıklığı oldukça azaldığı ve mevsimsel özellik kazandığı dikkat çekmektedir.

Son 10 yıllık dönem ele alındığında en sık tiplendirilemeyen influenza A virüs enfeksiyonları görülmüş ve erişkin grubun klinik hastalarında; pediatrik grubun ise hem klinik hem de yoğun bakım hastalarında artış olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bölgemizde salgın daha çok hastaneye yatış gerektirmeden sonlanmış, salgını takip eden 10 yılda H1N1

dışı influenza A virüslerinin klinik ve yoğun bakım hastalarında saptanma sıklığı artmıştır.

**Anahtar kelimeler:** H1N1, influenza, pandemik influenza, real time PCR

## Kaynaklar

1. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. Vaccine. 2008;26(Suppl 4):D49-53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>
2. Moriuchi H, Katsushima N, Nishimura H, Nakamura K, Numazaki Y. Community-acquired influenza C virus infection in children. J Pediatr. 1991;118(2):235-8. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)80489-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)80489-5)
3. Procop GW, Church DL, Hall GS, et al. Diagnosis of Infections Caused by Viruses, Chlamydia/Chlamydia, Rickettsia, and Related Organisms. In: Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda JM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. (eds) Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: Wolter Kluwer Health. 2017:1506-1515.
4. Hatta H, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. Science. 2001;293(5536):1840-2. <https://doi.org/10.1126/science.1062882>
5. CDC. 2009 H1N1 Pandemic (H1N1pdm09 virus) | Pandemic Influenza (Flu) | CDC. <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/2009-h1n1-pandemic.html> (Erişim tarihi: 06 Ocak 2021).
6. Badur S. H1N1 epidemiyolojisi ve virüs. ANKEM Derg. 2010;24(Ek 2):190-5.

# Pandemi Öncesinde Akut Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Hastalarda Influenza Virüsü, Koronavirüs ve Çoklu Viral Enfeksiyonların Dağılımının Araştırılması

Hasan Selçuk Özkan<sup>1</sup>, Fatma Gökçen Tuna<sup>1</sup>, Candan Çiçek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 4. Sınıf Öğrencisi, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

✉ hselcukozkan@gmail.com

## Giriş

Solunum yolu enfeksiyonları (SYE), hem erişkin hem de çocuk yaş grubunda önemli morbidite ve mortalite nedenlerindendir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, 2019 yılında pnömöni ve diğer alt SYE (ASYE), bulaşıcı hastalıklar arasında en öne çıkan mortalite nedeni olarak belirlenmiştir. Tüm nedenler arasında dördüncü en sık görülen ölüm sebebi olarak kalmaya devam etmesine rağmen, 2000 yılına oranla SYE nedeniyle hayatını kaybeden insan sayısı azalmıştır. Düşük ve orta gelir grubundaki ülkelerde ise SYE önemini korumaya devam etmektedir<sup>(1)</sup>. Hala içinde bulunduğumuz ciddi akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) pandemisinin bu listede nasıl bir değişikliğe yol açacağı ise bilinmemektedir.

Solunum yolu enfeksiyonlarına bakteriler, virüsler ve parazitler neden olmakla birlikte, ağırlıklı olarak virüslerin etken olarak rol aldığı bilinmektedir. Akut SYE hastalarına ait epidemiyolojik veriler; ülkelere, mevsimlere ve viral patojenlerin saptanma yöntemlerine göre de farklılık göstermekle beraber viral patojenlerin saptanmasında multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi oldukça yaygın kullanılmaktadır<sup>(2,3)</sup>.

Türkiye'de resmi açıklamalara göre ilk SARS-CoV-2 olgusu 11 Mart 2020 tarihinde görülmüştür. Bu çalışmada, bu tarihten önce hastanemizde SARS-CoV-2 olgularına ait örneklerin çalışılmadığı 1 Aralık 2019-31 Mart 2020 tarihleri arasında koronavirüsler, influenza virüsleri ve diğer solunum yolu virüslerine ait epidemiyolojik verilerin dağılımının araştırılması amaçlanmaktadır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmaya 1 Aralık 2019-31 Mart 2020 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli bölümlerine başvuran veya hastanemizde yatışı gerçekleşmiş olan akut solunum yolu enfeksiyonu semptomları (öksürük, boğaz ağrısı, ateş, miyalji, baş ağrısı vb.) gösteren hastalar dahil edilmiştir. Toplam 1797 [882 (%49.1) kadın; 915 (%50.9) erkek] hastadan alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri kullanılmıştır. Hastaların, 965'i (%53.7) çocuk, 832'si (%46.3) ise erişkindir. Çocuk hastalarda medyan yaş 1 (0-18 yaş), erişkin hastalarda medyan yaş 40 (19-93 yaş) olarak bulunmuştur. Toplam 1797 hastanın, 374'ü (%20.8) poliklinik, 1267'si (%70.5) servis, 156'sı (%8.7) yoğun bakım hastasıdır.

Klinik örnekler uygun viral transport besiyeri (Copan Diagnostics Inc., İtalya) kullanılarak Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına ulaştırılmıştır. Bu örneklerden nükleik asitler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) çoğaltılmak üzere izole edilmiştir. Nükleik asit ekstraksiyonu (EZ1 Virus Mini Kit v2.0, Qiagen, Almanya) tamamlanan örnekler multipleks PCR kiti (FTD Respiratory Pathogens 21, Siemens, Lüksemburg) kullanılarak çoğaltılmış ve saptanmıştır. Kullanılan kitin saptadığı patojenler; influenza A virüsü (INFA), influenza B virüsü (INFB), influenza A(H1N1) virüsü (H1N1), insan koronavirüsü NL63 (HCoV-NL63), insan koronavirüsü 229E (HCoV-229E), insan koronavirüsü OC43 (HCoV-OC43), insan koronavirüsü HKU1 (HCoV-HKU1), parainfluenza virüs 1 (PIV1), parainfluenza virüs 2 (PIV2), parainfluenza virüs 3 (PIV3), parainfluenza virüs 4 (PIV4), hMPV, insan bokavirüsü (HBOV), insan solunum sinsityal virüsü (RSV), insan adenovirüsü (ADV), enterovirüs (ENT), insan parekovirüsü, insan rinovirüsü (HRV), Mycoplasma pneumoniae'dir. Çoğaltılan örnekler ait siklus sınır (Ct) değerlerinin incelenmesi, analiz cihazıyla (RotorGene, Qiagen, Almanya) yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Microsoft Excel 2019 (Microsoft, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 05.11.2020 tarihinde 20-11T/83 sayılı izin alınarak bu çalışma yapılmıştır.

## Bulgular

Toplam 1797 hastanın 891'inde (%49.6) solunum virüsleri pozitif bulundu. Test edilen 965 çocuk hastanın 452'sinde (%46.8), 832 erişkin hastanın 339'unda (%40.7), 374 poliklinik hastasının 189'unda (%50.5), 1267 servis hastasının 621'inde (%49.0) ve 156 yoğun bakım hastasının ise 81'inde (%51.9) solunum virüsleri saptandı.

Solunum virüsleri pozitif bulunan 891 hastanın; 452'si (%50.7) çocuk, 339'u (%38.0) erişkin, 189'u (%21.1) poliklinik, 621'i (%69.7) servis, 81'i (%9.1) yoğun bakım, 457'si (%51.3) erkek, 434'ü (%48.7) kadın hastalardan oluşmaktadır.

Toplam 1797 hastanın 328'inde (%18.2) influenza virüsleri pozitif bulundu. Bu virüslerin 86'sı (%4.8) INFA, 148'i (%8.2) H1N1, 94'ü (%5.2) INFB olarak tiplendirildi. Çocuk yaş grubunda pozitiflik oranı %16.8 (162/965) olarak bulunmuş olup 965 çocuk hastanın 84'ünde (%8.7) H1N1,

20'sinde (%2.1) INFA, 58'inde (%6.0) ise INFB saptandı. Erişkin yaş grubunda ise pozitiflik oranı %17.5 (146/832) olarak bulundu ve 832 erişkin hastanın 46'sında (%5.5) INFA, 64'ünde (%7.7) H1N1, 36'sında (%4.3) INFB saptandı. Poliklinikte izlenen hastalarda influenza pozitiflik oranı %22.1 (83/374) olarak saptandı ve bu şekilde izlenen 374 hastanın 20'sinde (%5.3) INFA, 39'unda (%10.4) H1N1, 24'ünde (%6.4) INFB gözlendi. Tüm hastalar içinde %70.5 (1267/1797) oranla çoğunluğu oluşturan serviste izlenen 1267 hastanın 43'ünde (%3.4) INFA, 105'inde (%8.3) H1N1 ve 64'ünde (%5.0) ise INFB saptandı. Bunlara ek olarak toplam 156 yoğun bakım hastasında %8.3 (13/156) oranında influenza virüsleri pozitif bulundu ve bu hastaların 3'ünde (%1.9) INFA, 4'ünde (%2.6) H1N1, 6'sında (%3.8) INFB saptandı. Toplam 915 erkek hasta içinde influenza pozitiflik oranı %14.1 (130/915) olarak belirlendi ve bu hastaların 25'inde (%2.7) INFA, 68'inde (%7.4) H1N1, 37'sinde (%4.0) INFB saptandı. Tüm hastaların 882'sini oluşturan kadın hastalarda toplam influenza pozitiflik oranı %20.1 (178/882) bulundu ve bu hastaların dağılımı şu şekildedir: 41 hastada (%4.6) INFA, 80 hastada (%9.0) H1N1, 57 hastada (%6.5) INFB (Tablo 1).

İnsan koronavirüsleri 1797 hastanın 52'sinde (%2.8) saptandı, bunların 41'i (%2.2) HCoV-229E/NL63, 9'u (%0.5) HCoV-HKU1 ve 2'si (%0.1) HCoV-OC43 olarak tiplendirildi. Çocuk yaş grubunda pozitiflik oranı %1.5 (15/965) olarak saptandı ve bu hastaların 12'sinde (%1.2) HCoV-229E/NL63, 3'ünde (%0.3) HCoV-HKU1 pozitif bulundu. Erişkin yaş grubunda pozitiflik oranı %4.4 (37/832) olarak bulundu. Bu hastaların

29'unda (%3.5) HCoV-229E/NL63, 6'sında (%0.7) HCoV-HKU1, 2'sinde (%0.2) HCoV-OC43 saptandı. Poliklinikte izlenen hastalarda koronavirüslere ait pozitiflik oranı %1.1 (4/374) olarak saptanmış olup bu hastaların 3'ünde (%0.8) HCoV-229E/NL63, 1'inde (%0.3) HCoV-HKU1 tespit edildi. Serviste izlenen hastalarda ise koronavirüs pozitiflik oranı %3.6 (47/1267) olup 37 (%2.9) hastada HCoV-229E/NL63, 8 (%0.6) hastada HCoV-HKU1, 2 (%0.1) hastada HCoV-OC43 gözlendi. Yoğun bakım hastalarında pozitiflik oranı %0.6 (1/156) olup 1 hastada HCoV-229E/NL63 saptandı. Erkek hastalarda koronavirüs pozitiflik oranı %3.7 (35/915) olup bu hastaların 28'inde (%3.0) HCoV-229E/NL63, 5'inde (%0.5) HCoV-HKU1 ve 2'sinde (%0.2) HCoV-OC43 saptandı. Kadın hastalarda ise pozitiflik oranı %1.9 (17/882) oranında saptandı ve 13 (%1.5) hastada HCoV-229E/NL63, 4 (%0.4) hastada ise HCoV-HKU1 bulundu (Tablo 1).

Influenza virüsleri ve koronavirüsler dışındaki diğer solunum virüslerinin tekli enfeksiyonları toplam 362 (%20.1) hastada görüldü. Diğer solunum virüsleri, 965 çocuk hastanın 257'sinde (%26.6), 832 erişkin hastanın 105'inde (%12.6) saptandı. 374 poliklinik hastasından 68'inde (%18.2), 1267 servis hastasından 247'sinde (%19.5), 159 yoğun bakım hastasından ise 47'sinde (%30.1) diğer solunum virüsleri saptandı. Diğer solunum virüslerinin pozitif bulunan hastalarda dağılımına ilişkin veriler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Solunum virüslerinin çoklu enfeksiyonları ise 1797 hastanın 169'unda (%9.4) saptandı. Toplam 965 çocuk hastanın

**Tablo 1. Akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum virüslerinin dağılımı.**

| Virüsler                   | Çocuk<br>n* (%) | Erişkin<br>n* (%) | Poliklinik<br>n* (%) | Servis<br>n* (%) | Yoğun Bakım<br>n* (%) | Erkek<br>n* (%) | Kadın<br>n* (%) | Toplam<br>n* (%) |
|----------------------------|-----------------|-------------------|----------------------|------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| INFA                       | 20 (2.1)        | 46 (5.5)          | 20 (5.3)             | 43 (3.4)         | 3 (1.9)               | 25 (2.7)        | 41 (4.6)        | 86 (4.8)         |
| H1N1                       | 84 (8.7)        | 64 (7.7)          | 39 (10.4)            | 105 (8.3)        | 4 (2.6)               | 68 (7.4)        | 80 (9.0)        | 148 (8.2)        |
| INFB                       | 58 (6.0)        | 36 (4.3)          | 24 (6.4)             | 64 (5.0)         | 6 (3.8)               | 37 (4.0)        | 57 (6.5)        | 94 (5.2)         |
| HCoV 229E/NL63             | 12 (1.2)        | 29 (3.5)          | 3 (0.8)              | 37 (2.9)         | 1 (0.6)               | 28 (3.0)        | 13 (1.5)        | 41 (2.2)         |
| HCoV HKU1                  | 3 (0.3)         | 6 (0.7)           | 1 (0.3)              | 8 (0.6)          |                       | 5 (0.5)         | 4 (0.4)         | 9 (0.5)          |
| HCoV OC43                  |                 | 2 (0.2)           |                      | 2 (0.1)          |                       | 2 (0.2)         |                 | 2 (0.1)          |
| DSV                        | 257 (26.6)      | 105 (12.6)        | 68 (18.2)            | 247 (19.5)       | 47 (30.1)             | 192 (21.0)      | 170 (19.3)      | 362 (20.1)       |
| Çoklu Etken Enfeksiyonları | 118 (112.2)     | 51 (6.1)          | 34 (9.1)             | 111 (8.8)        | 20 (12.8)             | 100 (11.0)      | 69 (7.8)        | 169 (9.4)        |
| Negatif                    | 413 (42.8)      | 493 (59.2)        | 185 (49.5)           | 646 (51.0)       | 75 (48.1)             | 458 (50.0)      | 448 (50.8)      | 906 (50.4)       |
| Toplam                     | 965             | 832               | 374                  | 1267             | 156                   | 915             | 882             | 1797             |

\*sütun yüzdesidir.

**Tablo 2. Pozitif bulunan hastalarda diğer solunum virüslerinin dağılımı.**

| Virüsler | Çocuk<br>n* (%) | Erişkin<br>n* (%) | Poliklinik<br>n* (%) | Servis<br>n* (%) | Yoğun Bakım<br>n* (%) | Erkek<br>n* (%) | Kadın<br>n* (%) | Toplam<br>n* (%) |
|----------|-----------------|-------------------|----------------------|------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| ADV      | 18 (7.0)        | 5 (4.8)           | 1 (1.5)              | 17 (6.9)         | 5 (10.6)              | 13 (6.8)        | 10 (5.9)        | 23 (6.3)         |
| ENTERO   | 2 (0.8)         |                   |                      | 2 (0.8)          |                       | 1 (0.5)         | 1 (0.6)         | 2 (0.5)          |
| HBOV     | 4 (1.5)         |                   |                      | 3 (1.2)          | 1 (2.1)               | 1 (0.5)         | 3 (1.8)         | 4 (1.1)          |
| HMPV     | 28 (10.9)       | 21 (20.0)         | 11 (16.2)            | 33 (13.4)        | 5 (10.6)              | 26 (13.5)       | 23 (13.6)       | 49 (13.5)        |
| HRV      | 109 (52.6)      | 46 (43.8)         | 36 (53.0)            | 97 (39.3)        | 22 (46.8)             | 77 (40.1)       | 78 (46.1)       | 155 (42.8)       |
| PIV1     | 1 (0.4)         | 1 (1.0)           |                      | 2 (0.8)          |                       | 1 (0.5)         | 1 (0.6)         | 2 (0.5)          |
| PIV2     | 1 (0.4)         |                   |                      | 1 (0.4)          |                       |                 | 1 (0.6)         | 1 (0.3)          |
| PIV3     | 2 (0.8)         |                   |                      | 1 (0.4)          | 1 (2.1)               |                 | 2 (1.2)         | 2 (0.5)          |
| PIV4     | 8 (3.1)         | 16 (15.2)         | 1 (1.5)              | 22 (8.9)         | 1 (2.1)               | 11 (5.7)        | 13 (7.7)        | 24 (6.6)         |
| RSV      | 84 (32.7)       | 16 (15.2)         | 19 (28.0)            | 69 (28.0)        | 12 (25.5)             | 62 (32.3)       | 37 (21.9)       | 100 (27.6)       |
| Toplam   | 257             | 105               | 68                   | 247              | 47                    | 192             | 169             | 362              |

\*sütun yüzdesidir.

118'inde (%12.2), 832 erişkin hastanın 51'inde (%6.1) çoklu etken enfeksiyonlarına rastlandı. Test edilen 374 poliklinik hastasının 34'ü (%9.1), 1267 servis hastasının 111'i (%8.8), 156 yoğun bakım hastasının ise 20'si (%12.8) çoklu etken enfeksiyon açısından pozitif bulundu. Ayrıca, 915 erkek hastanın 100'ünde (%11.0), 882 kadın hastanın ise 69'unda (%7.8) çoklu etken enfeksiyonları saptandı. Onbir (%6.5) hastada INFB ve H1N1 birlikte, 10 (%5.9) hastada ise RSV ve HRV birlikte saptandı.

### Sonuç

İnfluenza virüsleri arasında H1N1 ve INFB, ağırlıklı olarak çocuk hastalarda, servis hastalarında ve kadın hastalarda görülmüştür. INFB aynı zamanda yoğun bakım hastaları arasında en sık görülen influenza virüsü olmuştur. INFA ise erişkin ve kadın servis hastalarında daha sık görülmüştür.

Tespit edilen üç insan koronavirüsü tipi de en sık erişkin, erkek ve servis hasta gruplarında görülmüştür. *Alphacoronavirus* ailesinin üyeleri olan HCoV-229E/NL63, tıpkı SARS-CoV, SARS-CoV-2 ve MERS-CoV gibi *Betacoronavirus* ailesinin üyeleri olan HCoV-OC43 ve HCoV-HKU1'e oranla pandemi öncesi dönemde daha sık görülmüştür.

Diğer solunum virüsleri çocuk hastalarda, servis hastalarında ve erkek hastalarda daha sık görülmüştür ve bunların içinde en sık saptanan etken HRV'dir. HRV, çocuk hastalarda ve servis hastalarında sıklıkla saptanırken hastalar arasında belirgin bir cinsiyet farklılığı bulunmamaktadır. Bu etkenler arasında ikinci en sık görülen RSV ise yine çocuk hastalarda ve servis hastalarında görülmekte olup belirgin olarak erkeklerde daha sık tespit edilmiştir. Bir diğer sık saptanan etken olan HMPV, tıpkı RSV gibi bir sıklık profili izlemekle beraber, diğer solunum virüsü saptanan yetişkin hastalar içinde %20 gibi önemli bir pozitiflik yüzdesine sahiptir. PIV1, PIV2, PIV3 ağırlıklı olarak çocuk hastalarında, serviste izlenen hastalarda ve kadın hastalarda sık iken; PIV4 ise erişkin hastalarda, servis hastalarında ve erkek hastalarında daha sık görülmüştür. Bir diğer solunum virüsü olan ADV ise yine ağırlıklı olarak çocuk, erkek ve serviste izlenen hastalarda görülmektedir.

Çoklu etken enfeksiyonlarının çocuk hastalarda, erkek hastalarda ve servis hastalarında daha sık görüldüğü belirlenmiştir. Çoklu enfeksiyonlarda en sık tespit edilen etkenler ise sırasıyla H1N1, HRV, 229E/NL63, INFB ve RSV olup özellikle H1N1 ile INFB ve HRV ile RSV birlikteliği ön plana çıkmıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından yayınlanmış olan 2002-2014 yılları arasında bölgemizde saptanan solunum virüslerine ait epidemiyolojik verilerle karşılaştırıldığında<sup>(4)</sup>, Aralık 2019-Mart 2020 arasındaki dört aylık süreçte 1797 hasta başvurmuşken, 2002-2014 yılları arasında aynı şikayetlerle başvuran 5102 hasta bulunmaktadır. Akut SYE şikayetleriyle 12 yıllık sürede başvuran hasta sayısının yaklaşık üçte biri dört aylık dönemde başvurmuştur. Başvuran hasta sayısındaki bu belirgin artışa rağmen, solunum virüsleri çocuk hastalarda erişkin hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla görülmeye devam etmiştir. İnfluenza virüsleri pandemi öncesi dönemde %18.2'lik pozitiflik oranına ulaşmış olup 12 yıllık çalışmada ise bu oran sadece %9.7 olup bu dört aylık dönemde bölge-

mizde influenza virüslerinin pozitiflik oranında iki kata yakın bir artış gözlenmiştir. H1N1, 2002-2014 yılları arasında %4'lük bir pozitiflik oranına sahip olmasına rağmen, Aralık 2019-Mart 2020 döneminde %8.2 oranına ulaşarak iki katın üzerinde bir artış göstermiş ve yine INFB, 2002-2014 yılları arasında %0.8'lik bir pozitiflik oranına sahipken Aralık 2019-Mart 2020 döneminde %5.2 oranıyla yaklaşık 7 kat artış göstermiştir. İnfluenza virüslerinde 2002-2014 döneminde poliklinikte izlenen hastalar %43, servis ve yoğun bakım hastaları %57 gibi bir orana sahipken, Aralık 2019-Mart 2020 döneminde bu oranlar sırasıyla %27 ve %73 olarak bulunmuştur. İnfluenza virüslerinde yoğun bakım ve serviste izlenen hastalarda belirgin bir artış mevcuttur. İnfluenza virüsleri 2002-2014 yılları arasında çocuk hastalarda %8.4, erişkin hastalarda %14.7 oranında saptanmış, dört aylık dönemde ise çocuklarda %16.8 erişkinlerde ise %17.5 oranında saptanmıştır. İnfluenza virüslerinin çocuk hastalarda iki kat fazla saptandığı belirlenmiştir.

Koronavirüslerde pandemi öncesindeki dört aylık dönemde saptanan %2.9'luk pozitiflik oranı, bölgemiz için saptanan en yüksek orandır. Servis ve yoğun bakımda izlenen hastaların oranında 2002-2014 dönemine göre %92.3 ile %1'lik bir azalma, poliklinikte hasta izleminde ise %7.7 ile %1'lik bir artış görülmektedir. HCoV, 2002-2014 döneminde %0.3'lük pozitiflik oranına sahipken bu dört aylık dönemde %2.9'a ulaşmıştır. Sonuçta, koronavirüslerde hasta izleminde belirgin bir değişim olmamakla beraber pozitif hastaların oranında 10 kata yakın artış gözlenmiştir. Koronavirüsler, 2002-2014 yıllarında çocuk hastalarda %0.3, erişkin hastalarda %0.2 oranında saptanırken, dört aylık dönemde çocuklarda %1.5, erişkinlerde ise %4.4 oranında saptanmıştır. Koronavirüsler, çocuk hastalarda beş kat, erişkin hastalarda ise 22 kat daha fazla saptanmıştır.

Pandemi öncesi dört aylık dönemde, akut SYE semptomlarıyla başvuran hasta sayısında belirgin bir artış gözlenmiştir. İnfluenza virüsü saptanan hastaların servis ve yoğun bakımda izlenme oranları ciddi olarak artmıştır. Bu dönemde influenza virüsleri çocuk hastalarda daha sık görülmüştür. Koronavirüslerin pozitiflik oranı da belirgin olarak artmıştır ancak hastaların izleminde bir farklılık olmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** İnfluenza virüsleri, koronavirüs, akut solunum yolu enfeksiyonu

### Kaynaklar

1. WHO reveals leading causes of death and disability worldwide: 2000-2019 <https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019> (Erişim tarihi: Aralık 2020).
2. Arslan A, Çiçek C, Ulaş Saz E, Gülen F, Soydaner Karakuş H. Viral solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında bir multiplex PCR yönteminin performansının değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cemiyet Derg.* 2016;46(4):159-64. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2016.159>
3. Huang HS, Tsai CL, Chang J, Hsu TC, Lin S, Lee CC. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(10):1055-63. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.018>
4. Çiçek C, Bayram N, Anil M, ve ark. Solunum virüsleri ve influenza A virüs alt tiplerinin multiplex PCR yöntemi ile aynı anda saptanması. *Mikrobiyol Bul.* 2014;48(4):652-60. <https://doi.org/10.5578/mb.8221>



# Pandemi Öncesi 2019-2020 Kış Sezonunda Solunumsal Viral Etkenler ve İnfluenzada Oseltamivir Direnci

Tuğba Kaya<sup>1</sup>, Hüseyin Agah Terzi<sup>2</sup>, Hande Toptan<sup>2</sup>, Fatma Bayrakdar<sup>3</sup>, Yasemin Coşgun<sup>3</sup>, Mehmet Köroğlu<sup>4</sup>, Mustafa Altındış<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Öğrencisi, Sakarya

<sup>2</sup>Sağlık Bakanlığı Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya

<sup>3</sup>Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları, Ankara

<sup>4</sup>Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya

<sup>5</sup>Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Sakarya

✉ maltindis@gmail.com

## Giriş

Grip, influenza virüsüne bağlı ortaya çıkan bir solunum yolu enfeksiyonudur. Virüs içeren damlacıkların enfekte bireylerin hapşırması, öksürmesi veya konuşmasıyla 100-180 cm mesafeye kadar ulaşabildiği gösterilmiştir. Damlacık yoluyla gelen virüsler, yakındaki kişilerin ağız ve burunlarına yerleşebildiği gibi daha az sıklıkla direkt inhale edilebilir. Daha nadir olarak, kişi üzerinde grip virüsü bulunan bir yüzeye veya nesneye dokunup ardından kendi ağzına, burununa veya gözlerine dokunarak da grip olabilir<sup>(1)</sup>. Hafif bir üst solunum yolu enfeksiyonundan, ölüme neden olan ağır bir alt solunum enfeksiyonuna kadar farklılık gösteren klinik tablosu vardır. Bazı influenza türleri, insandan insana kolaylıkla bulaşarak özellikle kış aylarında mevsimsel salgınlara ve pandemilere neden olur. Dünya nüfusunun yaklaşık %10-20'si her yıl influenza ile enfekte olmaktadır. Enfekte olan kişiler hastane yatışları ile tedavi görebilirken özellikle yüksek riskli gruplarda mortaliteye sebep olabilmektedir<sup>(2)</sup>. Gripten korunmanın en iyi yolu grip aşısıdır. Özellikle influenzaya bağlı komplikasyon gelişme riski olan kişilerde aşılama büyük öneme sahiptir. Antiviral tedavi, ciddi, komplike veya ilerleyici hastalığı olan veya hastaneye yatırılması gereken doğrulanmış veya şüpheli influenza hastaları için mümkün olan en kısa sürede önerilmektedir. Yapılan çalışmalarda, hastalığın başlangıcından itibaren 48 saat içinde oseltamivir başlandığında klinik yarar görüldüğü bildirilmiştir<sup>(3)</sup>.

Bu çalışmada pandemi öncesi 2019-2020 kış sezonunda Eğitim Araştırma Hastanesi'ne üst solunum yolu enfeksiyonu semptomları ile başvuran ve laboratuvar bulguları ile saptanan virüslerin dağılımı irdelenmiş ve İnfluenza A (H1N1) pozitif olarak bulunan 11 hasta örneğinde oseltamivir direnci araştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

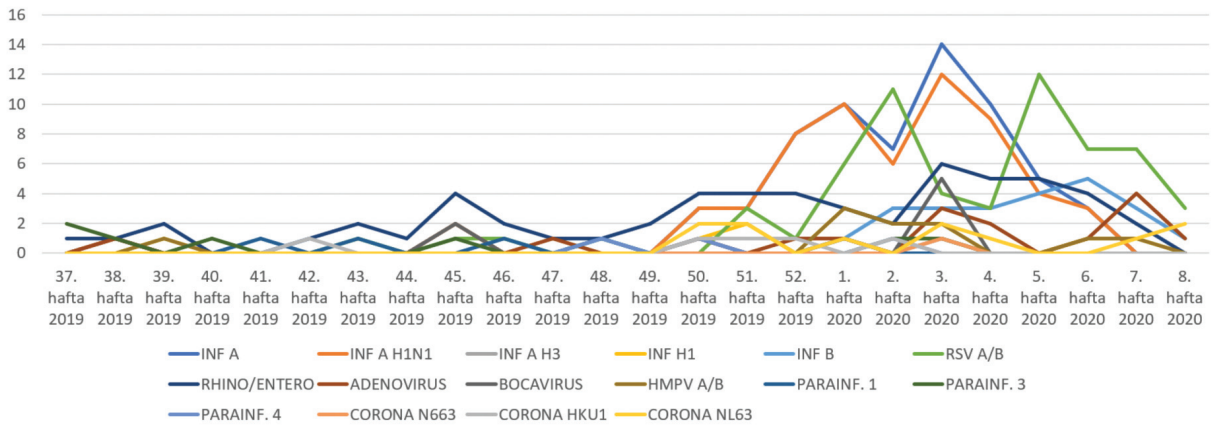
Sakarya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 05.03.2020 tarih ve E.3029 sayılı evrağı izni sonrası Eylül 2019-Şubat 2020 tarihleri arasında Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesine başvuran 0-93 Yaş arası toplam 354 hastanın nazofaringeal sürüntü ve bronkoalveoler lavaj sıvılarından alınan örnekler multip-

leks PCR yöntemi ile Solunum Viral Panel (RVP) testi (QIAstat-Qiagen, Almanya) ile değerlendirilmiştir. İnfluenza A H1N1 PCR pozitif saptanan örneklerden 11'i virüs hücre kültüründe üretilerek sekans analizi ile oseltamivir direnci araştırılmıştır. Qiagen One Step RT PCR kit ile 1410 bp uzunluğundaki neuraminidase geni N1F1, N1R1099, N1F401 ve NARUc primerleri ile amplifiye edilmiştir. Kullanılan primerler: 5x Reaction buffer (10 µl), dNTP (2 µl), 10 µM Primer F (1.5 µl), 10 µM Primer R (1.5 µl), Enzyme Mix (2 µl), RNase inhibitor (optional) (0.5 µl), Template RNA (10 µM), RNase-free water (22.5 µl) şeklindedir. 120 V da %1.5 lik agaroz jelde ampliconlar yürütülüp 1410 bp'lik bant gözlenmiştir. PCR ürünleri Agencourt AMPure XP (cat. No: A63881) ile üreticinin talimatlarına göre pürifiye edilmiştir. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (4337454) ile reaksiyon hazırlanmıştır. PCR ürünü pürifikasyonu sonrası Axygen AxyPrep MAG DyeClean-Up Kitiyle ABI 3500 sekans cihazında DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya alınan hastaların demografik bilgileri, klinik özellikleri, mevsimsel dağılımları retrospektif olarak taranmıştır.

**Tablo 1. Hastaların kliniklere başvuru dağılımı.**

| Klinikler                           | Kadın | Erkek | Toplam |
|-------------------------------------|-------|-------|--------|
| Çocuk Servisi                       | 58    | 72    | 130    |
| Çocuk Yoğun Bakım                   | 29    | 35    | 64     |
| İntaniye                            | 27    | 28    | 55     |
| Çocuk Acil                          | 19    | 25    | 44     |
| Çocuk Onkolojisi ve Hematoloji      | 6     | 9     | 15     |
| Nefroloji                           | 4     | 6     | 10     |
| Çocuk İmmunoloji ve Alerji          | 2     | 4     | 6      |
| Anestezi ve Reaminasyon Yoğun Bakım | 3     | 2     | 5      |
| Dahiliye Yoğun Bakım                | 3     | 2     | 5      |
| Göğüs Hastalıkları                  | 3     | 1     | 4      |
| Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım      | 3     | 1     | 4      |
| Böbrek Nakil Servisi                | -     | 3     | 3      |
| Çocuk Kardiyoloji                   | 3     | -     | 3      |
| Çocuk Endokrin                      | 1     | -     | 1      |
| Hematoloji                          | -     | 1     | 1      |
| Onkoloji                            | 1     | -     | 1      |
| Koroner Yoğun Bakım                 | -     | 1     | 1      |
| Cerrahi Yoğun Bakım                 | -     | 1     | 1      |
| Aşı Polikliniği                     | -     | 1     | 1      |
| Toplam                              | 162   | 192   | 354    |



Şekil 1. Hastanemize solunumsal enfeksiyon nedeni başvuran 354 kişide saptanan virüslerin dağılımı.

## Bulgular

Çalışmamıza 12 Eylül 2019- 19 Şubat 2020 tarihleri arasında T.C. Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne üst solunum yolu enfeksiyonu semptomları ile başvuran 354 hastanın örnekleri dahil edildi. Örneklerin 130'u çocuk servisi, 64'ü çocuk yoğun bakım, 55'i enfeksiyon kliniği, 44'ü çocuk acil, 15'i çocuk onkoloji ve hematoloji, 10'u nefroloji ve 36'si ise diğer polikliniklerden gönderilmiştir. Başvuranların 162'si kadın, 192'si erkektir (Tablo 1).

Hastanemize solunumsal enfeksiyon nedeni başvuran 354 kişi de saptanan virüslerin dağılımı şu şekildedir: İnfluenza A (68), İnfluenza A H1N1 (59), İnfluenza H1 (3), İnfluenza A H3 (1), İnfluenza B (24), Respiratuvar sinsityal virüs A/B (64), Rhinovirüs/Enterovirüs (58), Adenovirüs (18), Bocavirüs (10), İnsan metapnömovirüsü (HMPV) A/B (12), Parainfluenza virüs 1 (4), Parainfluenza virüs 3 (7), Parainfluenza virüs 4 (3), Coronavirus N663 (1), Coronavirus HKU1 (5), Coronavirus NL63 (12). Coronavirüsler (17) arasında baskın serotip Coronavirüs NL63'ün (11) olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).

İnfluenza virüslerinde Ocak ayının 3. Haftası belirgin artış olmuştur. RSV A/B'nin 0-1 yaş arası çocuklarda (47) literatürde olduğu gibi baskın olduğu gözlenmiştir. Sekans analizi yapılan İnfluenza A/H1N1 pozitif örneklerin hiçbirinde oseltamivir direnci saptanmamıştır.

## Sonuç

Viral etken ajanları tespit etmek için laboratuvar testleri gereksiz antibiyotik kullanımını azaltacaktır. Ülkemizde görülen influenza A/H1N1 suşlarının oseltamivir direnci açısından analizinin yapılması ampirik tedavinin yönlendirilmesinde önemlidir. İnfluenza benzeri klinik ile başvuran hastalarda, oseltamivir tedavisine gerekirse sadece klinik öngörü ile başlanması, influenza enfeksiyonunun tedavisi ve komplikasyonların önlenmesi açısından önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** Solunumsal virüsler, influenza, oseltamivir, PCR, sekans

## Kaynaklar

1. CDC. Seasonal Influenza (Flu)> About Flu > How Flu Spreads 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/about/disease/spread.htm> (Erişim tarihi: Aralık 2020)
2. Grohskopf LA, Alyanak E, Broder KR, Walter EB, Fry AM, Jernigan DB. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices - United States, 2019-20 influenza season. MMWR Recomm Rep. 2019;68(3):1-21. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6803a1>
3. Yıldırım A. Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde 2016-2017 ve 2017-2018 mevsimsel influenza sezonunda influenza enfeksiyonuyla ilişkili olabilecek semptomlarla hastaneye yatmış ve nazofarengeal sürüntü örneğinde influenza virüsü tespit edilmiş çocuk hastaların klinik ve epidemiyolojik özelliklerinin ve hastalığın aileye sosyal yükünün değerlendirilmesi. [Tıpta uzmanlık tezi], Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, 2019.

# Manisa Bölgesinde Kadınlarda Human Papilloma Virus Prevalansı ve Genotip Dağılımı

Nalan Yıldız, Özlem Türkmen, Ferdi Çetin, Sinem Akçalı

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

✉ nalanyildiz93@gmail.com

## Giriş

Serviks kanseri, dünyada her iki dakikada bir kadın ölümüne neden olan ve kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanserdir. Serviks kanserinin oluşumu için, human papilloma virusu (HPV) varlığı gereklidir, ancak yeterli değildir. Günümüzde servikal kanser gelişimi için HPV'nin mutlaka var olması gerektiği, diğer risk faktörlerinin ya virusla karşılaşma oranını arttırdığı ya da viral persistansın karsinojenik süreci hızlandırmada önemli olduğu konusu üzerinde durulmaktadır. Cinsel olarak aktif kadın ve erkeklerin %50-80'ninde hayatlarının bir dönemi genital HPV enfeksiyonu gelişebilir. 50 yaşlarındaki kadınların %80'ni genital HPV enfeksiyonuna maruz kalmakta ancak %90'ını iki yıl içinde HPV(-) olmaktadır. %10'unda ise persistan enfeksiyon geliştirmektedir. Persiste enfeksiyonlar neoplastik süreci tetikler. Önlenabilir kanser tipleri arasında yer alan serviks kanserinin etyolojisinde yer alan HPV'nin belirlenmesi, invaziv kanser sıklığının ve mortalitenin azaltılmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Bu çalışmanın amacı HPV DNA araştırılması için laboratuvarımıza gönderilen servikal örneklerde HPV varlığının ve genotiplerinin belirlenmesidir.

## Gereç ve Yöntem

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2.01.2019-17.11.2020 tarihleri arasında gönderilen 1723 servikal sürüntü örneği sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir. HPV genotip tayini multipleks gerçek zamanlı PCR yöntemiyle (Cobas® 4800, Roche) gerçekleştirilmiştir. Cobas® 4800 sistemi, HPV Tip 16 ve HPV Tip 18 dahil olmak üzere toplam 14 yüksek riskli tip saptamakta ve sonuçları HPV Tip 16, HPV Tip 18 ve Yüksek Riskli olarak raporlamaktadır.

## Bulgular

Çalışmaya alınan 1723 servikal örnekten 201'inde (%11.6) HPV DNA pozitif olarak bulunmuştur. HPV tip 16 örneklerin %27.8'inde, HPV Tip 18 %7'sinde, diğer Yüksek Riskli HPV tipleri ise %67'sinde pozitif saptanmıştır.

Tek başına HPV Tip 16 ve Tip 18 pozitiflerin oranı %17.4 ve %4'tür. HPV Tip 16 veya Tip 18 pozitif bulunan 22 hastada (%11) ise eş zamanlı olarak Yüksek Riskli HPV tiplerinden biri pozitif olarak tespit edilmiştir.

## Sonuç

Bölgemiz için bulduğumuz %11.6 pozitiflik oranı HPV enfeksiyonunun önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu göstermektedir. Bazı Türk bölgesel çalışmalarında genel HPV prevalansının %2.1 ile %25 arasında olduğu bildirilmiştir. HPV aşısı 87 ülkede ulusal aşı programında yer almaktadır; ülkemizde de rutin aşılama programına girmesinin HPV ile ilişkili kanserlere karşı korunmada etkili olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** HPV, genotip, prevalans, Manisa

## Kaynaklar

1. Ege S. Gebe kadınlarda human papilloma virüs sıklığının araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. Zonguldak: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı; 2014.
2. Aref-Adib M, Freeman-Wang T. Cervical cancer prevention and screening: the role of human papillomavirus testing. TOG. 2016;18:251-63. <https://doi.org/10.1111/tog.12279>
3. Eroğlu C, Keşli R, Eryılmaz MA, Ünlü Y, Gönenç O, Çelik Ç. Serviks kanseri için riskli olan kadınlarda HPV tiplendirmesi ve HPV sıklığının risk faktörleri ve servikal smearle ilişkisi. Nobel Med 2011;7(3):72-7.

**Tablo 1. Hastalarda tespit edilen HPV tiplerinin dağılımı.**

| Tipler                                                                 | Sayı | %    |
|------------------------------------------------------------------------|------|------|
| Tip16                                                                  | 56   | 27.8 |
| Tip18                                                                  | 15   | 7    |
| Yüksek Riskli Diğer Tipler                                             | 135  | 67   |
| Tip16/Tip18 ile eş zamanlı pozitif saptanan Diğer Yüksek Riskli Tipler | 22   | 11   |

# Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Çocuklarda Hızlı Moleküler Tanı Testi Kullanımının Hasta Yönetimine Etkisi

Tansu Gülbahar Aydoğan<sup>1</sup>, Aykut Eşki<sup>2</sup>, Zuhal Ümit<sup>2</sup>, Timur Köse<sup>3</sup>, Candan Çiçek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, İzmir

✉ drtansuaydogan@gmail.com

## Giriş

Solunum yolu enfeksiyonları, çocuklarda en sık görülen hastalıklardan biridir ve dünyada yüksek morbidite ve mortaliteye neden olur<sup>(1)</sup>. Bakteriyel ve viral etiyoloji arasındaki ayrım, hastaya verilecek ileri tedavi için gereklidir. Viral hastalık için antibiyotiklerin aşırı reçete edilmesi, pediatri-de karşılaşılan bakteriyel patojenler arasında antibiyotik direncin artmasına katkıda bulunan bir faktördür. Gereksiz antibiyotik kullanımı, akut solunum yolu hastalığının etiyolojisine ilişkin klinik belirsizlikten kaynaklanmaktadır ve bu nedenle virüslerin erken tanımlanmasıyla antibiyotik kullanımının önlenebileceği öngörülmektedir<sup>(2)</sup>. Rutin moleküler testler ile klinisyene sonuç vermek en az 24 saat sürerken, hızlı moleküler testlerin kullanımı ile çok kısa sürede (<2 saat) sonuç verilebilmektedir<sup>(3)</sup>. Bu çalışmada; alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda kısa sürede sonuç veren hızlı moleküler tanı testlerinin kullanımıyla; hastalara antibiyotik ve antiviral ilaçların başlanması, hastanede kalış süresi üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları kliniğinden Şubat 2019 ile Ocak 2020 tarihleri arasında akut solunum yolu enfeksiyonu olan 1320 örnek laboratuvarımıza kabul edildi. Bu örneklerin 757'sinde (%57.3) bir veya birden fazla solunum virüsü pozitif bulundu. Solunum virüsü pozitif olan yatan ve solunum yolu enfeksiyonu semptomuyla başvuran hastalar arasından randomize yöntemle 84 hasta seçildi. Bu hastalar saptanan virüslere göre iki gruba ayrıldı ve uygulanan tanı yöntemine göre her grup kendi içinde tekrar iki grup şeklinde incelendi (Tablo 1).

Tablo 1. Tanı testi ve pozitif sonuçlara göre hasta grupları.

| Grup                                    | Tanı yöntemi               | Hasta Sayı |
|-----------------------------------------|----------------------------|------------|
| İnfluenza virüsleri pozitif (FLU +)     | Hızlı moleküler test (HMT) | 14         |
|                                         | Rutin moleküler test (RMT) | 14         |
| Diğer solunum virüsleri pozitif (DSV +) | Hızlı moleküler test       | 28         |
|                                         | Rutin moleküler test       | 28         |

Tabloda tanımlanan her iki grup kendi içinde kullanılan tanı yöntemine göre; hastanede yatış süresi, gereksiz antibiyotik kullanımı ve süresi, antiviral ilaç kullanımı açısından aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı

(Ki-kare, Mann Whitney U, Fisher's Exact Testi) araştırıldı. İstatistiksel analiz SPSS®18.0 kullanılarak yapıldı.

Hızlı moleküler tanı testi olarak; QIAstat-Dx (DiagCORE, Hilden, Almanya) ve FilmArray Solunum Paneli (BIOFIRE, Salt Lake City, UT, ABD), rutin moleküler tanı testi olarak; FTD Respiratory Pathogens 21 (Simens, Lüksemburg) kullanıldı.

Aşağıdaki patojenler, QIAstat-Dx Respiratory Panel ile saptanabilir ve ayırt edilebilir\*: İnfluenza A, İnfluenza A alt tip H1N1/2009, İnfluenza A alt tip H1, İnfluenza A alt tip H3, İnfluenza B, Koronavirüs 229E, Koronavirüs HKU1, Koronavirüs NL63, Koronavirüs OC43, Parainfluenza virüs 1, Parainfluenza virüs 2, Parainfluenza virüs 3, Parainfluenza virüs 4, Respiratuvar Sinsityal Virüs A/B, insan Metapnömovirüs A/B, Adenovirüs, Bocavirüs, Rinovirüs/Enterovirüs, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* ve *Bordetella pertussis* (\*Enterovirüs ve Rinovirüs, QIAstat-Dx Respiratory Panel ile saptanır ancak ayırt edilmez.)<sup>(4)</sup>.

FilmArray Solunum Paneli nazofarengeal aspiratlardan aynı anda 20 viral ve üç bakteriyel patojeni tespit edebilir: Adenovirus, Coronavirus 229E, Coronavirus HKU1, Coronavirus OC43, Coronavirus NL63, Human Metapneumovirus, Human Rhinovirus/Enterovirus, İnfluenza A, İnfluenza A/H1, İnfluenza A/H1-2009, İnfluenza A/H3, İnfluenza B, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3, Parainfluenza 4, RSV, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* <sup>(5,6)</sup>.

FTD Respiratory Pathogens 21 (Simens, Lüksemburg); İnfluenza A virüs, İnfluenza A(H1N1) virus (swine-lineage), İnfluenza B virüs, human rhinovirus, human coronaviruses NL63, 229E, OC43 ve HKU1, human parainfluenza viruses 1, 2, 3 ve 4, human metapneumoviruses A/B, human bocavirus, human respiratory syncytial viruses A/B, human adenovirus; enterovirus, human parechovirus, *Mycoplasma pneumoniae* patojenlerini saptayabilir.

## Bulgular

Hızlı moleküler test (HMT) ve rutin moleküler test (RMT) sonuç verme süreleri açısından karşılaştırıldığında; HMT medyan 5 saat, RMT medyan 62.5 saat bulunmuştur.

İnfluenza ve diğer solunum virüsleri pozitif olan hastalarda

kullanılan yöntemlerin hasta yöntemine etkisi Tablo 2 ve Tablo 3'te özetlenmiştir.

**Tablo 2. İnfluenza virüs pozitif hastalarda kullanılan yöntemlerin hasta yönetimine etkisi.**

|                                | Değerler        | FLU + HMT | FLU + RMT  | p değeri |
|--------------------------------|-----------------|-----------|------------|----------|
| Gereksiz antibiyotik kullanımı | Sayı (%)        | 6 (42.9)  | 13 (%92.9) | 0.013    |
| Antibiyotik kullanım süresi    | Min-Max/ Medyan | 3-21/7    | 4-14/7     | 0.864    |
| Antiviral ilaç kullanımı       | Sayı (%)        | 12 (85.7) | 2 (14.3)   | <0.0001  |
| Hastanede yatış süresi         | Min-Max/ Medyan | 1-32/5    | 2-14/4     | 0.443    |

**Tablo 3. Diğer solunum virüsleri pozitif hastalarda kullanılan yöntemlerin hasta yönetimine etkisi.**

|                                | Değerler        | DSV + HMT | DSV + RMT | p değeri |
|--------------------------------|-----------------|-----------|-----------|----------|
| Gereksiz antibiyotik kullanımı | Sayı (%)        | 16 (57.1) | 23 (82.1) | 0.042    |
| Antibiyotik kullanım süresi    | Min-Max/ Medyan | 1-15/7    | 4-14/9    | 0.811    |
| Antiviral ilaç kullanımı       | Sayı (%)        | 12 (42.9) | 8 (28.6)  | 0.265    |
| Hastanede yatış süresi         | Min-Max/ Medyan | 1-32/7    | 2-27/6    | 0.281    |

İnfluenza virüsü pozitif saptanan hastalarda HMT kullanılanlarda gereksiz antibiyotik kullanımı %42.9, RMT kullanılanlarda %92.9'du. İkili lojistik regresyon analizi, HMT kullanımının gereksiz antibiyotik kullanımı üzerinde önemli bir etkisi ( $p=0.013$ ) olduğunu gösterdi. Antibiyotik kullanım süresi açısından HMT ve RMT kullanılan her iki grupta da medyan 7 gündü. Tanı yöntemi farklılığının, doğrusal lojistik regresyon analizinde antibiyotik tedavisi süresi üzerinde önemli ( $p=0.864$ ) bir etki göstermediği saptandı. HMT kullanılanlarda antiviral kullanımı %85.7, RMT kullanılanlarda %14.3 bulundu. İkili lojistik regresyon analizi, antiviral kullanımı üzerinde HMT kullanımının önemli bir etkisi ( $p<0.0001$ ) olduğunu gösterdi. Hastanede kalış süresinin; HMT kullanılan grupta medyanı 5 gün, RMT kullanılan grupta medyanı 4 gündü. Tanı yöntemi farklılığının, doğrusal lojistik regresyon analizinde antibiyotik tedavisi süresi üzerinde önemli ( $p=0.443$ ) bir etkisi olmadı.

Diğer solunum virüsleri pozitif saptanan hastalarda HMT kullanılanlarda gereksiz antibiyotik kullanımı %57.1 ,RMT

kullanılanlarda %82.1 bulundu. İkili lojistik regresyon analizi, HMT kullanımının gereksiz antibiyotik kullanımı üzerinde önemli bir etkisi ( $p=0.042$ ) olduğunu gösterdi. Antibiyotik kullanım süresinin; HMT kullanılan grupta medyanı 7 gündü, RMT kullanılan grupta medyanı 9 gündü. Tanı yöntemi farklılığının, doğrusal lojistik regresyon analizinde antibiyotik tedavisi süresi üzerinde önemli ( $p=0.811$ ) bir etkisi olmadığı saptandı. HMT kullanılanlarda antiviral kullanımı %42.9, RMT kullanılanlarda %28.6 bulundu. İkili lojistik regresyon analizi, HMT kullanımının antiviral kullanımı üzerinde önemli bir etkisi ( $p=0.265$ ) olmadığını gösterdi. Hastanede kalış süresinin; HMT kullanılan grupta medyanı 7 gün, RMT kullanılan grupta medyanı 6 gün bulundu. Tanı yöntemi farklılığının, doğrusal lojistik regresyon analizinde antibiyotik tedavisi süresi üzerinde önemli ( $p=0.281$ ) bir etkisi olmadığı saptandı.

## Sonuç

İnfluenza pozitif olan hasta grubunda tanıda HMT kullanımıyla örnek kabul ile test sonuçlanma süresi oldukça kısalmış, gereksiz antibiyotik kullanımı önlenmiştir. Ancak antibiyotik tedavisi başlanmış hastalarda kullanım süresini kısaltmadığı ve hastanede yatış süresi üzerine de bir etkisi olmadığı saptanmıştır. HMT ile influenza pozitif saptanan hastaların, influenza için kritik antiviralleri zamanında almaları sağlanmıştır. Diğer solunum virüslerinin HMT ile çalışılan grubunda da gereksiz antibiyotik kullanımının azaldığı görülmüş, ancak diğer parametreler üzerine bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. HMT kullanımının kısa sürede, doğru tedaviye başlamada etkili olabileceği; ancak daha fazla hasta sayısı ile çalışmanın gerekli olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Akut solunum yolu enfeksiyonu, hızlı moleküler test, antibiyotik tedavisi

## Kaynaklar

1. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. Clin Microbiol Rev. 2010;23(1):74-98. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-09>
2. Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. Clin Infect Dis. 2011;52(suppl. 4):S284-9. <https://doi.org/10.1093/cid/cir043>
3. Pérez-Ruiz M, Pedrosa-Corral I, Sanbonmatsu-Gámez S, Navarro-Marí M. Laboratory detection of respiratory viruses by automated techniques. Open Virol J. 2012;5(1):151-9. <https://doi.org/10.2174/1874357901206010151>
4. QIAstat-Dx® Respiratory Panel Kullanım Talimatları (El Kitabı) 04/2019
5. BioFire. FilmArray® Solunum Paneli (RP) Talimat Kitapçığı. Salt Lake City, UT, ABD: BioFire Diagnostics; 2015.
6. Leber AL, Everhart K, Daly JA, et al. Multicenter evaluation of BioFire FilmArray respiratory panel 2 for detection of viruses and bacteria in nasopharyngeal swab samples. J Clin Microbiol. 2018;56(6):e01945-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01945-17>



## Covid-19 Ön Tanısı İle Yatıp Vefat Eden Hastaların Mortalite Risk Faktörlerinin Belirlenmesi

Büşra Çalışır<sup>1</sup>, Nilay Çöplü<sup>1</sup>, Çetin Kılınç<sup>1</sup>, Sedat Gülten<sup>2</sup>, Abdullah İbrahim Çalışır<sup>3</sup>, Ahmet Özden<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Kastamonu Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kastamonu

<sup>2</sup>Kastamonu Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Kastamonu

<sup>3</sup>Kastamonu Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kastamonu

<sup>4</sup>Kastamonu Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyoloji Anabilim Dalı, Kastamonu

✉ busraozeycalisir@gmail.com

### Giriş

Covid-19 Aralık 2019'da ilk kez ortaya çıkan yeni bir corona-virüsün neden olduğu hastalıktır. Diğer coronavirüslerden farklı özellikleri vardır, bu nedenle de hastalığın seyri, tanı yöntemleri ve tedavisi hakkında bilinmeyen faktörler mevcuttur<sup>(1)</sup>. Dünyada ve Türkiye'de 27 Ağustos 2020 tarihine kadar sırasıyla 24.021.218 ve 263.998 vaka, 821.462 ve 6.209 ölüm bildirilmiştir<sup>(2)</sup>. Mortalitenin erkeklerde, ileri yaşta ve altta yatan hastalığı olanlarda (hipertansiyon, koroner arter hastalığı, diyabet, KOAH, malignite gibi) daha yüksek olduğuna dair yayınlar mevcuttur<sup>(3-6)</sup>. Bu hastalarda bazen ek olarak bakteriyel enfeksiyonlar da gözlenmekte olup, bu durum morbidite ve mortalitenin artmasına neden olabilir<sup>(7,8)</sup>. Bu çalışmada Covid-19 ön tanısı ile takip edilen hastalarda mortalite risk faktörlerinin irdelenmesini amaçladık.

### Gereç ve Yöntem

Kastamonu Eğitim Araştırma Hastanesi'nde (KEAH) 24.03.2020-09.08.2020 tarihleri arasında Covid-19 ön tanısıyla takip edilirken ölen 86 vaka çalışmaya dahil edilmiştir.

COVID 19 için gerçek zamanlı RT-qPCR yöntemi: Nazofaringeal sürüntüde gerçek zamanlı quantitative PCR (RT-qPCR) ile viral RNA analizi yapılmıştır. COVID 19 için RT-qPCR test kitleri Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından sağlanmış, Covid-19 RT-qPCR Tespit Kiti (Bio-Speedy) ile Bio-eksen firmasının önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

**Görüntüleme Tekniği ve Radyolojik Değerlendirme:** Tüm hastalar 16 kesitli Alexion Advance Bilgisayarlı Tomografi (BT) cihazı ile Toraks değerlendirmesine alınmıştır (Toshiba, 2014, Hollanda). Çekim parametreleri olarak 130 kVp; 100-200 mAs; pitch, 0.75-1.5; and collimation, 0.625-5 mm, FOV 44x44 kullanılmıştır. Buzlu cam opasitesi ve konsolidasyon birlikteliği Covid-19 lehine bulgu olarak değerlendirilmiştir.

**Diğer veriler:** Hastaların kültür ve antibiyotik duyarlılık testleri konvansiyonel yöntemler ve VİTEK (BioMérieux, Fransa) ile yapılmış ve EUCAST standartlarına göre değerlendirilmiştir. Vakaların demografik bilgileri, komorbiditeler, hastaneye yatıştan ölene kadar geçen süreler, moleküler

test sonuçları, toraks BT bulguları, biyokimyasal bulgular, kültür ve antibiyotik duyarlılık test sonuçları ve uygulanan tedaviler hakkında veriler hastanenin elektronik sisteminde toplanmıştır.

**İstatistiksel analiz:** Kategorik değişkenler frekanslar ve yüzdelere kullanılarak tanımlanırken, sürekli değişkenler ortalama ve medyan değerleri kullanılarak tanımlanmıştır. Ortalama (SS) ve kategorik değişkenler gibi sürekli ölçümler sayı ve yüzde (%) olarak rapor edilmiştir. Tüm analizler için SPSS (sürüm 22.0) kullanılmıştır.

### Bulgular

Çalışmamızda o dönemde Covid-19 ön tanısıyla takip edilen 1169 hastadan 86'sının (%7.35) vefat ettiği gözlenmiş, ancak bu hastaların hepsinin ölüm sebeplerinin Covid-19 olduğu gösterilememiştir.

Tablo 1. Ölen vakaların demografik özellikleri.

| Özellikler               |                   | Toplam | %     |
|--------------------------|-------------------|--------|-------|
| Yaş                      | Ortalama          | 72     |       |
| Alt gruplar              | <40 yaş           | 2      | 2.32  |
|                          | 40-49 yaş         | 5      | 5.81  |
|                          | 50-59 yaş         | 10     | 11.62 |
|                          | 60-69 yaş         | 12     | 13.95 |
|                          | 70-79 yaş         | 29     | 33.72 |
|                          | 80-89 yaş         | 23     | 26.74 |
|                          | 90-96 yaş         | 5      | 5.81  |
| Cinsiyet                 | Erkek             | 59     | 68.6  |
|                          | Kadın             | 27     | 31.4  |
| Altta yatan hastalık     | Hipertansiyon     | 21     | 24.4  |
|                          | KVH <sup>1</sup>  | 16     | 18.6  |
|                          | DM <sup>2</sup>   | 13     | 15.1  |
|                          | KOAH <sup>3</sup> | 13     | 15.1  |
|                          | Malignite         | 10     | 11.6  |
|                          | KBH <sup>4</sup>  | 8      | 9.3   |
| Komorbidite birlikteliği | 0 Komorbidite     | 40     | 46.52 |
|                          | 1 Komorbidite     | 21     | 24.4  |
|                          | 2 Komorbidite     | 13     | 15.1  |
|                          | ≥3 Komorbidite    | 12     | 13.9  |

<sup>1</sup>Kardiyovasküler Hastalık

<sup>2</sup>Diyabetes mellitus

<sup>3</sup>Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

<sup>4</sup>Kronik böbrek hastalığı

Ölen vakaların demografik özellikleri Tablo 1’de sunulmuştur. Ölen vakaların 59’u (%68.6) erkek, 27’si (%31.4) kadındır. Vakalar 35-96 yaş arasında olup yaş ortalaması 72; medyan ise 75 olarak bulunmuştur.

Ölen vakaların RT-qPCR ve BT sonuçları Tablo 2’de gösterilmiştir. Vakaların 21’inin RT-qPCR testi pozitif olarak bulunurken, bu vakalardan 9’unda bir süre sonra kontrol RT-qPCR testleri negatif bulunmuştur. Başlangıçta RT-qPCR pozitif bulunan 21 vakanın 18’inin BT sonucu Covid-19 ile uyumlu olup 3’ünün BT sonucuna ulaşılamamıştır. BT çekilmiş olan 59 vakanın sonuçları irdelendiğinde; 51’inin (%86.44) sonucu Covid-19 ile uyumlu, yedisinin sonucu ara vaka ile uyumlu, birinin de Covid-19 ile uyumsuz olduğu görülmüş, 27 vakanın ise BT sonucuna ulaşılamamıştır.

**Tablo 2. İrdelenen 86 vakanın PCR ve bilgisayarlı tomografi (BT) sonuçları.**

|                | BT Sonucu                       |                         |                           |               |
|----------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------|
|                | Covid-19 uyumlu (Grup 1) (n=51) | Ara vaka (Grup 2) (n=7) | BT uyumsuz (Grup 3) (n=1) | BT yok (n=27) |
| PCR (+) (n=21) | 9+9 <sup>1</sup>                | 0                       | 0                         | 3             |
| PCR (-) (n=65) | 33                              | 7                       | 1                         | 24            |
| Toplam         | 51                              | 7                       | 1                         | 27            |

<sup>1</sup>: Baştan PCR pozitif olup takibinde PCR’i negatifleşen hastalar

Ölen vakaların hastaneye başvuru ve ölmeden son 24 saatteki laboratuvar bulguları Tablo 3’te gösterilmiştir. Vakalarda nötrofil artışı, beyaz küre artışı, lenfosit azalması ve inflamatuvar belirteçlerin medyan değerlerinde de artış gözlenmiştir.

**Tablo 3. Vakaların hastaneye yattığı gün ve ölmeden son 24 saatteki laboratuvar bulguları.**

| Biyokimyasal Bulgular  | Hastaneye yattığı gün bulguları                                                    | Ölmeden son 24 saat bulguları                                    |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Beyaz kan hücresi (µL) | Ortalama <3.5x10 <sup>3</sup><br>3.5-10.5x10 <sup>3</sup><br>>10.5x10 <sup>3</sup> | 11.12x10 <sup>3</sup><br>6 (%8.45)<br>22 (%30.13)<br>29 (%40.84) |
| Nötrofil               | Ortalama <1.7x10 <sup>3</sup><br>1.7-7x10 <sup>3</sup><br>>7x10 <sup>3</sup>       | 9.44x10 <sup>3</sup><br>2 (%2.81)<br>20 (%27.77)<br>45 (%63.38)  |
| Lenfosit               | Ortalama <0.9x10 <sup>3</sup><br>0.9-2.9x10 <sup>3</sup><br>>2.9x10 <sup>3</sup>   | 1.16x10 <sup>3</sup><br>33 (%45.83)<br>37 (%51.38)<br>2 (%2.81)  |
| CRP                    | Medyan >5                                                                          | 103<br>70 (%97.22)                                               |
| LDH                    | Medyan >248                                                                        | 344<br>53 (%76.81)                                               |
| D-dimer                | Medyan >0.55                                                                       | 3.85<br>63 (%87.5)                                               |
| Ferritin               | Medyan                                                                             | 202<br>29 (%41.42)                                               |
| Troponin               | Medyan                                                                             | 42<br>52 (%72.22)                                                |
|                        | Erkek:>336; Kadın:>307                                                             | 44 (%64.70)                                                      |
|                        | Erkek:>19; Kadın>11.6                                                              | 67 (%91.78)                                                      |

Ölen vakalarda kültür sonuçları incelendiğinde 21 vakada (%24.41) toplam 43 bakteriyel üreme olduğu saptanmıştır. Hastaların bir ila yedi klinik örneğinde üreme olduğu ve her hasta için bir ila dört değişik bakteri türü ürettiği gözlenmiştir. Bu hastaların beşinin Covid-19 RT-PCR sonucu pozitifken, birinin sonucu takip sırasında negatifleşmiş, 16’sının sonucu ise negatif olarak bulunmuştur. Kırk üç bakteriyel üremenin 20 adedi panresistan bakteri ile olup toplam 13 hastaya ait üremelerdir.

Vefat eden 86 vakanın 6’sı (%6.97) Covid-19 servislerinde, 80’i (%93.03) yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalardır.

## Sonuç

Bu retrospektif çalışmada, KEAH’nde Covid-19 ön tanısı ile takip edilirken ölen 86 vakanın mevcut durum analizi yapılmıştır.

Çalışmamızda erkeklerin daha sık öldüğü gözlenmektedir ve bu durum diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Ölen vakaların yaş ortalaması bizim çalışmamızda 72,04 olarak bulunmuş olup, bizimle uyumlu şekilde ölen vakaların yaş ortalamasının 68-75.5 arası olduğunu rapor eden çalışmalar vardır<sup>(3-6)</sup>.

Çalışmamızda ölen vakaların %53.48’inde komorbiditeler mevcuttur. Diğer çalışmalarda da ölen vakaların %44.9-100 arasında değişen oranlarda en az bir komorbiditeye sahip olduğu ve sıklığının hipertansiyon (%64-38), diyabet (%18-40) ve koroner kalp hastalığı (%16-32) şeklinde olup bizimle uyumlu olduğu görülmüştür<sup>(3-6)</sup>.

Ölen vaka grubumuzda RT-PCR pozitif iken ölmüş ve Covid-19 nedeniyle vefat ettiği ispatlanmış olan vaka sıklığı %14 olarak bulunmuştur. BT bulguları ile değerlendirildiğinde ise 51 vakanın Covid-19 ile uyumlu bulunduğu ve RT-PCR pozitif vakaların tamamının bu grupta olduğu gözlenmektedir. Buna karşılık RT-PCR (+) olup sonradan negatifleşen 9 vaka da dahil olmak üzere 42 vakanın BT bulguları Covid-19 ile uyumlu iken PCR sonuçları negatiftir. Covid-19 tanısında BT özgülüğü düşük bir test olduğu ve diğer solunum yolu viral etkenleri aranmadığı için bu hastaların ölüm sebebi netleşmemiş olup başka viral etkenler de sebepler arasında olabilir.

Bu çalışmada hastaların kan tablosunda da değişimler gözlenmiştir (Tablo 3). Bunlardan biri olan lenfopeni, Covid-19 enfeksiyonu olan kritik hastalarda öne çıkan bir özelliktir. Lenfositler koronavirüs reseptörü olan ACE2’yi sunar ve virüs için doğrudan hedef haline gelerek direkt lenfosit ölümü ile sonuçlanabilir; proinflamatuvar sitokinler muhtemelen lenfosit apoptozuna yol açar; hiperlaktik asidemi gibi metabolik bozukluklar sonucunda üretilen moleküller lenfositlerin inhibisyonuna yol açabilir. Bunların sonucunda oluşan lenfopeni, hücresel bağışıklık yetersizliği durumu oluşturarak ölüme yol açabilir<sup>(9)</sup>.

Ölen vakaların eş zamanlı üreyen kültür numuneleri incelendiğinde 13 vakaya ait 20 klinik örnekte panresistan bakteri ürettiği gözlenmiştir. Bu vakaların hepsinin RT-PCR sonuçları negatiftir. Bu vakalarda klinik örneklerin solunum yolu, kan ve idrar şeklinde olduğu da göz önünde tutulursa

ölüm nedeni bakteriyel enfeksiyon olabilir. Çalışmamızdaki vakaların %95.34'ü yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) ölmüştür. Covid-19 hastalarının YBÜ yatması hastalığın ağırlaştırıcının göstergesidir. Ancak ek olarak YBÜ'de invaziv tedavilere ihtiyaç duyulması nedeniyle koenfeksiyon riskleri artar.

Sonuç olarak Covid-19 hastalarının ölüm sebeplerinin viral enfeksiyona ek olarak altta yatan sebepler, inflamasyondan kaynaklanan patolojiler ve sekonder bakteriyel enfeksiyonlar olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Covid-19, lenfopeni, mortalite

#### Kaynaklar

1. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Tropical medicine & international health: TM & IH*. 2020;25(3):278-80. <https://doi.org/10.1111/tmi.13383>
2. Cakir B. COVID-19 in Turkey: Lessons Learned. *J Epidemiol Glob Health*. 2020;10(2):115-7. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.200520.001>
3. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
4. Qiu P, Zhou Y, Wang F, et al. Clinical characteristics, laboratory outcome characteristics, comorbidities, and complications of related COVID-19 deceased: a systematic review and meta-analysis. *Aging Clin Exp Res*. 2020:1-10. <https://doi.org/10.1007/s40520-020-01664-3>
5. Zhang B, Zhou X, Qiu Y, et al. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. *PLoS One*. 2020;15(7):e0235458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235458>
6. Zhao Y, Nie HX, Hu K, et al. Abnormal immunity of non-survivors with COVID-19: predictors for mortality. *Infect Dis Poverty*. 2020;9(1):108. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00723-1>
7. Li X, Wang L, Yan S, et al. Clinical characteristics of 25 death cases with COVID-19: A retrospective review of medical records in a single medical center, Wuhan, China. *Int J Infect Dis*. 2020;94:128-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.053>
8. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol*. 2020;10.1002/jmv.26232. <https://doi.org/10.1002/jmv.26232>
9. Tan L, Wang Q, Zhang D, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):33. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4>

# Akut Gastroenteritli Beş Yaşın Altındaki Çocuklarda Rotavirüs ve Adenovirüs Antijenlerinin Araştırılması

Merve Ayyıldız, Sümeyra Kayalı, Fatma Günbey, Zülal Aşçı Toraman

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

✉ mrv\_ayyldz\_46@hotmail.com

## Giriş

Akut gastroenteritler, beş yaş altı çocuklardaki morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. Global verilere göre beş yaş altı çocuklarda diyareye neden olan hastalıkların; alt solunum yolu enfeksiyonları, erken doğum komplikasyonlarından sonra üçüncü sırada mortalite nedeni olduğu bildirilmektedir. Dünya genelinde beş yaş altı çocuklarda yılda 1.5 milyarın fazla akut gastroenterit vakası görüldüğü ve 2 milyon civarı çocuğun öldüğü tahmin edilmektedir<sup>(1,2)</sup>.

Virüsler, akut gastroenterit etkenleri arasında ilk sırada yer alır ve özellikle çocuklardaki akut gastroenteritlerin yaklaşık %70'inden sorumludur<sup>(3)</sup>. Akut gastroenterite sıklıkla neden olan viral ajanlar arasında rotavirüs, adenovirüs, norovirüs, astrovirüs, bocavirüs ve sapovirüsler yer alır<sup>(4)</sup>. Çocuklardaki akut gastroenteritlerin en sık görülen etkenleri ise rotavirüs ve adenovirüslerdir<sup>(5)</sup>.

Rotavirüs, dünya genelinde prevalansı en yüksek viral gastroenterit etkenidir<sup>(4)</sup>. *Reoviridae* ailesinde yer alan rotavirüs; yaklaşık 70-100 nm çapında, ikozahedral simetrik kapside sahip, zarfsız RNA virüsüdür. İç, orta ve dış kapsit olarak üç protein tabakadan oluşan kapsitte, iç kapsit 11 adet çift zincirli RNA segmenti içeren viral genomu içerir. Her segmentte 6 adet yapısal (VP1-VP4,VP6,VP7) ve 6 adet yapısal olmayan protein (NSP1-NSP6) kodlanır<sup>(4,6)</sup>.

Rotavirüslerden sonra çocuklarda en sık görülen gastroenterit etkeni ise adenovirüslerdir. Adenovirüsler *Adenoviridae* ailesinden olup 70-90 nm çapında, ikozahedral simetrik, zarfsız, lineer çift zincirli DNA içeren virüslerdir<sup>(7,8)</sup>.

Rotavirüsün etken olduğu gastroenteritler ishal ile seyreden subklinik enfeksiyondan ölümle sonuçlanabilecek dehidratasyona kadar çeşitli klinik tablolarla seyredebilir. Rotavirus enfeksiyonu daha sıklıkla ılıman iklim bölgelerinde sonbahar ile ilkbahar arasında ve 2 yaşından küçük çocuklarda görülmektedir<sup>(3,9)</sup>.

Adenovirüs enfeksiyonları rotavirüs gastroenteritlerine göre daha hafif seyirli olup bazen öksürük ve burun akıntısı gibi solunum yolu semptomları da eşlik edebilir. Yaz aylarında daha sık olmak üzere yılın tüm aylarında ve daha çok dört yaş altı çocuklarda görülmektedir<sup>(9,10)</sup>.

Bu çalışmada, hastanemize başvuran akut gastroenteritli 0-5 yaş arası çocuk hastalarda rotavirüs ve adenovirüs antijen sıklığının yaş, cinsiyet ve mevsimlere göre dağılımının

retrospektif olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Aralık 2015 - Aralık 2020 tarihleri arasında akut gastroenterit ön tanısı ile çeşitli poliklinik ve servislerden gönderilen 0-5 yaş grubundaki 2172 hastanın dışkı örneği verileri incelenmiştir.

Taze dışkı örneklerinde rotavirüs ve adenovirüs antijenleri kalitatif immünokromotagrafik Rotavirus and Adenovirus Combo Rapid Test Cassette (ACRO BIOTECH, ABD) kiti ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Testin sensitivite ve spesifitesi üretici firma tarafından rotavirus için >%99.9 ve %97.8, adenovirus için >%99.9 ve >%99.5 olarak bildirilmiştir.

Rotavirüs ve adenovirüs antijen sıklığının yaş, cinsiyet ve mevsime göre dağılımı SPSS 21.0 programı kullanılarak ki-kare testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve p<0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

## Bulgular

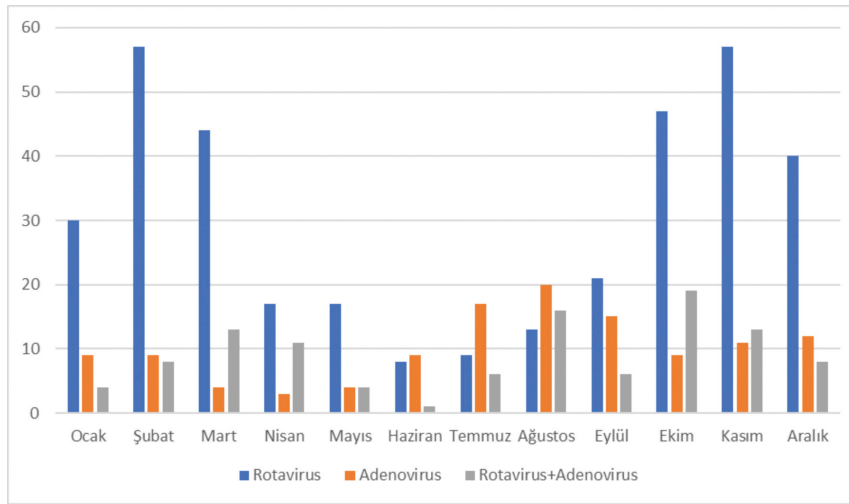
Toplam 2172 hastanın 591'inde (%27.21) viral antijen saptanmıştır. Bu örneklerin 360'unda (%16.57) rotavirüs, 122'sinde (%5.62) adenovirüs ve 109'unda (%5.02) rotavirüs ve adenovirüs birlikte pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 1).

Rotavirüs saptanan toplam 360 olgunun 158 (%43.9)'i kadın, 202 (%56.1)'i erkek; adenovirüs saptanan toplam 122 olgunun 48 (%39.3)'i kadın, 74 (%60.7)'i erkek; rotavirus ve adenovirüs birlikte pozitif saptanan toplam 109 olgunun 44 (%40.4)'i kadın, 65 (%59.6)'i erkek olarak tespit edilmiştir. Viral antijen pozitifliği yüzdesel olarak erkeklerde daha yüksek olmakla birlikte cinsiyetler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (p>0.05) (Tablo 1).

Mevsimsel dağılım açısından viral antijenlerin varlığı değerlendirildiğinde, viral antijen pozitifliği en sık sonbahar 198 (%9.12) mevsiminde tespit edildi. Rotavirüsün kış 127 (%5.85) ve sonbahar 125 (%5.75); adenovirüsün yaz 46 (%2.12); rotavirüs ve adenovirüs birlikte pozitifliğinin ise sonbahar 38 (%1.75) mevsiminde daha sık enfeksiyona neden olduğu belirlenmiştir (Tablo 1, Şekil 1). Rotavirüs enfeksiyonlarında sonbahar ve kış mevsimlerinde antijen pozitifliği ilkbahar ve yaz mevsimlerinden istatistiksel ola-

**Tablo 1. Akut gastroenterit ön tanılı çocuklarda rotavirüs ve adenovirüs antijen pozitiflik oranlarının dağılımı.**

| Özellik      | Olgu Sayısı |       | Pozitif Olgu Sayısı |       |       |            |      |       |                      |      |       |
|--------------|-------------|-------|---------------------|-------|-------|------------|------|-------|----------------------|------|-------|
|              |             |       | Rotavirüs           |       |       | Adenovirüs |      |       | Rotavirüs+Adenovirüs |      |       |
|              | N           | %     | n                   | %     | p     | n          | %    | p     | n                    | %    | p     |
| Cinsiyet     |             |       |                     |       |       |            |      |       |                      |      |       |
| Kız          | 925         | 42.59 | 158                 | 7.27  | >0.05 | 48         | 2.21 | >0.05 | 44                   | 2.03 | >0.05 |
| Erkek        | 1247        | 57.41 | 202                 | 9.30  |       | 74         | 3.41 |       | 65                   | 2.99 |       |
| Yaş Grupları |             |       |                     |       |       |            |      |       |                      |      |       |
| 0            | 1068        | 49.17 | 143                 | 6.58  |       | 69         | 3.18 | >0.05 | 69                   | 3.18 |       |
| 1            | 584         | 26.89 | 130                 | 5.99  |       | 32         | 1.47 |       | 18                   | 0.83 |       |
| 2            | 232         | 10.68 | 47                  | 2.16  | <0.05 | 9          | 0.41 |       | 5                    | 0.23 | <0.05 |
| 3            | 133         | 6.13  | 19                  | 0.87  |       | 4          | 0.19 |       | 9                    | 0.42 |       |
| 4            | 85          | 3.91  | 15                  | 0.69  |       | 3          | 0.14 |       | 4                    | 0.18 |       |
| 5            | 70          | 3.22  | 6                   | 0.28  |       | 5          | 0.23 |       | 4                    | 0.18 |       |
| Mevsimler    |             |       |                     |       |       |            |      |       |                      |      |       |
| İlkbahar     | 478         | 22.01 | 78                  | 3.59  |       | 11         | 0.51 | >0.05 | 28                   | 1.29 |       |
| Yaz          | 563         | 25.92 | 30                  | 1.38  |       | 46         | 2.12 |       | 23                   | 1.06 |       |
| Sonbahar     | 601         | 27.67 | 125                 | 5.75  | <0.05 | 35         | 1.61 |       | 38                   | 1.75 | >0.05 |
| Kış          | 530         | 24.40 | 127                 | 5.85  |       | 30         | 1.38 |       | 20                   | 0.92 |       |
| Toplam       | 2172        | 100   | 360                 | 16.57 |       | 122        | 5.62 |       | 109                  | 5.02 |       |



**Şekil 1. Rotavirüs ve adenovirüs antijen pozitiflik oranlarının aylara göre dağılımı.**

rak anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ); adenovirüs ve rotavirüs - adenovirüs birlikte pozitifliği için mevsime göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

Yaşa göre viral antijenlerin dağılımını incelendiğinde rotavirüs pozitifliği 0 ve 1 yaş grubu çocuklarda diğer yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Tablo 1). Adenovirüs ve rotavirüs - adenovirüs antijenlerinin birlikte pozitiflik oranları ise 0 yaş grubunda diğer yaş gruplarına göre yüzdesel olarak daha yüksek tespit edilmiştir (Tablo 1). Ancak rotavirüs - adenovirüs birlikte pozitifliğinde 0 yaş grubu için diğer yaşlara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ( $p<0.05$ ); adenovirüs pozitifliğinde yaş grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

## Sonuç

Akut enfeksiyöz gastroenteritler gerek ayakta tedavi gerekse hastaneye yatışların yaygın bir nedeni olup ciddi sosyoekonomik kayıplara yol açmaktadır. Gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere dünya genelini etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir<sup>(11)</sup>. Çocuklarda görülen ciddi gastroenteritlerde en sık görülen etken rotavirüslerdir<sup>(12)</sup>.

Birçok farklı ülkede viral gastroenterit etkenleri üzerine yapılan çalışmalarda pozitiflik oranları rotavirüs için %11-71, adenovirüs için % 2-22,2 ve rotavirüs - adenovirüs birlikte pozitifliği için %1,3-6 olarak bildirilmiştir<sup>(3,5,13-16)</sup>. Ülkemizde bu oranlar genellikle rotavirüs için %9.8-39.8, adenovirüs için %5-15 arası değişmektedir<sup>(3,13,14)</sup>. Gül ve ark.<sup>(5)</sup> rotavirüs görülme sıklığını %25.7; Akıncı ve ark.<sup>(3)</sup>



rotavirüs oranını %13.7, adenovirüs oranını %23 olarak bildirmişlerdir. Bayraktar ve ark.<sup>(17)</sup> sırasıyla rotavirüs ve adenovirüs sıklığını %23.7 ve %1.5 olarak saptamışlardır. Tekin<sup>(13)</sup>'in 12 aylık sürede yaptığı çalışmada %16.7 rotavirüs, %1.0 adenovirüs ve %0.4 rotavirüs ve adenovirüs birlikte pozitiflik oranları tespit edilmiştir. Konya'da 2010-2013 yıllarını kapsayan başka bir çalışmada ise %9.8 rotavirüs, %1.3 adenovirüs ve %1.0 oranında rotavirüs - adenovirüs birlikte pozitifliği belirlenmiştir<sup>(9)</sup>.

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak viral antijen oranları rotavirüs için %16.57 adenovirüs için %5.62 ve rotavirüs - adenovirüs birlikte pozitifliği için %5.02 olarak tespit edilmiştir.

Çocukluk çağındaki akut gastroenteritlerde enfeksiyöz etken ve oluşturduğu klinik tablonun şiddeti yaş, mevsim ve coğrafi bölgelere göre değişkenlik göstermektedir<sup>(3,10)</sup>.

Rotavirüs gastroenteritleri ılıman iklimli bölgelerde sıklıkla sonbahar, kış ve ilkbahar başlarında görülürken, adenovirüs gastroenteritlerinin yazın daha sık görüldüğünü bildiren çalışmalarla birlikte mevsimsel olarak anlamlı dağılım göstermediğini bildiren çalışmalar da vardır<sup>(3,5,13-15,18,19)</sup>. Iraz ve ark.<sup>(12)</sup> yaptıkları bir çalışmada 6749 çocuk hastanın dışkı örneğinde rotavirus antijenini immünokromatografik yöntemle araştırmış ve pozitifliğin kış ve ilkbahar mevsiminde daha sık görüldüğünü tespit etmişlerdir. Tekin, yaptığı çalışmada, rotavirüs antijen pozitifliğini sonbaharda diğer mevsimlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulurken, adenovirüs ve rotavirüs - adenovirüs antijenlerinin birlikte pozitifliğini sonbaharda diğer mevsimlere göre sadece yüzdesel olarak yüksek saptamıştır<sup>(13)</sup>.

Çalışmamızda viral antijen pozitifliklerinin mevsimlerle olan ilişkisi incelendiğinde rotavirüsün sonbahar ve kışın daha sık görüldüğü ve bu sıklığın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Adenovirüsün ise oransal olarak yazın daha fazla olduğu tespit edilmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Rotavirüs ve adenovirüsün etken olduğu gastroenteritler daha çok 2 yaş altı çocuklarda görülmekte ve sıklığı yaşla beraber giderek azalmaktadır<sup>(9,13,17,20)</sup>. Akıncı ve ark.<sup>(3)</sup> çalışmalarında 2 yaş altı grupta rotavirüs antijen pozitifliğini %52.4 olarak bildirmişlerdir. Iraz ve ark.<sup>(12)</sup> 0-5 yaş arası çocuklar içinde rotavirüs antijen pozitifliğini en yüksek 13-24 aylık (%23) grupta saptamışlardır. Gültepe ve ark.'nın<sup>(10)</sup> yaptığı çalışmada rotavirüs en sık 0-1 yaş (%42) ile 1-2 yaş (%27) çocuklarda saptanırken, adenovirüs en sık 0-1 yaş (%47) ve 1-2 yaş (%23) çocuklarda tespit edilmiştir.

Çalışmamızda viral antijen oranlarının yaşa göre dağılımı incelendiğinde rotavirüs pozitifliği 0 ve 1 yaş grubu çocuklarda diğer yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Adenovirüs pozitifliği 0 ve 1 yaşlarında daha sık görülse de yaş grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Yapılan çalışmalarda viral gastroenterit sıklığının cinsiyete göre dağılımında çoğunlukla anlamlı bir fark tespit edilmemiştir<sup>(13,15,16)</sup>. Bizim çalışmamızda da viral antijen

pozitiflik oranlarının cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde gruplar arası anlamlı farklılık görülmemiştir ( $p > 0.05$ ).

Sonuç olarak hastanemizdeki rotavirüs enfeksiyon sıklığı, adenovirüs enfeksiyonundan daha fazla olup, gastroenteritli olguların ve viral antijen pozitifliklerinin çok büyük bir kısmını 2 yaş altındaki grup oluşturmaktadır. Çocuklarda gastroenterit yakınması tüm yıl görülebilmekle birlikte sıklığı mevsimlere göre farklı dağılımlar göstermektedir. Akut gastroenteritli hastalarda etkenlerin hızlı bir şekilde sap-tanması hem doğru tedavi olanağı sunup gereksiz antibiyotik kullanımını azaltacak hem de epidemiyolojik verilere katkıda bulunarak gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasına yardımcı olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Akut gastroenterit, adenovirüs, rotavirüs

#### Kaynaklar

1. King CK, Glass R, Bresee JS, Duggan C. Centers for Disease Control and Prevention. Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. MMWR Recomm Rep, 2003;52(RR16):1-16.
2. <https://ourworldindata.org/grapher/causes-of-death-in-children-under-5> (Erişim tarihi: Aralık 2020).
3. Akıncı N, Ercan TE, Yalman N, Eren A, Severge B, Ercan G. Akut gastroenteritli çocuklarda adenovirus ve rotavirus. Çocuk Enf Derg 2007; 1:98-101.
4. Elliott EJ. Acute gastroenteritis in children. BMJ. 2007;334(7583):35-40. <https://doi.org/10.1136/bmj.39036.406169.80>
5. Gül M, Garipardıç M, Çırağıl P, Aral M, Karabiber H, Güler İ. 0-5 yaş arası gastroenteritli çocuklarda rotavirus ve adenovirus tip 40/41 araştırılması. ANKEM Derg 2005;19:64-7.
6. Meral M, Bozdayı G, Özkan S, Dalgıç B, Alp G, Ahmed K. Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus prevalansı, serotip ve elektroferotip dağılımı. Mikrobiyol Bul 2011;45(1):104-12.
7. Langley JM. Adenoviruses. Pediatr Rev. 2005;26(7): 244-9.
8. Ruuskanen O, Meurman O, Akusjärvi G. Adenoviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, (Eds). Clinical Virology. Washington: ASM Press; 2002.
9. Türk Dağı H, Fındık D. Akut gastroenteritli hastalarda rotavirüs ve adenovirüs antijenlerinin araştırılması. J Clin Exp Invest 2014;5:256-260.
10. Gültepe B, Yaman G, Çıkman A, Gündüzoğlu H. Gastroenteritlerinde rotavirüs ve adenovirüs sıklığı. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2012;42(1):16-20.
11. GBD Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet Infect Dis. 2017;17(9):90948. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30276-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1)
12. Iraz M, Ceylan A. Akut gastroenteritli 0-5 yaş arası çocuklarda rotavirüs sıklığı, ANKEM Derg. 2013;27(1):2-6. <https://doi.org/10.5222/ankem.2013.002>
13. Tekin A. Mardin'deki akut gastroenteritli çocuklarda rotavirüs ve enterik adenovirüs sıklığı. Klinik ve Deneysel Araştırmalar Derg. 2010;1(1):41-5.
14. Biçer S, Tunca Şahin G, Koncay B, ve ark. Çocuklarda adenovirus gastroenteritis olgularının sıklığı. Bakırköy Tıp Derg, 2009;5(1):6-10.
15. Yousefi Rad A, Gözalan A. Detection of rotavirus and enteric adenovirus antigens in outpatients with gastroenteritis. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2010;30:174-9.
16. Şimşek Y, Bostancı İ, Bozdayı G, Öner N, Kamruddin A, Rota S. Frequency and serotype features of Rotavirus in 0-5 age children with acute gastroenteritis. Türkiye Klinikleri J Pediatr.

- 2007;16:165-70.
17. Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E. Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus ve adenovirus saptanması. *Klimik Derg.* 2010;23(1):15-7.
  18. Öztürk O, Demir B, Yalçın BM, Ünal M. Birinci basamakta adenovirus enfeksiyonları. *Klinik Tıp Aile Hekimliği Dergisi.* 2014;6(3):21-5.
  19. Bozkurt D, Selimoğlu MA, Otlı B, Sandıkkaya A. Eight different viral agents in childhood acute gastroenteritis. *Turk J Pediatr.* 2015;57(1):68-73.
  20. Pickering LK. Summaries of infectious Diseases, Adenovirus infections. In: Pickering LK Ed. *American Academy of Pediatrics RedBook*, New York: Elk Grove Co, 2003; 90-192.

## COVID-19 Tanısında Farklı Örnek Alım Yöntemlerinin Etkinliklerinin Kıyaslanması

Mert Ahmet Kuşkucu<sup>1</sup>, Seda Salman Yılmaz<sup>5</sup>, Devrim Sarıbal<sup>2</sup>, Sena Alkan<sup>4</sup>, Yusuf Emre Özdemir<sup>4</sup>, İlker İnanç Balkan<sup>4</sup>, Hatice Balkan<sup>4</sup>, Metin Yalçın<sup>4</sup>, Okan Kadir Nohut<sup>3</sup>, Yeşim Tuyji Tok<sup>1</sup>, Kenan Midilli<sup>1</sup>, Gökhan Aygün<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

<sup>2</sup>*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul*

<sup>3</sup>*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul*

<sup>4</sup>*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

<sup>5</sup>*İstanbul Üniversitesi-Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul*

✉ dr.yesimtok@gmail.com

### Giriş

Coronavirus 2019 Hastalığı (COVID-19), 2019 Aralık ayında tanımlanmasından itibaren dünya çapında hızla yayıldı ve Dünya Sağlık Örgütü 235 ülkenin etkilenecek yüz milyondan fazla vakaya, iki milyona yakın ölüme sebep olduğunu açıkladı<sup>(1)</sup>. Yine, 44 ülkede 1000'den fazla hemşirenin öldüğü ve sağlık çalışanları (SÇ) arasında enfeksiyon oranının %10 civarında olduğu bildirilmektedir<sup>(2)</sup>. Hastalığın erkenden tanısının konularak tedavi edilmesi, karantina ve izolasyon stratejilerine uyulması ile virüs bulaşı kısıtlanabilir ve SÇ'nin korunması sağlanabilir. Pandeminin uzamasıyla SÇ artık kişisel koruyucu ekipmalara (KKE) ulaşmakta zorluklar yaşamaya başlamıştır. Ayrıca COVID-19'u hastadan hastaya ya da ailelerine taşıyarak yaşlı ya da ek hastalığı mevcut kişileri riske atmak gibi güvenlik endişeleri yaşamaktadırlar<sup>(3)</sup>. COVID-19 gibi salgın hastalıklarda SÇ her zaman bulaş için kolay hedef olmaktadır, bu yüzden onların korunması virüsün hızlı yayılımını önleme ve sağlık hizmetlerinin devamlılığı için vazgeçilmezdir<sup>(4)</sup>. Diğer yandan, poliklinik şartlarında orta burundan örnek almak yada tükürük örneği vermek daha kolaydır ve bu yöntemlerle hapşırma, öksürme, öğürme gibi virüs yayılımı açısından risk oluşturacak aerosol ve havada asılı kalan damlacıkların oluşumuna neden olan reflekslerin uyarılmasının önüne geçilebilir. Son çalışmalar da SARS-CoV-2'nin saptanmasında nazofaringeal olmayan örneklerin de geçerli olduğunu destekler niteliktedir ve kişinin kendisinden örnek alması ile hem KKE sarfı azalacak hem de SÇ'nin hastalarla yakın teması azaltılarak onların da hastalanmasının önüne geçilebilecektir<sup>(5-7)</sup>.

Günümüzde, COVID-19 hastalık tanısı üst solunum yollarından alınan örneklerde SARS-CoV-2'nin real-time RT-PCR (gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) testi ile saptanmasıyla konulmaktadır<sup>(8)</sup>. Bu çalışmada, SÇ'nin virüsle karşılaşma riskini azaltacak, hem tanı için kullanılan test hem de KKE sarfını azaltacak bir yöntem olarak tükürük örneği verme, kişinin kendisinden boğaz ve burun sürüntü örneği alması ile standart SÇ tarafından nazofaringeal sürüntü örnek alım yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

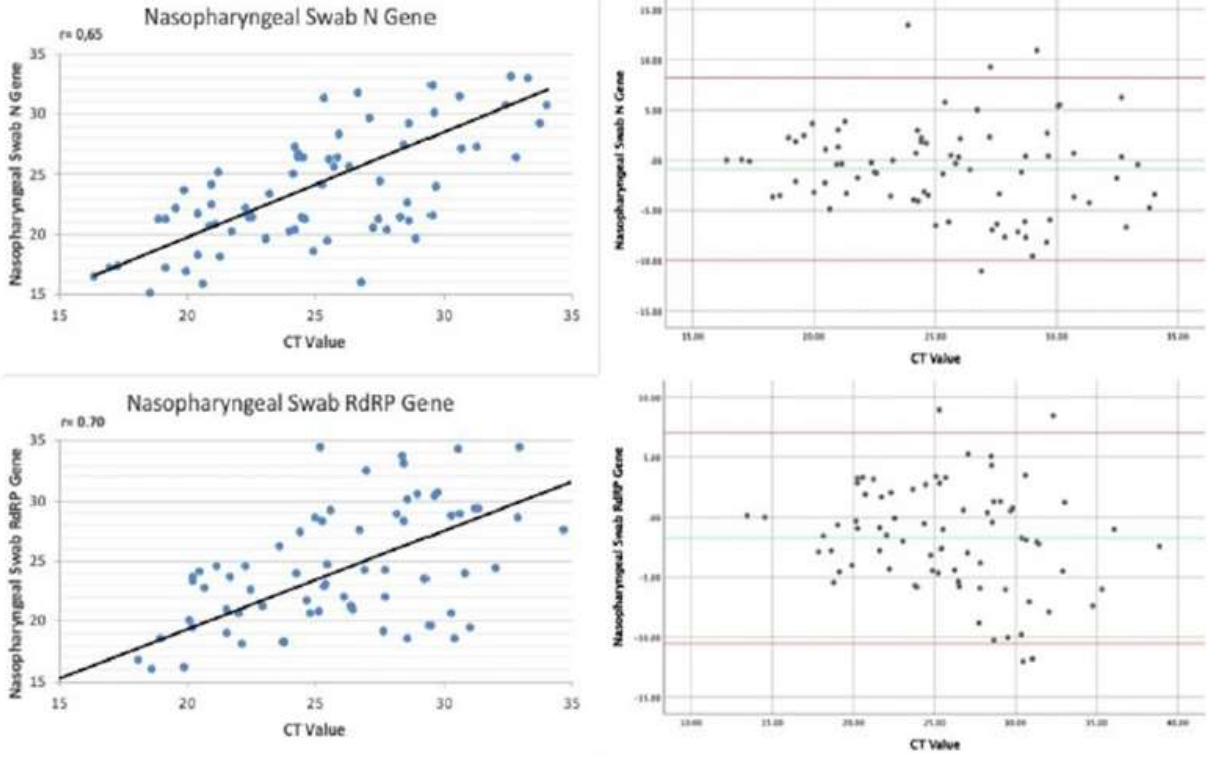
### Gereç ve Yöntem

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (dosya karar no:83045809-604.01.02) alınarak ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırmalar Fonu desteği ile gerçekleştirilmiştir.

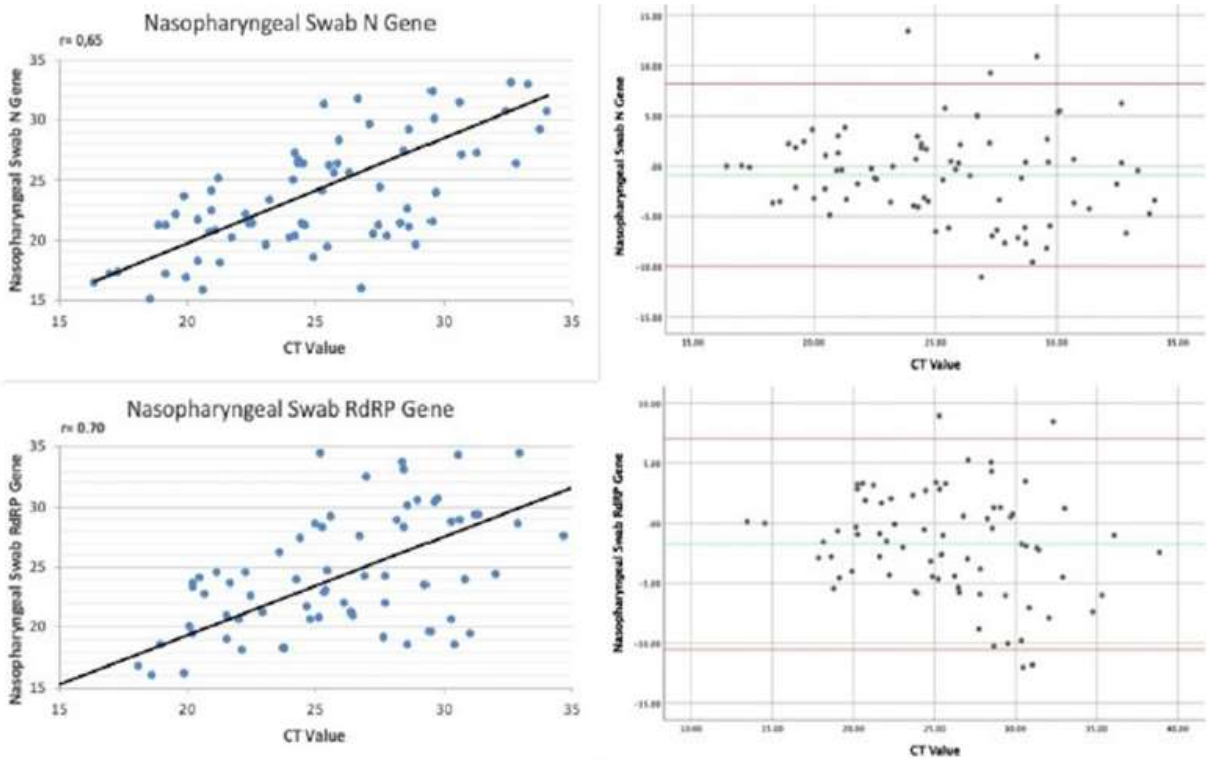
**Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi:** İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde COVID-19 tespiti için çalışmaya katılmayı kabul eden 18-65 yaş aralığındaki 132 gönüllüden onamları alındı. Aynı hastaya ait üst solunum yolu örnekleri; I. Standart sağlık çalışanı tarafından örnek alma işlemi (boğaz-burun sürüntü örneği), II. Tükürük örneği alma, III. Hastanın kendi kendisinden örnek alması (burun sürüntü örneği) şeklinde olmak üzere üç farklı şekilde numune toplandı. Çalışmaya katılan gönüllülere kendilerinden örnek almaları öncesi SÇ tarafından nasıl örnek alacakları izah edildi. Nazofaringeal ve orofaringeal örnek-

**Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen gönüllülerin demografik ve klinik özellikleri.**

| Çalışmaya dahil edilen toplam olgu sayısı (n=132) |              |
|---------------------------------------------------|--------------|
| COVID-19, n (%)                                   | 80 (60.6)    |
| Yaş, ortalama (±SD)                               | 38,0 (±12.5) |
| Cinsiyet (kadın/erkek)                            | 60/72        |
| Temas öyküsü, n (%)                               | 81 (61.4)    |
| Sigara öyküsü, n (%)                              | 42 (31.8)    |
| Sağlık çalışanı, n (%)                            | 10 (7.6)     |
| Ko-morbidite                                      |              |
| Hipertansiyon                                     | 13 (9.8)     |
| Diyabet                                           | 15 (11.4)    |
| Astım                                             | 8 (6.1)      |



Şekil 1. Hastaların kendilerinden örnek alması ile standart örnek alım yönteminin Ct değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 2. Hastaların tükürük örneği vermesi ile standart örnek alım yönteminin Ct değerlerinin karşılaştırılması.

ler viral transport mediyuma alınırken, tükürük örneği steril kaplara alındı. Gönüllülere ait klinik ve demografik veriler (yaş cinsiyet, semptomlar, ko-morbidite, eşlik eden enfeksiyon vb) kaydedildi. Alınan 3 örnekten yapılan virus izolasyonu (GENEALL RNA izolasyon kiti) işlemi sonrası SARS-CoV-2 ORF 1ab ve N gen bölgelerini hedef alan amplifikasyon (GeneMark Real-Time kiti, USA) CFX96 Real-Time sisteminde (Biorad, Hercules, CA, USA) değerlendirildi. Elde edilen Ct (Cycle of Threshold) değerleri örneklerin pozitiflik oranlarının karşılaştırılması amacıyla analiz edildi.

**İstatistiksel Değerlendirme:** İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS-21 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Kantitatif değişkenler için elde edilen veriler ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Kategorik değişkenler yüzde (%) ve sıklık olarak ifade edildi. Kalitatif değişkenlerin karşılaştırması Pearson ki-kare testi ile değerlendirildi. Parametrik verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov ve Kurtosis-Skewness testleri ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren parametrik veriler Student's t-testi ile değerlendirildi. Sürekli değişkenler Kruskal Wallis testi ile analiz edildi. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi ve anlamlılık  $p < 0.05$  olarak ifade edildi.

#### Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 60'ı kadın ve 72'si erkek 132 gönüllünün yaş ortalaması  $38.0 (\pm 12.5)$  idi, semptomlar virüsle karşılaşmadan ortalama 2-5 gün sonra başlarken en sık görülen semptomlar sırasıyla halsizlik, myalji, baş ağrısı, boğaz ağrısı ve öksürüktü (Tablo 1).

SARS-CoV-2 test sonuçları değerlendirildiğinde hastaların kendilerinden aldıkları örneklerin, sağlık çalışanları tarafından alınanlar kadar geçerli olduğu ve Ct değerlerinin de birbiriyle korele olduğu görüldü (Şekil 1, Şekil 2).

#### Sonuç

COVID-19 pandemi döneminde, hastaların kendi kendile-

rinden örnek almalarının sağlık çalışanlarının korunması, halka açık alanlarda daha pratik şekilde örnek alınımının sağlanması ve kişisel koruyucu ekipmanlarının sarfının azaltılması için yararlı bir yaklaşım olacağı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** COVID-19, duyarlılık, özgüllük, sağlık Çalışanı, Kişisel Koruyucu Ekipman.

#### Kaynaklar

1. World Health Organization. Novel coronavirus—Globally. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/> (Erişim tarihi: 20 Ekim 2020)
2. [https://www.icn.ch/system/files/documents/2020-09/Analysis\\_COVID.pdf](https://www.icn.ch/system/files/documents/2020-09/Analysis_COVID.pdf). (Erişim tarihi: 14 Eylül 2020)
3. The Lancet. COVID-19: Protecting health-care workers. Lancet. 2020;395(10228):922. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30644-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30644-9)
4. Malhotra N, Gupta N, Ish S, Ish P. COVID-19 in intensive care. Some necessary steps for health care workers. Monaldi Arch Chest Dis. 2020;25:90(1). <https://doi.org/10.4081/monaldi.2020.1284>
5. Qian Y, Zeng T, Wang H, Xu H, Chen J, Hu N, Chen D, Lui Y. Safety management of nasopharyngeal specimen collection from suspected cases of coronavirus disease 2019. International Journal of Nursing Sciences 7(2):153-156. <https://doi.org/10.1016/j.ijnss.2020.03.012>
6. World Health Organization Interim guidance. Infection prevention and control during health care when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected. [https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected-20200125](https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected-20200125) (Erişim tarihi: 19 Mart 2020)
7. Emergency General Hospital. Manual for prevention and control of novel coronavirus Pneumonia. [http://www.xinhuanet.com/politics/2020-01/28/c\\_1125508409.htm](http://www.xinhuanet.com/politics/2020-01/28/c_1125508409.htm) (Erişim tarihi: 08 Mayıs 2020)
8. Tu YP, Jennings R, Hart B, et al. Swabs collected by patients or health care workers for SARS-CoV-2 testing. N Engl J Med. 2020;383(5):494-6. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2016321>



## COVID-19 Geçiren Sağlık Çalışanlarının Antikor Düzeylerinin Periyodik Değerlendirilmesi

Yeşim Tuyji Tok<sup>1</sup>, Mert Ahmet Kuşkucu<sup>1</sup>, Devrim Sarıbal<sup>2</sup>, Seda Salman Yılmaz<sup>1</sup>,  
Okan Kadir Nohut<sup>4</sup>, Gökhan Aygün<sup>1</sup>, Kenan Midilli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

<sup>2</sup>*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul*

<sup>3</sup>*İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, İstanbul*

<sup>4</sup>*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul*

✉ kuskucum@gmail.com

### Giriş

Aralık 2019'da, Çin'in Wuhan şehrinde ilk tespitinden bu yana, koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) etkeni olan ağır solunum sendromu koronavirüsü 2 (SARS-CoV-2), tüm kıtalara insandan insana bulaşarak yayılmıştır ve artık bir pandemi olarak kabul edilmektedir<sup>(1-4)</sup>. SARS-CoV-2 zoonotik, pozitif polariteli bir RNA virüsü olup, viral enfeksiyon ve replikasyonda rol oynayan diken (S), zarf (E), membran (M), nükleokapsid (N) başta olmak üzere yapısal ve ayrıca 16 yapısal olmayan proteinleri mevcuttur. SARS-CoV-2 enfeksiyonu bu proteinleri hedef alan antikorların üretimini de kapsayan bir immün yanıt başlatır ki oluşan antikorlar aylarca plazmada saptanır düzeyde kalır, virüs antijenlerine hızlı ve kuvvetli şekilde bağlanarak hücrel infiltrasyonu ve replikasyonu bloke ederler<sup>(5-8)</sup>. SARS-CoV-2 antijenlerinden kısa bir süre sonra, ortalama 1-3 hafta içinde, anti-SARS-CoV-2 Ig M ve Ig G sınıfı antikorlar serolojik olarak plazmada saptanır düzeye ulaşır<sup>(9-12)</sup>. Anti-SARS-CoV-2 total antikor düzeyi ölçümü ve dinamik olan titrenin periyodik takibi, popülasyondaki virüsle karşılaşma ve enfeksiyon oranının belirlenmesi gibi epidemiyolojik çalışmalarda kullanılması yanı sıra hastalığın ağırlığı ve tekrar enfeksiyon geçirme riski konusunda da ipucu sağlar<sup>(13)</sup>.

Bu çalışmada COVID-19 hastalığı geçirmiş sağlık çalışanlarında oluşan total antikor düzeylerinin periyodik olarak ölçümüyle antikorların kaybolma zamanının tayini, reenfeksiyon riski ve aşılama zamanının öngörülmesi amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde görevli, RT-PCR ve/veya klinik olarak COVID-19 hastalık tanısı almış, 123 gönüllü (63 kadın, 60 erkek) onamları alınarak dahil edildi. Hastalardan, COVID-19 tanısından 30-45 gün sonra (akut dönemde), 3. ve 6. aylarda alınan venöz kan örneklerinin santrifüjü sonrası ayrılan 0.5 ml plazmada SARS-CoV-2 N antijenine karşı oluşan total antikor düzeyi ECLIA (Elecsys Anti-SARS-CoV-2, Roche) Cobas e-601 cihazında ölçüldü. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda >1 COI üzeri değerler reaktivite olarak değerlendirildi. Çalışma verilerinin istatistiksel analizler için "Statistical

Package for Social Sciences (SPSS) 22.0" programı kullanıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyumu Shapiro-Wilk testi ile analiz edildi. Grup varyanslarının homojenliği Levene's testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren ve grup varyanslarının homojen olduğu parametrelerde iki grup ortalaması arasındaki farkın anlamlılığı Student's t-testi ile değerlendirildi, sonuçlar ortalama ve standart sapma ile ifade edildi. Parametrik olmayan verilerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis testi kullanıldı, sonuçlar medyan ve 1.-3. çeyrek değerleri (medyan, Q1-Q3) olarak ifade edildi. Spearman korelasyon analizi ile değişkenler arasındaki ilişkilere bakıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık p<0.05 düzeyinde değerlendirildi.

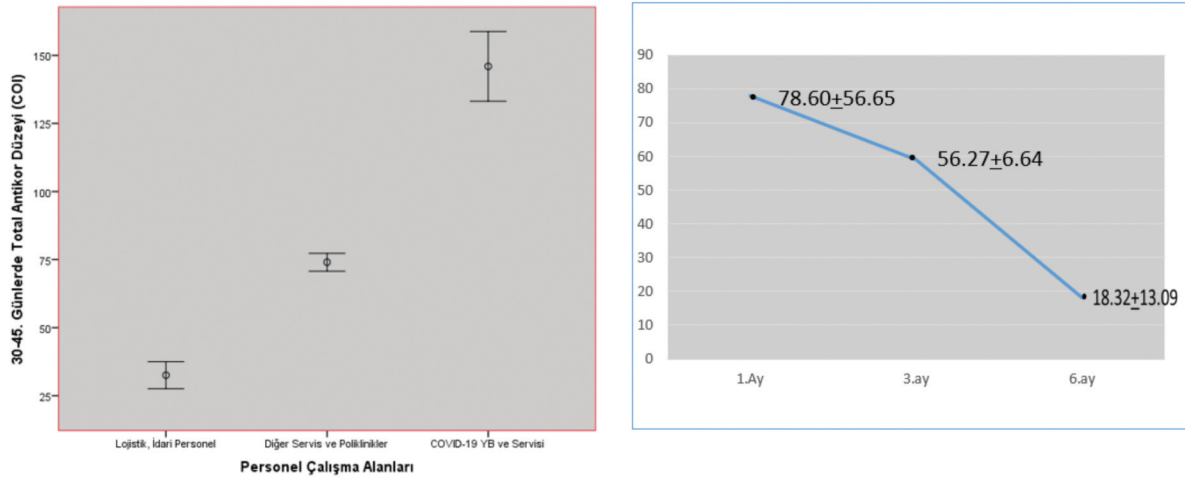
### Bulgular

Çalışmaya dahil edilen yaş ortalaması 37.8 (+4.54) 123 olgunun 17'sinde (%13.8) RT-PCR ile pozitiflik saptanmış, klinik+radyolojik olarak tanı konmuştur. Çalışma verileri değerlendirildiğinde; en yüksek titrelere semptomların başlangıcından 4-6 hafta sonra ulaşıldığı (78.60+56.65) ve özellikle 6 aydan sonra anlamlı düşüş (18.32+13.09) izlendiği görüldü. Çalışmaya dahil edilen olgular, yoğun bakım ve COVID-19 servisi gibi yüksek virüs yükü mükerrer karşılaşma riski mevcut alanlarda görevli sağlık çalışanları, diğer servislerde ve polikliniklerde çalışanlar ve COVID-19 hastaları ile karşılaşma riski düşük çalışanlar (lojistik, idari vb görevlerde bulunanlar) olarak üç grupta değerlendirildi. SARS-CoV-2 N bölgesine karşı oluşan antikorların plazmada diğerlerinden daha önce kaybolmasına rağmen, özellikle risk alanlarda çalışanlarda antikor seviyelerinin daha yüksek seviyede ve daha uzun süre saptanmaya devam ettiği dikkat çekti (p<0.02) (Şekil 1).

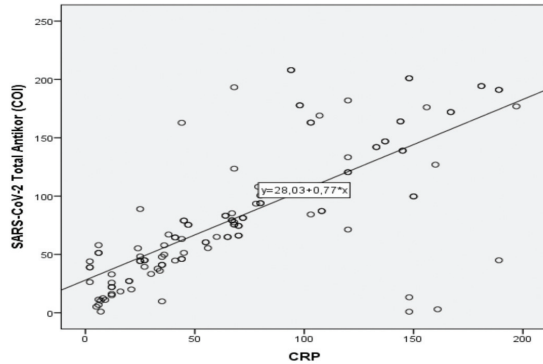
Hastaneye yatış gereken, radyolojik bulguların eşlik ettiği ve CRP, D-dimer gibi hastalığın prognozuyla ilişkili laboratuvar parametrelerin daha yüksek seyrettiği hastalarda antikor seviyelerinin yine daha uzun süre ve yüksek saptandığı görüldü (r=0.64, p>0.02) (Şekil 2).

### Sonuç

Çalışmada COVID-19 hastalığının ağırlığı ile oluşan antikor seviyesi ve dolaşımda saptanma süresinin ilişkili olduğu,



**Şekil 1.** Hastane personelinin çalışma alanlarına göre SARS-CoV-2 total antikor düzeylerinin karşılaştırılması ve periyodik takipte düzeylerin değişimi.



**Şekil 2.** SARS-CoV-2 total antikor düzeyleri ile serum CRP değerleri arasındaki pozitif ilişki.

belirli aralıklarla antikor titrlerinin takibinin kişilerin yeni den enfeksiyon geçirme riskinin başlayacağı ve aşılama ihtiyacının doğacağı sürenin belirlenmesinde yol gösterici olacağı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Antikor, ECLIA, SARS-CoV-2

#### Kaynaklar

1. Del Rio C, Malani PN. COVID-19: new insights on a rapidly changing epidemic. *JAMA*. 2020;323(14):1339-40. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3072>
2. Sharfstein JM, Becker SJ, Mello MM. Diagnostic testing for the novel coronavirus. *JAMA*. 2020;323(15):1437-8. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3864>
3. Huang G, Zeng W, Wang W, et al. Triaging patients in the outbreak of the 2019 novel coronavirus. *medRxiv*. 2020; 2020.03.13.20035212. <https://doi.org/10.1101/2020.03.13.20035212>
4. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *Nature*. 2020;579:270-3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

5. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Db Syst Rev*. 2020;6(6):CD013652. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>
6. The National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(12):1390-400. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30634-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30634-4)
7. Wellinghausen N, Plonné D, Voss M, Ivanova R, Frodl R, Deininger S. SARS-CoV-2-IgG response is different in COVID-19 outpatients and asymptomatic contact persons. *J Clin Virol*. 2020;130:104542. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104542>
8. Fafi-Kremer S, Bruel T, Madec Y, et al. Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France. *EBioMedicine*. 2020;59:102915. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102915>
9. Suhandynata RT, Hoffman MA, Kelner MJ, McLawhon RW, Reed SL, Fitzgerald RL. Longitudinal monitoring of SARS-CoV-2 IgM and IgG seropositivity to detect COVID-19. *J Appl Lab Med*. 2020;5(5):908-20. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa079>
10. Xiang F, Wang X, He X, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020;71(8):1930-4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa461>
11. To KK, Tsang OT, Leung W, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(5):565-74. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
12. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(6):845-8. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>
13. Adams ER, Ainsworth M, Anand R, et al. Antibody testing for COVID-19: A report from the National COVID Scientific Advisory Panel. *Wellcome Open Res*. 2020;5:139. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15927.1>

# Isparta İlinde Kadınların Servikal Sürüntü Örneklerinde HPV DNA Genotiplerinin Dağılımı

**Tuğba Ayvalık, Gülşah Kaygısız, Mümtaz Cem Şirin, Emel Sesli Çetin,  
Buket Cicioğlu Arıdoğan, Server Yağcı**

*Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta*

✉ tuubaayvalik@gmail.com

## Giriş

İnsan papilloma virüsü (HPV), papillomaviridae ailesinde bulunmaktadır. Papillomaviridae ailesinde on iki cins yer almaktadır. Bunlar alfa, beta, gamma, mu ve nu cinsleri ile bunların dışında kalan ve hayvan papilloma virüsleri oluşturan yedi cinsi içermektedir<sup>(1)</sup>. Alfa papilloma cinsi, en büyük grup olup, bu grupta mukozayı enfekte eden tipler ile deride yaygın siğillere sebep olan kutanöz tipler yer almaktadır. Bu virüsler 50–55 nm çapında zarfsız, çift sarmallı, ikozahedral nükleokapsitli ve proteinle çevrili DNA genomu içermektedirler<sup>(2,3)</sup>. HPV birçok şekilde bulaşmaktadır; kontamine yüzeylerden, ciltteki lezyonlardan ve doğum kanalından olmak üzere direkt veya indirekt olarak bulaş görülmektedir<sup>(4)</sup>. Ancak en önemli bulaş şekli cinsel yolla bulaştır<sup>(5)</sup>. HPV cinsel temasla bulaşan hastalıklar içinde görülen en sık enfeksiyonlardır. İnsan papilloma virüsü tipleri klinik olarak da üç kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar; kanser açısından düşük riskli HPV'ler (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55 ve 62), olası yüksek riskli HPV'ler (26, 53 ve 66) ve yüksek riskli HPV (hrHPV)'ler (16 ve 18 başta olmak üzere, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82) olarak gruplandırılmaktadırlar<sup>(6)</sup>. Düşük riskli tipler genital siğiller ve düşük dereceli genital anormallikleri içeren benign lezyonlara sebep olur, ancak genital kanserlere yol açmazlar. Yüksek riskli tipler hem düşük hem de yüksek dereceli prekanseröz lezyonlara sebep olurlar<sup>(4)</sup>. Serviks kanseri kadınlarda en sık görülen dördüncü kanser olup, kanser ilişkili ölümlerin önemli kısmını oluşturmaktadır<sup>(7,8)</sup>. HPV ile serviks kanseri arasındaki ilişki ilk kez 1977 yılında zur Hausen tarafından bildirilmiştir. Günümüze kadar yayınlanan birçok epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmalarından elde edilen bilgiler, serviks kanseri gelişimindeki en önemli etken olarak hrHPV tipleriyle persistan enfeksiyonunun olduğunu ortaya koymuştur<sup>(9,10)</sup>. Dünya genelinde, büyük kısmı aşı ile önlenilecek, yılda yaklaşık yarım milyon serviks kanseri olgusunun tanı aldığı düşünülmektedir<sup>(11)</sup>. Servikal kanser tarama testlerinin rutin kullanıma girmesi ile prekanseröz lezyonların tanınması ve erken dönemde hastalığın kontrol altına alınmasına bağlı olarak hastalığın insidansında ve mortalite oranlarında azalma sağlandığı ortaya konulmuştur<sup>(12)</sup>. HPV prevalansının belirlenmesi ve tiplerin dağılımının değerlendirilmesi hem tedavi hem aşılama stratejileri açısından önemlidir. Bu çalışmada rutin kontroller için hastanemize başvuran kadınlarda hrHPV pozitifliğinin retrospektif olarak araştırılması ve Isparta bölgesinde yaşa bağlı olarak hangi tiplerin sıklıkla görüldüğünün belirlenerek tarama ve aşı çalışmalarına kaynak oluşturulması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Ocak 2018-Eylül 2020 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine başvuran kadınların Roche Cell Collection Medium solüsyonu içerisinde Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen servikal sürüntü örnekleri HPV DNA genotiplerini belirlemek için Real-time PCR (Roche Cobas 4800, Roche Diagnostics, Almanya) yöntemiyle çalışıldı. Cobas 4800 HPV test sistemi iki parçadır; nükleik asit ekstraksiyonu ve PCR numune pipetleme otomasyonu için kullanılan bir Cobas x 480 cihazı ve otomatik Real-time PCR amplifikasyonu ve genotip saptama için olan bir Cobas z 480 cihazından oluşur. Kit, HPV 16 ve 18 genotiplerini ayrı ayrı; diğer hrHPV türleri olan 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 genotiplerini aynı havuzda çalışmaktadır. Olguların yaşları ve HPV DNA genotiplerinin dağılımı hastane veri tabanı kullanılarak retrospektif olarak değerlendirildi. Çalışmaya aynı hastaların aynı yıl içindeki tekrarlayan sonuçları dahil edilmemiştir.

## Bulgular

Bu çalışmada toplam 11.222 örnek içerisinde; 2018 yılında 4728 örnekten 210 (%4.4), 2019 yılında 4400 örnekten 337 (%7.7), 2020 yılı Eylül ayına kadar 2094 örnekten 186 (%8.8) olmak üzere 733 (%6.5) HPV DNA pozitifliği saptanmıştır. Birden fazla HPV genotipinin bir arada olduğu 91 (%12.4) hasta tespit edilmiştir. HPV prevalansı dünya genelinde %1.4 ile %25.6 aralığında olarak raporlanmıştır<sup>(13,14)</sup>. Ülkemizdeki farklı bölgelerdeki çalışmalarda HPV DNA pozitiflik oranı %2.7-%8.5 arasında bildirilmiş olup, çalışmamızda elde ettiğimiz oranla benzerdir<sup>(15)</sup>. Hasta yaşına ve tespit edilen HPV genotipine göre HPV DNA pozitifliklerinin dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir. Çalışmalara göre HPV DNA pozitifliği en sık 30-40 yaş aralığında görüldüğü bildirilmiştir<sup>(16,17)</sup>. Bu çalışmada hastalar yaşlarına göre beş gruba ayrılarak incelendiğinde HPV DNA pozitifliğinin en fazla 201 (%27.4) hasta ile 40-49 yaş grubunda, ikinci sıklıkta 194 (%26.5) hasta ile 30-39 yaş grubundadır; en az ise 66 (%9) hasta ile 60 yaş üstü kadınlarda tespit edildiği görülmüştür. Dünyada yapılan birçok çalışmada HPV 16 en sık görülen genotiptir<sup>(18,19)</sup>. Bu çalışmada tüm yaş gruplarında en sık %66.7 oranıyla diğer hrHPV genotipleri, ikinci sırada %17.4 oranıyla HPV 16 genotipi, üçüncü sırada ise %9.1 oranıyla HPV 16 ve diğer hrHPV birlikteliği tespit edilmiştir. Laboratuvarımızdaki kit HPV 16 ve 18 dışındaki diğer hrHPV genotiplerini ayrı ayrı saptayamadığı için en sık diğer hrHPV genotipini tespit ettiğimizi düşünmekteyiz.

**Tablo 1. HPV DNA genotiplerinin yaş gruplarına göre dağılım oranı (tekli ve çoklu enfeksiyonlar dahil).**

|                                      | 20-29 yaş  | 30-39 yaş  | 40-49 yaş  | 50-59 yaş | ≥60 yaş | Tüm yaşlar |
|--------------------------------------|------------|------------|------------|-----------|---------|------------|
| HPV 16 n (%)                         | 23 (3.1)   | 40 (5.5)   | 42 (5.7)   | 16 (2.2)  | 7 (1)   | 128 (17.4) |
| HPV 18 n (%)                         | 2 (0.3)    | 6 (0.8)    | 9 (1.2)    | 6 (0.8)   | 1 (0.1) | 24 (3.3)   |
| Diğer hrHPV* n (%)                   | 97 (13.2)  | 133 (18.1) | 131(17.9)  | 77 (10.5) | 51 (7)  | 489 (66.7) |
| HPV 16 ve HPV 18 n (%)               | 0          | 1 (0.1)    | 0          | 0         | 1 (0.1) | 2 (0.3)    |
| HPV 16 ve Diğer hrHPV* n (%)         | 24 (3.3)   | 10 (1.4)   | 13 (1.8)   | 15 (2)    | 5 (0.7) | 67 (9.1)   |
| HPV 18 ve Diğer hrHPV* n (%)         | 8 (1.1)    | 2 (0.3)    | 4 (0.5)    | 3 (0.4)   | 1 (0.1) | 18 (2.5)   |
| HPV 16, HPV 18 ve Diğer hrHPV* n (%) | 1 (0.1)    | 2 (0.3)    | 2 (0.3)    | 0         | 0       | 5 (0.7)    |
| Toplam n (%)                         | 155 (21.1) | 194 (26.5) | 201 (27.4) | 117 (16)  | 66 (9)  | 733 (100)  |

\*Diğer hrHPV genotipleri: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

Birden fazla HPV DNA pozitifliğinin görüldüğü genotipler en fazla diğer hrHPV ve HPV 16 genotiplerinin birlikteliği-ken, en az birliktelikse HPV 16 ve 18 genotiplerinde görül-müştür.

## Sonuç

Kadın popülasyonunun yaklaşık %80'i yaşamları boyunca HPV ile karşılaşmaktadır. Cinsel olarak aktif kişiler arasında özellikle de genç kadınlar arasında hrHPV yaygındır. Gelişmiş ülkelerdeki başarılı tarama programlarıyla morta-lite oranları önemli derecede düşürülmüştür. Önlenabilir kanser olarak düşünülen serviks kanseri taramalarında HPV DNA'nın erken dönemde saptanması, HPV tiplerinin belirlenmesi büyük önem taşır. HPV genotiplerinin dağılı-mını belirlemek servikal kanser için prognostik ve terapötik değere sahiptir. Servikal kanser hrHPV'nin persistan enfeksi-yonu ile geliştiği için tarama programlarına hrHPV taramasını eklemek programın etkinliğini artırır<sup>(8)</sup>. Yapılan çalışmalar HPV prevalansının ve genotip dağılımının coğra-fik farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur<sup>(20)</sup>. Her hasta-nenin ve ilin epidemiyolojik verilerini ortaya koyması önemlidir. Ülkemizde hrHPV prevalansını belirlemek için hrHPV hakkında daha fazla ve kapsamlı veriye ihtiyaç var-dır. Aşılar, HPV ile ilişkili hastalıkların küresel yükünü azalt-mak için geliştirildiğinden, aşıların uygulanması için de HPV genotiplerinin dağılımının belirlenmesi çok önemlidir. Çalışmamızda 30-49 yaş arası kadınlarda tespit etmiş oldu-ğumuz yüksek pozitiflik oranları özellikle cinsel yaşamdan önce olan bireylerin tarama ve aşılmasının önemini des-teklemektedir.

**Anahtar kelimeler:** Epidemiyoloji, HPV DNA, servikal sürüntü

## Kaynaklar

1. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classi-fication of human papillomavirus types associated with cervi-cal cancer. N Engl J Med. 2003;348(6):518-27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>

2. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studi-es to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002;2(5):342-50. <https://doi.org/10.1038/nrc798>
3. Ramael M, Gudleviciene Z, Didziapetriene J. Natural history and biological behaviour of human papillomavirus: implicati-ons for cervical cancer screening. Acta Med Litu. 2004;11(3):1-7.
4. Milde-Langosch K, Riethdorf S, Löning T, et al. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical imp-lications. Virchows Arch. 2000;437(3):227-33. <https://doi.org/10.1007/s004280000234>
5. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to can-cer. Biochem Soc Trans 2007;35(Pt 6):1456-60. <https://doi.org/10.1042/BST0351456>
6. Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. Cancer. 2007;111(1):1-14. <https://doi.org/10.1002/cncr.22425>
7. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major pat-terns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136(5):E359-86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
8. Kaleli İ, Aksoy L, Demir M, ve ark. Jinekoloji polikliniğine baş-vuran hastalarda insan papillomavirüs prevalansı ve genotip dağılımı. Mikrobiyol Bul. 2019;53(2):170-8. <https://doi.org/10.5578/mb.67765>
9. Roden RB, Ling M, Wu TC. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. Hum Pathol. 2004;35(8):971-82. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.04.007>
10. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: followup of four European randomized controlled trials. Lancet. 2014;383(9916):524-32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62218-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62218-7)
11. World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization (BLT). 2006;84(2):84-9.
12. Whitlock EP, Vesco KK, Eder M, Lin JS, Senger CA, Burda BU. Liquid-based cytology and human papillomavirus testing to screen for cervical cancer: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med. 2011;155(10):687-97. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-10-201111150-00376>
13. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in

- low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(5):1157-64.  
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0812>
14. International Agency for Research on Cancer (IARC). Summary of data reported and evaluations: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses. Lyon: World Health Organization. 2007;90:465-77.
  15. Guckan R, Kilinc C, Gozdemir E, Gurcaglar AA, Nergiz O. Prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus in Amasya region, Turkey. *Biomed Res.* 2016;27(3):769-72.
  16. Akay E, Tekelioğlu F, Karaman H. Original article concordance of the frequency, typing, and results of high risk human papilloma virus in cervical cytology materials with biopsy: Retrospective analysis of 5604 patients. *Ann Med Res.* 2019;26(2):180-4.  
<https://doi.org/10.5455/annalsmedres.2018.09.177>
  17. Senapati R, Nayak B, Kar SK, Dwibedi B. HPV Genotypes distribution in Indian women with and without cervical carcinoma: Implication for HPV vaccination program in Odisha, Eastern India. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):30.  
<https://doi.org/10.1186/s12879-016-2136-4>
  18. Gultekin M, Zayifoglu Karaca M, Kucukyildiz I, et al. Initial results of population based cervical cancer screening program using HPV testing in one million Turkish women. *Int J Cancer.* 2018;142(9):1952-8.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.31212>
  19. Wu C, Zhu X, Kang Y, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection among women in Fujian, China. *BMC Public Health.* 2017;18(1):95.  
<https://doi.org/10.1186/s12889-017-4651-7>
  20. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: A meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(7):453-9.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70158-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70158-5)



## SARS-COV-2 RT-PZR Pozitif COVID-19 Hastalarının Solunum Yolu Tekrar Örneklerindeki RT-PZR Sonuç Dinamikleri

Sibel Gümüş, Bora Doğan, Bayhan Bektöre, Mehmet Ekingen,  
Elif Bilge Uysal, Ayşegül Gözalan

Alaaddin Keykubat Üniversitesi Alanya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Antalya

✉ sibelgumush@gmail.com

### Giriş

Aralık 2019'da SARS-CoV-2'nin ortaya çıkmasından bu yana, virüsü ve virüsün neden olduğu COVID-19 (Koronavirüs hastalığı 2019) hastalığının klinik seyrini karakterize etmek için yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Çalışmamızda, Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) testi ile SARS-CoV-2 taşıdığı saptanan kişilerin tekrarlayan test sonuçlarının; testler arasında geçen süre ile pozitiflik oranları ve CT (cycle threshold) değerleri arasındaki ilişki yönünden değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmaya, Nisan - Aralık 2020 tarihleri arasında COVID-19 hastalığı tanısı SARS-CoV-2 RT-PZR test pozitifliği ile doğrulanan ve ilk tanıyı takip eden 1-20. günlerde en az bir kez RT-PZR testi tekrarlanan 724 kişi dahil edilmiştir. Çalışılan tüm örnekler, kombine (nazofarengeal + orofarengeal) sürüntü örneğidir. Solunum yolu örneklerinde SARS-CoV-2 varlığı, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından gönderilen RT-PZR kiti Biospeedy SARS CoV-2 RT-qPCR (Bioeksen, İstanbul, Türkiye) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda araştırılmıştır. CT değeri 38 ve daha düşük olan örnekler pozitif olabileceği yönünde değerlendirilmiştir. Verilerin analizinde SPSS (ver 23.0, ABD) istatistik programı kullanılmıştır.

### Bulgular

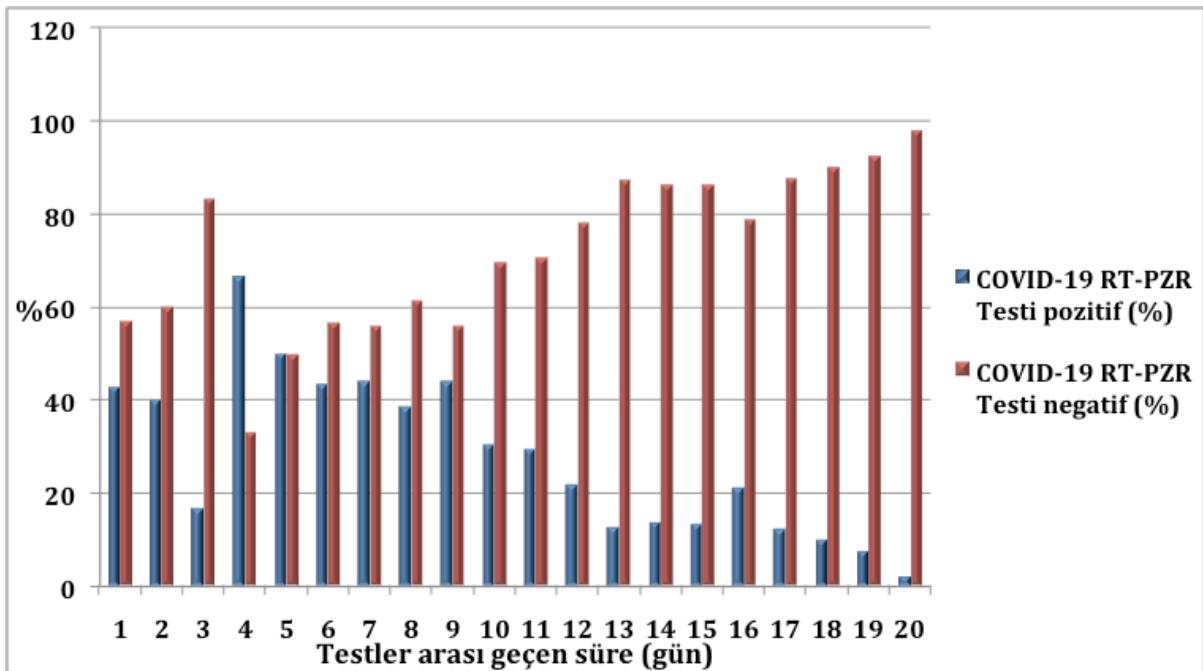
Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması 38.6 (SD=15.4)'dır. Kadın/erkek oranı 0.7/1'dir. COVID-19 RT-PZR testi pozitif saptanan 34 hastanın tekrar örnekleri 1-4. günler arasında alınmış olup bu örneklerdeki pozitiflik oranları %16.7-66.7 arasında değişmektedir (Tablo 1). İlk dört günde tekrar edilen testlerin pozitiflik oranlarındaki dalgalanmanın, hastadan örneğin uygun şekilde alınmaması, örneğin enfeksiyonun çok erken ya da geç evresinde alınması, örneğin transportu veya işlem sürecindeki olumsuzluklar, virüsün semptomatik ve asemptomatik vakalarda dalgalı saçılım göstermesi veya test ile ilgili teknik nedenlerden dolayı olabileceği düşünülmüştür. Bu dönemde negatif raporlanan testlerin çoğu (%58) kurum tarama, yurtdışı çıkış, askere alım gibi tarama amaçlı örnek alınan kişilere aittir. Çalışma grubundaki 690 hastanın test tekrarı 5-20. günler arasında yapılmıştır. Pozitiflik oranının beşinci günden itibaren düşüş eğilimi gösterdiği, 20. günde %2'ye

indiği görülmüştür (Şekil 1). 5-10. günler arası tekrar örnek verenlerde pozitiflik oranı (%39), 11-14. günler (%18.6) ile 15-20. günlerde (%11.1) tekrar örnek verenlerin pozitiflik oranlarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p=0.001$ ). Elli iki hastanın ikinci örneklerinin CT değerleri ile test tekrar günleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. 5-10. günlerde test edilen örneklerin CT değerleri ortalaması (30.7; SD=3.8), 11-14. günlerde test edilen örneklerin CT değerleri ortalamasından (33.2; SD=3.3) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ( $p=0.022$ ).

Tablo 1. Solunum yolu örneklerinde COVID-19 RT-PZR test sonuçlarının testler arası geçen sürelerle göre dağılımı.

| RT-PZR test tekrar günü | COVID-19 RT-PZR Test Sonucu |    |         |    |
|-------------------------|-----------------------------|----|---------|----|
|                         | Pozitif                     |    | Negatif |    |
|                         | Sayı                        | %  | Sayı    | %  |
| 1                       | 6                           | 43 | 8       | 57 |
| 2                       | 2                           | 40 | 3       | 60 |
| 3                       | 1                           | 17 | 5       | 83 |
| 4                       | 6                           | 67 | 3       | 33 |
| 5                       | 4                           | 50 | 4       | 50 |
| 6                       | 10                          | 43 | 13      | 57 |
| 7                       | 18                          | 44 | 23      | 56 |
| 8                       | 10                          | 38 | 16      | 62 |
| 9                       | 11                          | 44 | 14      | 56 |
| 10                      | 20                          | 30 | 46      | 70 |
| 11                      | 22                          | 29 | 53      | 71 |
| 12                      | 12                          | 22 | 43      | 78 |
| 13                      | 9                           | 13 | 61      | 87 |
| 14                      | 13                          | 14 | 82      | 86 |
| 15                      | 8                           | 14 | 51      | 86 |
| 16                      | 7                           | 21 | 26      | 79 |
| 17                      | 3                           | 13 | 21      | 88 |
| 18                      | 2                           | 10 | 18      | 90 |
| 19                      | 2                           | 8  | 24      | 92 |
| 20                      | 1                           | 2  | 43      | 98 |
| Toplam                  | 167                         |    | 557     |    |

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır; örneklerin semptomların başlangıcında alındığı tahmin edilse de, hastalığın hangi evresinde alındığı bilinmemektedir, hastaların immün durumu, aldıkları tedavi ve hastalığın şiddeti bilinmemektedir. Ayrıca CT değerleri nisbeten kısıtlı hastada araştırılabilmektedir.



Şekil 1. Solunum Yolu Örneklerinde COVID-19 RT-PZR test sonuçlarının testler arası geçen süreler göre dağılımı.

## Sonuç

Çalışmamızda, SARS-CoV-2 RT-PZR testi pozitif saptanıp yeni solunum yolu örneklerinden tekrar edilen testlerde pozitiflik oranının dördüncü günde en yüksek olduğu, ileri ki günlerde düşme eğiliminde olup 20. günde %2'ye indiği görülmüştür. Yapılan araştırmalarda üst solunum yollarında SARS-CoV-2 viral yükünün en yoğun olarak semptom başlangıcında veya hastalığın ilk haftasında saptandığı ve ardından azaldığı belirtilmekte, ciddi hastalığı olanlarda viral saçılımın daha uzun sürebileceği ifade edilmektedir<sup>(1,2)</sup>. Xiao ve ark.<sup>(3)</sup> çalışmalarında, yaşlı hastalarda viral saçılımın daha uzun sürdüğünü tesbit etmişlerdir. Çalışmamızda 11-14. günlerde çalışılan testlerin CT değerlerinin ortalaması (33.2) ile 5-10. günlerde çalışılan testlerin CT değerlerinin ortalaması (30.7) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu yani viral yükün belirgin derecede düştüğü gözlenmiştir (p=0.022). Singanayagam ve ark.<sup>(4)</sup> solunum yolu örneklerinde RT-PZR testi ile SARS-CoV-2 saptanan örneklerde testin CT değeri ile virüsün kültürde üretilebilirliğini karşılaştırmışlar ve CT değeri 35'in üzerinde olan örneklerin ancak %8.3'ünde virüsün kültürde üretilebildiğini tesbit etmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca virüsün kültürde üretilebilme ihtimalinin semptomlar başladığında en üst seviyede olduğu ve 10 gün sonra %6'ya düştüğü belirtilmektedir<sup>(4)</sup>.

Sonuç olarak, bazı COVID-19 hastalarında uzamış viral RNA varlığı görülebilir ancak bu durum bulaştırıcılığın devam ettiği anlamına gelmemektedir. Bu konuda yapılacak ileri araştırmalar, hastalığın seyrini ve viral saçılımı daha iyi anlamamıza katkı sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** COVID-19, SARS-COV-2, RT-PZR

## Kaynaklar

1. Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*. 2020;371:m3862. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3862>
2. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2021;2(1):e13-22. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30172-5)
3. Xiao AT, Tong YX, Gao C, Zhu L, Zhang YJ, Zhang S. Dynamic profile of RT-PCR findings from 301 COVID-19 patients in Wuhan, China: a descriptive study. *J Clin Virol*. 2020;127:104346. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104346>
4. Singanayagam A, Patel M, Charlett A, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Eurosurveill*. 2020;25(32):2001483. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483>