



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

REPUBLIC OF TURKEY
THE MINISTRY OF HEALTH
GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ISSN 0377-9777 (Basılı / Printed)
ISSN 1308-2523 (Çevrimiçi / Online)

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 77 ■ Sayı/Number 1 ■ Yıl/Year 2020

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü adına
On behalf of General Directorate of Public Health

Fatih KARA, Genel Müdür (General Director)

EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Hasan IRMAK

EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

Demet CANSARAN-DUMAN

Hülya ŞİMŞEK

Pınar KAYNAR

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Mehmet Kürşat DERİCİ

Fatih BAKIR

Mestan EMEK

Fehminaz TEMEL

Selin NAR-ÖTGÜN

Dilek YAĞCI-ÇAĞLAYIK

Şule ŞENSES-ERGÜL

Arsun ESMER

Sibel KARACA

Gülsen TOPAKTAŞ

TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Utku ERCÖMART

Zeynep KÖSEOĞLU

Selahattin TAŞOĞLU

Gülşay GÜLTAY

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ
GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH
ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü / General Directorate of Public Health
THDBD Teknik Kurulu / TBHEB Technical Board
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No:55 Sıhhiye /
ANKARA Tel: +90 312 565 55 80

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü / General Directorate of Public Health
İdari ve Mali İşler Dairesi Başkanlığı - Matbaa / Administrative
and Financial Affairs Department - Printing House
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No:55 Sıhhiye/ANKARA
Tel: +90 312 565 55 88

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

Mart - 2020 / March - 2020

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç

Anna PAPA, Yunanistan

Aziz SANCAR, ABD

Cristina DOMINGO, Almanya

Daniel MOTLHANKA, Botsvana

Dwight D. BOWMAN, ABD

Isme HUMOLLI, Kosova

Isuf DEDUSHAJ, Kosova

Iva CHRISTOVA, Bulgaristan

Johan LINDH, İsveç

Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail

Manfred WEIDMANN, İngiltere

Paul HEYMAN, Belçika

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba

Sıraç DİLBER, İsveç

Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya

Takashi AKAMATSU, Japonya

Varalakshmi ELANGO, Hindistan

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Ahmet KART, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADILOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Ankara

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Çorum

Banu ÇAKIR, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Ankara

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Çağatay GÜLER, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Ebubekir CEYLAN, Ankara

Emrah RUH, Kıbrıs

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fehminaz TEMEL, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnur TARHAN, Adıyaman

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Hakan ABACIOĞLU, İzmir	Nuran ESEN, İzmir
Haluk VAHABOĞLU, İstanbul	Oğuz GÜRİSOY, Denizli
Hasan IRMAK, Ankara	Orhan BAYLAN, İstanbul
Hasan TEZER, Ankara	Orhan YILMAZ, Ankara
Hayrettin AKDENİZ, Bolu	Özlem KURT AZAP, Ankara
Hilal ÖZDAĞ, Ankara	Pınar KAYNAR, Ankara
Hülya ŞİMŞEK, Ankara	Pınar OKYAY, Aydın
Hürrem BODUR, Ankara	Rahmet GÜNER, Ankara
Işıl MARAL, İstanbul	Recep AKDUR, Ankara
İ. Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir	Recep KEŞLİ, Afyonkarahisar
İpek MUMCUOĞLU, Ankara	Recep ÖZTÜRK, İstanbul
İrfan EROL, Ankara	Rıza DURMAZ, Ankara
İrfan ŞENCAN, Ankara	S. Aykut AYTAÇ, Ankara
İsmail CEYHAN, Ankara	Saime ŞAHİNÖZ, Gümüşhane
Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara	Sami AYDOĞAN, Kayseri
Koray ERGÜNAY, Ankara	Sarp ÜNER, Ankara
Levent AKIN, Ankara	Seçil ÖZKAN, Ankara
Mahinur AKKAYA, Ankara	Seda KARASU YALÇIN, Bolu
Mehmet Ali ONUR, Ankara	Seda TEZCAN, Mersin
Mehmet Kürşat DERİCİ, Çorum	Selçuk KAYA, Trabzon
Mestan EMEK, Antalya	Selçuk KILIÇ, Ankara
Metin KORKMAZ, İzmir	Selim KILIÇ, Ankara
Mithat ŞAHİN, Kars	Selin NAR ÖTGÜN, Ankara
Muhsin AKBABA, Adana	Sema BURGAZ, Ankara
Murat DİZBAY, Ankara	Semra Ayşe GÜREŞER, Çorum
Mustafa AKSOY, Ankara	Sercan ULUSOY, İzmir
Mustafa ERTEK, Ankara	Sultan ESER, İzmir
Mustafa Necmi İLHAN, Ankara	Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa
Mustafa Kasım KARAHOCAGİL, Kırşehir	Sümer ARAS, Ankara
Mustafa Kemal BAŞARALI, Ankara	Şule SENSES ERGÜL, Ankara
Mustafa KAVUTÇU, Ankara	Tevfik PINAR, Kırıkkale
Mükerrem KAYA, Erzurum	Turan BUZGAN, Ankara
Nazan YARDIM, Ankara	Yeşim ÖZBAŞ, Ankara
Nazime MERCAN, Denizli	Yunus Emre BEYHAN, Van
Nazmi ÖZER, Ankara	Zafer ECEVİT, Ankara
Nilay ÇÖPLÜ, Ankara	Zafer KARAER, Ankara
Nur AKSAKAL, Ankara	Zati VATANSEVER, Kars
Nur Münevver PINAR, Ankara	Zeynep GÜLAY, İzmir

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

Dergide yayımlanmak üzere gönderilen yazılar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yazım kurallarına göre hazırlanmalıdır. Başvurular www.turkhijyen.org adresinden "Çevrimiçi Makale Gönder, Takip Et, Değerlendir Programı" aracılığıyla on line olarak yapılabilir.

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallara uyum aranır. Kurallara uymayan yazılar daha ileri bir inceleme gerektirmeksizin yazarlarına iade edilir.

1. "Telif Hakkı Devir Formu" tüm yazarlarca imzalanarak onaylandıktan sonra dergimizin makale kabul sistemine yüklenmelidir.

2. Makale başlığı, İngilizce başlık, kısa başlık, yazar adları, çalışılan kurumlara ait birimler, yazışma işini üstlenen yazarın açık adresi, telefon numaraları (sabit ve cep), elektronik posta adresi belirtilmelidir:

a. Yazının başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.

b. Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.

c. Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka belirtilmelidir.

d. Makale, kongre/sempozyumda sunulmuşsa sunum türü ile birlikte dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka belirtilmelidir.

3. Yazılardaki terimler mümkün olduğunca Türkçe ve Latince olmalı, dilimize yerleşmiş kelimelere yer verilmeli ve Türk Dil Kurumu'nun güncel sözlüğü kullanılmalıdır. Öz Türkçe'ye özen gösterilmeli ve Türkçe kaynak kullanımına önem verilmelidir.

4. Metin içinde geçen mikroorganizma isimleri ilk kullanıldığında tam ve açık yazılmalı, daha sonraki kullanımlarda kısaltılarak verilmelidir. Mikroorganizmaların orijinal Latince isimleri italik yazılmalıdır: Örneğin; *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* gibi. Yazıda sadece cins adı geçen cümlelerde stafilokok, streptokok gibi dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir. Antibiyotik isimleri dil bütünlüğü açısından okunduğu gibi yazılmalı; uluslararası standartlara uygun olarak kısaltılmalıdır.

5. Metin içerisinde bahsedilen birimlerin sembolleri Uluslararası Birimler Sistemi (SI)'ne göre verilmelidir.

6. Yazılar bir zorunluluk olmadıkça "geçmiş zaman edilgen" kip ile yazılmalıdır.

7. Metnin tamamı 12 punto Times New Roman karakteri ile çift aralıklı yazılmalı ve sayfa kenarlarından 2,5 cm boşluk bırakılmalıdır.

8. Yazarlar araştırma ve yayın etiğine uymalıdır. Klinik araştırmalarda, çalışmaya katılanlardan bilgilendirilmesi olur alındığının gereç ve yöntem bölümünde belirtilmesi gerekmektedir. Gönüllü ya da hastalara uygulanacak prosedürlerin özelliği tümüyle anlatıldıktan sonra, kendilerinin bilgilendirilip onaylarının alındığını gösterir bir cümle bulunmalıdır. Yazarlar Helsinki Bildirgesi'nde ana hatları çizilen ilkeleri izlemelidir. Yazarlar, bu tür bir çalışma söz konusu olduğunda, uluslararası alanda kabul edilen kılavuzlara ve yürürlükte olan tüm mevzuatta belirtilen hükümlere uymalı ve "Etik Kurul Onayı"ni göndermelidir.

9. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar için de gereken izinler alınmalı; yazıda deneklere ağrı, acı ve rahatsızlık verilmemesi için neler yapıldığı açık bir şekilde belirtilmelidir.

10. Hasta kimliğini tanıyacak fotoğraf kullanıldığında, hastanın yazılı onayı gönderilmelidir.

11. Araştırma yazıları;

Türkçe Özet, İngilizce Özet, Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma, Teşekkür (varsa) ve Kaynaklar bölümlerinden oluşmalıdır. Bu bölüm başlıkları sola yaslanacak şekilde büyük harflerle kalın yazılmalıdır. İngilizce makalelerde de Türkçe başlık, kısa başlık ve özet bulunmalıdır.

a) **Türkçe Özet:** Amaç, Yöntem, Bulgular ve Sonuç, alt başlıklarından oluşmalıdır (yapılandırılmış özet) ve en az 250, en fazla 400 kelime içermelidir.

b) **İngilizce Özet (Abstract):** Türkçe Özet bölümünde belirtilenleri birebir karşılayacak şekilde "Objective, Method, Results, Conclusion" olarak yapılandırılmalıdır.

c) **Anahtar Kelimeler:** 3-8 arasında olmalı ve Index Medicus Medical Subject Headings-(MeSH)'de yer alan kelimeler kullanılmalıdır. Türkçe anahtar kelimelerinizi oluşturmak için <http://www.bilimterimleri.com/> adresini kullanınız.

d) **Giriş:** Araştırmanın amacı ve gerekçesi güncel literatür bilgisi ile desteklenerek iki sayfaya aşmayacak şekilde sunulmalıdır.

e) **Gereç ve Yöntem:** Araştırmanın gerçekleştirildiği kurum/kuruluş ve tarih belirtilmeli, araştırmada kullanılan araç, gereç ve yöntem sunulmalı; istatistiksel yöntemler açıkça belirtilmelidir.

f) **Bulgular:** Sadece araştırmada elde edilen bulgular belirtilmelidir.

g) **Tartışma:** Araştırmanın sonunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulgularıyla karşılaştırılmalıdır. Araştırmacı, kendi yorumlarını bu bölümde aktarmalıdır.

h) **Teşekkür:** Ana metnin sonunda kaynaklardan hemen önce yer almalıdır. Teşekkür bölümünde çalışmaya destek veren kişi, kurum/kuruluşlar yer almalıdır.

i) **Kaynaklar:** Yazarlar kaynakların eksiksiz ve doğru yazılmasından sorumludur. Kaynaklar, metnin içinde geçiş sırasına göre numaralandırılmalıdır. Numaralar, parantez içinde cümle sonlarında verilmelidir. Kaynakların yazılımı ile ilgili aşağıda örnekler verilmiştir. Daha detaylı bilgi için "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997; 277: 927-934) (<http://www.nejm.org/>) bakılmalıdır.

Sürelili yayın: Yazar(lar)ın Soyadı Adının baş harf(ler)i (altı veya daha az yazar varsa hepsi yazılmalıdır; yazar sayısı yedi veya daha fazla yalnız ilk altısını yazıp "et al." veya "ve ark." eklenmelidir). Makalenin başlığı, Derginin Index Medicus'a uygun kısaltılmış ismi, Yıl; Cilt (Sayı): İlk ve son sayfa numaraları.

• Standard dergi makalesi için örnek: Demirci M, Ünlü M, Şahin Ü. A case of hydatid lung cyst diagnosed by kinyoun staining of bronco-alveolar fluid. Türkiye Parazitoloj Derg, 2001; 25 (3): 234-5.

• Yazarı verilmemiş makale için örnek: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the panceras (Editorial). Br Med J, 1981; 283: 628.

• Dergi eki için örnek: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functinal asplenia: Demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). Blood, 1979; 54 (Suppl 1): 26a.

Kitap: Yazar(lar)ın soyadı adının baş harf(ler)i. Kitabın adı. Kaçınıcı baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı.

• Örnek: Eisen HN. Immunology: an Introduction to Molecular and Cellular Principles of the Immun Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974.

Kitap bölümü: Bölüm yazar(lar)ın soyadı adının başharf(ler)i. Bölüm başlığı. In: Editör(ler)in soyadı adının başharf(ler)i ed/eds. Kitabın adı. Kaçınıcı baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı: Bölümün ilk ve son sayfa numaraları.

• Örnek: Weinstein L. Swarts MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic Physiol ogy: Mechanism of Disease. Phidelphia. WB Saunders, 1974: 457-72.

Web adresi: Eğer doğrudan "web" adresi referans olarak kullanılacaksa adres ile birlikte parantez içinde bilgiye ulaşılan tarih de belirtilmelidir. Web erişimli makalelerin referans olarak metin içinde verilmesi gerektiğinde DOI (Digital Object Identifier) numarası verilmesi şarttır.

Kongre bildirisi: Entrala E, Mascaro C. New structural findings in Cryptosporidium parvum oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October,10-14, Izmir-Turkey. 1994.

Tez: Bilhan Ö. Labirent savakların hidrolik karakteristiklerinin deneysel olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.

j) **GenBank/DNA Dizi Analizi:** Gen kalıtım numaraları ve DNA dizileri makale içinde kaynak olarak gösterilmelidir. Konuyla ilgili ayrıntılı bilgi için "National Library of Medicine" adresinde "National Center for Biotechnical Information (NCBI)" bölümüne bakınız.

k) **Şekil ve Tablolar:** Her tablo veya şekil ayrı bir sayfaya basılmalı, alt ve üst çizgiler ve gerektiğinde ara sütun çizgileri içermelidir. Tablolar, "Tablo 1." şeklinde numaralandırılmalı ve tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne yazılmalıdır. Açıklayıcı bilgiye başlıkta değil dipnotta yer verilmeli, uygun simgeler (*,+,,+,+, v.b.) kullanılmalıdır. Fotoğraflar "jpeg" formatında ve en az 300 dpi olmalıdır. Baskı kalitesinin artırılması için gerekli olduğu durumlarda fotoğrafların orijinal halleri talep edilebilir.

12. Araştırma Makalesi türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 40 olmalıdır.

13. Derleme türü yazılarda tercih yazar sayısı ikiden fazla olmamalıdır. Yazar(lar) daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olmalı; bu deneyimlerini derleme yazısında tartışmalı ve kaynak olarak göstermelidir. Derlemelerde Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet (en az 250, en fazla 400 kelime içermelidir) ve anahtar kelimeler bulunmalıdır. Derleme türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 60 olmalıdır.

14. Olgu sunumlarında metin yedi sayfayı aşmamalıdır. Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet ve anahtar kelimeler ayrıca giriş, olgu ve tartışma bölümleri bulunmalıdır. Olgu sunumu türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 20 olmalıdır.

15. Editöre Mektup: Daha önce yayımlanmış yazılara eleştiri getirmek, katkıda bulunmak ya da bilim haberi niteliği taşıyacak bilgilerin iletilmesi amacıyla yazılan yazılar, Yayın Kurulu'nun inceleme ve değerlendirmesinin ardından yayınlanır. Editöre Mektup bir sayfayı aşmamalı ve kaynak sayısı en fazla 10 olmalıdır.

16. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

17. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Articles should be prepared according to the rules of the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology. Submissions can be made online at the address www.turkhiyjen.org through the Online "Manuscript Submission, Tracking, Evaluation Program".

Manuscripts are checked according the following rules. If the rules are not adhered to, manuscripts will be returned to the author.

1. The "Copyright Transfer Form" (Copyright Release Form) after being signed by all authors should be uploaded using the article accepting system of the journal.

2. The title of article, short title, author name(s), names of institutions and the departments of the authors, full address, telephone numbers (landline and mobile) and e-mail address should be given:

- The title should be short and written in lower case.
- The short title should not exceed 40 characters.
- The study supported by a fund or scientific organisation must be mentioned in a footnote or in the acknowledgements.
- The study presented in a conference/symposium must be mentioned with the type of presentation in footnotes or in the acknowledgements.

3. For Turkish studies; Terms used in articles should be in Turkish and Latin as much as possible, according to the latest dictionary of the "Turkish Language Institution". Importance should be given to use pure Turkish language and as many as Turkish references.

4. Latin names of microorganisms used for the first time in the text have to be written in full. If these names are used later, they should be abbreviated in accordance to international rules. The original Latin names of microorganisms should be written in *Italic*: for example, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*. Names of antibiotics should be abbreviated in accordance with international standards.

5. Symbols of the units mentioned in the text should be according to "The Système International (SI)".

6. Articles should be written in one of the "past perfect, present perfect and past" tenses and in the passive mode.

7. Only one side of A4 paper should be used and should have a 2.5 cm margin on each side. 12 pt, Times New Roman font and double line space should be used.

8. The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology expects the authors to comply with the ethics of research and publication. In human research, a statement of the informed consent of those who participated in the study is needed in the section of the "Materials and Methods". In case of procedures that will apply to volunteers or patients, it should be stated that the study objects have been informed and given their approval before the study started. In case the authors do not have a local ethics committee, the principles outlined in the "Declaration of Helsinki" should have been followed. Authors should declare that they have followed the internationally accepted latest guidelines, legislation and other related regulations and should send "Approval of the Ethics Committee".

9. In case animal studies, approval also is needed; it should be stated clearly that the subjects will be prevented as much as possible from pain, suffering and inconvenience.

10. In case patient photos are used which shows his/her ID, a written informed consent of the patient on the use of the photos must be submitted.

11. Research Articles;

Research papers should consist of Turkish abstract, English abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements (if any), and References sections. These sections should be written in bold capital letters and aligned left. English articles should have a Turkish abstract and title in Turkish. (If the all of the authors from abroad the manuscript and abstract can be write English language).

a) Turkish Abstract should consist of the subheadings of Objective, Methods, Results and Conclusion (Structured Abstract). It should be between 250 and 400 words.

b) English Abstract: The abstract should be structured like the Turkish abstract (Objective, Methods, Results, and Conclusion). It should be between 250 and 400 words.

c) Key words The number of keywords should be between 3-8 and the terminology of the Medical Subjects Headings (Index Medicus Medical Subject Headings-MeSH) should be used.

d) Introduction: The aim of the study, and references given to similar studies should be presented briefly and should not exceed more than two pages.

e) Materials and Methods: The date of the study, institution that performed the study, and materials and methods should be clearly presented. Statistical methods should be clearly stated.

f) Results: The results should be stated clearly and only include the current research.

g) Conclusions: In this section, the study findings should be compared with the findings of other researchers. Authors should mention their comments in this section.

h) Acknowledgements should be placed at the end of the main text and before the references. In this section, the institutions/departments which supported the research should be stated.

i) References: Authors are responsible for supply complete and correct references. References should be numbered according to the order used in the text.

Numbers should be given in brackets and placed at the end of the sentence. Examples are given below on the use of references. Detailed information can be found in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997 277: 927-934) and at <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>.

Periodicals: Author(s) Last Name initial(s) name of author(s) (if there are six or fewer authors, all authors should be written; if the number of authors are seven or more, only the first six of the authors should be written and the rest as "et al"). The title of the article, the abbreviated name of the journal according to the Index Medicus, Year; Volume (Issue): The first and last page numbers.

- Example of standard journal article: Demirci M, Unlü M, Sahin U. A case of hydatid cyst diagnosed by kinyoun staining of lung bronco-alveolar fluid. *Türkiye Parazitol Derg*, 2001; 25 (3): 234-5.
- Example of an article with authors unknown: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J*, 1981; 283:628.
- Example of journal supplement: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: Demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood*, 1979; 54 (Suppl 1): 26a.

Books: Surname of the author(s) initial name(s) of author(s). The name of the book. The edition number. Place of publication: Publisher, Publication year. Example: Eisen HN. Immunology: an Introduction to the Principles of Molecular and Cellular Immune Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974.

Book chapters: The author(s) surname of the chapter initial(s) letter of the name. Section title. In: Surname of editor(s) initial (s) letter of first name(s) ed / eds. The name of the book. Edition number. Place of publication: Publisher, year of publication: The first and last page numbers of the chapter.

- Example: Weinstein L, Swarts MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic Physiology: Mechanism of Disease. Philadelphia. WB Saunders, 1974:457-72.

Web address: If a "web" address is used as the reference address, the web address date should be given in brackets with the address. The DOI (Digital Object Identifier) number must be provided, when a web access article used in the text as a reference.

Congress papeyars: Entrala E, Mascaro C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, Izmir-Turkey, 1994.

Thesis: Bilhan Ö. Experimental investigation of the hydraulic characteristics of labyrinth weir. Master Thesis, Science Institute of Firat University, 2005.

j) GenBank / DNA Sequence Analysis: DNA sequences of genes and heredity numbers should be given as references in the article. For more information, check "National Library of Medicine" and "National Center for Biotechnical Information (NCBI)".

k) Figure and Tables: Each table or figure should be printed on a separate sheet, the top and bottom lines and if necessary column lines must be included. Tables should be numbered like "Table 1." and the table title should be written above the top line of the table. Explanatory information should be given in footnotes, not in the title and appropriate icons (*,+,++, etc.) should be used. Photos should be in "jpeg" format. In case the quality of the photos is not good for publication, the originals can be requested.

12. Research articles should have up to 40 references.

13. In reviews, it is preferred to have not more than two authors. Author(s) must have done research and published articles previously on this subject; they should discuss their experience and use as reference in the review. Reviews should have Turkish and English titles, abstracts (it should contain minimum 250, maximum 400 words) and key words. Reference numbers for the review should be maximum 60.

14. Case reports should have a maximum of seven pages of text.

Case report should have a Turkish and English title, abstract, keyword(s) and also introduction, case description and discussion sections should be given. Number of references should be maximum 20.

15. Letters to Editor: Written to make criticisms, additions to previously published articles or scientific updates are published after review and assessment of the Editorial Board. Letters should not exceed one page of text and must be supported with up to 10 references.

16. The articles which do not comply with the journal rules are not accepted.

17. Authors should keep a copy of the article that they submit.

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 79

Fax : +90 312 565 55 91

e-mail : hsgm.thdbd@saglik.gov.tr

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

- Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü yayın organıdır. Dergi üç (3) ayda bir çıkar ve dört (4) sayıda bir cilt tamamlanır.
- Dergide biyoloji, mikrobiyoloji, enfeksiyon hastalıkları, farmakoloji, toksikoloji, immünoloji, parazitoloji, entomoloji, kimya, biyokimya, gıda, beslenme, çevre, halk sağlığı, epidemiyoloji, patoloji, fizyopatoloji, moleküler biyoloji, genetik, biyoteknoloji ile ilgili alanlardaki özgün araştırma, olgu sunumu, derleme, editöre mektup türündeki yazılar Türkçe ve İngilizce olarak yayımlanır.
- Dergiye, daha önce başka yerde yayımlanmamış ve yayımlanmak üzere başka bir dergide inceleme aşamasında olmayan yazılar kabul edilir.
- Dergi Yayın Kurulu tarafından uygun görülen yazılar, konu ile ilgili en az iki Bilimsel Danışma Kurulu Üyesinden olumlu görüş alındığında yayımlanmaya hak kazanır. Bu kurulların, yazının içeriğini değiştirmeyen her türlü düzeltme ve kısaltmaları yapma yetkileri vardır.
- Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.
- Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.
- Dergide yayımlanan yazıların yayın hakkı Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne aittir. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

- Bütün yazarlarca isim sırasına göre imzalanmış telif hakkı devir formu eksiksiz olarak dolduruldu.
 - Yazar isimleri açık olarak yazıldı.
 - Her yazarın bağlı bulunduğu kurum adı, yazar adının yanına numara verilerek başlık sayfasında belirtildi.
 - Yazışmalardan sorumlu yazarın adı, adresi, telefon-faks numaraları ve e-posta adresi verildi.
 - Türkçe ve İngilizce başlıklar ile kısa başlık yazıldı.
 - Türkçe ve İngilizce özetlerin kelime sayısı (300-500 arası) kontrol edildi.
 - Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (MeSH ve Türk Tıp Terimleri Sözlüğü'ne uygun) verildi.
 - Tüm kısaltmalar gözden geçirildi ve standard olmayan kısaltmalar düzeltildi.
 - Metin içerisinde geçen orijinal Latince mikroorganizma isimleri italik olarak yazıldı.
 - Metin içerisinde bahsedilen birimlerin sembolleri the Système International (SI)'e göre verildi.
 - Yazılar "miş'li geçmiş" zaman edilgen kip ile yazıldı.
 - Metnin tamamı 12 punto Times New Roman karakteri ile çift aralıkla yazıldı.
 - Metin sayfanın yalnız bir yüzüne yazılarak her bir kenardan 2,5 cm boşluk bırakıldı.
 - Tablolar, şekiller yazım kurallarına uygun olarak ve her biri ayrı bir sayfada verildi.
 - Fotoğraflar JPEG formatında aktarıldı.
 - Kaynaklar cümle sonlarında parantez içinde ve metin içinde kullanım sırasına göre ardışık sıralandı.
 - Kaynaklar, makale sonunda metin içinde verildiği sırada listelendi.
 - Kaynaklar gözden geçirildi ve tüm yazar adları, ifade ve noktalamalar yazım kurallarına uygun hale getirildi.
- Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız.
- Etik kurul onayı alındı.
 - Bilimsel kuruluş ve/veya fon desteği belirtildi.
 - Kongre/Sempozyumda sunumu ve sunum türü belirtildi.
 - Varsa teşekkür bölümü oluşturuldu.

EDITORIAL POLICY

- The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology is a publication of the “General Directorate of Public Health (Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)” of Ministry of Health. The Journal is published every three months and one volume consists of four issues.
- The journal publishes biology, microbiology, infectious diseases, pharmacology, toxicology, immunology, parasitology, entomology, chemistry, biochemistry, food safety, environmental, health, public health, epidemiology, pathology, pathophysiology, molecular biology, genetics, biotechnology in the field of original research, case report, reviews and letters to the editor are published in Turkish and English.
- Articles which are not previously published in another journal or not currently under evaluation elsewhere can be accepted for the journal.
- Articles approved by the Scientific Committee and Editorial Board are eligible to be released after receiving at least two positive opinions from the Scientific Committee members. Those committees have the authority to make all corrections and abbreviations but not to change the content of the article.
- The authors have the all the scientific and legal responsibilities of the articles.
- The authors must fully obey the ethics of research and publication.
- The copyright of the article published in the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology belongs to the Journal. Copyright fee is not paid to the authors.

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

- Copyright transfer form is completed in full and signed by all authors according to the name order.
 - Author names are written clearly.
 - Affiliated institutions of the all authors are given on the title page by the number stated after the author's name.
 - The name, address, phone-fax numbers and mail address of the author responsible for correspondence are given.
 - Turkish, English titles and short title are written.
 - The number of words in Turkish and English abstracts (between 300-500) is checked.
 - Turkish and English keywords (according to MeSH) are given.
 - All abbreviations are reviewed and non-standard abbreviations are corrected
 - Original Latin names of microorganisms are written in italic.
 - Symbols are mentioned according to the units in the Système International (SI).
 - The article is written in passive mode and given one of the “past perfect, present perfect or past ” tenses.
 - Text is written in 12 pt Times New Roman characters and with double line spacing.
 - Text is written only on one side of the page and has 2.5 cm space at each side.
 - Tables and figures are given on each separate page according to the writing rules.
 - Photos are in JPEG format.
 - References are given at the end of the sentence in brackets and are listed in order of use in the text.
 - References are listed at the end of the article in the order given in the text.
 - References are reviewed, and the name of all authors, spelling and punctuation are controlled according the writing rules.
- Furthermore, please check.**
- “Ethics Committee Approval” is given.
 - Support to a study by a fund or organization is mentioned.
 - Congress / Symposium presentations and the type of presentation are stated.
 - Acknowledgement is given, if there is.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne
www.turkhijyen.org adresinden online olarak makale gönderilebilir

Submissions can be made online at the address www.turkhijyen.org
to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL

DOAJ DIRECTORY OF
OPEN ACCESS
JOURNALS



CAS
A division of the American Chemical Society

Google
scholar beta

Academic Journals Database
disseminating
quality controlled scientific knowledge

EBSCO
HOST
Electronic
Journals
Service

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (Türk Hij Den Biyol Derg); DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, ResearchGate, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Medoanet, SCOPUS, Türkiye Atıf Dizini, Türk - Medline ve TUBITAK - ULAKBİM Türk Tıp Dizini'nde yer almaktadır.

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (Türk Hij Den Biyol Derg) is taken part in DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, Research Gate, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Medoanet, SCOPUS, Türkiye Atıf Dizini, Türk - Medline and TUBITAK - ULAKBİM Türk Tıp Dizini.

TUBITAK
ULAKBİM

TÜRK MEDLINE

TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

ResearchGate

Scopus

GENAMICS™
...research from your desktop

medoanet
Mediterranean Open Access Network

İLETİŞİM

CORRESPONDENCE

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

General Directorate of Public Health
Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Sağlık Mahallesi Adnan Saygun Caddesi No: 55 Refik Saydam Yerleşkesi 06100 Sıhhiye/ANKARA - TÜRKİYE

Tel: 0312 565 55 79



Faks: 0312 565 55 91

e-posta: hsgm.thdbd@saglik.gov.tr

<http://www.hsgm.gov.tr>

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılmasında CLSI ve EUCAST standartlarının karşılaştırılması
Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from blood cultures comparison of CLSI and EUCAST standards in the investigation
Yasemin GENÇ-BAHÇE, Irmak BARAN, Altan AKSOY
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.32549 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 3 - 14

2. Yoğun bakım ünitelerinde kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarının moleküler yöntemlerle karakterizasyonu
Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates causing bloodstream infections in intensive care unit
Aysegül GÖZALAN, Özlem ÜNALDI, Fisun KIRCA, Nilay ÇÖPLÜ, Tuba MÜDERRİS, Ziya Cibali AÇIKGÖZ, Rıza DURMAZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.53323 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 15 - 24

3. İdrar yolu enfeksiyonlarında kültürden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları
The isolated bacteria from culture and antibiotic susceptibilities in urinary tract infections
Duygu MERT, Sabahat ÇEKEN, Mustafa ERTEK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.57984 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 25 - 32


4. Servikal örneklerde human papillomavirüs pozitifliği ve genotip dağılımı
Human papillomavirus positivity and genotype distribution in cervical samples
Özlem AYDEMİR, Hüseyin Agah TERZİ, Mehmet KÖROĞLU, Gupse TURAN, Mustafa ALTINDIŞ, Engin KARAKEÇE
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.68984 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 33 - 40


5. Mesane gen regülasyonunda etkili süper-enhancer'ların belirlenmesi
Identification of the super-enhancers involved in bladder gene regulation
Serap ERKEK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.81904 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 41 - 50

6. The protective role of melatonin against the effect of caffeine on embryonic kidney
Kafeinin embriyonel böbrek gelişimine olan etkisine karşı melatoninin koruyucu rolü
Seher YILMAZ, Ayşe Yeşim GÖÇMEN, Arda Kaan ÜNER, Enes AKYÜZ, Adem TOKPINAR
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.77675 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 51 - 58

7. *Enterobacter cloacae* kompleks sp. V1 suşu tarafından üretilen L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisi
Effect of media composition on the activity of L-asparaginase enzyme produced by *Enterobacter cloacae* complex sp. V1 strain
Erdal ÖĞÜN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.03206 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 59 - 68

8. Assessment of knowledge about nosocomial infection among Cukurova University Vocational School of Health Services Students
Çukurova Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu öğrencilerinde nozokomiyal enfeksiyon bilgi düzeylerinin değerlendirilmesi
Pınar ETİZ, Sedefgül YÜZBAŞIOĞLU-ARIYÜREK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.69335 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 69 - 78

9. Yemek fabrikası çalışanlarının portör muayenelerinin değerlendirilmesi
Evaluation of porter examination of food factory workers
İzzettin TOKTAŞ, Ali CEYLAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.95815 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 79 - 86

10. Personal hygiene habits of some university students in Turkey
Türkiye'deki bazı üniversite öğrencilerinin kişisel hijyen alışkanlıkları
Demet HANÇER-AYDEMİR
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.04880 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 87 - 96

11. Enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifika sınavı amacına ulaştı mı?
Has the infection control nursing certificate exam reached its purpose?
Can Hüseyin HEKİMOĞLU, Selahattin GELBAL
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.37039 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 97 - 106

12. PAK4, MCF-7 hücrelerinde E-kaderini baskılayarak PKC-bağımlı invaziv potansiyeli destekler
PAK4 promotes invasive potential of MCF-7 cells in PKC-dependent manner through downregulation of E-Cadherin
Suray PEHLIVANOĞLU, Çiğdem AYDIN-ACAR
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.33340 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 107 - 116


■ Olgu Sunumu / Case Report

13. Erişkin iki hastada el-ayak-ağız hastalığının değerlendirilmesi
Evaluation of hand-foot-mouth disease in two adult patients
Nuran SARI
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.79446 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

117 - 122



■ Derleme / Review

14. Hızla yayılan çoklu ilaca dirençli maya mantarı: *Candida auris*
Rapidly spreading multi-drug resistant yeast: *Candida auris*
Tuğba AYHANCI, Mustafa ALTINDIŞ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.26879 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

123 - 136



Kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılmasında CLSI ve EUCAST standartlarının karşılaştırılması

Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from blood cultures comparison of CLSI and EUCAST standards in the investigation

Yasemin GENÇ-BAHÇE¹, İrmak BARAN², Altan AKSOY²

ÖZET

Amaç: Antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT) için dünyada yaygın olarak kullanılan iki standart mevcuttur. Bu standartlardan biri, yıllardır ülkemizde kullanılan "Klinik Laboratuvar Standartları Kurumu" (CLSI), diğeri ise Avrupa Birliği'ne üye birçok ülkede kullanılan ve 2015 yılında ülkemizde kullanıma giren "Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi" (EUCAST) standarttır. EUCAST standartlarının ülkemizde kullanıma girmesi ile muhtemel direnç profillerinde bazı değişiklikler olabilecektir.

Yöntem: Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına 01.03.2014 - 22.06.2015 tarihleri arasında gönderilen kan kültürleri geriye yönelik incelenmiştir. Kan kültürü şişeleri BACTEC FX (Becton Dickinson, ABD) otomatize sisteminde takip edilmiştir. Pozitif sinyal alınan tüm örneklerin Kanlı Agar, Çikolata Agar ve Eozin Metilen Mavisı Agar besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Üreme gözlenen tüm besiyerleri MALDI Biotyper (Bruker, Almanya) ile bakteri tanımlanması yapıldıktan sonra etken olduğu düşünülen bakterilerin BD Phoenix™ (Becton Dickinson, ABD) ile antibiyotik duyarlılıkları

ABSTRACT

Objective: There are two widely used standards for antimicrobial susceptibility testing (AST) in the world. One of these standards is the "Clinical Laboratory Standards Institute" (CLSI) which has been used for many years in our country and the other one is the "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) standard which has been used in many countries of the European Union and since 2015 being used in our country. There may be some possible changes in resistance profiles after the EUCAST standards have been used in our country.

Methods: Blood cultures sent to Ankara Numune Training and Research Hospital Medical Microbiology Laboratory between 01.03.2014 - 22.06.2015 were examined retrospectively. The blood culture bottles were monitored on the BACTEC FX automated system (Becton Dickinson, USA). All samples with positive signal were cultured simultaneously on Bloody Agar, Chocolate Agar and Eosin Methylene Blue Agar Media. After bacteria were identified with MALDI Biotyper (Bruker, Germany) antibiotic susceptibilities of through to be causative agents studied with BD Phoenix. Antibiotic susceptibility tests of bacteria that are thought to be

¹Siirt Devlet Hastanesi, Siirt

²Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Yasemin GENÇ-BAHÇE

Siirt Devlet Hastanesi 2. Kat Mikrobiyoloji Laboratuvarı 56000 Siirt - Türkiye

Tel : +90 545 630 57 60 E-posta / E-mail : yasemingenbahce@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 12.08.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 27.02.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.32549

Genç-Bahçe Y, Baran I, Aksoy A. Kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılmasında CLSI ve EUCAST standartlarının karşılaştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 3-14

çalışılmıştır. Antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri CLSI ve EUCAST'e göre ayrı ayrı yorumlanıp karşılaştırılmıştır. Antimikrobiyal direnç ilişkisinin araştırılması amacıyla veriler SPSS 15 tabanında değerlendirilerek istatistiksel analizi Pearson ki-kare testi ile yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızdaki bütün bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri CLSI ve EUCAST standartlarına göre değerlendirildiğinde 254 *Esherichiae coli* suşunda amikasin, seftazidim ve tikarsilin-klavulanik asit direnç oranlarının EUCAST'da anlamlı olarak daha dirençli olduğu izlenmiştir ($p<0,05$). Çalışmamızda 107 *Pseudomonas* spp.'de aztreonam direnç oranı CLSI'a göre %56,1, EUCAST'a göre %98,1 olarak bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışmamızda 92 *Enterococcus faecium* suşu için ampicilin CLSI'a göre %97,8, EUCAST'a göre %89,1 oranında dirençli saptanmıştır ($p<0,05$). Çalışmamızda 160 *Staphylococcus aureus*, suşunun klindamisin direnci CLSI'a göre %4,4, EUCAST'a göre %88,8 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$).

Sonuç: Kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıklarını CLSI ve EUCAST standartlarına göre karşılaştırdığımız bu çalışmada; hem Gram-negatif, hem de Gram-pozitif bakterilerde genel olarak birçok antibiyotik için direnç oranları arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Anahtar Kelimeler: CLSI, EUCAST, kan kültürü, antibiyotik duyarlılık testi

causative were made by BD Phoenix™ (Becton Dickinson, USA). The minimum inhibitor concentration (MIC) values of antibiotics were interpreted separately according to CLSI and EUCAST and results were compared. In order to investigate the relation of antimicrobial resistance, the data were analyzed by SPSS 15 and the statistical analysis was done by Pearson Chi-square test.

Results: When all antibiotic susceptibility tests of our study were evaluated according to the CLSI and EUCAST guidelines, amikacin, ceftazidime and ticarcillin-clavulanic acid resistance rates of 254 *Esherichiae coli*, strains were found to be significantly more resistant according to EUCAST ($p<0,05$). In this study, the resistance rate of aztreonam in 107 *Pseudomonas* spp. was 56.1% according to CLSI and 98.1% according to EUCAST ($p<0,05$). In the study 97.8% of 92 *Enterococcus faecium*, strains were resistant to ampicillin according to CLSI and 89.1% resistant according to EUCAST ($p<0,05$). In our study, the clindamycin resistance of 160 *Staphylococcus aureus*, strains was determined as 4.4% according to CLSI and 88.8% according to EUCAST ($p<0,05$).

Conclusion: In this study, comparing antibiotic susceptibilities of microorganisms from blood cultures according to the guidelines of CLSI and EUCAST, no significant difference was found in general between the resistance rates for many antibiotics in both Gram-negative and Gram-positive bacteria.

Key Words: CLSI, EUCAST, blood culture, antibiotic susceptibility test

GİRİŞ

Sepsis, yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden erken tanı konulup tedavi edildiğinde mortalite oranlarının azaldığı bir klinik tablodur (1,2). Sepsis mortalitesi %30-60 arasında değişmektedir. Yoğun bakım hastalarının ölüm sebepleri arasında birinci sırada ve tüm ölüm nedenleri arasında 10-11.

sıralarda bulunmaktadır. Bir çalışmaya göre dünyada her gün 1400 kişi sepsis ve komplikasyonları nedeniyle ölmektedir (3). Bu nedenle uygun antibiyotik seçimi önemlidir. Ampirik tedavide mümkün olabilecek en etkin antibiyotiklerin seçilebilmesinde mikrobiyolojik verilerin değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Bakteriyemiye neden olan mikroorganizmaların dağılımında ve antibiyotik duyarlılıklarında zaman içinde değişikliklere neden olduğundan, ampirik tedavide klinisyene yol göstermesi açısından, mikroorganizmaların dağılımları ve antibiyotik duyarlılıkları her merkez tarafından sürekli olarak belirlenmelidir (4,5).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT) için dünyada yaygın olarak kullanılan iki standart mevcuttur. Bu standartlardan biri, yıllardır ülkemizde kullanılan CLSI (6), diğeri ise Avrupa Birliği'ne üye birçok ülkede kullanılan ve 2015 yılında ülkemizde kullanıma giren EUCAST (7) standardıdır. EUCAST standartlarının ülkemizde kullanıma girmesi ile muhtemel direnç profillerinde bazı değişiklikler olabilecektir. Bunun nedeni EUCAST (6) standartlarının, CLSI (7) standartları ile kıyaslandığında özellikle Gram negatif basillerde daha düşük klinik duyarlılık sınır değerlerine sahip olmasıdır.

Bu çalışmada Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi'nde 01.03.2014 - 22.06.2015 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen, enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin geriye yönelik incelenmesi ve antimikrobiyal duyarlılıkları CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre değerlendirilerek karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına 01.03.2014 - 22.06.2015 tarihleri arasında gönderilen kan kültürleri geriye yönelik incelenmiştir. Laboratuvarımıza kabul edilen kan kültürü şişeleri BACTEC FX (Becton Dickinson, ABD) otomatize sisteminde takip edilmiştir. Pozitif sinyal alınan tüm örnekler Gram boyama yöntemi ile incelenip eş zamanlı olarak Kanlı Agar, Çikolata Agar ve Eozin Metilen Mavisı agar besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Tüm plaklar 35 ± 2 °C'de 16-20 saat enkübe

edilmiştir. Üreme gözlenen tüm besiyerlerinde MALDI Biotyper (Bruker, Almanya) ile bakteri tanımlanması yapıldıktan sonra BD Phoenix™ (Becton Dickinson, ABD) ile antibiyogram duyarlılıkları çalışılmıştır. Antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri CLSI (6) ve EUCAST (7)'e göre ayrı ayrı yorumlanıp karşılaştırılmıştır. Üç gün içinde aynı hastanın farklı kan kültürü şişelerinde üreyen aynı etkenler çalışmaya dahil edilmemiştir.

Antimikrobiyal direnç ilişkisinin araştırılması amacıyla veriler SPSS 15 tabanında değerlendirilerek istatistiksel analiz Pearson ki-kare testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için yanılma düzeyi $p < 0,05$ olarak seçilmiştir.

BULGULAR

01.03.2014 - 22.06.2015 tarihleri arasında BACTEC FX (Becton Dickinson, ABD) otomatize sisteminde pozitif sinyal alınan toplam 2.552 kan kültürü geriye yönelik değerlendirilmiştir. Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların 1616 (%63,3)'sü Gram-pozitif bakteri, 871 (%34,1)'i Gram-negatif basıl, 65 (%2,5)'i maya olarak tanımlanmıştır. Gram-pozitif bakterilerin 1219 (%75,4)'ü Koagülaz negatif stafilokok, 160 (%9,9)'ü *Staphylococcus aureus*, 107 (%6,6)'si *Enterococcus faecalis*, 92 (%5,6)'si *Enterococcus faecium*, 38 (%2,3)'i *Streptococcus spp* olarak tanımlanmıştır. Gram-negatif basillerin 254 (%29,1)'ü *Esherichiae coli*, 230 (%26,4)'ü *Acinetobacter spp.*, 143 (%16,4)'ü *Klebsiella spp.*, 107 (%12,2)'si *Pseudomonas spp.*, 34 (%3,9)'ü *Enterobacter spp.*, 31 (%3,5)'i *Serratia spp.*, 19 (%2,1)'ü *Proteus spp.*, 19 (%2,1)'ü *Stenotrophomonas maltophilia*, 9 (%1)'ü *Morganella morganii*, 7 (%0,9)'si *Burkholderia spp*, 5 (%0,5)'i *Salmonella spp*, 4 (%0,4)'ü *Ralstonia pickettii*, 3 (%0,3)'ü *Aeromonas spp.*, 2 (%0,2)'si *Ochrobactrum anthropi*, 1 (%0,1)'i *Haemophilus influenzae*, 1 (%0,1)'i *Pantoea agglomerans*, 1 (%0,1)'i *Achromobacter spp.*, 1 (%0,1)'i *Brevundimonas diminuta* olarak tanımlanmıştır. Kan kültürlerinden izole edilen mayaların 33 (%50,7)'ü *Candida albicans*,

11 (%16,9)'i *Candida glabrata*, 9 (%13,8)'u *Candida parapsilosis*, 6 (%9,2)'sı *Candida tropicalis*, 3 (%4,6)'ü *Candida kefyr*, 1 (%1,5)'i *Candida dubliniensis*, 1(%1,5)'i *Candida krusei*, 1 (%1,5)'i *Candida lusitanae* olarak tanımlanmıştır.

Escherichiae coli: *E. coli* CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre değerlendirildiğinde sırasıyla %98,8 ve %95,3 oranları ile en çok amikasinine duyarlı bulunmuştur. Daha sonra bunu her iki standarta göre de karbapenemler ve gentamisin takip etmiştir. Hem CLSI (6) hem EUCAST (7)'E göre %35,0 oranı ile en düşük duyarlılığa ampisilin-sulbaktam sahip olmuştur. Bunu seftriakson ve kinolonlar izlemiştir. Genel olarak hemen hemen bütün antibiyotikler için alt ve/veya üst sınır MİK değerleri standartlar arasında farklılık göstermiştir. Karbapenemler dışında bütün antibiyotikler EUCAST'a göre daha dirençli veya

aynı direnç yüzdesinde bulunmuştur. Özellikle amikasin, seftazidim ve tikarsilin-klavulanik asit direnç yüzdelерinin EUCAST'da daha yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 1).

Acinetobacter spp: *Acinetobacter spp* CLSI ve EUCAST'a göre değerlendirildiğinde %97,5 oranında en fazla kolistine duyarlı bulunmuştur. Trimetoprim-sulfametoksazol her iki standarta göre de %23,5 oranı ile kolistinden sonra en duyarlı antibiyotik olarak görülmüştür. Meropenem dışında diğer antibiyotikler EUCAST standartına göre değerlendirildiğinde aynı veya daha dirençli bulunmuştur. *Acinetobacter spp.* için MİK değerleri bakılan antibiyotiklerin hiçbirinde her iki standarta göre de istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 2).

Tablo 1. *E. Coli* şuşlarının CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

<i>Escherichiae coli</i> n=254 (%29,1)					
	CLSI		EUCAST		p değeri
	S (%)	R(%)	S (%)	R(%)	
Amikasin	98.8	1.2	95.3	4.7	<0,05
Gentamisin	75.2	24.8	74.4	25.6	>0,05
Seftriakson	44.5	55.5	44.5	55.5	>0,05
Seftazidim	62.2	37.8	50.8	49.2	<0,05
Sefepim	51.6	48.4	47.2	52.8	>0,05
Ampisilin-sulbaktam	35.0	65.0	35.0	65.0	>0,05
Piperasilin-tazobaktam	72.0	28.0	70.5	29.5	>0,05
Tikarsilin-klavulanik asit	39.4	60.6	30.3	69.7	<0,05
İmipenem	85.4	14.6	90.9	9.1	>0,05
Meropenem	91.7	8.3	92.5	7.5	>0,05
Ertapenem	87.0	13.0	87.4	12.6	>0,05
Siprofloksasin	44.9	55.1	43.7	56.3	>0,05
Levofloksasin	46.1	53.9	45.3	54.7	>0,05
Trimetoprim-sulfametoksazol	49.6	50.4	49.6	50.4	>0,05
Aztreonam	53.9	46.1	48.4	51.6	>0,05

S: Duyarlı , R: Dirençli

Tablo 2. *Acinetobacter* spp. suşlarının CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

<i>Acinetobacter</i> spp. n=230 (%26,4)					
	CLSI		EUCAST		P değeri
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	
Amikasin	12.2	87.8	11.7	88.3	>0,05
Gentamisin	17.0	83.0	17.0	83.0	>0,05
İmipenem	7.4	92.6	7.4	92.6	>0,05
Meropenem	6.1	93.9	6.5	93.5	>0,05
Siprofloksasin	6.5	93.5	6.1	93.9	>0,05
Levofloksasin	7.4	92.6	7.0	93.0	>0,05
Trimetoprim-sulfametoksazol	23.5	76.5	23.5	76.5	>0,05
Kolistin	97.4	2.6	97.4	2.6	>0,05

S: Duyarlı , R: Dirençli

***Klebsiella* spp:** *Klebsiella* spp CLSI (6) ve EUCAST (7)'a göre değerlendirildiğinde sırasıyla %95.8 ve %93.0 oranı ile en yüksek amikasin duyarlı bulunmuştur. CLSI (6) standartına göre değerlendirildiğinde amikasin sırasıyla %68,5, %67,8, %67,1 ve %64,3 duyarlılık oranları ile gentamisin, meropenem, ertapenem ve imipenem takip etmektedir. EUCAST (7) standartına göre yorumlandığında ise amikasin sırasıyla %77,6, %74,1, %67,8 ve %67,1 duyarlılık oranları ile meropenem, imipenem, gentamisin ve ertapenemdir. İmipenem ve meropenem dışında diğer antibiyotikler genel olarak EUCAST (7)'da daha dirençli veya aynı direnç yüzdesinde bulunmuştur. İmipenem CLSI (6)'da %35,7, EUCAST (7)'da %25,9 oranında dirençli gösterilmiştir. İmipenemin CLSI (6)'a göre daha dirençli bulunması CLSI (6) standartındaki imipenem üst sınır MİK değerinin daha düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. CLSI (6) ve EUCAST (7) rehberlerine göre *Klebsiella* spp için bakılan antibiyotiklerin MİK değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 3).

***Pseudomonas* spp:** *Pseudomonas* spp hem CLSI (6) hem EUCAST (7)'a göre antibiyotik duyarlılığı yorumlandığında %96,3 oranında kolistine duyarlı bulunmuştur. *Pseudomonas* spp kolistinden sonra en çok amikasin duyarlı bulunmuştur. Amikasinin CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre yorumlanmış

duyarlılık yüzdeleri sırasıyla %79,4 ve %78,5'dir. *Pseudomonas* spp'de aztreonam direnç oranı CLSI (6)'a göre %56,1, EUCAST (7)'a göre %98,1 olarak bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir (p<0,05) (Tablo 4).

Diğer *Enterobacteriaceae* üyeleri: Çalışmamızdaki diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde (*Enterobacter* spp n: 34 (%3,9), *Serratia* spp n:31 (%3,5), *Proteus* spp n: 19 (%2,1), *Morganella morganii* n: 9 (%1), *Salmonella* spp n:5 (%0,5)) CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre sırasıyla %90,5, %89,5 duyarlılık oranları ile en duyarlı antibiyotikler amikasin ve aztreonam olarak tespit edilmiştir. Amikasinden sonra CLSI (6)standartına göre sırasıyla en duyarlı antibiyotikler sırasıyla %89,5, %85,7, %85,7, %82,9 duyarlılık oranları ile levofloksasin, meropenem, sefepim ve ertapenem olmuştur. EUCAST (7) standartına göre ise amikasinden sonra en duyarlı antibiyotikler sırasıyla %88,6, %82,9, %81,0, %80,0 duyarlılık oranları ile meropenem, ertapenem, piperasilin-tazobaktam ve levofloksasin olmuştur. İmipenem ve meropenem dışında antibiyotiklerin çoğu EUCAST (7)'a göre değerlendirildiğinde daha dirençli veya aynı direnç oranında bulunmuştur. İmipenem ve meropenem standartlara göre değerlendirildiğinde CLSI (6)'da EUCAST'a göre daha

Tablo 3. *Klebsiella* spp. suşlarının CLSI ve EUCAST standartlarına göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

<i>Klebsiella</i> spp n=143 (%16,4)					
	CLSI		EUCAST		P değeri
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	
Amikasin	95.8	4.2	93.0	7.0	>0,05
Gentamisin	68.5	31.5	67.8	32.2	>0,05
Seftriakson	44.1	55.9	44.1	55.9	>0,05
Seftazidim	49.7	50.3	44.8	55.2	>0,05
Sefepim	53.8	46.2	52.4	47.6	>0,05
Ampisilin-sulbaktam	34.3	65.7	34.3	65.7	>0,05
Piperasilin-tazobaktam	60.1	39.9	50.3	49.7	>0,05
Tikarsilin-klavulanik asit	36.4	63.6	35.7	64.3	>0,05
İmipenem	64.3	35.7	74.1	25.9	>0,05
Meropenem	67.8	32.2	77.6	22.4	>0,05
Ertapenem	67.1	32.9	67.1	32.9	>0,05
Siprofloksasin	51.7	48.3	49.7	50.3	>0,05
Levofloksasin	60.8	39.2	58.7	41.3	>0,05
Trimetoprim-sulfametoksazol	51.7	48.3	51.7	48.3	>0,05
Aztreonam	44.8	55.2	44.8	55.2	>0,05

S: Duyarlı , R: Dirençli

Tablo 4. *Pseudomonas* spp. suşlarının CLSI ve EUCAST standartlarına göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

<i>Pseudomonas</i> spp n=107 (%12.2)					
	CLSI		EUCAST		P değeri
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	
Amikasin	79.4	20.6	78.5	21.5	>0,05
Gentamisin	67.3	32.7	67.3	32.7	>0,05
Seftazidim	59.8	40.2	59.8	40.2	>0,05
Sefepim	57.9	42.1	58.9	41.1	>0,05
Piperasilin-tazobaktam	57.0	43.0	57.0	43.0	>0,05
Tikarsilin-klavulanik asit	26.2	73.8	26.2	73.8	>0,05
İmipenem	56.1	43.9	60.7	39.3	>0,05
Meropenem	55.1	44.9	55.1	44.9	>0,05
Siprofloksasin	57.0	43.0	52.3	47.7	>0,05
Levofloksasin	51.4	48.6	45.8	54.2	>0,05
Aztreonam	43.9	56.1	1.9	98.1	<0,05
Kolistin	96.3	3.7	96.3	3.7	>0,05

S: Duyarlı , R: Dirençli

Tablo 5. Diğer *Enterobacteriaceae* suşlarının CLSI ve EUCAST standartlarına göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

Diğer <i>Enterobacteriaceae</i> n=105 (%12)					
	CLSI		EUCAST		P değeri
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	
Amikasin	90.5	9.5	89.5	10.5	>0,05
Gentamisin	79.0	21.0	75.2	24.8	>0,05
Seftriakson	73.3	26.7	73.3	26.7	>0,05
Seftazidim	76.2	23.8	72.4	27.6	>0,05
Sefepim	85.7	14.3	78.1	21.9	>0,05
Ampisilin-sulbaktam	45.7	54.3	45.7	54.3	>0,05
Piperasilin-tazobaktam	81.0	19.0	81.0	19.0	>0,05
Tikarsilin-klavulanik asit	72.4	27.6	72.4	27.6	>0,05
İmipenem	53.3	46.7	60.0	40.0	>0,05
Meropenem	85.7	14.3	88.6	11.4	>0,05
Ertapenem	82.9	17.1	82.9	17.1	>0,05
Siprofloksasin	79.0	21.0	69.5	30.5	>0,05
Levofloksasin	89.5	10.5	80.0	20.0	>0,05
Trimetoprim-sulfametoksazol	61.9	38.1	61.9	38.1	>0,05
Aztreonam	90.5	9.5	89.5	10.5	>0,05

S: Duyarlı , R: Dirençli

dirençli bulunmuştur (Tablo 5).

***Enterococcus faecalis*:** *E. faecalis*'de CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre %100 duyarlılık oranı ile en duyarlı antibiyotik linezolid olarak tespit edilmiştir. Ampisilin, vankomisin, teikoplaninin CLSI (6)'a göre duyarlılık yüzdeleri sırasıyla %97,2, %98,1, %99,1, EUCAST (7)'a göre duyarlılık yüzdeleri ise %96,3, %98,1, %99,1 olarak tespit edilmiştir. *E. faecalis* için MİK değerleri bakılan antibiyotikler için her iki standart arasında istatistiksel anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 6).

***E. faecium*:** *E. faecium*'da CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre sırasıyla %95,7 ve %98,9 duyarlılık oranları ile en duyarlı antibiyotik linezolid olarak tespit edilmiştir. Ampisilin, vankomisin, teikoplaninin CLSI (6)'a göre duyarlılık yüzdeleri sırasıyla %2,2, %93,5, %92,4, EUCAST (7)'a göre duyarlılık yüzdeleri ise %10,9,

%93,5, %92,4 olarak tespit edilmiştir. Ampisilin CLSI (6)'a göre %97,8, EUCAST (7)'a göre %89,1 oranında dirençli saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 7).

Koagülaz negatif stafilokok (KNS): KNS için üyelerinde CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre sırasıyla %100 ve %98,9 oranı ile en duyarlı antibiyotikler linezolid ve vankomisin olarak tespit edilmiştir. CLSI (6) standartına göre vankomisin ve linezolidten sonra en duyarlı antibiyotikler sırasıyla %96,1, %90,2, %80,7, %78,2 duyarlılık oranları ile teikoplanin, levofloksasin, moksifloksasin ve klindamisin olarak tespit edilmiştir. EUCAST (7) standartına göre vankomisin ve linezolidten sonra en duyarlı antibiyotikler sırasıyla %91,6, %90,2, %80,7, %72,3 duyarlılık oranları ile teikoplanin, levofloksasin, moksifloksasin ve trimetoprim-sulfametoksazol belirlenmiştir. KNS üyelerinde MİK değerleri bakılan antibiyotikler arasında CLSI (6)

Tablo 6. *E. faecalis* suşlarının CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

<i>E. faecalis</i> n=107 (%6,6)					
	CLSI		EUCAST		P değeri
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	
Ampisilin	97.2	2.8	96.3	3.7	>0,05
Vankomisin	98.1	1.9	98.1	1.9	>0,05
Teikoplanin	99.1	0.9	99.1	0.9	>0,05
Linezolid	100	0	100	0	. ^a

a: Durum sabit olduğu için istatistik analiz yapılmamıştır. S: Duyarlı , R: Dirençli

Tablo 7. *E. faecium* suşlarının CLSI 2015 ve EUCAST 2015 standartlarına göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

<i>E. faecium</i> n=92 (%5,6)					
	CLSI		EUCAST		P değeri
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	
Ampisilin	2.2	97.8	10.9	89.1	<0,05
Vankomisin	93.5	6.5	93.5	6.5	>0,05
Teikoplanin	92.4	7.6	92.4	7.6	>0,05
Linezolid	95.7	4.3	98.9	1.1	>0,05

S: Duyarlı , R: Dirençli

Tablo 8. KNS suşlarının CLSI 2015 ve EUCAST 2015 standartlarına göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

KNS n=1.219 (%75,4)					
	CLSI		EUCAST		P değeri
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	
Trimetoprim-sulfametoksazol	72.3	27.7	72.3	27.7	>0,05
Klindamisin	78.2	21.8	13.5	86.5	<0,05
Siprofloksasin	46.6	53.4	46.7	53.3	>0,05
Levofloksasin	90.2	9.8	90.2	9.8	>0,05
Moksifloksasin	80.7	19.3	80.7	19.3	>0,05
Tetrasiklin	61.0	39.0	45.0	55.0	<0,05
Vankomisin	98.9	1.1	98.9	1.1	>0,05
Teikoplanin	96.1	3.9	91.6	8.4	<0,05
Linezolid	100	0	100	0	. ^a
Rifampin	67.8	32.2	64.5	35.5	>0,05

a: Durum sabit olduğu için istatistik analiz yapılmamıştır. S: Duyarlı , R: Dirençli

ve EUCAST (7) standartlarına göre yorumlandığında klindamisin, tetrasiklin ve teikoplanin dirençleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 8).

Staphylococcus aureus: *S. aureus* CLSI ve EUCAST standartlarına göre %100 duyarlılık oranları ile en yüksek duyarlılığa sahip antibiyotikler vankomisin, linezolid ve moksifloksasin olmuştur. Penisilin direnci her iki standarta göre de %100 olarak bulunmuştur. CLSI (6) standartına göre vankomisin, linezolid ve moksifloksasinden sonra en duyarlı antibiyotikler sırasıyla %99,4, %96,2, %95,6, %95,6 duyarlılık oranları ile levofloksasin, trimetoprim - sulfametoksazol, klindamisin ve teikoplanin olmuştur. EUCAST (7) standartına göre vankomisin, linezolid ve moksifloksasinden sonra en duyarlı antibiyotikler sırasıyla %99,4, %96,2, %95,6, %83,8 direnç oranları ile levofloksasin, trimetoprim-

sulfametoksazol, teikoplanin ve gentamisin olmuştur. Genel olarak bakılan antibiyotikler EUCAST standardı ile değerlendirildiğine CLSI (6)'a göre aynı direnç oranında veya daha dirençli bulunmuştur. Klindamisin direnci CLSI (6)'a göre %4,4, EUCAST (7)'a göre %88,8 olarak belirlenmiştir. Bu direnç farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 9).

Çalışmamızda, metisilin direnci *S. aureus* ve KNS'ler için sırasıyla %22,0 ve %57,7 oranında tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Kan kültürleri bakteriyemi ve sepsis tanısı için en değerli laboratuvar testidir (8). Kan kültürlerinde patojen etkenin mümkün olan en kısa süre içinde saptanması, tedaviye zamanında başlanması sağlayarak mortaliteyi önemli oranda azaltmaktadır

Tablo 9. *S. aureus* suşlarının CLSI 2015 ve EUCAST 2015 standartlarına göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

<i>S. aureus</i> n=160 (%9,9)					
	CLSI		EUCAST		P değeri
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	
Penisilin	0	100	0	100	. ^a
Oksasilin	78.1	21.9	78.1	21.9	>0,05
Trimetoprim-sulfametoksazol	96.2	3.8	96.2	3.8	>0,05
Eritromisin	78.1	21.9	79.4	20.6	>0,05
Klindamisin	95.6	4.4	11.2	88.8	<0,05
Siprofloksasin	79.4	20.6	79.4	20.6	>0,05
Levofloksasin	99.4	0.6	99.4	0.6	>0,05
Moksifloksasin	100	0	100	0	. ^a
Tetrasiklin	73.8	26.2	71.2	28.8	>0,05
Gentamisin	83.8	16.2	83.8	16.2	>0,05
Vankomisin	100	0	100	0	. ^a
Teikoplanin	95.6	4.4	95.6	4.4	>0,05
Linezolid	100	0	100	0	. ^a
Rifampin	78.1	21.9	78.1	21.9	>0,05

a: Durum sabit olduğu için istatistik analiz yapılmamıştır. S: Duyarlı , R: Dirençli

(9). Gram-pozitif koklar özellikle de koagülaz negatif stafilkoklar kan kültürlerinden en sık soyutlanan mikroorganizmalardır (10). Hastaneler arasında değişen oranlarda Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerle oluşan sepsis tablolarından söz edilmekte ve gram-negatif bakterilerin %15-35, Gram-pozitif bakterilerin %64-80 arasında enfeksiyon etkeni olduğu bildirilmektedir (11-14). Çalışmamızda; pozitif kan kültürlerinde, Gram-pozitif koklardan (%63,3) sonra en fazla Gram-negatif bakterilerin izole edildiği görülmüştür (%34,1). Gram-pozitif bakterilerden en sık koagülaz negatif stafilkok (KNS), ikinci sıklıkta enterokoklar izole edilmiştir. Gram-negatif bakterilerden sırasıyla; *E. coli*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp. ve *Pseudomonas* spp. izole edilen kökenler olmuştur.

Ülkemizden bildirilmiş kandidemi olgularında, çeşitli merkezlerden farklı oranlar verilmeyle beraber, çoğunlukla *C. albicans* birinci sırada, *C. parapsilosis* ise ikinci sırada yer almaktadır. Öztürk ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada (15) *C. albicans* %53, *C. parapsilosis* %30, *C. tropicalis* %5,5 oranında saptanmıştır. Çalışmamızda ise 33 (%50,7) *Candida albicans*, 11 (%16,9) *Candida glabrata*, 9 (%13,8) *Candida parapsilosis*, 6 (%9,2) *Candida tropicalis*, 3 (%4,6) *Candida kefyr* olarak bulunmuştur.

Enterokoklar kan dolaşımı enfeksiyonlarında üçüncü ve ya dördüncü sıklıkta izole edilen bakterilerdir (16). Çalışmamızda da enterokoklar KNS, *E. coli* ve *Acinetobacter* spp.'den sonra dördüncü sırayı almıştır. Enterokoklarda vankomisine direnç oranını Türk-Dağı ve ark. (17) %9.1 bulmuşlardır. Çalışmamızda enterokoklarda tür ayrımı yapılarak direnç oranına bakıldığında *E. faecium* için vankomisin direnci %6,5, *E. faecalis* için vankomisin direnci %1,8 olarak bulunmuştur. Enterokoklarda vankomisin direnç oranları CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre değerlendirildiğinde aynı saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda CLSI (6)'dan EUCAST (7)'a geçişte Gram-pozitif bakterilerin direnç oranlarında önemli bir değişiklik raporlanmamıştır, fakat

gram-negatif bakterilerde özellikle sefalosporin, karbapenem ve kinolon grubu antibiyotiklerde direnç oranlarında artışlar gösterilmiştir (18-21). Çalışmamızda *E. coli* suşları için amikasin, seftazidim ve tikarsilin-klavulanik asit direnç oranlarının EUCAST (7)'da anlamlı olarak daha dirençli olduğu izlenmiştir ($p<0,05$). *Acinetobacter* spp. için MİK değerleri bakılan antibiyotiklerin hiçbirinde her iki standarta göre de anlamlı fark bulunmamıştır. CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre *Klebsiella* spp. için bakılan antibiyotiklerin MİK değerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Çalışmamızda *Pseudomonas* spp'de aztreonam direnç oranı CLSI (6)'a göre %56,1, EUCAST (7)'a göre %98,1 olarak bulunmuştur ($p<0,05$). Bu fark anlamlı olarak değerlendirilmiştir ve bu farkın CLSI (6) standartında aztreonam için üst sınır MİK değerinin 32 iken EUCAST (7)'da 4 olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. *E. faecalis* için MİK değerleri bakılan antibiyotikler için her iki standart arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Çalışmamızda *E. faecium* suşları için ampisilin CLSI (6)'a göre %97,8, EUCAST (7)'a göre %89,1 oranında dirençli saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). KNS üyelerinde MİK değerleri bakılan antibiyotikler arasında CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre yorumlandığında klindamisin, tetrasiklin ve teikoplanin dirençleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Klindamisin EUCAST (7)'da daha dirençli bulunmasının sebebi daha çok üst sınır MİK değerinin EUCAST (7)'da 0.5 iken CLSI (6)'da 4 olmasına dayandırılmıştır. Tetrasiklin ve teikoplaninin EUCAST (7)'da daha dirençli bulunması EUCAST (7)'da üst ve alt sınır MİK değer aralıklarının daha dar ve üst sınır MİK değerlerinin daha düşük olmasına bağlanmıştır. Çalışmamızda *S. aureus* suşlarının klindamisin direnci CLSI (6)'a göre %4.4, EUCAST (7)'a göre %88.8 olarak belirlenmiştir. Bu direnç farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). EUCAST (7)'a göre daha dirençli bulunmasının nedeni EUCAST (7) standartında üst sınır MİK değerinin CLSI (6)'a göre daha düşük olması olabilir.

Metisilin dirençli stafilkoklar bakteriyemilerde

mortalite, morbidite ve tedavi maliyetlerinin artmasına neden olmaktadır. Türkiye’de yapılan çeşitli çalışmalarda *S. aureus*’da metisilin direnci %28,4 - %71,7, KNS’lerde metisilin direnci %56,4-89,7 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (22-26). Çalışmamızda, metisilin direnci *S. aureus* ve KNS’ler için sırasıyla %22,0 ve %57,7 oranında tespit edilmiştir.

Sonuç olarak kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıklarını CLSI (6) ve EUCAST (7) standartlarına göre karşılaştırdığımız bu çalışmada CLSI (6)’dan EUCAST (7)’a geçiş sürecinde direnç oranlarında ne gibi değişiklikler

olabileceğini ortaya koymak amaçlanmıştır. EUCAST (7) standartında kullanılan MİK aralıkları CLSI (6) standardı ile karşılaştırıldığında antibiyotiklerin daha dirençli raporlanmasına yol açan MİK değerlerine sahiptir (6,7). Çalışmamızda ise hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilerde genel olarak birçok antibiyotik için direnç oranları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu nedenle, en azından direnç haritalarını değerlendirme noktasında coğrafi olarak yakın olduğumuz Avrupa ülkelerinin kullanmış olduğu EUCAST (7) standartlarını kullanmak daha yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. The International Sepsis Forum. Guidelines for the management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*, 2004; 27 (Suppl.1): 1-134.
2. Anonymous. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 1992; 20 (6): 864- 74.
3. Anonymous. <http://www.ihl.org/IHL/Topics/CriticalCare/Sepsis/>, Erişim Tarihi: 07.06.2017.
4. Yüce P, Demirdağ K, Kalkan A, Özden M, Denk A, Kılıç SS. Kan kültürlerinde izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, 2005;19 (1):17-21.
5. Yurtsever SG, Baran N, Afflar İ, Yalçın MA, Kurultay N, Türker M. İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesinde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere karşı duyarlılıkları. *Klimik Derg*, 2006; 19:56- 9.
6. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25, Wayne: CLSI, 2015
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. <http://www.eucast.org>, Erişim tarihi: 06.10.2018.
8. Roh KH, Kim JY, Kim HN, Lee HJ, Sohn JW, Kim MJ, et al. Evaluation of BACTEC Plus aerobic and anaerobic blood culture bottles and BacT/Alert FAN aerobic and anaerobic blood culture bottles for the detection of bacteremia in ICU patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012; 73 (3): 239-42.
9. Ntusi N, Aubin L, Oliver S, Whitelaw A, Mendelson M. Guideline for the optimal use of blood cultures. *S Afr Med J*, 2010; 100(12): 839-43.
10. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. *Bailey and Scott’s Diagnostic Microbiology*. 9th ed. London: Mosby Co, 1994: 193-209.
11. Çetin F, Mumcuoğlu İ, Aksoy A, Gürkan Y, Aksu N. Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2014; 71(2): 67-74.
12. Ulusan-Gündoğdu DZ, Çopur-Çiçek A, Mutlu MA, Koçyiğit S. Kan kültürlerinden izole edilen gram negatif çomaklar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Eur J Health Sci*, 2015;1(2):58-62.
13. Çopur-Çiçek A, Şentürk-Köksal Z, Ertürk A, Köksal E. Rize 82. Yıl Devlet Hastanesi’nde bir yıllık sürede kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2011; 68(4): 175-84.

14. Gültekin E, Uyanık MH, Hancı H, Erdil Z, Gelen FN, Çelebi S. Kan kültürlerinden izole edilen nonfermentatif gram negatif bakterilerin çeşitliantibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg, 2014;28(3):79-85.
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. Jones RN, Low DE, Pfaller MA. Epidemiologic trends in nosocomial and community-acquired infections due to antibiotic-resistant gram positive bacteria: the role of streptogramins and other newer compounds. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999; 33(2): 101-12.
17. Türk-Dağı H, Arslan U, Tuncer El. Kan kültürlerinden izole edilen enterokoklarda antibiyotik direnci. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2011; 41(3):103-6.
18. Hombach M, Bloemberg GV, Böttger ECJ. Effects of clinical breakpoint changes in CLSI guidelines 2010/2011 and EUCAST guidelines 2011 on antibiotic susceptibility test reporting of Gram-negative bacilli. Antimicrob Chemother, 2012;67(3):622-32.
19. Hombach M, Wolfensberger A, Kuster SP, Böttger EC. Influence of clinical breakpoint changes from CLSI 2009 to EUCAST 2011 antimicrobial susceptibility testing guidelines on multidrug resistant cerates of Gram-negative rods. J Clin Microbiol, 2013;51(7):2385-7.
20. Wolfensberger A, Sax H, Weber R, Zbinden R, Kuster SP, Hombach M. Change of antibioticsusceptibility testing guidelines from CLSI to EUCAST: influence on cumulative hospital antibiograms. PLoS One, 2013;8(11):e79130.
21. Marchese A, Esposito S, Barbieri R, Bassetti M, Debbia E. Does the adoption of EUCASTsusceptibility breakpoints affect the selection of antimicrobials to treat acute communityacquired respiratory tract infections? BMC Infect Dis, 2012;12:181.
22. Yüce P, Demirdağ K, Kalkan A, Özden M, Denk A, Kılıç SS. Kan kültürlerinde izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg, 2005; 19:17-21.
23. Duman Y, Kuzucu Ç, Çuğlan SS. Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antimikrobiyal duyarlılıkları. Erciyes Tıp Derg, 2011; 33:189-96.
24. Yılmaz S, Gümral R, Güney M ve ark. İki yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. Gülhane Tıp Derg, 2013; 55:247-52.
25. Demirbakan H, Dağlar D, Yıldırım Ç, Öztürk F, Öngüt G, Yaman M ve ark. Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2005; 35 (3):183-8.
26. Er H, Aşık G, Yoldaş Ö, Demir C, Keşli R. Kan Kültürlerinde izole edilerek tanımlanan mikroorganizmaların ve antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2015; 45(1):48-54.

Yoğun bakım ünitelerinde kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarının moleküler yöntemlerle karakterizasyonu

Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates causing bloodstream infections in intensive care unit

Ayşegül GÖZALAN¹, Özlem ÜNALDI², Fisun KIRCA³, Nilay ÇÖPLÜ⁴, Tuba MÜDERRİS⁵,
Ziya Cibali AÇIKGÖZ⁶, Rıza DURMAZ⁶

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada; yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastaların kan örneklerinden izole edilen karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişki ve karbapenem direnç genlerinin moleküler yöntemler ile araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Kan kültürü şişelerinden bakteri izolasyonu için Bactec 9240 sistemi (Becton Dickinson, ABD) kullanıldı. Çalışmaya; konvansiyonel testler, API 20NE (bioMérieux, Fransa) ve Phoenix TM 100 sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile tanımlanan ve *bla*_{OXA-51} gen varlığı gösterilerek doğrulanan 112 *A. baumannii* suşu dahil edildi. Antimikrobiyal duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve Phoenix TM 100 sistemi ile gerçekleştirildi. Karbapenem direnç genleri; *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{NDM-1} Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırıldı. *Acinetobacter baumannii* suşları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi için Pulse Field Jel Elektrofrezisi (PFGE) yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Suşların antibiyotik direnç yüzdeleri gentamisin, amikasin, tobramisin, netilmisin, seftazidim, trimetoprim/sulfametoksazol, piperasilin,

ABSTRACT

Objective: In this study, the aim was to investigate the clonal relationship between carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates and carbapenem resistance genes isolated from blood samples of patients followed in intensive care units by molecular methods.

Methods: Bactec 9240 system (Becton Dickinson, USA) was used for the isolation of bacteria from blood culture flasks. Identification of 112 strains included in the study were performed by conventional tests, API 20NE (bioMérieux, France) and Phoenix TM 100 system (Becton Dickinson, USA) and confirmed by the presence of *bla*_{OXA-51} gene. Antimicrobial susceptibility tests were performed by Kirby-Bauer disk diffusion method and Phoenix TM 100 system. Carbapenem resistance genes; *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{NDM-1} were investigated by Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) was used to determine the clonal relationship between *Acinetobacter baumannii* strains.

Results: The antibiotic resistance percentages of strains for gentamicin, amikacin, tobramycin, netilmicin, ceftazidime, trimethoprim/sulfamethoxazole,

¹Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Antalya

²Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı, Ankara

³Ankara Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

⁴Kastamonu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Kastamonu

⁵Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, İzmir

⁶Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Ayşegül GÖZALAN

Alanya Alaaddin Keykubat Üni., Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD Antalya - Türkiye

Tel : +90 530 787 08 72 E-posta / E-mail : agozalan@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 09.05.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 09.11.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.53323

Gözalan A, Ünalı Ö, Kırcı F, Çöplü N, Müderris T, Açıkgöz ZC, Durmaz R. Yoğun bakım ünitelerinde kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarının moleküler yöntemlerle karakterizasyonu. Turk Hij Den Biol Derg, 2020; 77(1): 15-24

siprofloksasin, ampicilin/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam ve sefoperazon/sulbaktam için sırasıyla %88; %81; %78; %36; %98,5; %96; %89; %100; %100; %93; %91 olarak bulundu. İmipenem ve meropenem MİK değerleri tüm grupta ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'nin üzerinde saptandı. Çalışmaya alınan izolatların tümünde *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-23} gen varlığı tespit edildi. PFGE yöntemi ile 62 farklı pulsotip saptandı. Pulsotiplerden 19 tanesi birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren (eşittir üzeri) ≥ 2 suş içermektedir. Toplam 108 (%96,4) suşun (benzerlik oranı pulsotipler için %85 ve üzeri kabul edildiği durumda) klonal yönden ilişkili 11 grup içerisinde toplandıkları gözlemlendi.

Sonuç: Bu çalışmada, karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarının netilmisin dışında çalışılan tüm antibiyotiklere çok yüksek yüzdelerle dirence sahip olduğu ve hastane içinde çapraz bulaş yoluyla yayıldığı gösterildi. Bu suşlar hastane enfeksiyonları açısından risk oluşturmaktadır, bunula birlikte klonal yönden ilişkili suşlar spesifik bir ünite ve zaman periyodu ile sınırlı değildir.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, antibiyotik direnci, yoğun bakım üniteleri, polimeraz zincir reaksiyonu, pulsed-field jel elektroforezi

piperacillin, ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam and cefoperazone/sulbactam, were 88%; 81%; 78%; 36%; 98.5%; 96%; 89%; 100%; 100%; 93%; 91% respectively. MIC values of imipenem and meropenem were determined above ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the whole group. *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} genes were detected in all isolates included in the study. By PFGE method, 62 different pulsotypes were detected. Among the pulsotypes, 19 of them contained ≥ 2 strains. It was observed that 108 (96.4%) strains were clustered in 11 clonally related groups when the similarity between pulsotypes for grouping was limited to 85% or more.

Conclusion: In this study, it was observed that carbapenem-resistant *A. baumannii* strains were resistant for all tested antibiotics at high levels except netilmicin and spread in the hospital via cross contamination. These strains posed a risk for hospital infections, however, clonal-related strains were not limited to a specific unit and time period.

Key Words: *Acinetobacter baumannii*, antibiotic resistance, Intensive care units, Polymerase Chain Reaction, pulsed-field gel electrophoresis

GİRİŞ

Acinetobacter spp. türleri özellikle yoğun bakım üniteleri için önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan en önemli klinik türlerden biri *Acinetobacter baumannii*'dir. Bakterinin yüksek antibiyotik direnci ve cansız, kuru yüzeylerde yaşayabilme yeteneği hastane ortamındaki yaşam süresini uzatarak salgınların görülmesine neden olur. *Acinetobacter nosocomialis* ve *Acinetobacter pittii* türlerinin de gittikçe artan oranlarda hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olduğu, buna karşın çevresel

bir tür olan *Acinetobacter calcoaceticus*'un çok daha az klinik öneme sahip olduğu rapor edilmektedir (1-4). *Acinetobacter* türlerinin tanımlanmasında biyokimyasal testler güvenilir değildir. Bu nedenle genotipik olarak farklı ancak fenotipik olarak - ayırt edilemez düzeyde- benzer bu türler *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* complex (*Acb complex*) olarak adlandırılmıştır (5). Son yıllarda bu komplekse *Acinetobacter seifertii* ve *Acinetobacter djikshoorniae* dahil edilmiştir (6,7).

A. baumannii özellikle ventilatör ilişkili pnömoni

başta olmak üzere bakteriyemi, menenjit, üriner sistem, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olabilir (3). *A. baumannii* enfeksiyonuna bağlı mortalite hızı %30 ile %75 arasında değişiklik gösterir (8).

A. baumannii'nin kolistin, polimiksin B ve tigesiklin dahil hemen tüm antibiyotiklere direnç geliştirdiği rapor edilmektedir (1). Son yıllarda; ciddi enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnç oranlarındaki artışa dikkat çekilmektedir. *A. baumannii* izolatları için karbapenem direncinden sorumlu en önemli mekanizmalar; OXA tipi karbapenemazlar [Carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamases (CHDLs)] ve metallo-β-laktamazlardır [metallo-β-lactamases (MBLs)] (2,9). Karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarının klonal yayılımının (sıklıkla Avrupa klonu II) CHDL taşıyıcılığı ile paralel olduğu rapor edilmektedir (10). Bu nedenle, özellikle karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişki ve yayılımının moleküler yöntemler ile tanımlanması ve elde edilen bilginin hastane enfeksiyon kontrol programlarında kullanılması önemlidir.

Bu çalışmada; yoğun bakımda takip edilen hastane kaynaklı bakteriyemi/sepsis olgularının kan örneklerinden izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkinin PFGE ile gösterilmesi ve karbapenem direnç genlerinin moleküler yöntemler ile araştırılması amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Ocak 2012-Haziran 2014 tarihleri arasında yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastaların kan örneklerinden izole edilen karbapenem dirençli 112 *A. baumannii* izolatları dahil edilmiştir. Bu araştırma Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik komitesi tarafından onaylanmıştır (26379996/78).

Bakteri izolasyon ve tanımlanması:

Kan kültürü şişelerinden bakteri izolasyonu için Bactec 9240 sistemi (Becton Dickinson, ABD)

kullanıldı. İzolatlar; konvansiyonel testler (Gram boyama, oksidaz testi, üç şekerli besiyerinde üreme ve hareket özelliği), API 20NE (bioMérieux, Fransa) ve Phoenix TM 100 sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile tanımlandı. *A. baumannii* olarak tanımlanan suşların *bla_{OXA-51}* geni PCR ile araştırılarak doğrulandı (4,11). Birden çok üremesi olan hastaların ilk *A. baumannii* izolatu çalışmaya dahil edildi.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri:

Antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT) CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu) standartlarına uygun olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve Phoenix TM 100 sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile gerçekleştirildi ve yorumlandı (12). Gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), netilmisin (30 µg), seftazidim (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), siprofloksasin (5 µg), trimetoprim/sülfametoksazol (1.25/23.75 µg), piperasilin (100 µg), ampisilin/sülbaktam (10/1 µg), piperasilin/tazobaktam (100/10 µg) ve sefoperazon/sulbaktam (75/30 µg) antibiyotikleri (Oxoid, ThermoScientific, İngiltere) için test edildi. Kalite kontrol suşu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

İmipenem, ve meropenem duyarlılığı Phoenix TM 100 sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile üretici firmanın talimatlarına uygun olarak değerlendirildi. CLSI yorumlama kriterlerine göre, MİK değerleri imipenem ve meropenem için ≥ 8 µg/mL, olan suşlar dirençli kabul edildi (12).

Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

OXA-23, OXA-48, OXA-58, IMP, VIM ve NDM-1 karbapenemazları kodlayan genler Tablo 1'de baz dizileri verilen primerler kullanılarak multipleks PZR yöntemi ile araştırıldı (13-16). Tüm izolat ve standart suşlardan DNA eldesi CDC (Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi)'nin (17) kaynama protokolüne göre yapıldı. Amplifikasyon için 2,5 µL/10X TaqDNA polimeraz reaksiyon tamponu, 1,25 mM MgCl₂, her birinden 200 mM dNTP (Fermentas, USA), 10 pmol 7 çift primer, 2,5 U Taq DNA polimeraz (Fermentas, USA) ve 2 µL

Tablo 1. *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{NDM-1} gen primer dizimleri

Hedef gen	Primer 5´-3´ oligonükleotit dizisi	Amplikon büyüklüğü (bp)
OXA-48	TTGGTGGCATCGATTATCGG	744
	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	
OXA-23	CTTGCTATGTGGTTGCTTCTC	650
	ATCCATTGCCCAACCAGTC	
OXA-58	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599
	CCCCTCTGCGCTCTACATAC	
NDM-1	GTAGTGCTCAGTGTGGCAT	476
	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT	
VIM	GTGTTTGGTCGCATATCGC	380
	CGCAGCACCAGGATAGAAG	
IMP	GAATAGAGTGGCTTAATTCTC	188
	CCAAACCACTACGTTATC	

genomik DNA içeren 20 µL karışım hazırlandı. PZR koşulları; 95°C’de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 35 siklus denatürasyon (1 dakika/95°C), bağlanma (30 saniye/60°C), uzama (1,5 dakika/72°C); ve 72°C’de 10 dakika final uzama şeklinde çalışılmıştır. PZR ürünleri %1,5’lik agaroz jelde yürütüldükten sonra etidyum bromidle boyanarak UV ışık altında görüntüleme gerçekleştirildi.

Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE):

PFGE yöntemi daha önce tanımlandığı şekilde uygulandı (18). Bakteri hücre süspansiyonu %1’lik SeaKem® Gold Agarose (Lonza Rockland, Inc., Rockland, ME 04841 USA) ve %1 SDS ile karıştırılarak pluglar hazırlandı. Pluglar lizis tamponu [(50 mM Tris, 50mM EDTA [pH 8.0], 1% sarcosine ve 25 µL proteinaz K (20 mg/mL stok solüsyon)] içinde, 55°C’lik su banyosunda 2 saat boyunca çalkalandı ve hücrelerin lizise uğraması sağlandı. Ardından

55°C’lik su banyosunda 5 kere (15 dakika/yıkama) yıkama (2 kere steril ultra pür su ve 3 kere TE (Tris EOTA) tamponu; her bir yıkama basamağı için 10 mL) yapıldı. Yıkamanın ardından kromozomal DNA 30 U *Apal* (Fermantas Corporation, USA) enzimi ile kesildi. Oluşan DNA parçaları %1’lik agaroz jelde, 0,5X TBE (Tris-Borat EOTA) tamponunda CHEF-DR III sistemi (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) kullanılarak başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 20 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 19 saat olarak elektroforez yapıldı. Jeller %0,1’lik etidyum bromidle boyanıp Gellogic 2200 görüntüleme sistemi (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bantlarının fotoğrafı çekildi. BioNumerics version 7.5 yazılımı (Applied Maths, Sint Maarten Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. UPGMA (Aritmetik Ortalama ile ağırlıksız çift grup metodu) metodu ve Dice benzerlik katsayısı kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturuldu

ve kümelenme analizi yapıldı. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında tolerans %1,5 ve optimizasyon %1 olarak alındı. İzolatlar arasındaki ilişki Tenover ve ark. (19) tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak değerlendirildi.

BULGULAR

Araştırmaya alınan *A. baumannii* suşlarının %43,1'i reanimasyon yoğun bakım-2 (RYB-2), %34,5'i reanimasyon yoğun bakım-1 (RYB-1) ve %22,4'ü diğer yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalardan izole edildi.

Antibiyotik direnç yüzdeleri; gentamisin, amikasin, tobramisin, netilmisin, seftazidim, trimetoprim/sulfametoksazol, piperasilin, siprofloksasin, ampicilin/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam ve sulperazon/sulbaktam için sırasıyla %88; %81; %78; %36; %98,5; %96; %89; %100; %100; %93; %91 olarak bulundu. Minimum inhibitör konsantrasyon değerleri imipenem ve meropenem için tüm suşlarda ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'nin üzerinde tespit edildi. Çalışmaya alınan izolatların tümünde *bla*_{OXA51-like} ve *bla*_{OXA23-like} genleri saptandı. Çalışılan diğer antibiyotik direnç genleri tespit edilemedi.

PFGE yöntemi ile moleküler tiplendirmeye alınan 112 *A. baumannii* suşunda 62 farklı (PFGE tipi) pulsotip saptandı. Pulsotiplerden 19 tanesi birbirleriyle ayırt edilemez profili gösteren ≥ 2 suş içermektedir. Kümelerin genişliği 2-9 suş arasında değişmektedir. Kümeleşme oranı %61,6 olarak hesaplandı. Pulsotipler arasındaki benzerlik oranı ≥ 85 alındığında yalnızca dört suşun klonal olarak ilintisiz oldukları, 108 (%96,4) suşun ise birbirleriyle klonal yönden ilişkili 11 PFGE grup içerisinde toplandıkları kaydedildi. Klonal yönden ilişkili olan suşların yalnızca spesifik bir ünite ve zaman periyodu ile sınırlı olmadığı görüldü. En büyük grup olan PFGE grup beş içerisinde yer alan 45 suşun üç ayrı ünite içerisinde bir yılı aşkın bir süreden beri varlığını devam ettirdiği kaydedilmiştir.

TARTIŞMA

A. baumannii düşük virülansa sahip bir mikroorganizma olmakla birlikte hastanede yatan ve ciddi hastalığı olan kişilerde hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenlerdir. Yoğun bakım enfeksiyonlarının yaklaşık %20'sine *A. baumannii*'nin neden olduğu rapor edilmektedir (20). Ülkemizde yapılan bir çalışmada; *A. baumannii*'nin hastane kaynaklı gram negatif bakterilerin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonları içerisinde en yüksek mortalite hızına (%58) sahip olduğu rapor edilmektedir (21).

Acinetobacter cinsi içerisindeki türlerin antibiyotik duyarlılık ve yaptığı hastalıkların klinik görünüşleri büyük farklılıklar gösterdiği için izole edilen suşların moleküler yöntemler ile tanımlanması önemlidir. *A. baumannii*'ye spesifik intrinsik *bla*_{OXA-51} like genlerinin PZR ile gösterilmesi, bu türün tanımlanmasında basit ve güvenilir bir yöntemdir (4,11). Bazı çalışmalar ise; *bla*_{OXA-51-like} geni ISAb15 veya ISAb19 ile kesintiye uğrayabildiği için bu genin multipleks PZR'le saptanması *A. baumannii*'nin tanısında güvenilir olmayacağını ileri sürmektedir (22). Ayrıca horizontal gen transferi ile non-*A. baumannii* türlerinin de bu geni kazanabileceği rapor edilmektedir (23). Bununla birlikte; Wang ve arkadaşları (4), 2197 *bla*_{OXA-51-like} gen pozitif *A. baumannii* suşundan yalnızca birinde ISAb19 göstermiş olup, 385 non-*A. baumannii* suşunun hiç birinde *bla*_{OXA-51-like} pozitifliği saptamamıştır. Dolayısıyla araştırmacılar *bla*_{OXA-51-like} geninin *A. baumannii* tanısında belirleyici olmadığını söylemek için yeterli sayıda veri olmadığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda; Phoenix ile *A. baumannii* olarak tanımlanan tüm suşlarda *bla*_{OXA-51-like} ile birlikte *bla*_{OXA-23-like} gen varlığı gösterildi.

A. baumannii izolatlarında *bla*_{OXA-23-like} geni, ilk olarak 1985 yılında İngiltere'de gösterilmiştir (24). Bu gen ve varyantlarının (*bla*_{OXA-23-like} gen grubu) tüm dünyada en sık saptanan karbapenemaz geni olduğu (1,9,25) ve sıklıkla Avrupa klonu I veya II izolatları

tarafından eksprese edildiği rapor edilmektedir (26).

Türkiye’de 2006-2010 yılları arasında, *A. baumannii* endemik ve epidemik suşlarında karbapenemaz üretiminden *bla*_{OXA-58-like} daha sık olmak üzere, *bla*_{OXA-23-like} genlerinin sorumlu olduğu görülmektedir (27-30). Bununla birlikte; Ergin ve arkadaşları (31) 2004-2009 yılları arasında *A. baumannii* izolatlarında hakim olan *bla*_{OXA-58-like} gen oranlarının 2010 yılında azalmaya başladığını, 2008-2010 yılları arasında *bla*_{OXA-23-like} oranında artış olduğunu saptamıştır. Bu konuda yapılan diğer çalışmalar da *bla*_{OXA-23-like} gen pozitifliği oranlarındaki artış desteklemektedir (32-34).

Akdeniz ülkelerini kapsayan çok merkezli bir araştırmada ülkemize ait Acb complex izolatlarının *bla*_{OXA-23} like geni saptanma oranlarındaki artışa doripenem direncindeki artışın eşlik ettiği bildirilmektedir (35). Benzer şekilde Gur ve arkadaşları (30); *bla*_{OXA-23} karbapenemaz üreten suşların *bla*_{OXA-58} üretenlerden daha dirençli olduğunu rapor etmektedir.

Son yıllarda özellikle yoğun bakım ünitelerinde gözlenen çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının yayılımı tüm dünyada endişe ile izlenmektedir. EARS-Net (Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı) 2016 sürveyans raporuna göre; Avrupa bölgesindeki ülkelerin %55.4’den fazlası *A. baumannii* izolatları için florokinolon, aminoglikozid ve karbapenem grubu antibiyotiklerden en az birine direnç bildirmektedir (36). SMART surveyans çalışması kapsamında yapılan bir araştırmada; çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* insidansının Afrika, Asya ile Latin Amerika’da %75 ve Orta Doğu ile Avrupa’nın bazı bölgelerinde %90 oranlarına ulaştığı rapor edilmektedir (37).

A. baumannii enfeksiyonlarının tedavisinde etkin ve güvenli antibiyotikler olarak kabul edilen karbapenemlerin yaygın kullanımı son yıllarda bu gruba karşı gittikçe artan bir dirence neden olmuştur (1). Aydın ve arkadaşları (21); ülkemizin farklı

bölgelerini kapsayan çok merkezli çalışmalarında *A. baumannii* kan izolatlarında antibiyotik direnç hızlarını değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada; karbapenem, flurokinolon, üçüncü kuşak sefalosporinler, aminoglikozid ve kolistin direnç oranları sırası ile; %91,8, %89, %93,8, %70,9, %2,1 olarak belirlendi. Bu araştırmada; karbapenem dirençli *A. baumannii* suşları ile çalışıldığı için antibiyotik direnç oranlarımız yüksek bulundu. Karbapeneme dirençli *A. baumannii* izolatları, minosiklin/tigesiklin ve polimiksinler (kolistin, polimiksin B) dışında genellikle diğer tüm antibiyotiklere karşı dirençlidir (1,9).

Dirençli *A. baumannii* izolatlarının hastane ortamındaki çapraz bulaş sıklığının ortaya konulması, uygulanmakta olan kontrol önlemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi ve daha etkin olabilecek yöntemlerin geliştirilmesi açısından önemlidir. Çalışmamızda PFGE sonuçları karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarının çapraz bulaş geliştirdiğini (%96.4) ve klinikler arası yayılmanın bir yılı aşkın süreden beri devam ettiğini göstermektedir. Çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde dirençli *A. baumannii* klonlarının hastane içinde yalnızca bir klinikle sınırlı kalmayıp, aynı zamanda farklı klinikler ve coğrafik bölgeler arasında da yayılım gösterdiği ortaya koyan başka bir çalışma da vardır (32).

Sonuç olarak; özellikle yoğun bakım ünitelerinde yüksek morbidite ve mortalite hızına sahip bir enfeksiyon etkeni olan *A. baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişki, çalışma popülasyonunda uygulanmakta olan kontrol önlemlerinin gözden geçirilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Moleküler tiplendirme verilerine dayalı etkin bir kontrol ve sürveyans programının uygulanması, antibiyotik direnci nedeniyle hastaların tedavi seçeneklerini sınırlayan ve enfeksiyon kontrol önlemlerini tehdit eden bu önemli halk sağlığı sorununun çözümüne önemli oranda katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Doi Y, Murray GL, Peleg AY. Acinetobacter baumannii: evolution of Antimicrobial resistance-treatment options. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015; 36(1): 85-98.
2. Lee HY, Chen CL, Wu SR, Huang C .W, Chiu CH. Risk factors and outcome analysis of acinetobacter baumannii complex bacteremia in critical patients. *Crit Care Med*, 2014; 42(5): 1081-8.
3. Chusri S, Chongsuvivatwong V, Rivera JI, Silpapojakul K, Singkhamanan K, McNeil E et al. Clinical outcomes of hospital-acquired infection with Acinetobacter nosocomialis and Acinetobacter pittii. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014; 58(7): 4172-9.
4. Wang J, Ruan Z, Feng Y, Fu Y, Jiang Y, Wang H et al. Species distribution of clinical Acinetobacter isolates revealed by different identification techniques. *PLoS One*, 2014; 13;9(8),e104882.
5. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing. Reliability of phenotypic tests for identification of Acinetobacter species. *J Clin Microbiol*, 1991; 29(2): 277-82.
6. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. Acinetobacter seifertii sp. nov., a member of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2015; 65(Pt 3): 934-42.
7. Cosgaya, C, Mari-Almirall M, Van Assche A, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M et al. Acinetobacter dijkshoorniae sp. nov., a member of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016; 66(10): 4105-11.
8. Wenzler E, Goff DA, Humphries R, Goldstein EJC. Anticipating the Unpredictable: A review of Antimicrobial Stewardship and Acinetobacter Infections. *Infect Dis Ther*, 2017; 6(2): 149-72.
9. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in Acinetobacter baumannii: from bench to bedside. *World J Clin Cases*, 2014; 2(12): 787-814.
10. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. *J Antimicrob Chemother*, 2010; 65(2): 233-8.
11. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of Acinetobacter baumannii by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*, 2006; 44(8): 2974-6.
12. Anonymous. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Fifth Informational Supplement, M100-S25. ISBN: 1-56238-989-0, Wayne, CLSI, 2015.
13. Gómez-Gil MR, Paño-Pardo JR, Romero-Gómez MP, Gasior M, Lorenzo M, Quiles I, Mingorance J. Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother*, 2010; 65(12): 2695-7.
14. Garza-Ramos U, Morfin-Otero R, Sader HS, Jones RN, Hernández E, Rodríguez-Noriega et al. Metallo-beta-lactamase gene bla(IMP-15) in a class 1 integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008; 52(8): 2943-6.
15. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012; 56(1): 559-62.
16. Lim J, Cho HH, Kim S, Kim J, Kwon KC, Park JW, Koo SH. The Genetic characteristics of Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii Coproducing 16S rRNA Methylase armA and Carbapenemase OXA-23. *J Bacteriol Virol*, 2013; (43)1: 27-36.
17. Anonymous. Center for disease control and Prevention. Multiplex Real-Time PCR Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo-β-lactamase (NDM-1) genes, CDC . <http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/kpc-ndm1-lab-protocol>. (Erişim Tarihi: 2011).

18. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*, 2005; 43(9): 4328-35.
19. Tenover FC, Arbeit RD., Goering RV1. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol*, 1997; 18(6): 426-39.
20. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 2009; 2: 302(21): 2323-9.
21. Aydın M, Ergönül Ö, Azap A, Bilgin H, Aydın G, Çavuş SA, et al. Rapid emergence of colistin resistance and its impact on fatality among healthcare-associated infections. *J Hosp Infect*, 2018; 98(3): 260-3.
22. Zander E, Higgins PG, Fernández-González A, Seifert H. Detection of intrinsic blaOXA-51-like by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Med Microbiol*, 2013; 303(2): 88-9.
23. Lee YT, Kuo SC, Chiang MC, Yang SP, Chen CP, Chen TL, et al. Emergence of carbapenem-resistant non-baumannii species of *Acinetobacter* harboring a blaOXA-51-like gene that is intrinsic to *A. baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012; 56(2): 1124-7.
24. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007; 51(10): 3471-84.
25. Sarı AN, Biçmen M, Gülay Z. The first report on the outbreak of OXA-24/40-like carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *Jpn J Infect Dis*, 2013; 66(5): 439-42.
26. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*, 2010; 16(1): 35-40.
27. Ozen N, Ergani A, Naas T, Ogunc D, Gultekin M, Colak D, et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58in Turkey. *The Open Antimicrob Agents J*, 2009; 1: 1-8.
28. Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A, et al. High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 58(3): 537-42.
29. Kulah C, Mooij MJ, Comert F, Aktas E, Celebi G, Ozlu N, et al. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *Int J Antimicrob Agents*, 2010; 36(2): 114-8.
30. Gur D, Korten V, Unal S, Deshpande LM, Castanheira M. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. *J Med Microbiol*, 2008; 57(Pt 12): 1529-32.
31. Ergin A, Hascelik G, Eser OK Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. *Scand J Infect Dis*, 2013; 45(1): 26-31.
32. Ahmed SS, Alp E, Ulu-Kilic A, Dinc G, Aktas Z, Ada B, et al. Spread of carbapenem-resistant international clones of *Acinetobacter baumannii* in Turkey and Azerbaijan: a collaborative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016; 35(9): 1463-8.
33. Ciftci IH, Aşık G, Karakeçe E, Oksüz L, Yağcı S, Sesli Çetin E, et al. Distribution of blaOXA genes in *Acinetobacter baumannii* strains: a multicenter study]. *Mikrobiyol Bul*, 2013; 47(4): 592-602.

34. Keskin H, Tekeli A, Dolapci İ, Öcal D. Molecular characterization of beta-lactamase-associated resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical samples. *Mikrobiyol Bul*, 2014; 48(3): 365-76.
35. Castanheira M, Costello SE, Woosley LN, Deshpande LM., Davies TA, Jones RN. Evaluation of clonality and carbapenem resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex and *Enterobacteriaceae* isolates collected in European and Mediterranean countries and detection of two novel β -lactamases, GES-22 and VIM-35. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014; 58(12): 7358-66.
36. Anonymous. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, Antimicrobial Resistance Surveillance Network) 2016, Stockholm: ECDC; 2017. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AMR-surveillance-Europe-2016.pdf> (Erişim tarihi: 2017). doi 10.2900/296939.
37. Lob SH, Hoban DJ, Sahm DF, Badal E. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*, 2016; 47(4): 317-23.

İdrar yolu enfeksiyonlarında kültürden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları

The isolated bacteria from culture and antibiotic susceptibilities in urinary tract infections

Duygu MERT¹, Sabahat ÇEKEN¹, Mustafa ERTEK¹

ÖZET

Amaç: İdrar yolu enfeksiyonu tüm enfeksiyon hastalıkları içinde ikinci sıklıkta görülmektedir. Kostovertebral açı hassasiyeti, ateş, suprapubik hassasiyet, dizüri, pollaküri ve idrar kaçırma gibi klinik bulgularla birlikte bakteriyüri ve/veya piyüri bulunması idrar yolu enfeksiyonu olarak tanımlanır. Akut enfeksiyonlarda en sık izole edilen bakteri *Escherichia coli*'dir. Bu çalışmanın amacı idrar yolu enfeksiyonu olan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen bakterileri saptamak ve bu bakterilerin antibiyogram sonuçlarını inceleyerek tedavide yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını ve direnç durumlarını araştırmaktır.

Yöntem: Bu çalışmada idrar yolu enfeksiyonu tanısı ile 1 Aralık 2014 ile 1 Ekim 2016 tarihleri arasında üçüncü basamak bir hastanenin klinik mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen idrar kültürleri retrospektif olarak incelenmiştir. Tam otomatik idrar tetkikinde piyüri ve kültürde 10⁵ koloni/mL üremesi olan idrar yolu enfeksiyonu tanısı konmuş hastalar çalışmaya alınmıştır. Üreyen etkenlerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemiyle Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi

ABSTRACT

Objective: Urinary tract infection is the second most common among all infectious diseases. Urinary tract infection is defined as presence of bacteriuria and/or pyuria with clinical findings such as costovertebral angle sensitivity, fever, suprapubic tenderness, dysuria, pollacuria and urinary incontinence. The most commonly isolated bacterium in acute infections is *Escherichia coli*. The aim of this study is to determine the bacteria isolated from the urine cultures of patients with urinary tract infections and to investigate the antibiogram results of these bacteria and to investigate their susceptibility and resistance to antibiotics commonly used in treatment.

Methods: In this study, urine cultures sent to the clinical microbiology laboratory of a tertiary hospital between December 1, 2014 and October 1, 2016 with the diagnosis of urinary tract infection were retrospectively analyzed. Patients diagnosed with urinary tract infection with pyuria and 10⁵ colony/mL growth in culture in a fully automated urine test were included in the study. Identification of the reproductive factors and antibiotic susceptibility tests were performed by disc diffusion method according to the recommendations of The

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Duygu MERT

Ankara Onkoloji EAH, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği Ankara - Türkiye

Tel : +90 506 648 62 79

E-posta / E-mail : drduygumert@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 23.10.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 24.09.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.57984

Mert D, Çeken S, Ertek M. İdrar yolu enfeksiyonlarında kültürden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 25-32

(EUCAST) önerilerine göre yapılmıştır. Veriler sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir.

Bulgular: Yetmiş altı hastanın idrar kültür sonucu değerlendirilmiştir. İdrar kültürlerinden izole edilen 48 suş ve bu suşların antibiyogram sonuçları incelenmiştir. En sık izole edilen mikroorganizma *E. coli* (%69) olup 33 suş saptanmıştır. İzole edilen 48 (%100) suş içinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)-pozitif *E. coli* 20 (%42), GSBL-negatif *E. coli* 13 (%27), GSBL-pozitif *Klebsiella pneumoniae* 5 (%10) ve GSBL-negatif *K. pneumoniae* 2 (%4), diğer Gram negatif ve pozitif bakteriler 8 (%17) suş olarak saptanmıştır. *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Acinetobacter lwoffii* üreyen diğer etkenler olarak saptanmıştır. GSBL-negatif *E. coli*'lerde imipenem, meropenem, sefoperazon-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, sefepim, siprofloksasin, amikasin ve nitrofurantoin duyarlılığı %100 ve tobramisin duyarlılığı %92,31 olarak bulunmuştur.

Sonuç: GSBL-pozitif *E. coli* %42 oranında saptanmıştır. Bu oran yıllar içinde artan antibiyotik direnci sonuçlarını desteklemektedir. Ampirik antibiyotik tedavisinde sıklıkla tercih edilen siprofloksasin, trimetoprim-sulfametoksazol ve sefuroksime karşı direnç artmaktadır. Bu nedenle idrar yolu enfeksiyonu olan olgularda ampirik antibiyotik tedavi seçiminin gözden geçirilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: İdrar yolu enfeksiyonu, idrar kültürü, antibiyotik duyarlılık

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The data was expressed as numbers and percentages.

Results: The urine culture results of 76 patients were evaluated. 48 strains isolated from urine cultures and antibiogram results of these strains were examined. The most frequently isolated microorganism was *E. coli* (69%) and 33 strains were detected. Expanded spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *E. coli* 20 (42%), ESBL-negative *E. coli* 13 (27%), ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* 5 (10%) in 48 (100%) strains isolated and ESBL-negative *K. pneumoniae* 2 (4%), other gram negative and positive bacteria were detected as 8 (17%) strains. *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter lwoffii* have been identified as other factors. Sensitivity of imipenem, meropenem, cefoperazone-sulbactam, piperacillin-tazobactam, cefepime, ciprofloxacin, amikacin and nitrofurantoin was 100% and tobramycin was 92.31% in ESBL-negative *E. coli*.

Conclusion: ESBL-positive *E. coli* was detected at 42%. This rate supports the increasing antibiotic resistance results over the years. The resistance to ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and cefuroxime, which are often preferred in the treatment of empirical antibiotics, increases. Therefore, empirical antibiotic treatment selection should be revised in patients with urinary tract infections.

Key Words: Urinary tract infection, urine culture, antibiotic susceptibility

GİRİŞ

İdrar yolu enfeksiyonları tüm enfeksiyon hastalıkları içinde ikinci sıklıkta görülmektedir. Kostovertebral açı hassasiyeti, ateş, suprapubik hassasiyet, dizüri, pollaküri ve idrar kaçırma gibi klinik bulgularla birlikte bakteriüri ve/veya piyüri

bulunması idrar yolu enfeksiyonu olarak tanımlanır (1, 2).

İdrar yolu enfeksiyonlarında çoğunlukla tek bir bakteri etkindir. Akut enfeksiyonlarda en sık izole edilen *Escherichia coli* olup aynı zamanda toplum

kökenli enfeksiyonlarda da en sık saptanan etkindir. *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., enterokoklar ve stafilokoklar genellikle hastane kökenli enfeksiyonlara neden olurlar (3).

İdrar yollarında taş, diabetes mellitus, prostat hiperplazisi gibi altta yatan hastalığı olan kişilerde komplike idrar yolu enfeksiyonunun hızlı bir şekilde tedavi edilmesi gerekmektedir. İdrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kotrimoksazol ve kinolon sık kullanılan antibiyotiklerdir. Ancak bu ajanlara karşı artan direnç oranları bildirilmiştir (4).

Antibiyoqram test sonucunun zaman alması nedeniyle genellikle tedavide hastalara ampirik antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Antibiyotik direnci göz önüne alındığında seçilen antibiyotik tedavisi önemlidir. Verilen antibiyotik ve sebep olan etken tedavinin başarısını etkilemektedir. Tedavide uygun antibiyotik seçiminin yapılabilmesi için çalışılan bölge ve hastanenin duyarlılık sonuçlarının belirli aralıklarla izlenmesi gerekmektedir (5).

Bu çalışmanın amacı hastalardan istenen idrar kültürü ve üreyen mikroorganizmaların antibiyoqram sonuçlarını inceleyerek, etken olan patojenler ve tedavide yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada; idrar yolu enfeksiyonu tanısı konan hastaların 1 Aralık 2014 - 1 Ekim 2016 tarihleri arasında üçüncü basamak bir hastanenin klinik mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen idrar kültürleri retrospektif olarak incelenmiştir. İdrar yolu enfeksiyonu tanısı konan, idrar kültüründe üreme olan olgular çalışmaya alınmıştır. İdrar kültürleri için servislerde yatan ve idrar sondası olmayan hastalar ile ayakta hastalarda orta akım idrarı alınırken, servislerde yatan ve idrar sondası olan hastalardan steril şartlarda enjektör ile idrar aspirasyonu yöntemi ile idrar kültürü alınmıştır.

İdrar yollarında enflamatuvar reaksiyonu gösteren

piyüri, genellikle idrarda dipstick testinde bir pozitif lökosit esteraz olması ya da mikroskopide alan başına 10 ya da daha fazla lökositin olması olarak tanımlanır. Bakteriüri için kabul edilen kriterler, kateteri olmayan hastaların idrarında tek bir organizmanın idrarın her 1 mL'de en az 10^5 kob, kateteri olan hastalarda 10^3 kob/mL veya daha fazla koloni oluşturması olarak tanımlanır (6).

Tam otomatik idrar tetkikinde piyürisi olan, kültürde 10^5 kob/mL ve üzeri üreme olan ya da sondadan alınan idrar örneği kültüründe 10^3 kob/mL ve üzerinde üreme olan kültürler çalışmaya alınmıştır.

Üreyen etkenlerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemiyle Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) önerilerine göre yapılmıştır. Veriler yüzde ve sayı olarak ifade edilmiştir.

BULGULAR

Klinik ve laboratuvar bulguları açısından idrar yolu enfeksiyonu tanısı alan 76 hasta [kadın 43 (%57,3), erkek 33 (%42,7)] çalışmaya alınmıştır. Enfeksiyon hastalıkları polikliniğinden 24 ve servislerden 52 olmak üzere toplam 76 hastanın idrar kültür sonucu değerlendirilmiştir.

Hastaların yaş ortalaması 63,0 [21,0-87,0] yıl bulunmuştur. Kırksekiz (%63) hastanın idrar kültüründe üreme saptanmıştır. İdrar yolu enfeksiyonu tanısı konan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen 48 suş ve bu suşların antibiyoqram sonuçları incelenmiştir. Üreyen etkenler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Otuz üç hastanın idrar kültüründe *E. coli* üremiş olup idrar kültürlerinden en sık izole edilen mikroorganizma (%69) olmuştur. Yirmi (%42) *E. coli* suşunda genişlemiş spektrumlu beta- laktamaz (GSBL) enzimi pozitif, 13 (%27) *E. coli* suşunda da GSBL enzimi negatif olarak saptanmıştır.

Radyoterapi, palyatif bakım ve medikal onkoloji servislerinden birer hasta ve enfeksiyon hastalıkları servisinden beş hastanın idrar kültüründe GSBL-

Tablo 1. 1 Aralık 2014-1 Ekim 2016 tarihleri arasında servislere yatan ve enfeksiyon hastalıkları polikliniğine başvuran idrar yolu enfeksiyonu tanısı alan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen suşların dağılımı

	Bakteri adı	Suş sayısı	%n
Gram pozitif bakteriler			
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	%2
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	%2
	<i>Enterococcus faecium</i>	1	%2
	Toplam sayı	3	%6
Gram negatif bakteriler			
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	33	%69
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	%15
	<i>Proteus mirabilis</i>	2	%4
	Toplam sayı	42	%88
Non-fermentatif bakteriler			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	%2
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	%2
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	%2
	Toplam sayı	3	%6
	Toplam izole edilen izolat sayısı	48	%100

negatif *E. coli* ürerken, enfeksiyon hastalıkları polikliniğine başvuran beş hastanın idrar kültüründe GSBL-negatif *E. coli* üremiştir.

Üroloji ve hematoloji servislerinden birer hasta ve enfeksiyon hastalıkları servisinde 14 hastanın idrar kültüründe GSBL-pozitif *E. coli* ürerken, enfeksiyon hastalıkları polikliniğine başvuran dört hastanın idrar kültüründe GSBL-pozitif *E. coli* üremiştir. Yirmi (%42) *E. coli* suşunda GSBL enzimi pozitif bulunmuştur.

GSBL-negatif *E. coli* suşlarında imipenem, meropenem, sefoperazon-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, sefepim, siprofloksasin, amikasin, nitrofurantoin duyarlılığı %100, tobramisin duyarlılığı %92,31 olarak saptanmıştır (Tablo 2).

Yedi hastanın idrar kültüründe *K. pneumoniae*

üremiş olup beş suşta GSBL enzimi pozitif ve iki suşta GSBL enzimi negatif olarak bulunmuştur.

Kulak burun boğaz servisi ve enfeksiyon hastalıkları polikliniğinden birer hastanın idrar kültüründe GSBL-negatif *K. pneumoniae* ürerken, enfeksiyon hastalıkları polikliniğinde bir ve enfeksiyon hastalıkları servisinde dört hastanın idrar kültürlerinde GSBL-pozitif *K. pneumoniae* üremiştir. Beş (%10) *K. pneumoniae* suşunda GSBL enzimi pozitif olarak bulunmuştur.

GSBL-negatif *K. pneumoniae* suşlarında imipenem, meropenem, sefoperazon-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, sefepim, siprofloksasin, amikasin, nitrofurantoin ve tobramisin duyarlılığı %100 olarak saptanmıştır.

Tablo 2. GSBL-negatif *E. coli* izolatlarının (n=13) antibiyotiklere duyarlılıkları

Antibiyotik	Duyarlılık oranı (%)
İmipenem	100
Meropenem	100
Sefoperazon-sulbaktam	100
Piperasilin-tazobaktam	100
Sefepim	100
Siprofloksasin	100
Amikasin	100
Nitrofurantoin	100
Tobramisin	92,3

Palyatif bakım ve ortopedi servisinde birer hastanın idrar kültüründe *Proteus mirabilis* üremiştir. Üreyen mikroorganizmalar aminoglikozid ve kinolonlara duyarlı bulunmuştur.

Enfeksiyon hastalıkları servisinde yatan üç ayrı hastanın idrar kültüründe *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ve *Pseudomonas aeruginosa* üremiştir. Radyoterapi ve palyatif bakım servisinde birer hastanın idrar kültüründe *Streptococcus agalactiae* ve *Stenotrophomonas maltophilia* üremiştir.

Enterococcus faecalis ve *Enterococcus faecium*'da vankomisin direnci saptanmamıştır.

Enfeksiyon hastalıkları polikliniğine başvuran bir hastanın idrar kültürlerinde *Acinetobacter lwoffii* üremiştir. Yapılan antibiyogramda antibiyotik direnci saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Bu çalışmada; idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen bakteriler ve direnç profillerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarla benzer oranda idrar kültürlerinden en sık izole edilen mikroorganizma %69 oranı ile *E. coli* olmuştur.

Toplam 33 *E. coli* suşu izole edilmiş ve yirmi (%42) *E. coli* suşu GSBL-pozitif bulunmuştur. İzole edilen yedi *K. pneumoniae* suşunun beşi (%10) GSBL- pozitif saptanmıştır.

İdrar yolu enfeksiyonuna en sık neden olan mikroorganizmalar başta *E. coli* olmak üzere *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. faecalis* ve *Staphylococcus saprophyticus*'dur (7). Bir çalışmada idrar yolu enfeksiyonlarında en sık izole edilen etken *E. coli* (%66) olup bunu *Klebsiella oxytoca* (%15) ve *P. mirabilis* (%7) takip etmiştir (8). Yurtdışında idrar kültürlerinden izole edilen *E. coli* oranı %67, ülkemizde ise %35-80 olarak bildirilmiştir (9). Ülkemizde yapılan bir çalışmada da idrar kültürlerinden izole edilen *E. coli* oranı %71,3 olarak bulunmuştur (10).

Bu çalışmada; 20 (%42) *E. coli* ve beş (%10) *K. pneumoniae* suşunda GSBL enzimi pozitif saptanmıştır. İzole edilen *Proteus mirabilis* suşu aminoglikozid ve kinolonlara duyarlı bulunmuştur.

İdrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi etkenlerdeki direnç gelişimi nedeniyle giderek zorlaşmaktadır (11). Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinin üyesi olan *E. coli* ve *K. pneumoniae* genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimini kodlayan kazanılmış plazmidde sahiptirler. Bu plazmidler, üçüncü kuşak sefalosporin

ve diğer antibiyotiklere karşı direnci hızlı bir şekilde yaymaktadır (11). Diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri, üçüncü kuşak sefalosporinlere ek olarak sefamisine karşı aktif olan ve aynı zamanda beta-laktamaz inhibitörlerine karşı dirençli olan sınıf C enzimlerini (AmpC enzimleri) üretirler. AmpC enzimlerinin ekspresyonu, ayrıca 42 kDa dış membran proteinine sahip olmayan *K. pneumoniae* suşlarında karbapenem direnci ile de ilgilidir (11).

Bu çalışmada, *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'da vankomisin direnci saptanmamıştır.

Trimetoprim, klindamisin, sefalosporinler ve penisilinlere doğal olarak dirençli oldukları için enterokoklarda çok ilaca direnç yaygındır. Son zamanlarda *Enterococcus* spp. vankomisin dahil olmak üzere glikopeptidlere karşı yüksek düzeyde direnç geliştirmeye başlamışlardır. Enterokoklar, penisilin bağlayan proteinler (PBP), VanA, VanB, VanD, VanE, VanG ve VanL'yi kodlayan vankomisin ve teikoplanin A tipi direnç (van) genlerinin ekspresyonu yoluyla glikopeptidlere karşı direnç geliştirmişlerdir (12).

Bu çalışmada, 13 GSBL-negatif *E. coli* suşunda siprofloksasin duyarlılığı %100 olarak saptanmıştır. GSBL-negatif *E. coli* suşlarında imipenem, meropenem, sefoperazon-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, sefepim, siprofloksasin, amikasin, nitrofurantoin duyarlılığı %100, tobramisin duyarlılığı %92,31 olarak saptanmıştır.

GSBL-negatif *K. pneumoniae* suşlarında imipenem, meropenem, sefoperazon-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, sefepim, siprofloksasin, amikasin, nitrofurantoin ve tobramisin duyarlılığı %100 olarak saptanmıştır.

Bir çalışmada yaşlı hastalarda yaygın olan üropatojenler arasında trimetoprim-sulfametoksazole direnç oranının %20'yi aştığı saptanmıştır (13).

Yapılan başka bir çalışmada ise 12 yıllık dönemde idrar kültürlerinde saptanan *E. coli*'lerin trimetoprim, florokinolonlar ve ampisiline duyarlılıklarının

giderek azaldığı bildirilmiştir (14). *E. coli* suşlarında trimetoprim-sulfametoksazol direnci %40 saptanmıştır. Bu nedenle idrar yolu enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde trimetoprim-sulfametoksazol kullanımının uygun olmadığı belirtilmiştir (15).

Garza-Montúfar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (16) idrar kültürlerinden en sık izole edilen bakteri *E. coli* olmuştur. Seftazidim (%91,5), kinolonlar (>%65) ve trimetoprim-sulfametoksazol (%58) direnci tespit edilmiştir. Genel çoklu direnç %66,3 oranında bulunmuştur. İzolatlar amikasin, imipenem, nitrofurantoin, meropenem ve piperasilin-tazobaktama daha duyarlı iken kinolonlar ve trimetoprim-sulfametoksazole karşı yüksek oranda direnç saptanmıştır.

Sierra-Díaz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (17) ise idrar kültürlerinden en sık izole edilen *E. coli* (%67,28) olup bunu *Pseudomonas* spp. (%7,12) takip etmiştir. Meropenem duyarlılığı %91,4 bulunmuştur. En fazla antimikrobiyal direnç ampisilin (%77,47) ve moksifloksasine (%72,89) karşı saptanmıştır. *E. coli* suşlarının yaklaşık %49'u ve *K. pneumoniae* suşlarının %27'sinde GSBL üretimi saptanmıştır.

Bu çalışmada da izole edilen *P. aeruginosa* suşunda çoklu antibiyotik direnci saptanmamıştır.

Abbas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (18); idrar kültürlerinden izole edilen 50 *P. aeruginosa* suşunun tamamında çoklu antibiyotik direnci saptanmış ve amoksisilin-klavulonik asit, trimetoprim-sulfametoksazol, doksisisiklin ve seftazidime karşı direnç bulunmuştur.

Baenas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (19) ise idrar yolu enfeksiyonlarında en sık izole edilen patojenler *E. coli* (%85,5) ve *K. pneumoniae* (%4,7) olmuştur. *E. coli* için trimetoprim-sulfametoksazol (%28,6,) siprofloksasin (%7,9) ve nitrofurantoin (%0,4) direnç saptanmıştır.

Kengne ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (20) idrar yolu enfeksiyonlarında *E. coli*, en sık (%59,3) izole edilen patojen olup bunu *K. pneumoniae* (%13) izlemiştir. Ampisilin, siprofloksasin ve sefalosporinlere

karşı yüksek oranda (>%60) direnç saptanmıştır. İmipeneme duyarlılık yüksek (%94,9) bulunmuştur.

Bu çalışmamızda; *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında yüksek oranda GSBL enzim pozitifliği saptanmıştır. GSBL-negatif suşlarda ise imipenem, meropenem, sefoperazon-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, sefepim, siprofloksasin, amikasin, nitrofurantoin ve tobramisine karşı yüksek oranda duyarlılık saptanmıştır. Diğer üreyen etkenlerde çok ilaca direnç saptanmamıştır.

İdrar yolu enfeksiyonunun tedavi seçiminde kılavuzlar kullanılmaktadır. Ancak tedavide kılavuz önerilerinin, yerel epidemiyolojik verilere göre uyarlanarak kullanılması önerilmektedir (21). İdrar yolu enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılıkları, hasta dağılımının ve ek hastalıkların zaman içinde değişmesi, antibiyotiklerin yaygın ve uygunsuz kullanılmaları sebebiyle değişmektedir (22).

Dirençli bakterilerin sebep olduğu idrar yolu enfeksiyonlarının sıklığının giderek artması nedeniyle, bu enfeksiyonların ampirik tedavisinin güçleştiği bildirilmiştir (23). Tedaviye dirençli idrar yolu enfeksiyonu gelişiminde risk faktörleri bulunan hastalarda idrar kültürü ve antibiyotik duyarlılık testlerinin şart olduğu belirtilmiştir (23).

Çalışmamızda; idrar kültürlerinden izole edilen etkenler arasında direncin arttığı saptanmıştır. Bu oranlar yıllar içinde artan antibiyotik direnci sonuçlarını desteklemektedir.

Sonuç olarak, idrar yolu enfeksiyonuna en sık neden olan mikroorganizma *E. coli*'dir. Yıllar içinde *E. coli* de GSBL-pozitiflik oranı artmaktadır. Bu nedenle idrar yolu enfeksiyonu olan olgularda ampirik antibiyotik tedavi seçiminin gözden geçirilmesi gerekmektedir. Ampirik olarak tercih edilebilecek ilaçlar konusunda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey WR. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St. Louis, Mo:Elsevier Mosby, 2007.
- Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Dis Mon, 2003;49:53-70.
- Topcu AW, Soyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 3.Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 2008. Cilt 1.
- Sobel JD, Kaye D. Urinary Tract Infections. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Disease, 5th ed. Philadelphia: Elsevier, 2000: 773-800.
- Sucu N, Aktoz-Boz G, Bayraktar Ö, Çaylan R, Aydın K, Köksal İ. Üropatojen Escherichia coli suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının yıllar içerisindeki değişimi. Klimik Derg 2004;17:128-31.
- Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009, International clinical practice guidelines from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis, 2010;50(5):625-63.
- Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol 2015 ;13(5): 269-84.

8. Cortes-Penfield NW, Trautner BW, Jump RLP. Urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria in older adults. *Infect Dis Clin N Am*, 2017; 31: 673-88.
9. Wright SW, Wrenn KD, Haynes ML. Trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among urinary coliform isolates. *J Gen Intern Med*, 1999;14:606-9.
10. Saraçoğlu KT, Fidan V, Pekel Ö, Saraçoğlu A, Kalkandelen S, Arpalı E. İdrar kültürlerinde izole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları. *J Clin and Exp Invest* 2013; 4 (3): 356-9.
11. Gupta K, Bhadelia N. Management of urinary tract infections from multidrug-resistant organisms. *Infect Dis Clin North Am*, 2014; 28:49-59.
12. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013; 11:297-308.
13. Sanchez GV, Babiker A, Master RN, et al. Antibiotic resistance among urinary isolates from female outpatients in the United States in 2003 and 2012. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016;60(5):2680-3.
14. Storby KA, Osterlund A, Kahlmeter G. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* in urine samples from children and adults: a 12 year analysis. *Acta Paediatr*, 2004; 93: 487-91.
15. Gozüküçük R, Cakıroğlu B, Nas Y. Toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonu etkeni olarak saptanan *Escherichia coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları. *JAREM*, 2012; 2: 101-3.
16. Garza-Montúfar ME, Treviño-Valdez PD, De la Garza-Salinas LH. Comorbidities and antimicrobial resistance in urological outpatients with positive urine culture. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 2018; 56(4):347-53.
17. Sierra-Díaz E, Hernández-Ríos CJ, Bravo-Cuellar A. Antibiotic resistance: microbiological profile of urinary tract infections in Mexico. *Cir Cir*, 2019;87(2):176-82.
18. Abbas HA, El-Ganiny AM, Kamel HA Phenotypic and genotypic detection of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *Afr Health Sci*, 2018;18(1):11-21.
19. Baenas DF, Palmieri HJ, Alomar JM, Álvarez Garzón JH, Berenguer L, Vilaró M, et al. Uncomplicated urinary tract infection in women: etiology and antimicrobial resistance. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*, 2017;74(3):180-5.
20. Kengne M , Dounia AT , Nwobegahay JM Bacteriological profile and antimicrobial susceptibility patterns of urine culture isolates from patients in Njamena, Chad. *Pan Afr Med J*. 2017;28:258.
21. Dromigny JA, Ndoeye B, Macondo EA, Nabeth P, Siby T, Perrier-Gros-Claude JD. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae uropathogens in Dakar, Senegal: a multicenter study. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003; 47: 595-600.
22. Rock W, Colodner R, Chazan B, Elias M, Raz P. Ten years surveillance of antimicrobial susceptibility of community-acquired *Escherichia coli* and other uropathogens in Northern Israel (1995-2005). *Isr Med Assoc J*, 2007; 9: 803-5.
23. Arslan H, Azap OK, Ergonul O, Timurkaynak F; Urinary tract infection study group. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. *J Antimicrob Chemother*, 2005; 56: 914-8.

Servikal örneklerde human papillomavirüs pozitifliği ve genotip dağılımı

Human papillomavirus positivity and genotype distribution in cervical samples

Özlem AYDEMİR¹, Hüseyin Agah TERZİ¹, Mehmet KÖROĞLU¹, Gupse TURAN², Mustafa ALTINDIŞ³, Engin KARAKEÇE¹

ÖZET

Amaç: Servikal kanser tüm dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen ikinci kanser türüdür. Human papilloma virus (HPV) servikal kanser ile ilişkisi gösterilmiş majör etiyolojik ajandır. HPV'nin bugüne kadar 200'den fazla türü belirlenmiş ve bunlardan 40 tanesinin genital sistemde enfeksiyon yaptığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı; HPV DNA araştırılması için laboratuvarımıza gönderilen servikal örneklerde HPV DNA varlığını ve HPV genotiplerini belirlemek, aynı zamanda HPV pozitif hastalarda gelişen sitopatolojik değişiklikleri incelemektir.

Yöntem: 01 Ocak 2015 - 30 Ocak 2018 tarihleri arasında Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran 20-66 yaş arası hastalardan alınan 1068 servikal sürüntü örneği çalışmaya dahil edildi. Alınan örneklerde DNA izolasyonu için QIAamp®DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya), PCR ve pyrosequencing yöntemi ile HPV tiplendirme aşamasında HPVsign® Q24 complete (Diatech Pharmacogenetics, İtalya) kiti kullanıldı.

Bulgular: 1068 örneğin 226 (%21,1) tanesinde HPV DNA pozitif olarak saptandı. HPV DNA pozitif bulunan örneklerin 141'inde (%62,3) yüksek riskli tipler tek başına saptandı. HPV DNA pozitif bulunan örneklerin içinde 73 (%32,3) hastada tek başına HPV tip 16 saptanırken 37

ABSTRACT

Objective: Cervical cancer is the second most common cancer type among women all over the world. Human papilloma virus (HPV) is the major etiologic agent associated with cervical cancer. More than 200 species of HPV have been identified so far and 40 of them are known to infect the genital system. The aim of this study was to determine the presence of HPV DNA and HPV genotypes in the cervical samples sent to our laboratory for HPV DNA investigation and to investigate the cytopathological changes in HPV positive patients.

Methods: A sample of 1068 cervical swabs taken from patients between the ages of 20 and 66 applied to the Obstetrics and Gynecology Clinic between 01 January 2015 and 30 January 2018 were included in the study. HPVsign® Q24 complete kit (Qiagen, Germany) was used for HPV typing with QIAamp® DNA Mini Kit PCR (Diatech Pharmacogenetics, Italy) and pyrosequencing for DNA isolation.

Results: HPV DNA was detected as positive in 226 (21.1%) samples of 1068 samples. In 141(62.3%) of the HPV DNA positive specimens, high-risk types were detected alone. Among HPV DNA positive samples, HPV type 16 was found in 73(32.3%) patients alone, multiple

¹Sağlık Bakanlığı Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya
²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Sakarya
³Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya



İletişim / Corresponding Author : Özlem AYDEMİR

Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Sakarya - Türkiye

Tel : +90 505 636 94 00

E-posta / E-mail : akkozlem@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 18.05.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 15.06.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.68984

Aydemir Ö, Terzi HA, Köroğlu M, Turan G, Altındış M, Karakeçe E. Servikal örneklerde human papillomavirüs pozitifliği ve genotip dağılımı. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 33-40

(%16,3) hastada multipl tipler ve 116 hastada da diğer tipler saptandı. HPV DNA pozitifliği 20-30 yaş grubu hastada en yüksek oranda (%26,3) saptandı. HPV DNA pozitifliği saptanan hastaların 20'sinde (%8,8) sitoloji pozitifliği belirlendi. Bu hastaların 13'ünde LSIL (%65), 4 (%20) hastada HGSIL, 1 (%5) hastada ASCUS, 2 (%10) hastada HGSIL /seviks CA bulundu.

Sonuç: Bu çalışma bölgemizde yapılan ilk kapsamlı çalışmadır. Servikal sürüntü örneklerinde saptanan HPV DNA pozitifliği oranı ve HPV tip 16 sıklığı ülkemizdeki diğer çalışmalarda bulunan oranlara göre kısmen yüksek bulundu. Ülkemizde HPV DNA ve HPV tip prevalansının ve HPV aşısında kullanılması gereken tiplerin belirlenmesi için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Human papilloma virus, servikal kanser, prevalans

types were found in 37 (16.3%) patients and other types were found in 116 patients. HPV DNA positivity was highest in the 20-30 age group (26.3%). Cytology positivity was found in 20 (8.8%) of the patients with HPV DNA positivity. Of these patients, 13 had LSIL (65%), 4 (20%) had HGSIL, 1 (5%) had ASCUS, 2 (10%) had HGSIL / seviks CA.

Conclusion: This is the first comprehensive study conducted in our region. The rate of HPV DNA positivity detected in cervical swab specimens and the frequency of HPV type 16 were found to be somewhat higher than the rates found in other studies in our country. More extensive work is needed to determine the type of HPV DNA and HPV type prevalence and the types of HPV that should be used in our country.

Key Words: Human papilloma virus, cervical cancer, prevalence

GİRİŞ

Human Papillomavirus (HPV) *Papillomaviridae* ailesine ait, zarfsız, 55 nm çapında, ikozahedral kapside sahip, çift iplikli çembersel DNA virüsüdür. Günümüzde 200'den fazla HPV tipi tanımlanmış olup bunların 170'den fazlasının anogenital epiteli enfekte ettiği bilinmektedir (1, 2). Dünya Sağlık Örgütü; HPV'nin dünyada cinsel yolla bulaşan en yaygın enfeksiyon olduğunu ve normal sitolojiye sahip kadınlar arasında prevalansının yaklaşık %11,4 olduğunu bildirmektedir (3).

HPV enfeksiyonları genellikle asemptomatik seyretmekle birlikte, kronik enflamasyon hücresel immun yanıtı baskılamakta ve intraepitelyal preneoplastik lezyon veya invaziv servikal kanser riskini arttırmaktadır (2).

HPV türleri onkogenik potansiyellerine göre düşük riskli ve yüksek riskli olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (2). Düşük riskli türler (HPV tip: 6,11,40,42,43,44) genital siğil gibi benign lezyonlara

neden olurken yüksek riskli türler (HPV tip: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,51, 52, 56, 58, 59,66) servikal kanser veya prekürsör lezyonlara neden olmaktadır. Özellikle tip 16 ve 18; servikal kanser vakalarının %70'den fazlası ile ilişkilidir (4,5). Ancak son yıllarda uygulamaya giren HPV aşuları sayesinde servikal ve anogenital kanser insidansında azalma olacağı öngörülmektedir (1,2).

Bu çalışmanın amacı; HPV DNA araştırılması için laboratuvarımıza gönderilen servikal sürüntü örneklerinde HPV DNA varlığını ve HPV genotiplerini belirlemek, aynı zamanda HPV pozitif hastalarda gelişen sitopatolojik değişiklikleri incelemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

01 Ocak 2015- 30 Ocak 2018 tarihleri arasında hastanemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran 20-66 yaş arası hastalardan alınan 1068

servikal sürüntü örneği çalışmaya dahil edildi. Servikal sürüntü örnekleri menstrüasyon döneminde olmayan, üç gün öncesine kadar vaginal tedavi uygulanmamış, test öncesinde vaginal asetik asit ve lugol solusyonu uygulanmamış, 24 saat içerisinde cinsel aktivitede bulunmamış olan hastalardan seçildi. Hastalardan birden fazla örnek alınması durumunda çalışma sonuçları değerlendirildi. Aynı sonuç elde edilmesi durumunda sadece bir sonuç değerlendirmeye alındı.

Örnek alımı için HPV PCR çalışmalarına uygun şekilde serviks sürüntüsü alınması amacıyla Digene HC2 DNA collection device seti (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Alınan örneklerde DNA izolasyonu QIAamp®DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Örneklerden 350 µL ependorf tüplere alınarak üzerine 350 µL Buffer ATL eklendi. Daha sonra 30 µL proteaz stok çözeltisi eklenip 15 saniye boyunca vorteksenerek 5 sn spin santrifüj yapıldı. 56 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 200 µL absolü etanol ilave edildi ve karışım yıkama tamponu I ve II kullanılarak iki kez spin kolonlarında yıkandı. Daha sonra 3 dakika boyunca santrifüj edilerek 150 µL yıkama solüsyonu ile yıkandı. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Üreticinin talimatları doğrultusunda; RotorGene Q Real-Time PCR (Qiagen, Milan, İtalya) platformunu kullanarak HPV Sign® Q24 Complete Real-Time PCR (Code 979990; Diatech Pharmacogenetics, Jesi, İtalya) kiti ile HPV viral DNA varlığı belirlendi. Tüm örneklerde DNA'nın varlığı ve bütünlüğü, bir iç kontrol olarak işlev gören β-aktin gen amplifikasyonu ile doğrulandı.

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda, HPV pozitif örneklerde HPV Sign® Q24 Complete Real Time PCR kiti ile pyrosequencing yöntemi kullanılarak HPV tipleri araştırıldı. Elde edilen sekanslar, ortak veritabanında bulunan genotip spesifik sekanslar ile karşılaştırıldı (Diatech Pharmacogenetics, Jesi, İtalya) ve HPV tipleri belirlendi. Hastaların 2004 Bethesda sınıflandırma sistemine göre yapılmış olan servikal

smear sonuçlarına ulaşıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan hastaların 190'ı (%17,7) 20-30 yaş, 353'i (%33) 30-40 yaş, 303'ü (%28,3) 40-50 yaş aralığında, 222'i(%20,7) ise 50 yaş ve üzeri idi. Toplam 1068 örneğin 226 (%21,1) tanesinde HPV DNA pozitif olarak saptandı. HPV DNA pozitif bulunan örneklerin 141'inde (%62,3) yüksek riskli tipler (HPV tip: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,51, 52, 56, 58, 59, 66) tek başına saptandı.

HPV DNA pozitif bulunan örneklerin içinde 73 (%32,3) hastada tek başına HPV tip 16 saptanırken 37 (%16,3) hastada multipl tipler ve 116 (%51,3) hastada da diğer tipler saptandı (Tablo 1). Multipl HPV DNA saptanan hastaların tümünde yüksek riskli HPV DNA tiplerinin en az birinin de yer aldığı saptandı.

HPV DNA pozitiflik yüzdeleri yaşlara göre incelediğimizde; 20-30 yaş grubunda 50 hasta (%26,3); 30-40 yaş arasında 64 hasta (%18,1) 40-50 yaş grubunda 56 hasta (%18,4) ve 50 yaş ve üzerinde 56 hastada (%25,2) HPV DNA pozitifliği saptandı.

HPV DNA pozitifliği saptanan hastaların 20'sinde (%8,8) anormal sitoloji saptanırken 206'sında (%91,1) sitoloji normaldi. Bu hastaların 13'ü düşük dereceli skuamöz intraepitelyal neoplazi (LSIL) (%65,0), 4'ü (%20,0) yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal neoplazi (HGSIL), 1'i (%5,0) nedeni tanımlanamayan anormal skuamöz hücreler (ASCUS), 2'si (%10,0) HGSIL/serviks kanseri tanısı aldı.

Normal sitolojili HPV pozitif bulunan 206 hastada en sık görülen HPV tipi %32,0 oranla HPV 16 olup bunu %7,2 oranla HPV 39, %4,3 ile HPV 18 ve HPV 11 izledi.

Anormal sitoloji saptanan hastalarda en sık saptanan HPV tipi % 45,0 oranla HPV tip 16 bulundu. Bunu %20,0 ile HPV tip 18 takip etti. LSIL saptanan hastaların HPV genotipleri incelendiğinde; 4'ünde (%30,7) HPV tip 18, ikişer hastada (%15,3) HPV tip 16, tip 51 ve tip 70 saptandı. Bunları birer hasta (%7,6) ile tip 42,39,97 izledi. Serviks CA saptanan hastaların ikisinde de HPV tip 16 bulundu. HGSIL saptanan

hastaların tümünde de tip 16 görüldü. ASCUS saptanan bir hastada ise tip 16 ve tip 39 birlikteliği saptandı. Anormal sitoloji saptanan hastalardan sadece 1'inde düşük riskli HPV tipi belirlendi.

TARTIŞMA

HPV enfeksiyonları dünya genelinde cinsel yolla bulaşan hastalıklar içerisinde en sık görülen hastalıklardır. Genital HPV enfeksiyonları hakkında edinilen bilgiler hem enfeksiyonun kontrolünde hem

Tablo 1. HPV pozitif olguların genotip dağılımı

HPV Genotipleri	HPV pozitif (n = 226)	
	n	%
Multipl tip	37	16.3
Tip 16	73	32.3
Tip 11	14	6.1
Tip 39	13	5.7
Tip 59	10	4.4
Tip 52	9	3.9
Tip 66	15	6.6
Tip 31	5	2.2
Tip 55	4	1.7
Tip 56	5	2.2
Tip 42	6	2.6
Tip 45	6	2.6
Tip 51	8	3.5
Tip 87	6	2.6
Tip 70	3	1.3
Tip 33	2	0.8
Tip 18	10	4.4

de tedavi şekillendirmesinde önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, HPV enfeksiyonlarının servikal kanser gelişimindeki ana rolünü de kanıtlamıştır (2,6).

Genital HPV enfeksiyonunun prevalansı; seçilen populasyonun sosyokültürel özellikleri, tanımlamada kullanılan yöntemler, çalışma için alınan örneğin kalitesi gibi değişkenlere bağlı olarak farklılıklar gösterebilir (4). Ülkemizde yapılan çalışmalarda HPV prevalansının %2,1 ile %19,2 arasında değiştiği bildirilmektedir (4,7-12). Merkezimizde saptanan %21,1 oranındaki HPV DNA pozitifliği ülkemizdeki değerlerin üzerinde saptandı. Dünya genelinde yapılan, bir meta analizde, normal sitolojiye sahip kadınlarda HPV prevalansı %10,4 olarak bulunmuş ve bölgeler arasında değişiklikler saptanmıştır. En yüksek prevalans; %22,1 oranıyla Afrika'da saptanırken sırasıyla, Orta Amerika ve Meksika'da %20,4, Kuzey Amerika'da %11,3, Avrupa'da %8,1 ve Asya'da %8 olarak belirlenmiştir. Avrupa ülkelerinde 18 çalışmanın verilerinin kullanıldığı meta analizde, 30-64 yaş arası kadınlarda yüksek riskli HPV prevalans aralığı; İspanya'da %2 iken, Belçika ve Fransa'da %12'ye kadar yükseldiği belirlenmiştir (13,14). Afrika ülkelerinde yapılan çalışmalarda ise %74 gibi çok daha yüksek prevalans bildiren çalışmalar bulunmaktadır (15,16).

Yapılan bazı çalışmalarda; yaş gruplarının HPV prevalansı için önemli bir parametre olduğunu, en düşük HPV prevalansının 14-19 yaş arası kadınlarda, en yüksek prevalansın ise 20-24 yaş grubu kadınlarda olduğu belirtilmiş olup, daha sonra bağışıklığın oluşmasıyla ilerleyen yaş ile birlikte azalma olduğunu belirtilmiştir (4,7). ABD'de yapılan HPV prevalansının yaşlara göre değerlendirildiği bir çalışmada; HPV prevalansı 14-19 yaş arası %24,5; 20-24 yaş arası %44,8; 25-29 yaş arası %27,4; 30-39 yaş arası %27,5; 40-49 yaş arası %25,2 ve 50-59 yaş arası %19,6 olarak bulunmuştur (4,7). De Sanjose ve ark. 2007 (13) yılında 70 ülkeden 346.000 kadının HPV pozitifliği yönünden değerlendirildiği bir çalışmada, HPV sıklığının 25 yaş civarında artmakta, daha yaşlı gruplarda ise

azalmakta olduğunu gözlemlemişlerdir. Yine aynı çalışmada bazı bölgelerde yeni edinilmiş enfeksiyona bağlı veya reaktive olmuş latent enfeksiyona bağlı ileri yaşlarda bir yükseliş olduğu da gözlenmiştir. Tüm bu verilere rağmen yaş ile HPV prevalansı arasında bir ilişki saptayamadıklarını belirten çalışmalarda bulunmaktadır (4,8,9). Çalışmamızda da HPV pozitifliği; 20-30 yaş grubunda %26,3; 30-40 yaş arasında %18,1; 40-50 yaş grubunda %18,4 ve 50 yaş ve üzerinde %25,2 olarak saptandı. Çalışmamızda elde edilen veriler otomasyon sisteminden geriye dönük olarak tarandığı için oral kontraseptif kullanımı, cinsel partner sayısı, sigara kullanımı, öğrenim durumu, evlilik sayısı gibi risk faktörleri sorgulanamadı. Bu durum çalışmamızın kısıtlayıcı tarafı oldu.

HPV enfeksiyonu kadınlarda yaygın ve çoğunlukla asemptomatik olarak seyretmekle birlikte prekanseröz lezyonlar ve serviks kanseri ile güçlü bir ilişkisi olduğu bilinmektedir (7). Ancak HPV enfeksiyonu çoğunlukla kendi kendini sınırlamaktadır (7). Ancak yüksek riskli HPV enfeksiyonu mevcut olan bir kadında, HGSIL ve servikal kanser gelişme riski artmaktadır (7). Çalışmamızda HPV pozitif hastaların 20'sinde (%8,8) anormal sitoloji saptandı. Bu hastaların sadece bir tanesinde düşük riskli HPV bulundu.

HPV'nin özellikle yüksek riskli tipleri, serviks yassı hücreli kanseri ve servikal intraepitelyal neoplazi ile ilişkilidir. Bu nedenle serviks kanseri açısından risk taşıyan kişilerin belirlenmesi, uygun klinik takibin sağlanması ve yeni aşı çalışmaları için rutin sitolojik taramalara ek olarak HPV pozitifliği ve HPV tipinin saptanması, bu konuda uluslararası kabul görmüş olan yaklaşımdır (17). Ülkemizde de yenilenmiş Ulusal Servikal Tarama programına göre, beş yılda bir HPV testi ve HPV pozitif olgularda smear değerlendirmesi 30-65 yaş arasındaki her kadına önerilmektedir (18,19). HPV genotiplerinin dağılımı, konakçıdaki immüno-genetik faktörler, coğrafi özellikler, farklı tanı yöntemlerinin kullanılması ve çalışmaların genel olarak sınırlı sayıdaki hasta gruplarında yapılması nedeniyle dünya genelinde önemli ölçüde değişimle

birlikte yapılan çalışmalara bakıldığında en sık rastlanan tipin HPV 16 olduğu ve bunu farklı tiplerin takip ettiği belirtilmektedir (7,20-24). Fındık ve ark. (10) HPV DNA saptanan örneklerdeki HPV tiplerinin %60,4'ünü yüksek riskli, %25'ini düşük riskli olarak belirlemişlerdir. Ankara'da yapılan bir çalışmada da hastaların %66,9'unda yüksek riskli HPV, %27,4'ünde düşük riskli HPV belirlemişlerdir. Aynı çalışmada, %33,7 ile en sık HPV16 saptanırken, HPV52 %12,6, HPV58 %11,6 oranında saptanmış bunu HPV 18, 31, 35 ve diğerleri takip ettiği belirtilmiştir (25). Koyuncu ve ark. (24) normal sito-lojili kadınlarda %52,9 ile HPV 16'yı ilk sırada bildirirken, %29,1 ile HPV 18 ikinci sırada ve azalan sıklıklarla HPV 52, HPV 45'i belirlemiştir. Sivas'ta yapılan bir çalışmada, HPV 6 %25 oranında en sık bulunurken, genotip 16 %16,6 oranında, genotip 18, 45, 51, 56, 58, 59 ve 66 %8,35 oranında tespit edilmiştir (20). Genel olarak çalışmalar incelendiğinde aşılarda yer alan tip 18'in ilk sıralarda olmadığı görülmektedir. Ülkemizdeki diğer çalışmalarda olduğu gibi merkezimizde de en yüksek oranda saptanan yüksek riskli HPV tipinin HPV16 olduğu görüldü. Çalışmamızda anormal

sitolojili hastalarda en sık görülen HPV tipi %45 oranla HPV 16 olarak tespit edildi. Bunu %20 oranla HPV 18 izledi. Aydoğan ve ark. (26) anormal sitoloji saptadıkları hastada %38 ile en fazla HPV tip 16 saptamışlardır. Normal sitolojili HPV pozitif bulunan 206 hastada en sık görülen HPV tipi %32,0 oranla HPV 16 olup bunu %7,2 oranla HPV 39, %4,3 ile HPV 18 ve HPV 11 izlemiştir. 9 valanlı aşılama programına dahil edilmeyen HPV 39'un en sık saptanan ikinci HPV tipi olduğu gözlenmiştir. Aşılama programına dahil edilen HPV 6 ve HPV 45 ise sırası ile %0,4 ve %1,3 oranlarında tespit edildi (20,21). Normal sitolojili HPV pozitif hastaların %13,1'inde ise çoklu enfeksiyon gözlenmiştir.

Sonuç olarak; yapılan çalışmalarda genel olarak HPV tip dağılımında bir uyum görülmemektedir. Ancak HPV16'nın en sık saptanan yüksek riskli tip olduğu, diğer tiplerin ise farklı sıklık-larda saptandığı söylenebilir. Bu nedenle ülkemiz-de HPV DNA ve HPV tip prevalansının ve HPV aşısında kullanılması gereken tiplerin belirlenmesi için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Xu H H, Lin A, Chen Y, Dong S, Shi W, Y Jia et al. Prevalence characteristics of cervical human papillomavirus (HPV) genotypes in the Taizhou area, China: a cross sectional study of 37967 women from the general population. *BMJ Open*, 2017;7:e014135.
2. Aziz H, Iqbal H, Mahmood H, Fatima S, Faheem M, Sattar AA, et al. Human papillomavirus infection in females with normal cervical cytology: genotyping and phylogenetic analysis among women in Punjab, Pakistan. *Int J Infect Dis*, 2018; 66: 83-9.
3. Coscia MF, Monno R, Ballini A, Mirgaldi R, Dipalma G, Pettini F et al. Human papilloma virus (HPV) genotypes prevalence in a region of South Italy (Apulia). *Ann Ist Super Sanità*, 2015; 51(3): 248-25.
4. Aslan FG, Us T, Kaşifoğlu N, Özalp SS, Akgün Y, Öge T, ve ark. Eskişehir bölgesindeki kadınlarda human papillomavirus DNA pozitifliği ve olası risk faktörlerinin değerlendirilmesi; *TAF Prev Med Bull*, 2015; 14(3): 222-28.
5. Nascimento M DSB, Vidal BFC, Silva MACN, Batista JE, Barbosa MCL, Filho WEM et al. Prevalence of human papillomavirus infection among women from quilombo communities in northeastern Brazil. *BMC Women's Health*. 2018; 18(1).
6. Dursun P, Senger SS, Arslan H, Kuşcu E, Ayhan A. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infect Dis*, 2009; 9:191.
7. Fındık D, Dağı HT, Arslan U, Fındık Y. Servikal örneklerde human papillomavirus sıklığı ve genotip dağılımı. *Genel Tıp Derg*, 2012; 22(4): 116-20.
8. Akcalı S, Goker A, Ecemis T, Kandiloglu AR, Sanlıdag T. Human papilloma virus frequency and genotype distribution in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013; 14(1): 503-6.
9. Yıldırım D. Sivas Yöresinde Human Papillomavirus İnfeksiyonlarının Araştırılması. Uzmanlık tezi. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2012.
10. Inal MM, Köse Ş, Yıldırım Y, Özdemir Y, Töz E, Ertopçu K, et al. The relationship between human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in Turkish women. *Int J Gyna Cancer*. 2007;17(6):1266-70.
11. Vardar MA, Altıntaş A, Doran F, Arıdoğan N, Demir C, Burgut R. et al. Human papillomavirus detection in cervical smears and cervical tissue excised by the loop electrosurgical excision procedure (LEEP). diagnostic value of cytology, colposcopy and histology. *Eur J Gynaecol Oncol*, 1995;16(6): 494-9.
12. Özalp S, Us T, Arslan E, Öge T, Kaşifoğlu N. HPV DNA and pap smear test results in cases with and without cervical pathology. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2012; 13(1): 8-14.
13. Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet Infect Dis*, 2007;7(7): 453-9.
14. De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S. HPV infection in Europe. *Eur J Cancer*, 2009; 45(15): 2632-9.
15. Akarolo-Anthony SN, Famooto AO, Dareng EO, Olaniyan OB, Offiong R, Wheeler CM, Adebamowo CA. Age-specific prevalence of human papilloma virus infection among Nigerian women. *BMC Public Health*. 2014;14(1):656.
16. Watson-Jones D, Baisley K, Brown J, Kavishe B, Andreasen A, Chagalucha J, et al. High prevalence and incidence of human papillomavirus in a cohort. *Sex Transm Infect*, 2013; 89: 358-65.
17. Cronje HS. Screening for cervical cancer in developing countries. *Int J Gynecol Oncol*, 2004; 84:101-8.
18. Açıköz A, Ergör G. Cervical cancer risk levels in Turkey and compliance to the national cervical cancer screening standard. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011;12(4):923-7.

19. Özmen V, Dağoğlu N, Dede İ, Akçakaya A, Kerem M, Göksel F, et al. Turkish ministry of health, 2nd Turkish medical general assembly clinical oncology study group report. *J Breast Health*, 2016;12(1):9-17.
20. Ortiza AP, Tortolero-Lunaa G, Romaguerac J, Pérezb CM, Gonzálezb D, Muñozc C, et al. Seroprevalence of HPV 6, 11, 16 and 18 and correlates of exposure in unvaccinated women aged 16-64 years in Puerto Rico. *Papillomavirus Res*, 2018; 5:109-13.
21. Xue H, Lin X, Li T, Yan X, Guo K, Zhang Y. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Liaoning province, China. *J Med Virol*, 2015;87(7):1248-53.
22. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*, 2008; 26(1); 1-16.
23. Casalegno JS, Benchaib M, Le Bail Carval K, Piaton E, Mathevet P, et al. Human papillomavirus genotype distribution among French women with and without cervical abnormalities. *Int J Gynaecol Obstet*, 2011;114(2): 116-9.
24. Koyuncu E. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniđi'ne Başvuran Hastaların Servikal Sitolojilerin Servikal Kanseri Risk Faktörlerine Göre Analizi-Normal ve Anormal Sitolojik Sonuçlarda Yüksek Onkogenik Hpv Prevalansı. Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İstanbul; 2006.
25. Şahiner F, Gümrall R, Şener K, Yiđit N, Dede M, Yapar M. Servikal sürüntü örneklerinde iki farklı yöntemle HPV-DNA varlığının araştırılması: MY09/11 Konsensus PCR ve Tipe Özgül Gerçek Zamanlı PCR. *Mikrobiyol Bul*. 2012; 46: 624-36.
26. Aydoğan S, Yazgan A, Taş EE, Gözalan A, Yavuz F, Açıkgöz ZC. Eş zamanlı servikal sitoloji örneklerinde yüksek riskli HPV tiplerinin varlığı ve dağılımı. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2018; 75(1): 13 - 20.

Mesane gen regülasyonunda etkili süper-enhancer'ların belirlenmesi

Identification of the super-enhancers involved in bladder gene regulation

Serap ERKEK¹

ÖZET

Amaç: Gen ekspresyonunun düzgün bir şekilde gerçekleşmesinde hızlandırıcı (enhancer) adı verilen genomik bölgeler, transkripsiyon faktörlerini genlerin promotor bölgeleri ile bir araya getirir. Enhancer bölgeleri genomda histon H3 lizin 27 asetilasyon (H3K27ac) sinyaline sahip olmalarıyla tanımlanabilmektedir. Süper-enhancer'lar genomda yüksek H3K27ac sinyaline sahip birkaç enhancer bölgesinin kümelenmesiyle oluşan regülatör bölgelerdir. Süper-enhancer'ların hücre-spesifik gen ekspresyon profillerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, Roadmap Epigenom konsorsiyum kapsamında oluşturulan mesane dokusu H3K27ac kromatin immünopresipitasyon dizileme (ChIP-seq) verisinin analiz edilerek mesane dokusunu regüle eden süper-enhancer'ların tanımlanması ve bağlantılı oldukları genlerin ortaya çıkarılmasıdır.

Yöntem: Mesane H3K27ac ChIP-seq verisine Roadmap Epigenom veritabanından erişilmiştir. Veri Homer ChIP-seq analiz platformunda analiz edilmiştir. Süper-enhancer'lar Homer platformunda 'zirve bulma' fonksiyonunu (findPeaks) 'super' modunda kullanılarak belirlenmiştir. Belirlenen süper-enhancer'ların genlerle ilişkilendirilmesi Homer 'zirve bölge anlamlandırma'

ABSTRACT

Objective: Enhancer elements in the genome take a role in establishment of proper gene expression patterns via bringing transcription factors together with the promoter regions of the genes. Acetylation of lysine K27 on histone H3 (H3K27ac) marks the enhancer regions in the genome. Super-enhancers are regulatory regions which have unusual high signal of H3K27ac and consist of several enhancer elements. Super-enhancers play a critical role in setting of correct cell-type specific gene expression programs. The aim of this study is to identify the super-enhancers characterizing normal bladder and associate these super-enhancers with the genes via analyzing bladder H3K27ac chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) data generated within Roadmap Epigenomics Project.

Methods: Bladder H3K27ac ChIP-seq data was downloaded from Roadmap Epigenomics server. The data was analyzed on Homer ChIP-seq analysis platform. Super-enhancers were called using 'findPeaks' function of the platform in 'super' mode. The identified super-enhancers were associated with the genes using 'annotatePeaks' function of Homer

¹İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir



İletişim / Corresponding Author : Serap ERKEK

İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Dokuz Eylül Üni. Sağlık Yerleşkesi Balçova, İzmir - Türkiye

Tel : +90 546 845 23 57

E-posta / E-mail : serap.erkek@ibg.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 10.10.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 17.04.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.81904

Erkek S. Mesane gen regülasyonunda etkili süper-enhancer'ların belirlenmesi.
Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 41-50

fonksiyonu (annotatePeaks) kullanılarak yapılmıştır. H3K27ac sinyalinin ve süper-enhancer bölgelerinin görsel olarak sunumu için UCSC GenomeBrowser altyapısından faydalanılmıştır. Süper-enhancer bağlantılı genlerin etkileşim ağlarını ve rol oynadıkları sinyal yollarını bulmak için STRING protein etkileşim veritabanı kullanılmıştır.

Bulgular: Mesane dokusunda 602 süper-enhancer belirlenmiştir. İlk en yüksek 100 H3K27ac sinyal değerine sahip olan süper-enhancer'lar aralarında *TBX3*, *RARA*, *RXRA*, *RASSF1*, *DAB2IP*'nin olduğu genlerle ilişkilendirilmiştir. Süper-enhancer-regüle olan (süper-enhancer'ın gen transkripsiyon başlangıç noktasına uzaklığı max 10 kilobaz) genlerin (n=386) organ gelişimi, epitel hücre farklılaşması, retinoik asit metabolizmasında görev aldıkları belirlenmiştir. Aynı zamanda mesane süper-enhancer'ları ile ilişkili olan genlerin istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde (yanlış bulgu oranı = $1.49e-07$) transkripsiyon faktör görevini yapan protein grubunda yer aldığı ve etkileşim ağı oluşturdukları belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışmayla mesane dokusunu regüle eden süper-enhancer regülatör bölgeler ortaya çıkarılmıştır. İlişkili genlerin normal mesane yapısının korunmasındaki rolleri ve söz konusu genlerin mesane kanser mekanizmalarıyla bağlantıları göz önünde bulundurularak, elde edilen sonuçların mesane biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağladığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Transkripsiyon, mesane, histon, hızlandırıcı (enhancer)

platform. The visualization of H3K27ac ChIP-seq signal and identified super-enhancers was performed using UCSC GenomeBrowser. The protein-protein interaction networks of super-enhancer regulated genes and the pathways involved were determined using STRING protein interaction database.

Results: 602 super-enhancers was identified in bladder tissue. Among the genes which were associated with super-enhancers having the top 100 highest H3K27ac signal were *TBX3*, *RARA*, *RXRA*, *RASSF1*, *DAB2IP*. Super-enhancer regulated (max distance of the super-enhancer to transcriptional start site of gene is 10 kb) genes (n=386) were identified to be involved in organ development, epithelial cell differentiation, and retinoic acid metabolism. In addition, it was determined that transcription factors were significantly (False Discovery Rate (FDR) = $1.49e-07$) enriched among the genes regulated by super-enhancers and those genes had a significant protein-protein interaction.

Conclusion: With this study, the super-enhancers regulating normal bladder were determined. Given the fact that associated genes are involved in the maintenance of normal bladder homeostasis and the misregulation same set of genes take a role in bladder cancer, it is estimated that the results obtained with this study will largely contribute to a better understanding of bladder biology.

Key Words: Transcription, bladder, histone, enhancer

GİRİŞ

Transkripsiyonel regülasyon doğru gen ifade profillerinin oluşması ve hücrel farklılaşma ve büyümenin gerektiği şekilde olması için çok önemlidir. Gen ifadesi için genlerin promotor bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörleri birincil olarak gerekli olmasına rağmen, sadece promotor bölgesi regülasyonu genlerin yeterli miktarda

ifade olması için yeterli değildir (1). Bu bağlamda, promotor bölgesi ile transkripsiyon için etkin diğer faktörleri bir araya getiren ve 'enhancer' olarak tanımlanan genomik bölgeler belirlenmiştir. İlk enhancer yaklaşık 35 yıl önce SV40 DNA'sında bir bölgenin Hela hücrelerinde β -globin ifadesini ciddi oranda artırmasıyla tanımlanmıştır (2). Bu çalışmayı

takiben farklı hücrelerde genlerin ifadesini regüle eden birçok enhancer belirlenmiştir. Enhancer genomik bölgeleri gen regülasyonu için önemli transkripsiyon faktör bağlanma alanlarına sahiptir (3). Fenotip/hastalık bağlantılı mutasyonların enhancer bölgelerinde bulunması da enhancer fonksiyonunun transkripsiyonel regülasyon için çok önemli olduğuna işaret etmektedir (1).

Geçtiğimiz son 20 yıldan günümüze uygulanmakta olan yeni nesil dizileme teknikleri genomda DNA düzeyinde meydana gelen değişiklikleri, gen ifade profillerini ve kromatin konfigürasyonunu yüksek çözünürlükte belirleme şansı yaratmıştır (4). Kromatin, DNA'nın histon proteinleri etrafına sarmalanmasıyla meydana gelen yapıdır ve histon proteinlerinin uç kısımlarında meydana gelen kimyasal değişiklikler genom regülasyonu için farklı mekanizmaların ortaya çıkmasına yön verir. Ortaya çıkan kromatin konfigürasyonu genotipin fenotipe yön verme şekli olarak tanımlanan epigenetik kontrol sistemini oluşturur (5). Kromatin izolasyonunu takiben belirli histon işaretlerine karşı antikolar kullanılarak gerçekleştirilen immüno-presipitasyon ve takiben yeni nesil dizileme (ChIP-seq), çeşitli hücrelerde ve doku türlerinde genomda histon işaretlerinin lokalize olduğu bölgeleri belirlemek için kullanılmıştır (6). Bu kapsamda özellikle 'DNA bölgelerinin ansiklopedisi' (The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)) (7) ve 'Epigenomik Yol Haritası' (Roadmap Epigenomics) (8) gibi uluslararası konsorsiyumlar tarafından gerçekleştirilen çalışmalar ChIP-seq metodunu kullanarak 100'den fazla doku türü ve hücre hattının epigenetik haritasını çıkarmıştır. Bu anlamda histon H3 üzerindeki lizin 27'nin asetilasyonu (H3K27ac), genomda aktif enhancer bölgelerini tanımlamak için yaygın olarak kullanılmıştır (7, 9, 10).

Enhancer bölgelerinin özellikle H3K27ac ChIP-seq yöntemiyle tanımlanmasından sonra enhancer'ların fonksiyonlarını ve etkilerini sınıflandırmak için çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir (1). Enhancer'ların sınıflandırılmasıyla göze çarpan en önemli gruplardan

biri süper-enhancer'lardır. Süper-enhancer H3K27ac sinyalinin ve transkripsiyon faktör motiflerinin çok yoğun olarak bulunduğu birkaç alt enhancer bölgesinin kümelenmesiyle bir araya gelen regülatör bölge olarak tanımlanmaktadır (11). Süper-enhancer'ların fonksiyonu ile ilgili en önemli özelliklerden biri her hücre/doku türü için belirlenen süper-enhancer'ların hücre kökeni-spesifik transkripsiyon faktörlerin bağlanma bölgelerini barındırmalarıdır (3). Örneğin embriyonik kök hücrelerde belirlenen süper-enhancer'lar pluripotent hücreleri regüle eden transkripsiyon faktörleriyle ilişkilendirilmiştir. Yine çeşitli kanser türleri için belirlenen süper-enhancer'ların onkojenlerin regülasyonu ile bağlantıları gösterilmiştir (9, 10, 12).

Günümüze kadar embriyonik kök hücrelerde ve kanser hücre hatlarında rol oynayan süper-enhancer'lar tanımlanmışken sağlıklı dokularda süper-enhancer tanımları büyük ölçüde yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı mesane dokusunu regüle eden süper-enhancer'ları tanımlamaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mesane H3K27ac ChIP-seq verisinin temini

Roadmap Epigenomics konsorsiyum çalışması (8) ile oluşturulan mesane H3K27ac ChIP-seq verisi bed formatında 'http://www.genboree.org/EdaccData/Current-Release/sample-experiment/Bladder/Histone_H3K27ac/' (01.09.18) adresinden temin edilmiştir.

Süper-enhancer'ların belirlenmesi

Mesane süper-enhancer'ları tanımlamak için Homer ChIP-seq analiz platformu (13) kullanılmıştır. İlk olarak platformla birlikte sağlanan 'makeTagDirectory' programı kullanılarak mesane H3K27ac ChIP-seq verisi süper-enhancer tanımlamada kullanılmak için hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan veri yine Homer platformuyla sağlanan 'findPeaks' algoritmasıyla (parametreler: - style super - L 1)

kullanılarak mesane dokusundaki süper-enhancer'lar belirlenmiştir. Bütün enhancer'lar (H3K27ac zirve bölgeleri) arasında süper-enhancer'ları grafiksel olarak göstermek amacıyla, bütün zirve bölgeleri 'findPeaks' algoritmasında 'style super -superSlope -1000 -L 1' parametreleri kullanılarak bulunmuştur.

Süper-enhancer grafiğinin çizimi

'findPeaks' algoritması ile ortaya çıkarılan zirve bölgelerinin sinyal değerleri R programlama dili (<https://www.r-project.org/> (10.09.18)) kullanılarak sıralamaya konulmuş ve 'plot' fonksiyonu ile grafik çizilmiştir. Grafik üzerinde 'süper-enhancer' kategorisinde olan zirve bölgeleri 'kırmızı' olarak işaretlenmiştir.

Örnek H3K27ac sinyalinin gösterimi

Mesane H3K27ac verisi wig formatında 'http://www.genboree.org/EdaccData/Current-Release/sample-experiment/Bladder/Histone_H3K27ac/' (01.09.18) adresinden temin edilmiştir. Wig formatındaki H3K27ac verisi ve süper-enhancer koordinatlarını gösteren 'bed' dosyası UCSC GenomeBrowser'a (14) yüklenmiş ve örnek grafikler ortaya çıkarılmıştır.

Süper-enhancer bağlantılı genler

Süper-enhancer'ların regüle ettikleri genleri belirlemek amacıyla Homer platformunda sağlanan 'annotatePeaks.pl' programı kullanılmıştır. Program kullanımı sonrasında ortaya her süper-enhancer'ın en yakın olduğu transkripsiyon başlangıç koordinatı (TBN), ve TBN'nin ilişkili olduğu geni gösteren bir tablo çıkmaktadır. Bu çalışmada, TBN bölgesi süper-enhancer'lara ± 10 kilobaz uzaklığında olan genler (n= 386), sinyal yolağı ve protein-protein etkileşim analizlerinde kullanılmıştır.

Protein etkileşim ve sinyal yolak analizi

Süper-enhancer-regüle genlerin etkileşim ağlarını ortaya çıkarmak amacıyla STRING protein etkileşim veritabanında (<https://string-db.org/> (18.09.18)) (15) 'Multiple proteins' opsiyonu kullanılmıştır. Ağ

haritasını çıkarmak için aşağıdaki parametreler kullanılmıştır.

Etkileşim kaynağı: Literatür bilgisi, deneysel veri, veritabanı bilgisi, ko-ekspresyon, yakınlık/çevre (neighborhood), gen füzyon, birlikte-gerçekleşme (co-occurrence).

Minimum etkileşim puanı: 0,7 (yüksek güvenilirlikle)

Etkileşim ağ kümelenmesi: kmeans kümelenmesi, küme sayısı = 10.

Etkileşim ağ haritası ortaya çıkarılırken, bağlantısız nodlar çıkarılmıştır.

İstatistiksel analizler

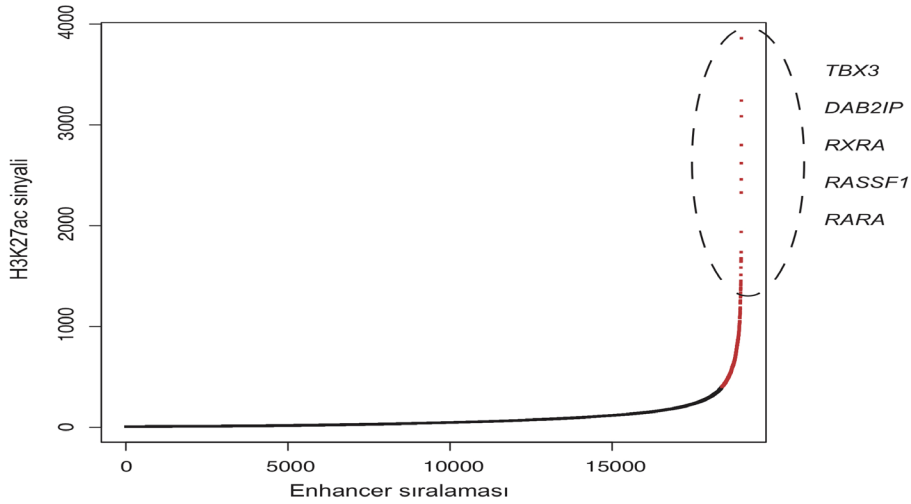
Süper-enhancer'ların belirlenmesi için kullanılan Homer platformuyla sağlanan 'findPeaks' algoritmasında Poisson dağılışa uygunluk testi uygulanmış olup yanlış bulgu oranının (False Discovery Rate, FDR) 0,001'den küçük olması esas alınmıştır. STRING veritabanı ile gerçekleştirilen sinyal yolak analizinde Hipergeometric test uygulanmış olup, p değerleri Benjamini and Hochberg metoduyla multiple testing için düzeltilip FDR değerleri hesaplanmıştır. Bu analizde FDR değerinin 0,05'den küçük olması esas alınmıştır.

BULGULAR

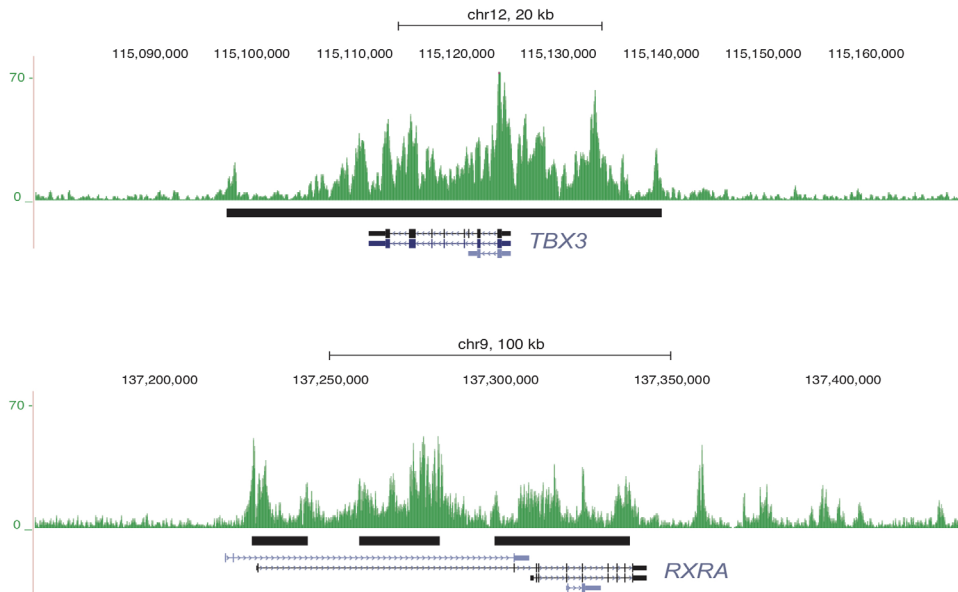
Mesane dokusunda süper-enhancer'lar

Roadmap Epigenom projesinde oluşturulan H3K27ac CHIP-seq verisi kullanılarak H3K27ac-zirve bölgelerinin belirlenmesini takiben mesane dokusunu regüle eden 602 süper-enhancer bulunmuştur (Şekil 1). Şekil 1'de verilen grafiğe göre en yüksek 100 H3K27ac sinyal değerine sahip süper-enhancer'lar ile ilişkilendirilen genler arasında *TBX3*, *RARA*, *RXRA*, *RASSF1*, *DAB2IP* genleri belirlenmiştir. Bu genlerden bazıları için örnek H3K27ac sinyal durumunun gösterimi de Şekil 2'de sunulmuştur.

HPV DNA pozitif bulunan örneklerin içinde 73 (% 32,3) hastada tek başına HPV tip 16 saptanırken 37

Şekil 1. Mesane süper-enhancer'ları*

*Şekil mesane dokusu için bulunan bütün H3K27ac zirve bölgelerinin (enhancer) H3K27ac sinyaline göre sıralanmasını göstermektedir. Homer algoritmasıyla 'süper-enhancer' olarak kalifiye olan enhancer'lar kırmızı olarak gösterilmiştir. İlk 100 en yüksek H3K27ac sinyal değerine sahip süper-enhancer'lar ile ilişkilendirilmiş genlerden bazıları grafiğin yanında gösterilmiştir.

Şekil 1. Mesane süper-enhancer'ları

* Şekil *TBX3* (yukarı panel) ve *RXRA* (aşağı panel) genleri etrafındaki H3K27ac sinyalini (yeşil renk) göstermektedir. H3K27ac sinyalinin altındaki siyah dikdörtgen kutular ise belirlenen süper-enhancer'ların yerini göstermektedir. Şekil, veri UCSC GenomeBrowser websayfasına yüklenerek oluşturulmuştur.

Şekil 2. Süper-enhancer'lar için örnek H3K27ac sinyal dağılımları

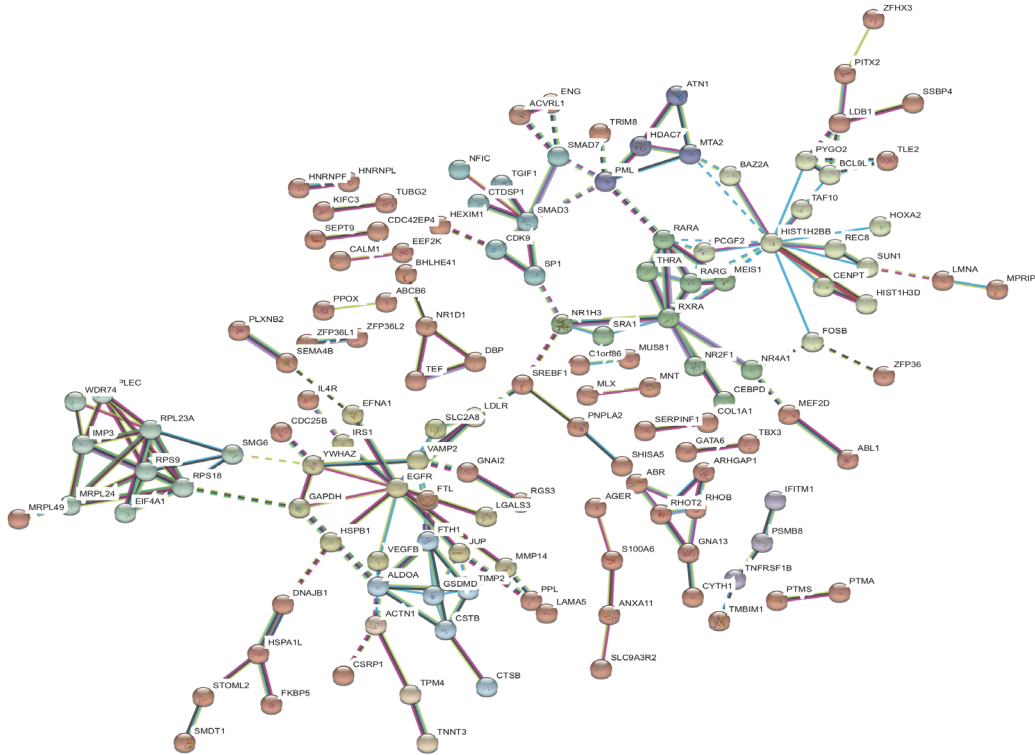
(%16,3) hastada multipl tipler ve 116 (%51,3) hastada da diğer tipler bulunmuştur (Tablo 1). Multipl HPV DNA saptanan hastaların tümünde yüksek riskli HPV DNA tiplerinin en az birinin de yer aldığı görülmüştür.

Süper-enhancer regüle genler

Bulunan süper-enhancer'lar genlerin transkripsiyon başlangıç noktalarına (TBN) yakınlık durumlarına göre filtrelendiğinde, genlerin TBN'lerine maksimum 10 kilobaz uzaklığında olan 386 gen bulunmuştur. Bu genler için protein-protein etkileşim haritası çıkarıldığında, etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (STRING veritabanının

rapor ettiği protein-protein etkileşim hipergeometrik test p-value: 2,59e-06) (Şekil 3).

Bu genlerin birçoğunun transkripsiyon faktör sınıfında olduğu (n=62, Gen Ontoloji terimi 'GO:0003700' zenginleşme yanlış pozitiflik oranı (False Discovery Rate (FDR))= 1,49e-07) bulunmuştur (Tablo 1). Söz konusu transkripsiyon faktörlerinin renal sistem gelişmesi (örneğin *SMAD7* (16), *ID3* (17)), retinoid asit metabolizması (örneğin *RARA* (18), *RXRA* (19)), epitel hücre farklılaşması (örneğin *PITX2* (20), *GATA6* (21)) gibi sinyal yollarında görev aldığı belirlenmiştir (FDR < 0,05).



Bilinen etkileşimler

- — ● Düzenli veritabanı bilgisine göre
- — ● Deneysel olarak belirlenmiş

Tahmin edilen etkileşimler

- — ● Gen yakınlığı/çevresi
- — ● Gen birlikteliği

Diğer

- — ● Birlikte ekspresyon
- — ● Protein homolojisi

* Şekil STRING protein veritabanı kullanılarak ortaya çıkarılan mesane dokusunda süper-enhancer'lar ile ilişkilendirilmiş genlerin etkileşim ağı haritasını göstermektedir. Etkileşimde kullanılan çizgilerin renklerine ilişkin açıklama şeklin altındaki gösterdede sunulmuştur. Katı çizgiler proteinler arasındaki doğrudan etkileşimleri temsil ederken kesik çizgiler proteinler arasındaki dolaylı etkileşimleri göstermektedir.

Şekil 3. Süper-enhancer ile ilişkilendirilen genlerin protein-protein etkileşim ağıları

Tablo 1. Mesane Süper-enhancer'ları ile ilişkilendirilmiş transkripsiyon faktörleri

AKNA	FOSB	NFIC	SP1	ZFP36L2
ARID3A	GATA6	NR1D1	SREBF1	ZNF580
ARID5B	GLIS2	NR1H3	SSBP4	
ATOH8	HOXA2	NR2F1	TBX2	
BCL3	ID1	NR2F2	TBX3	
BCL6	ID3	NR4A1	TEAD3	
BCL6B	KLF13	PCGF2	TEF	
BHLHE41	KLF16	PITX2	TGIF1	
CEBPD	KLF6	RAI1	THRA	
CENPT	KLF9	RARA	VEZF1	
CIC	MEF2D	RARG	ZBTB38	
CREB3L4	MEIS1	RXRA	ZBTB7A	
CSRNP1	MLX	SMAD3	ZC3H4	
DBP	MNT	SMAD7	ZFH3	
ELF4	MTA2	SOX13	ZFP36L1	

TARTIŞMA

Bu çalışmada Roadmap Epigenom konsorsiyum çalışması (8) kapsamında oluşturulan H3K27ac ChIP-seq verisi kullanılarak, mesane dokusunun regülasyonunda etmen süper-enhancer'lar belirlenmiştir. Belirlenen süper-enhancer sayısı (n=602), daha önceki çalışmalarda bulunan süper-enhancer sayıları ile aynı aralıktadır (multipl miyelom hücreleri: n=308 (22), atipik teratoid rhabdoid tümör: n=894 (9), medulloblastom alt grupları: n=600-1100 (10)).

Mesanedeki en yüksek H3K27ac sinyaline sahip süper-enhancer'lar ile ilişkilendirilen genler mesane gelişimi ve mesane kanser bağlantılarının anlaşılması açısından önemli bilgiler taşımaktadır. *TBX3*, omurgalılarda organ gelişiminde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinden biridir (23) ve *TBX3*'ün gen ekspresyonu yetişkin mesane ürotelyumunda gösterilmiştir (24). *TBX3*'ün metile olup eksprese olmadığı mesane kanseri tümörlerinde progresyon

olmadan sağkalımın istatistiksel olarak çok daha az olduğu gösterilmiştir (25). *RARA* ve *RXRA* genlerinin de mesanede süper-enhancer bağlantılı olduğunun bulunması önemlidir. Retinoik asit, retinoik asit reseptör (*RARA*) ve retinoik asit reseptör X dimer yapısına bağlanarak retinoik asit-cevap bölgesine sahip genleri regüle etmektedir (26). Retinoik asit sinyal mekanizmalarının normal mesane epitel dokusunun kararlı-halde (steady-state) korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir (27). Retinoik asit sinyal mekanizmalarında meydana gelen bozukluklar mesane kanser gelişiminin ortaya çıkmasıyla da ilişkilendirilmiştir (28). Ölümsüzleştirilmiş ürotelyum hücre hatlarında *RARA* geninde mutasyon olduğu saptanmıştır (29). Diğer bir çalışmada; *RARB* transkript seviyelerinin mesane kanserinde azaldığı gösterilmiştir (30). Başka bir çalışmada ise dört farklı mesane kanseri hücre hattının retinoid türevleriyle ve interferon ile muamele edilmesinin, mesane kanser hücre hatlarındaki proliferasyonu yavaşlattığını göstermiştir (31). *RASSF1* Ras efektör

grup ailesine ait olup birçok kanserde genomik delesyon ya da yanlış regülasyon sonucu yeteri kadar ifade olamayan bir tümör baskılayıcı bir gen dir (32). *RASSF1* gen ekspresyonundaki azalmanın normal mesaneden tümörejenik mesaneye geçişte önemli bir prognostik faktör olduğu (33) ve mesane kanserinde *RASSF1* promotor bölge metilasyonunun mesane kanserinin derecelendirilmesi ve gidişatı açısından belirleyici olduğu gösterilmiştir (34). Bu anlamda, bu çalışmada *RASSF1* geninin süper-enhancer regülasyonu ile ilişkilendirilmesi mesane dokusunun normal yapısının korunmasında *RASSF1* geninin rolüne işaret etmektedir. RAS GTP-ase aktive eden protein ailesine ait olan *DAB2IP* geninin de mesane kanserinde az eksprese olması prognostik bir faktör olarak görülmektedir. *DAB2IP* gen ifade seviyesinin düşük olması mesane kanserinde yüksek patolojik evre ve derecesiyle korelasyon göstermektedir (35). Ayrıca, *DAB2IP* gen ekspresyonunun kaybolması daha kötü nüksüz sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (36). Bu bilgiler doğrultusunda *DAB2IP* geninin de süper-enhancer bağlantılı regülasyonu, bu genin normal mesane gen ifade ağ regülasyonunda çok önemli olduğunu göstermektedir.

Daha önceden yapılan çalışmalarda, süper-enhancer-regüle olan genlerin büyük oranda transkripsiyon faktörlerden oluştuğu belirlenmiştir.

Örneğin, embryonik kök hücre için belirlenen süper-enhancer'lar embryonik kök hücre kimliğini belirleyen pluripotent özellik belirleyici transkripsiyon faktörleri (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2*) ile ilişkilendirilmiştir (11). Ayrıca, pediatrik beyin tümörlerinin alt gruplarını karakterize eden süper-enhancer'ların da onkogenik özellik taşıyan transkripsiyon faktörlerinin (örneğin *MYC*, *OTX2*, *GLI2*) ekspresyonunu regüle ettiği gösterilmiştir (9, 10). Bu çalışmada, süper-enhancer ile ilişkilendirilen genlerin istatistiksel olarak anlamlı büyük oranda transkripsiyon faktörlerden oluşması, belirlenen transkripsiyon faktörlerin epitel hücre farklılaşması, organ gelişimi, retinoik asit metabolizmasındaki rolleri (16-21) ve söz konusu genler için istatistiksel olarak anlamlı etkileşimlerin bulunması mesane dokusunda da temel regülasyon ağlarının ortaya çıkmasında süper-enhancer'ların rolüne işaret etmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmayla belirlenen mesane süper-enhancer'ları, mesane dokusunu düzenleyen temel regülatör bölgeleri tanımlamış, ilişkili oldukları genlerin ve etkileşim ağlarını belirlemiştir. Elde edilen sonuçların normal mesane biyolojisinin daha iyi anlaşılması mesane kanserine yol açan moleküler mekanizmaların keşfedilmesine ve deneylerin tasarlanmasına yön vereceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Niederriter AR, Varshney A, Parker SC, Martin DM. Super Enhancers in Cancers, Complex Disease, and Developmental Disorders. *Genes (Basel)*. 2015;6(4):1183-200.
2. Banerji J, Rusconi S, Schaffner W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 1981;27(2 Pt 1):299-308.
3. Pott S, Lieb JD. What are super-enhancers? *Nat Genet*. 2015;47(1):8-12.
4. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 2017;550(7676):345-53.
5. Morange M. The relations between genetics and epigenetics: a historical point of view. *Ann N Y Acad Sci*, 2002;981:50-60.
6. Milne TA, Zhao K, Hess JL. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) for analysis of histone modifications and chromatin-associated proteins. *Methods Mol Biol*, 2009;538:409-23.
7. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74.
8. Roadmap Epigenomics C, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*, 2015;518(7539):317-30.
9. Johann PD, Erkek S, Zapatka M, Kerl K, Buchhalter I, Hovestadt V, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumors are comprised of three epigenetic subgroups with distinct enhancer landscapes. *cancer cell*, 2016;29(3):379-93.
10. Lin CY, Erkek S, Tong Y, Yin L, Federation AJ, Zapatka M, et al. Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. *Nature*, 2016;530(7588):57-62.
11. Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, 2013;153(2):307-19.
12. Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-Andre V, Sigova AA, et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*, 2013;155(4):934-47.
13. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell*, 2010;38(4):576-89.
14. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*, 2002;12(6):996-1006.
15. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*, 2015;43(Database issue):D447-52.
16. Lan HY, Chung AC. TGF- β /Smad signaling in kidney disease. *Semin Nephrol*, 2012; 32(3):236-43.
17. Nackiewicz D, Dey P, Szczerba B, Mohammad S, Kaplan JL, McNamara CA, Deshmukh US, Bagavant H. Inhibitor of differentiation 3, a transcription factor, regulates hyperlipidemia-associated kidney disease. *Nephron Exp Nephrol*, 2014; 126(3):141-7.
18. Mendelsohn C, Batourina E, Fung S, Gilbert T, Dodd J. Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development. *Development*, 1999;126(6):1139-48.
19. Thiagarajan RD, Georgas KM, Rumballe BA, Lesieur E, Chiu HS, Taylor D, et al. Identification of anchor genes during kidney development defines ontological relationships, molecular subcompartments and regulatory pathways. *PLoS One*, 2011;6(2):e17286.

20. Sharp T, Wang J, Li X, Cao H, Gao S, Moreno M, et al. A pituitary homeobox 2 (Pitx2):microRNA-200a-3p:beta-catenin pathway converts mesenchymal cells to amelogenin-expressing dental epithelial cells. *J Biol Chem*, 2014;289(39):27327-41.
21. Keijzer R, van Tuyl M, Meijers C, Post M, Tibboel D, Grosveld F, et al. The transcription factor GATA6 is essential for branching morphogenesis and epithelial cell differentiation during fetal pulmonary development. *Development*, 2001;128(4):503-11.
22. Loven J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*, 2013;153(2):320-34.
23. Kispert A. T-box genes in the kidney and urinary tract. *Curr Top Dev Biol*, 2017;122:245-78.
24. Ito A, Asamoto M, Hokaiwado N, Takahashi S, Shirai T. Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells. *Cancer Lett.*, 2005;219(1):105-12.
25. Beukers W, Kandimalla R, Masius RG, Vermeij M, Kranse R, van Leenders GJ, et al. Stratification based on methylation of TBX2 and TBX3 into three molecular grades predicts progression in patients with pTa-bladder cancer. *Mod Pathol*, 2015;28(4):515-22.
26. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*, 2002;43(11):1773-808.
27. Wang C, Ross WT, Mysorekar IU. Urothelial generation and regeneration in development, injury, and cancer. *Dev Dyn*, 2017;246(4):336-43.
28. DeGraff DJ, Cates JM, Mauney JR, Clark PE, Matusik RJ, Adam RM. When urothelial differentiation pathways go wrong: implications for bladder cancer development and progression. *Urol Oncol*, 2013;31(6):802-11.
29. Hurst RE, Waliszewski P, Waliszewska M, Bonner RB, Benbrook DM, Dar A, et al. Complexity, retinoid-responsive gene networks, and bladder carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 1999;462:449-67.
30. Zou C, Liebert M, Zou C, Grossman HB, Lotan R. Identification of effective retinoids for inhibiting growth and inducing apoptosis in bladder cancer cells. *J Urol*, 2001;165(3):986-92.
31. Zou C, Ramakumar S, Qian L, Zou C, Zang R, Wang J, et al. Effect of retinoic acid and interferon alpha-2a on transitional cell carcinoma of bladder. *J Urol*. 2005;173(1):247-51.
32. Allen NP, Donniger H, Vos MD, Eckfeld K, Hesson L, Gordon L, et al. RASSF6 is a novel member of the RASSF family of tumor suppressors. *Oncogene*, 2007;26(42):6203-11.
33. Ha YS, Jeong P, Kim JS, Kwon WA, Kim IY, Yun SJ, et al. Tumorigenic and prognostic significance of RASSF1A expression in low-grade (WHO grade 1 and grade 2) nonmuscle-invasive bladder cancer. *Urology*, 2012;79(6):1411 e1-6.
34. Gao T, Wang S, He B, Pan Y, Song G, Gu L, et al. The association of RAS association domain family Protein1A (RASSF1A) methylation states and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2012;7(11):e48300.
35. Shen YJ, Kong ZL, Wan FN, Wang HK, Bian XJ, Gan HL, et al. Downregulation of DAB2IP results in cell proliferation and invasion and contributes to unfavorable outcomes in bladder cancer. *Cancer Sci*, 2014;105(6):704-12.
36. Jou YC, Tsai YS, Chen SY, Hsieh HY, Tsai HT, Tzai TS. Loss of DAB2IP expression in human urothelial carcinoma is associated with poorer recurrence-free survival. *Virchows Arch*, 2016;468(6):733-40.

The protective role of melatonin against the effect of caffeine on embryonic kidney

Kafeinin embriyonel böbrek gelişimine olan etkisine karşı melatoninin koruyucu rolü

Seher YILMAZ¹, Ayşe Yeşim GÖÇMEN², Arda Kaan ÜNER³, Enes AKYÜZ⁴, Adem TOKPINAR¹

ABSTRACT

Objective: Oxidative stress is one of the major causes of embryonal developmental disorders. In addition, melatonin reduces oxidative stress in the body and is known as a potential treatment for adverse effects of caffeine on fetal development. In this study, we aimed to investigate the teratogenic effect of caffeine on fetal kidney development and the protection of melatonin against the teratogenicity in terms of biochemical parameters.

Methods: 5-7 months old Wistar-Albino rats (n=24) weighing 180-220 g were divided into seven groups for control, caffeine, melatonin, and caffeine+melatonin (co-injection). Control group: Serum physiological (SF) as 1 mL/kg intraperitoneal (i.p.), Sham group: 0.1 ml hanks as i.p., Low dose caffeine group: 30 mg/kg caffeine as gavage, Low dose caffeine+melatonin group: 30 mg/kg dose gavage with 10 mg/kg melatonin as i.p., High dose caffeine group: 60 mg/kg caffeine as gavage, High dose caffeine+melatonin group: 60 mg/kg dose gavage with 10 mg/kg melatonin as i.p., and Melatonin group: 10 mg/kg melatonin as i.p.

Results: Total antioxidant status (TAS) values were 0.49±0.02 in the control group and 0.14±0.00 in the high

ÖZET

Amaç: Oksidatif stres embriyonel gelişim bozukluklarının en büyük sebeplerinden biridir. Ayrıca, melatonin vücutta oksidatif stresi azaltması nedeniyle kafeinin fetal gelişime olan olumsuz etkilerine karşı potansiyel bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir. Bu çalışmada; kafeinin fetal böbrek gelişimine olan teratojenik etkisi ve melatonin maddesinin bu teratojeniteye karşı koruyuculuğunu biyokimyasal parametreler üzerinden incelemeyi hedeflemiştir.

Yöntem: Çalışmada, 180-220 g ağırlığında 24 adet 5-7 aylık Wistar-Albino ırkı ratlar; kontrol, kafein, melatonin ve hem kafein hem de melatonin enjekte edilmek üzere yedi gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu: Serum fizyolojik (SF), (1ml/kg) intraperitoneal (i.p.) Sham grubu: 0.1 mL hanks i.p., Düşük doz kafein grubu: 30mg/kg kafein gavaj olarak Düşük doz kafein+Melatonin grubu: 30mg/kg dozda gavaj ile 10 mg/kg melatonin i.p., Yüksek doz kafein grubu: 60mg/kg kafein gavaj, Yüksek doz kafein+Melatonin grubu: 60mg/kg dozda gavaj ile 10 mg/kg melatonin i.p, Melatonin grubu: 10mg/kg melatonin i.p. olarak verilmiştir.

Bulgular: Alınan böbrek dokularında biyokimyasal değerler incelendiğinde, total antioksidan kapasite

¹Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Anatomy, Yozgat

²Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Yozgat

³Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Yozgat

⁴Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Yozgat



İletişim / Corresponding Author : Seher YILMAZ

Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Yozgat - Türkiye

Tel : +90 536 344 67 63 E-posta / E-mail : sehery38@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 19.12.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 05.01.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.77675

Yılmaz S, Göçmen AY, Üner AK, Akyüz E, Tokpinar A. The protective role of melatonin against the effect of caffeine on embryonic kidney.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 51-58

dose caffeine group. In addition, total oxidant status (TOS), oxidative stress index (OSI), glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), superoxide dismutase (SOD), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), calcium (Ca), vitamin D and GSH/GSSG levels were examined ($p<0.001$).

Conclusion: Melatonin has shown that caffeine has an essential role in reducing teratogenic effects and also reducing oxidative stress. Therefore, melatonin is a potential treatment for oxidative stress and caffeine teratogenicity in embryonic development.

Key Words: Caffeine, rat, melatonin, kidney

(TAS) değeri kontrol grubunda $0,49\pm0,02$, yüksek doz kafein grubunda $0,14\pm0,00$ olduğu görülmüştür. Ayrıca total oksidan kapasite (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI), glutatyon (GSH), glutatyon disülfid (GSSG), süperoksit dismutaz (SOD), tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS), Kalsiyum (Ca), D vitamini ve GSH/GSSG seviyeleri incelenmiştir ($p<0,001$).

Sonuç: Melatoninin kafeinin teratojenik etkilerini ve oksidatif stresi azaltmada önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle melatonin, embriyonel gelişimde oksidatif stres ve kafein teratojenitesi için potansiyel tedavi niteliği taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kafein, sıçan, melatonin, böbrek

INTRODUCTION

Oxidative stress is defined as the presence of active oxygen species above the available antioxidant buffering capacity. These products may damage proteins, lipids, and DNA that alter reactive oxygen species, the structure, and function of the organism. Tissue damage is caused by a series of enzymes that produce highly reactive intermediate compounds free radicals and non-enzyme-mediated biochemical reactions (1, 2).

Although oxidative stress is a feature of normal pregnancy, it affects the antioxidant capacity of the placenta, leading to the consumption and reduction of antioxidants. The high course of oxidative stress damages the lipids, proteins, and DNA in the placental tissue, causing an accelerated aging form. The premature aging of the placenta is associated with placental insufficiency, which prevents the organ and the fetus from addressing their needs, and as a result, the viability of the fetus is compromised. In addition, high doses of caffeine taken during pregnancy are known to cause oxidative stress (3).

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) has been a common component of human nutrition for thousands of years, given its behavior and stimulating

effects (4). Caffeine is the most commonly used psychostimulant in Western countries (5, 6). Caffeine is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract and the highest caffeine concentration is reached 30-60 minutes after consumption (6, 7). In addition to the organism, factors such as caffeine consumption time, sex, physiological status, and temperature also affect the pharmacokinetics of caffeine. In animal studies, teratogenic and embryotoxic effects of high caffeine doses have been determined (8). Since sufficient enzyme systems do not develop during pregnancy, caffeine metabolism might be extended up to 9-11 hours (9). Because of these effects, caffeine is known to adversely affect fetal development and especially kidney development (10). Therefore, several studies have been conducted on the teratogenic effects of caffeine in recent years. Antioxidants are especially targeted in the studies (11-13).

Melatonin, also known as N-acetyl 5 methoxy tryptamine, is secreted by the pineal gland, especially at night. In addition to adjusting the basic biological rhythm, it is also involved in other basic tasks, such as cell regeneration, strengthening the immune system and regulating body temperature. Melatonin is one

of the most powerful antioxidants known due to its lipophilic structure (14).

High-dose caffeine is known to adversely affect the kidneys and is closely associated with polycystic kidney disease, kidney stones, and hypertension (15). In addition, it has been recently shown that caffeine negatively affects fetal kidney development during the intrauterine period and causes oxidative stress (16). In line with this objective, melatonin may be targeted as a new treatment against the teratogenic effects of caffeine on the kidney.

In recent studies, total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), oxidative stress index (OSI), glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), superoxide dismutase (SOD), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) substances such as oxidative stress markers have been shown to be used (17). Therefore, in this study, the parameters were targeted as markers of oxidative stress.

In summary, although the teratogenic effects of caffeine on kidney development were shown in the literature, a study examining the protective effects of melatonin on these effects has not been performed yet. In this study, the teratogenic effect of caffeine on fetal kidney development and the protection of melatonin against the teratogenicity were investigated.

MATERIAL and METHOD

Animals

Wistar-Albino rats (n = 24), 5-7 months old, weighing 180-220 g were used in our study from Erciyes University Experimental Animals and Clinical Research Center (DEKAM). For the research, ethics committee permission of Erciyes University animal experiments local ethics committee dated 11.01.2017 and numbered 17/003 was obtained. The rats were caged at 5.00 pm, with two females and one male, for their match. The following morning, female rats were subjected to a vaginal smear test at 7.00 am.

Females with sperm on the smear test were accepted as 0.5 days pregnant. The rats were kept in specially prepared, automatically air-conditioned rooms with constant temperatures of 19-21 °C and 12 hours of light/dark periods during the study. Rats were fed with normal pellet feed.

1. Control group (C): Serum physiological (SF), (1 mL/kg) was applied i.p.
2. Sham group (S): 0.1 mL of hanks was administered i.p.
3. Low-dose caffeine group (LDC): 30 mg/kg caffeine was administered as gavage.
4. Low dose caffeine + Melatonin group (LDC + M): 30 mg/kg caffeine as gavage and 10 mg/kg melatonin were applied as i.p.
5. High-dose caffeine group (HDC): 60 mg/kg caffeine was administered as gavage.
6. High dose caffeine + Melatonin group (HDC + M): 60 mg/kg caffeine as gavage and 10 mg/kg melatonin were administered as i.p.
7. Melatonin group (M): 10 mg/kg melatonin was given as i.p.

Experimental procedure was shown in (Figure 1).

Preparation of Injections

Caffeine and melatonin powder 98% were obtained from Sigma Aldrich. Drinking water was used as the solvent solution to adjust the amount of caffeine to be given to the rats. In the process of dissolving melatonin in powder form, a hanks solution was used. Both substances were prepared daily and no stock solution was made.

Manipulation of Rats and Obtaining of Fetus

Pregnant rats were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) on the 20th day of gestation. The uterus and the fetuses were dissected individually with their placentas. The kidneys of the animals were collected in sterile plastic bags and stored at -80 °C until biochemical analysis.

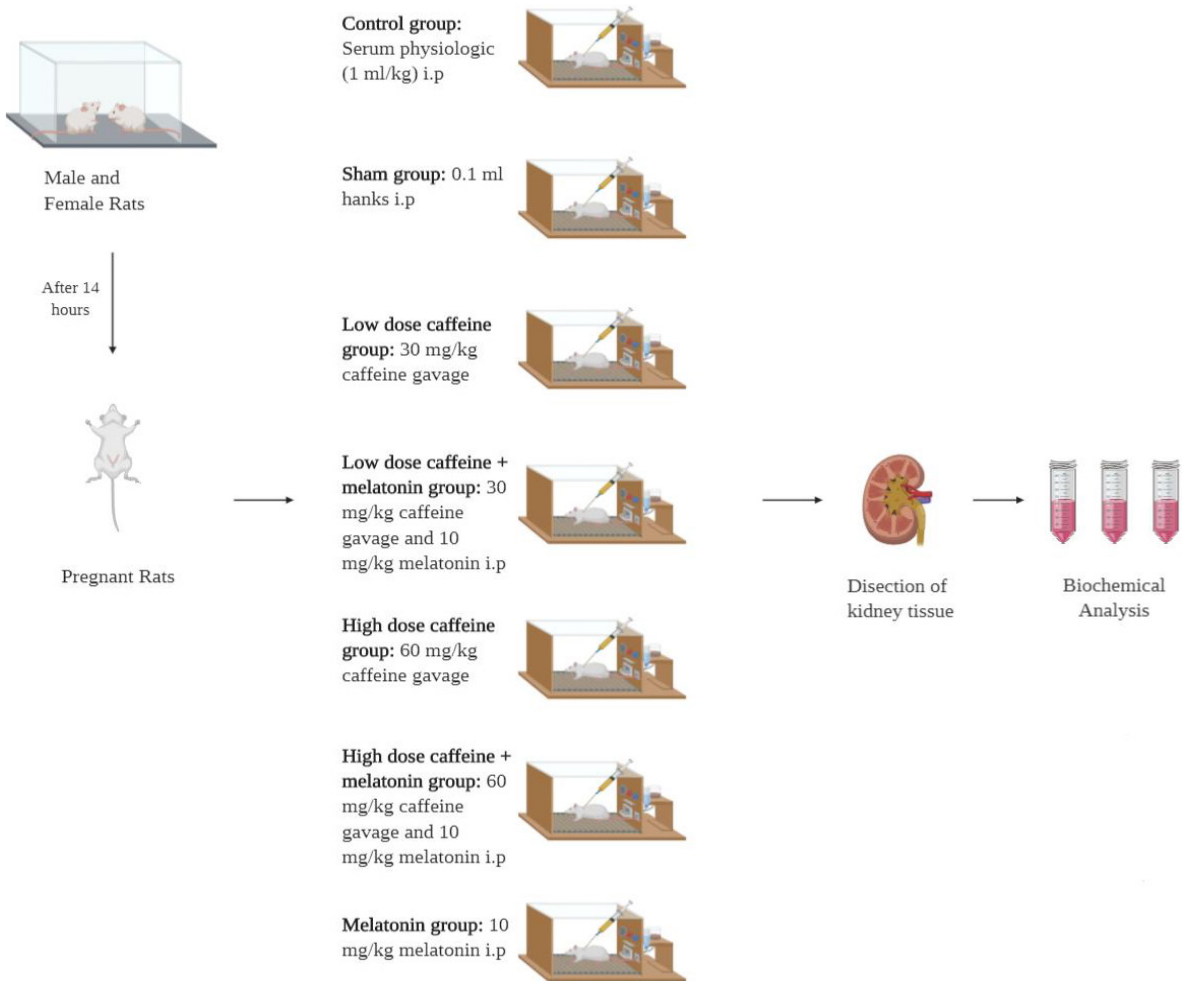


Figure 1. Summary diagram of the whole study. Biochemical analyzes of kidney tissues were performed in seven different groups

Biochemical Analysis

Tissue preparation and protein determination

The kidney tissue used for analysis was placed in microcentrifuge tubes, washed 3 times with 1 mL of 50 mM PBS and aspirated. The whole tissues were homogenized in cold potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4). Tissue protein levels were measured after appropriate dilutions had been made in the supernatants. The protein content of the samples was determined by the method of Lowry et al. (18) using bovine serum albumin as standard.

Oxidative stress parameters

Oxidative stress parameters (TAS, TOS and SOD levels) were determined by the spectrophotometric method. TAS and TOS tissue levels were calculated according to Erel (19). A known amount of antioxidant (1.65 mmol/l) was used to calculate the antioxidant levels in the samples. The TAS level was presented as mmol Trolox equivalent/l (mmol Trolox equivalent/l). The assay was calibrated with a standard hydrogen peroxide solution (39.16 $\mu\text{mol/l}$) to determine the TOS level. The results are presented as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/l ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/l). Other

oxidative stress parameters such as GSH (Cat. No: E-BC-K030-M), GSSG (Cat. No: 703002, Cayman, USA) and SOD (Cat. E-BC-K020, Elabscience, USA) according to the manufacturer's instructions microplate reader (BioTek Instruments, EL × 800 TM, USA). Commercial ELISA kits (EIA 5396 DRG, Germany) were used for vitamin D analysis.

Determination of Ca²⁺

Total Ca²⁺ was assessed using the calcium colorimetric assay kit (ab102505; Abcam) according to the manufacturer's data sheet. 25 standard L of standard solution and 25 sup L of supernatant (diluted 1: 10) extracted from the tissue were mixed with 45 µL of chromogenic reagent and 30 µL of test buffer. The mixture was incubated in the dark for 15 minutes at room temperature. The signal was scanned at 575 nm (Thermo Varioscan). The calcium concentration in the samples was calculated according to the technique described in 2018 by Sen et al.

Statistical analysis

All analyses were performed with SPSS version 23.0 (IBM Co., NY, USA). Data were given as mean (standard deviation). Differences between the groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Post hoc Tukey test for continuous variables and parametric data, respectively. Kruskal-Wallis and Post hoc Dunn tests were used for nonparametric data. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The highest TAS values were obtained in the control and melatonin groups, respectively. Melatonin administration significantly increased the antioxidant status in a dose-dependent manner compared to the caffeine group. Dose-dependent melatonin showed a stronger antioxidant effect as used without caffeine. TOS values showed the highest oxidant effect in HDC group. The control group had the lowest value compared to the others. Oxidative stress index was

calculated by TOS/TAS ratio. OSI was significantly higher in the HDC group and lower in the melatonin-treated groups (Table 1). GSH and GSH/GSSG were the highest in melatonin group and GSSG was the highest in HDC group. Melatonin decreased GSSG and increased GSH and GSH/GSSG (Table 1). SOD was the highest in HDC group. Intracellular calcium and vitamin D values of melatonin group were higher than all other groups. According to these results, melatonin significantly reduced oxidative stress by stimulating the antioxidant system.

DISCUSSION

Oxidative stress may disrupt various physiological processes, including cell damage and triggering apoptosis. Melatonin has antioxidant effects and might affect antioxidant enzyme activity and cellular mRNA levels under physiological or high oxidative stress conditions. The beneficial effects of melatonin on cellular toxicity induced by free radicals and peroxynitrite have emerged in numerous experimental and clinical studies (20, 21).

It is emphasized by several researchers that cytotoxic agents negatively affect the development of organs during embryo-fetal development (22).

In 2019, it was aimed to evaluate the possible antioxidant effect of pharmacological doses of melatonin on band-3 protein anion exchange ability. The findings obtained in the study showed the antioxidant power of melatonin for in vitro oxidative stress model (23). In another study, it was purposed to determine the effects of melatonin on antioxidant capacities and arginine metabolism in lung tissue and also on tissue inflammation and oxidative damage caused by carbon tetrachloride (CCl₄) exposure in rats. According to results, melatonin prevented tissue inflammation and the oxidative stress observing after molecules exposure to CCl₄ (24). It was also reported that melatonin, as an antioxidant, provides strong protection to cell organelles exposed to abundant

Table 1. Biochemical parameters of fetus kidney tissue

Parameters	Control	Melatonin Group	LDC Group	HDC group	LDC+Melatonin Group	HDC+Melatonin Group	Sham Group	p
TAS	0.49±0.02a	0.51±0.02a	0.28±0.02b	0.14±0.00c	0.35±0.03d	0.19±0.02e	0.42±0.03f	0.001
TOS	7.48±1.21a	8.12±0.32ab	10.63±0.65c	13.68±0.64d	8.16±0.97ae	8.07±1.22af	9.12±0.79bef	0.001
OSI	1.49±0.19a	1.59±0.10ab	3.73±0.40c	9.53±0.75d	2.34±0.36e	4.19±0.25c	2.20±0.43be	0.001
GSH	2.15±0.06a	2.20±0.15a	1.16±0.12b	0.50±0.14c	1.53±0.15d	0.96±0.07b	1.78±0.18e	0.001
GSSG	0.47±0.07a	0.50±0.02ab	0.65±0.04c	0.83±0.03d	0.50±0.06ae	0.51±0.05af	0.57±0.04bef	0.001
GSH/GSSG	215.34±6.91a	220.87±15.93a	116.60±12.83b	50.72±14.59c	153.64±15.45d	96.45±7.91e	50.52±2.92c	0.001
TBARS	0.84±0.13a	0.91±0.03ab	1.19±0.07c	1.51±0.07d	0.92±0.11ae	0.92±0.10af	1.02±0.08bef	0.001
SOD	9.89±1.60a	10.68±0.43ab	13.83±0.86c	17.50±0.83d	10.68±1.28ae	10.75±1.04af	11.94±0.99bef	0.001
Ca	3.79±0.18a	3.89±0.18a	2.41±0.14b	1.52±0.04c	2.78±0.23d	1.69±0.19c	3.30±0.24e	0.001
VIT D	2.13±0.09a	2.18±0.10a	1.27±0.08b	0.71±0.02c	1.53±0.14d	0.88±0.10c	1.82±0.15e	0.001

There is no significant difference between the groups with the same letters (a, b, c, d, e, f). $p < 0.05$ was considered significant. There was a significant decrease in TAS measurement in HDC group compared to control group. There was a significant increase in HDC+melatonin group compared to HDC group.

free oxygen radicals (25).

In 2019, pregnant mice were injected with energy drinks containing caffeine. As a result of this study, it was observed that perinatal exposure to energy drinks containing caffeine caused oxidative stress, tissue injury and behavioral changes in mouse newborns. Those effects have been reported to occur especially in kidney, liver and brain tissue. Therefore, it has been stated that the consumption of caffeine and energy drink during pregnancy and lactation has a negative effect in newborns and it should be seen as an essential health problem (10).

In another study conducted in 2019, the effects of melatonin on placental oxidative stress and intrauterine inflammation were aimed. It was observed that cardiovascular damage, mal-

perfusion and inflammation caused by oxidative stress decreased to reasonable levels as a result of melatonin exposure (26). It was stated that targeting of the use of melatonin in pregnancy and lactation would be valuable in the prevention of various adult chronic diseases and especially cardiovascular and neurological diseases in the next period (27). However, in the literature, there is no study examining the protective effect of melatonin in spite of the intrauterine oxidative stress caused by caffeine and its teratogenicity on the kidney.

In the light of these information, in this study, we examined the teratogenic effect of caffeine on fetal kidney development and the protection of melatonin against this teratogenicity through biochemical parameters. According to our study, HDC group had

the lowest GSH activity. GSH increased in HDC+M group after caffeine treatment following melatonin administration.

In addition, TAS, TOS, SOD and Vitamin-D are crucial biomarkers in the assessment of oxidative damage. It was determined that melatonin increased TAS levels and decreased TOS levels in HDC group. The highest SOD value was observed in the HDC group and the lowest value was recorded in the control group.

CONCLUSION

The results showed that melatonin has a key role in reducing the teratogenic effects of caffeine and oxidative stress. Therefore, melatonin is a potential treatment for oxidative stress and caffeine teratogenicity in embryonic development.

REFERENCES

1. Prakash R, Tanuja S, Gokulnatha. Review of oxidative stress in relevance to uremia. *Clin Quer: Nephrol*, 2012; 1 (3): 215-21.
2. Ling, XC, Ko-Lin K. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Ren ReplaceTher*, 2018; 4 (1): 53.
3. Sultana Z, Maiti K, Aitken J, Morris J, Dedman L, Smith R. Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes. *Am J Reprod Immunol*, 2017; 77 (5): e12653.
4. Knight CA, Knight I, Mitchell DC, Zepp JE. Beverage caffeine intake in US consumers and subpopulations of interest: estimates from the Share of Intake Panel survey. *Food Chem Toxicol*, 2004; 42 (12): 1923-30.
5. Xu F, Liu P, Pekar JJ, Lu H. Does acute caffeine ingestion alter brain metabolism in young adults? *Neuroimage*, 2015; 110: 39-47.
6. Ng YP, Or TCT, Ip NY. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 2015; 89: 260-70.
7. Fox GP, Wu A, Yiran L, Force L. Variation in caffeine concentration in single coffee beans. *J Agr Food Chem*, 2013; 61 (45): 10772-8.
8. Nehlig A, Jean-Luc D, Gérard D. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev*, 1992; 17 (2): 139-70.

9. Grosso LM, Michael BB. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann Epidemiol*, 2005; 15 (6): 460-6.
10. Al-Basher GI, Aljabal H, Almeer RS, Allam AA, Mahmoud AM. Perinatal exposure to energy drink induces oxidative damage in the liver, kidney and brain, and behavioral alterations in mice offspring. *Biomed Pharmacother*, 2018; 102: 798-811.
11. Matijasevich A, Barros FC, Santos IS, Yemini A. Maternal caffeine consumption and fetal death: a case-control study in Uruguay. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2006; 20 (2): 100-9.
12. Li J, Zhao H, Song JM, Zhang J, Tang YL, Xin CM. A meta-analysis of risk of pregnancy loss and caffeine and coffee consumption during pregnancy. *Int J Gynecol Obstet*, 2015; 130 (2): 116-22.
13. Weng X, Roxana O, De-Kun L. Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*, 2008; 198 (3): 279-e1-8.
14. Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Deng MH. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc Natl Acad Sci*, 1994; 91 (5): 1824-8.
15. Meca R, Balbo BE, Ormanji MS, Fonseca JM, Iannuzzi LR, Santana CE, et al. Caffeine accelerates cystic kidney disease in a Pkd1-deficient mouse model. *Cell Physiol Biochem*, 2019; 52: 1061-74.
16. Nisari M, Yılmaz S, Göçmen AY, Karataş E, Özge A. The protective effect of caffeine and melatonin on antioxidant enzymes in rat fetal lung tissues. *J Surg Med*, 2019; 3 (11): 805-8.
17. Czerska M, Mikolajewska K, Zielinski M, Gromadzinska J, Wasowicz W. Today's oxidative stress markers, *Medycyna Praktyczna*, 2015; 66(3):393-405.
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-75.
19. Erel OA. Novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, 2004; 37 (4): 277-85.
20. Galano A, Dun XT, Russel JR. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res*, 2011; 51 (1): 1-16.
21. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*, 2003; 34 (1): 75-8.
22. Groenman F, Sharon U, Martin P. The molecular basis for abnormal human lung development. *Neonatology*, 2005; 87 (3): 164-77.
23. Morabito R, Alessia R, Angela M. Melatonin Protects Band 3 Protein in Human Erythrocytes against H2O2-Induced Oxidative Stress. *Molecules*, 2019; 24 (15): 2741.
24. Radovic M, Ristic L, Krtinic D, Rancic M, Nickovic V, Vujnovic ZZ, et al. Melatonin treatment prevents carbon tetrachloride-induced acute lung injury in rats by mitigating tissue antioxidant capacity and inflammatory response. *Bratisl Med J*, 2019 120 (7): 527-31.
25. Reiter RJ, Rosales CS, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cell Mol Life Sci*, 2017; 74 (21): 3863-81.
26. Lee JY, Li S, Shin NE, Na Q, Dong, J, Jia B, et al. Melatonin for prevention of placental malperfusion and fetal compromise associated with intrauterine inflammation-induced oxidative stress in a mouse model. *J Pineal Res*, 2019; e12591.
27. Hsu CN, Huang LT, Tain YL. Perinatal use of melatonin for offspring health: focus on cardiovascular and neurological diseases. *Int J Mol Sci*, 2019; 20 (22): 5681.

Enterobacter cloacae kompleks sp. V1 suşu tarafından üretilen L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisi

Effect of media composition on the activity of L-asparaginase enzyme produced by *Enterobacter cloacae* complex sp. V1 strain

Erdal ÖĞÜN¹

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Van Gölü Havzasından toplanan toprak örneklerinden izole edilen bakteriyel izolatların, L-asparaginaz enzimini üretme kabiliyetleri ve L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, L-asparaginaz enzimi yönünden pozitif izolatların, fenotipik ve 16S rDNA diziliş analizine dayalı olarak bakteriyel taksonomideki yerlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yöntem: Toprak örneklerinden bakteriyel izolasyonunda ve kültüre alınmasında Luria-Bertani (LB) Agar besiyeri kullanılmıştır. L-asparaginaz üreten izolatların taranmasında %0.5 oranında L-asparagin ve %0,001 oranında fenol kırmızısı bulunan M9 minimal tuz ortamı kullanılmıştır. Pozitif izolatlar tarafından üretilen, enzimin aktivitesi 436 nm'de spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. L-asparaginaz üreten izolatın teşhisi, standart mikrobiyolojik yöntemler ve 16S rDNA diziliş analizine göre yapılmıştır.

Bulgular: Toplam 10 izolat arasında sadece birinin

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to investigate the effect of medium composition on the ability of producing L-asparaginase enzyme and the activity of L-asparaginase enzyme isolated from soil samples collected from Van Lake Basin. In addition, it was aimed to determine the location of L-asparaginase positive isolates in bacterial taxonomy based on phenotypic and 16S rDNA sequencing analysis.

Methods: Luria-Bertani (LB) Agar medium was used to isolate and cultivate bacteria from soil samples. L-asparaginase-producing isolates were screened for M9 minimal salt medium with 0.5% L-asparagine and 0.001% phenol red. The activity of the enzyme produced by positive isolates was determined by spectrophotometric method at 436 nm. The identification of the L-asparaginase producing isolate was performed according to standard microbiological methods and 16S rDNA sequencing analysis.

Results: Of the 10 isolates, only one was clearly positive for L-asparaginase in the M9 minimal salt

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van



İletişim / Corresponding Author : Erdal ÖĞÜN

Yüzüncü Yıl Üni. Fen Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 65080 Tuşba Van - Türkiye

Tel : +90 505 723 83 46

E-posta / E-mail : eogun@yyu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 03.07.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 11.02.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.03206

Öğün E. *Enterobacter cloacae* kompleks sp. V1 suşu tarafından üretilen L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 59-68

L-asparagin ve fenol kırmızısı içeren M9 minimal tuz ortamında aşikar bir şekilde L-asparaginaz yönünden pozitif olduğu gözlenmiştir. Bu izolatın ürettiği L-asparaginaz enziminin 48 saatlik inkübasyon aralığında 16,02 IU/mL, 35 °C sıcaklıkta 16,02 IU/mL, pH 8,0 değerinde 15,25 IU/mL, karbon kaynağı olarak mannitol varlığında 15,69 IU/mL, organik azot kaynağı olarak yeast ekstrat varlığında 14,55 IU/mL ve arginin amino asitinin varlığında 17,63 IU/mL aktivite oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. İlave olarak L-asparaginaz pozitif izolatın, 16S rDNA diziliş analizine göre *Enterobacter cloacae* kompleks suşuna mensup olduğu tespit edilerek bakteriyel taksonomideki durumu belirlenmiştir.

Sonuç: Bu araştırma; ülkemizde doğadan izole edilen ve L-asparaginaz üreten bakterilerin taranması ile ilgili ilk araştırmalar arasındadır. ALL tedavisinde kullanılan, L-asparaginaz enziminin *E. cloacae* kompleks sp. V1 suşunun, antineoplastik L-asparaginaz enzimi yönünden pozitif bulunması, milli gen kaynaklarımız açısından son derece önemlidir. Bu suşun, L-asparaginaz enziminin endüstriyel üretiminde potansiyel olarak kullanılabilecek bir aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Enterobacter cloacae* kompleks, L-asparaginaz, Van Gölü Havzası

medium containing L-asparagine and phenol red. The L-asparaginase enzyme produced by this isolate was incubated at a temperature of 35 °C 16.02 IU/mL at a pH of 8.0 15.25 IU/mL for a 48 hour incubation period 16.02 IU / mL, in the presence of mannitol as a carbon source 15.69 IU/mL, in the presence of yeast extract 14.55 IU/mL and arginine amino acid 17.63 IU/mL as a source of organic nitrogen. Morphological, physiological and biochemical properties of this isolate were determined. In addition, L-asparaginase positive isolate was found to belong to *E. cloacae* complex strain according to 16S rDNA sequencing analysis and its status in bacterial taxonomy was determined.

Conclusion: This research; In our country, it is one of the first studies about screening of L-asparaginase producing bacteria isolated from nature. In the treatment of ALL, L-asparaginase *E. cloacae* complex sp. V1 strain, positive for the antineoplastic L-asparaginase enzyme is extremely important for our national gene sources. This strain has been found to have an activity that could potentially be used in the industrial production of the enzyme L-asparaginase.

Key Words: *Enterobacter cloacae* complex, L-asparaginase, Lake Van Basin

GİRİŞ

L-asparaginaz (EC3.5.1.1) enzimi, ekstraselüler ortamda L-asparagin amino asitini L-aspartat ve amonyağa hidrolize eden bir enzim olup, akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve diğer alakalı kan kanserlerinin uzun süreli tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir. L-asparaginaz enziminin lenfoblastik hücrelerde protein sentezini inhibe ederek akabinde apoptozis ile bu hücrelerin ortadan kaldırılmasına neden olduğu gösterilmiştir (1).

L-asparaginaz enzimi tıbbi tedaviye ilave olarak gıda endüstrisi uygulamalarında da kullanılmaktadır

(2). Kızartılmış veya ısı uygulanmış gıdalarda oluşan akrilamidin organizmalarda nörotoksik, genotoksik, kanserojen etkiye sebep olmakla beraber gelişme ve üreme sistemi üzerine olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir (3). Gıda endüstrisinde L-asparaginaz enziminin, L-asparaginin indirgen şekerlerle etkileşimine ket vurduğu ve böylece akrilamid oluşumunu engellediği belirlenmiştir (4).

Tıbbi tedavide L-asparaginazın, *Escherichia coli*'den izole edilmiş, doğal *E. coli* asparaginazı, polietilen glikol'a bağlanmış *E. coli* asparaginazı

ve *Erwinia chrysanthemi*'den izole edilen *Erwinia asparaginazı* olmak üzere, ticari olarak üretilen, üç farklı formu kullanıldığı bildirilmiştir (5).

Ekstraselüler ortamda, L-asparaginaz enzimi, L-asparagini L-aspartata ve amonyağa dönüştüren, hidroliz reaksiyonunu katalize eder. L-asparagin, hücre fonksiyonları ve DNA sentezi için esansiyel bir amino asittir. Sağlıklı hücrelerde, protein sentezi için gerekli olan asparagin, aspartattan, asparagin sentetaz enziminin katalizörlüğünde sentezlenir. Tümör hücreleri dışardan alınan veya sağlıklı hücreler tarafından sentezlenerek, kana verilen L-asparagine bağımlıdır. Bu hücreler, L-asparagin sentetaz enzimine sahip olmadığı için, dolaşımda serbest olarak bulunan bu amino asitin, enjekte edilen, L-asparaginaz ile yıkılması sonucu neoplastik hücrelerde, protein sentezi bloke edilmiş olur. Bu uygulama sonunda, hücrelerin belli bir süre sonra, normal apoptosis ile ortadan kalktıkları belirtilmiştir (6,7).

L-asparaginaz; bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan bir amidohidrolazdır. Mikroorganizmalar, L-asparaginaz enzimi üretimi için potansiyel kaynak olarak, kabul edilmektedir (2). *Gamma Proteobacteria* içerisindeki *Enterobacteriaceae* familyası içerisindeki *Enterobacter* cinsi içerisindeki türlerin, L-asparaginaz enzimi ürettiği bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. *E. aerogenes* (8-12) ve *E. cloacae* (13) suşlarının L-asparaginaz enzimi ürettiği rapor edilmiştir.

Enterobacter cinsinin türleri, toprakta ve atık sularda saprofit olarak buldukları gibi, aynı zamanda insan gastrointestinal sistemin kommensal enterik biyotasının bir parçasıdır. *E. cloacae* kompleks türlerine, doğada yaygın olarak rastlanır, ancak bu suşlar, patojenler olarak da işlev görebilirler. Biyokimyasal ve moleküler çalışmalar *E. cloacae* complex grubu içerisinde, altı türden oluşan genomik heterojenite sergilendiğini ortaya koymuştur. Bu suşlar arasında yer alan; *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* ve *E.*

nimipressuralis suşları bulunmaktadır. *E. cloacae* suşu klinik örneklerde en sık rastlanan suşlar arasındadır (14).

Bu araştırmada, Van Gölü Havzasından toplanan toprak örneklerinden, izole edilen bakteri izolatlarının L-asparaginaz enzimini üretme kabiliyetleri ve L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, L-asparaginaz enzimi yönünden pozitif izolatların, fenotipik ve 16S rDNA diziliş analizine dayalı olarak, bakteriyel taksonomideki yerlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmada kullanılan kimyasallar

Araştırmada kullanılan ortamlar, ortam bileşenleri, şekerler, amino asitler ve moleküler çalışmalarda kullanılan kimyasallar yerel tedarikçiler aracılığı ile Sigma Firmasından sağlanmıştır.

Toprak örnekleri

Toprak örnekleri, Kuzey Doğu Anadolu Bölgesinden, Van Gölü havzasından 38°26'27K ve 042°19'04D koordinatlarına tekabül eden alandan sağlanmıştır. Bu örnekler, steril polietilen torbalar kullanılarak toplanmış ve soğuk zincir içerisinde mikrobiyoloji laboratuvara ulaştırılmıştır.

Toprak örneklerinden bakteri izolasyonu

Ringer çözeltisi içerisinde toprak örneklerinden, 1/10'luk toprak çözeltisi hazırlanmıştır. Bu ana solüsyondan, dilüsyon yöntemi ile seyreltmeler hazırlanmıştır. Bakterilerin izole edilmesi amacıyla, 1×10^{-4} lük seyreltmeden 100 µL, LB Agar besiyeri plakaların yüzeyine, yayma çubuğu yardımı ile yayılmıştır. Petri plakaları, 48 saat boyunca 30 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından elde edilen karışık kültürlerden saf kültürler elde edilmiştir. Saf kültürlerden stok kültürler hazırlanmış ve sonraki adımlarda %5 gliserol içeren kryo tüplerde -20 °C'de muhafaza edilmiştir (15).

Plaka deneyi ile L-asparaginaz pozitif izolatların taranması

L-asparaginaz enzimi açısından, izolatların primer taramasında, M9 minimal tuz ortamının 1 lt'lik bileşimi için 5 g L-asparagin, 64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g KH_2PO_4 ; 2.5g NaCl; 5 g NH_4Cl , 2 ml 1 M MgSO_4 , 20 ml %20'lik glikoz çözeltisi ve 0,1 ml 1 M CaCl_2 , % 0,001 fenol kırmızısı] kullanılmıştır (16). Ortamın pH'sı 6.5'e ayarlanmış ve ortamın katılaşması için %1.5 oranında bakteriyolojik agar ilave edilmiştir. Bakteriyel izolatlar, petri plakalarına steril eküvyon çubuğu yardımı ile yoğun bir şekilde ekilmiştir. Petri plakaları, 35 °C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petri plaklarında, biyomas etrafındaki rengin sarıdan kırmızıya dönmesi, L-asparaginaz enzimi üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (17).

L-asparaginaz enziminin üretimi

L-asparaginaz enziminin üretimi, batık kültür yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Üretim için 100 mL steril M9 minimal tuz ortamı içeren 250 mL'lik erlenler kullanılmıştır. Erlenlere, L-asparaginaz pozitif izolatın 24 saatlik kültüründen, 100 µL ile aşılmıştır. Enzim aktivitesini belirlerken, sıcaklık ve pH değerleri ile zaman aralıkları arasındaki ilişkiyi ortaya koyan, çapraz denemeler parametre sayısını çok fazla artıracığından yapılamamıştır. Bu enzim, tedavi edici enzimler içerisinde sınıflandırıldığı için memelilerin fizyolojik pH'sına yakın olarak bütün ortamların pH'sı 7,0'ye ayarlanmıştır. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon zamanının etkisini belirlemek için, Erlenler sırasıyla 24, 48, 72, 96 ve 120 saat için pH 7,0'de 35°C'de çalkalayıcıda 150 rpm'de inkübe edilmiştir. pH'nın etkisini belirlemek için, erlenler sırasıyla pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0 için 48 saat 35°C'de çalkalayıcıda 150 rpm'de inkübe edilmiştir. Sıcaklığın etkisini belirlemek için, erlenler sırasıyla 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C ve 50°C'de pH 7,0'de 48 saat çalkalayıcıda 150 rpm'de inkübe edilmiştir. Tek bir karbon kaynağının enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için, arabinoz, fruktoz, laktoz, maltoz,

mannitol ve trehaloz şekerleri son konsantrasyonları %1 olacak şekilde kullanılmıştır. Benzer şekilde, tek bir azot kaynağının, enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için arginin, asparagin, sistein, glutamin, metiyonin, ornitin ve triptofan amino asitleri ile kazein, et ekstratı, tripton, üre, ve maya ekstratının son konsantrasyonları %1 olacak şekilde ortama ilave edilmiştir. Hem azot kaynakları hem de karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için bütün ortamlar; pH 7,0'de, 48 saat 35°C'de çalkalayıcıda 150 rpm'de inkübe edilmiştir (18).

L-asparaginaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde neslerizasyon yöntemi kullanılmıştır (19). Bu amaçla, bakteriyel kültürler, +4 °C'de ve 8000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant, enzim aktivitesini belirlemek için, ekstraselüler ham L-asparaginaz enzimi kaynağı olarak kullanılmıştır. Test ve kör tüpleri için, 2 mL'lik hacimden oluşan reaksiyon karışımı; 1 mL 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,6), 189 mM 0,1 mL-asparagin, 0.9 mL distile sudan oluşturulmuştur. Test için, reaksiyon karışımının üzerine 0,1mL süpernatant ilave edilmiş ve 37°C'de 30 dk su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için 0,1 mL 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. Kör tüplerine TCA ilavesinden sonra, enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Oluşan amonyağın absorpsiyon değeri, spektrofotometrede (Schimadzu Bausch & Lomb) 436 nm'de belirlenmiştir. Standart eğriyi oluşturmak için 6 mM'lık amonyum sülfat çözeltisi kullanılmıştır. L-asparaginaz aktivitesinin, bir uluslararası birimi (IU); 37 °C'de, pH 8,6'da, dakikada 1,0 µmol amonyağı açığa çıkarmak için, gereken enzim miktarı olarak hesaplanmıştır.

L-asparaginaz pozitif izolatın fenotipik özelliklerinin belirlenmesi

L-asparaginaz enzimi üreten izolatın; morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri,

standart mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'e göre belirlenmiştir (20).

Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonunda, fenol: kloroform yöntemi kullanılmıştır (21). 16S rDNA bölgesi uygun üniversal primerler kullanılarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Bu amaçla; bakterial domaini için spesifik 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' ve 1492R 5'TACGGYTACCTTGTACGACTT3' evrensel primerleri kullanılmıştır. PCR işlemi tamamlandıktan sonra, PCR karışımının bir kısmı, agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntülenmiştir (22).

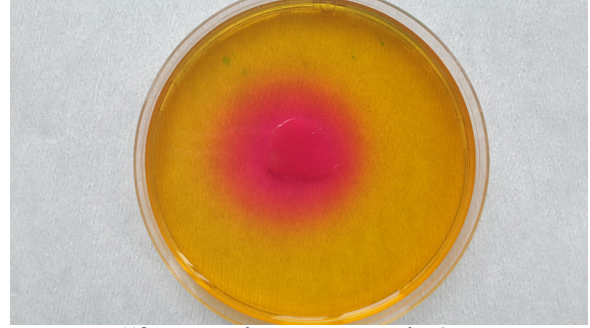
Polimeraz zincir reaksiyonu ve filogenetik ağacın oluşturulması

PCR ürünleri 27F ve 1492R primerleri kullanılarak nükleotid dizileri okunmuştur. Okunan dizi parçalarına (fragmentelerine) ait AB1 formatındaki dosyalar Codone Code Aligner V.6.02 programında açılarak kromatogramları kontrol edilmiş, hatalı okunan baş ve son kısımlar manuel olarak uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan nükleotid bölgelerinden, tek bir dizi (konsensüs dizisi) oluşturulmuştur. Nükleotid dizisi NCBI web sitesinden BLAST yapılmıştır. Yakın ilişkili organizmaların gen dizileri ile Mega 7.0 programında Clustal W algoritması kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanmış dizilerin nükleotid değişim modelleri JModel Test yöntemi ile test edilmiştir. Model testi sonucunda AIC kriterine göre TIM1+I+G modeli seçilmiştir (23). Bu modele göre Bayesian filogenetik analizi 3.000.000 jenerasyon ve her 100 jenerasyonda bir örnekleme şeklinde yapılmıştır (24).

BULGULAR

Van Gölü Havzasından toplanan toprak örneklerinden izole edilen bakteri izolatlarının, L-asparaginaz enzimini üretme kabiliyetleri ve

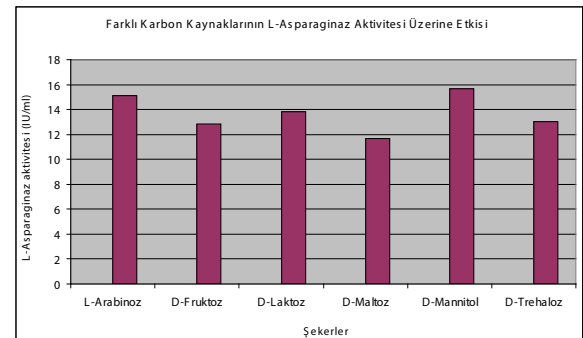
L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, toplam 10 izolat arasından, sadece birinin, L-asparaginaz enzimi yönünden pozitif olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. M9 minimal tuz ortamında L-asparaginaz üreten izolat

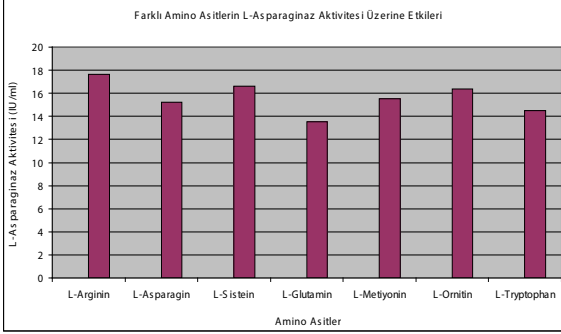
E. cloacae kompleks sp. V1 suşu tarafından üretilen L-asparaginaz enziminin, 48 saatlik sabit inkübasyon aralığında sırasıyla; 35 °C'de (16,02 IU/mL), pH 8,0 değerinde (15,25 IU/mL), mannitol (15,69 IU/mL) yeast ekstre (14,55 IU/mL) ve arginin amino asitinin varlığında (17,63 IU/mL) aktivite oluşturduğu tespit edilmiştir.

Arabinoz, fruktoz, laktoz, maltoz, mannitol ve trehaloz şekerlerinden, L-asparaginaz aktivitesi üzerine en yüksek etkiyi, mannitol (15,69 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi de maltoz (11,69 IU/mL) göstermiştir (Şekil 2).



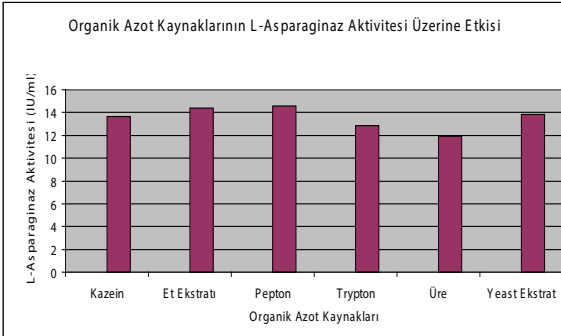
Şekil 2. Farklı karbon kaynaklarının L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

Arginin, asparagin, sistein, glutamin, metiyonin, ornitin ve triptofan amino asitlerinden, L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu yönde, en yüksek etkiyi arginin amino asidi (17,63 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi glutamin amino asidi (13,56 IU/mL) göstermiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı amino asitlerin L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

Kazein, et ekstraktı, pepton, tripton, üre ve maya ekstraktı gibi azot kaynaklarından, L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu yönde, en yüksek etkiyi pepton (14,55 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi de üre (11,91 IU/mL) göstermiştir (Şekil 4).

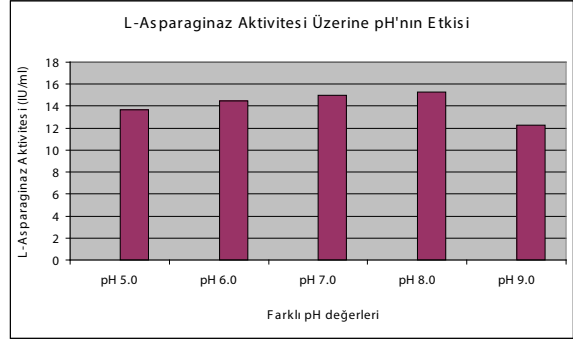


Şekil 4. Farklı organik azot kaynaklarının L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

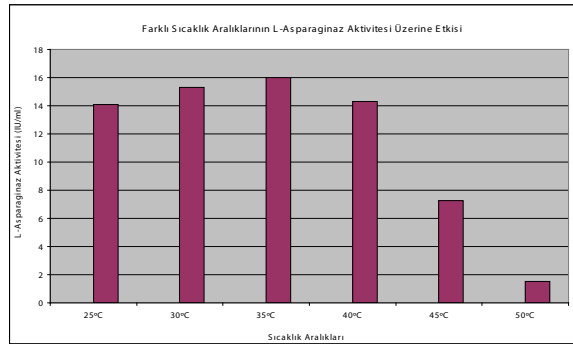
Beş farklı pH değerinden L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu yönde, en yüksek etkiyi pH 8.0 aralığı (15,25 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi de pH 9.0 aralığı (12,24 IU/mL) göstermiştir (Şekil 5).

Altı farklı sıcaklık değerinden, L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu yönde, en yüksek etkiyi 35 °C (16,02 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi de 50 °C

(1,54 IU/mL) göstermiştir (Şekil 6).

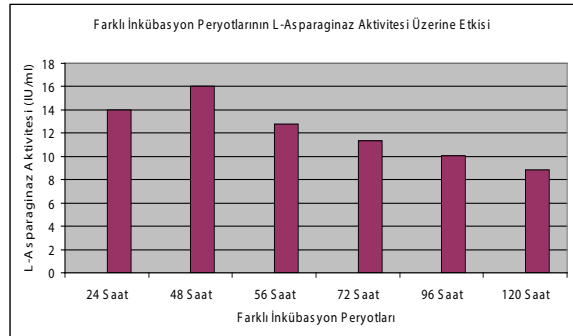


Şekil 5. Farklı pH aralıklarının L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi



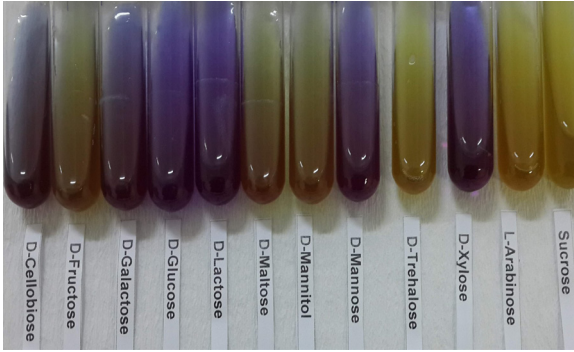
Şekil 6. Farklı sıcaklık değerlerinin L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

Altı farklı inkübasyon periyotundan, L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu yönde, en yüksek etkiyi 48 saatlik zaman aralığı (16,02 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi de 120 saatlik zaman aralığı (8,87 IU/mL) göstermiştir (Şekil 7).

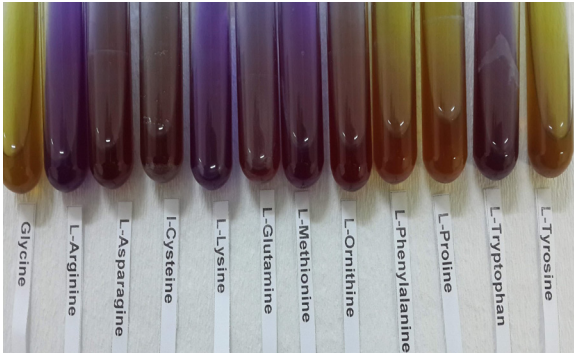


Şekil 7. Farklı zaman aralıklarının L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

L-asparaginaz enzimi üreten izolata; Gram negatif, fakültatif anaerobik, hareketli, Voges-Proskauer, nitrat ve H₂S testleri açısından negatif ve asetat, sitrat ve üreaz testleri açısından pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu izolata fruktoz, maltoz, manitol, trehaloz, arabinoz ve sükröz şekerlerini okside ettiği ancak sellobiyoz, galaktoz, glukoz, laktöz, mannoz ve ksiloz şekerlerini tek karbon kaynağı olarak kullanmadığı belirlenmiştir. İlave olarak; arginin, asparagin, sistein, lizin, glutamin, metiyonin, ornitin ve triptofan amino asitlerini dekarboksilasyona uğrattığı fakat glisin, fenilalanin, prolin ve tirozin amino asitlerini tek azot kaynağı olarak kullanmadığı belirlenmiştir (Şekil 8, 9).



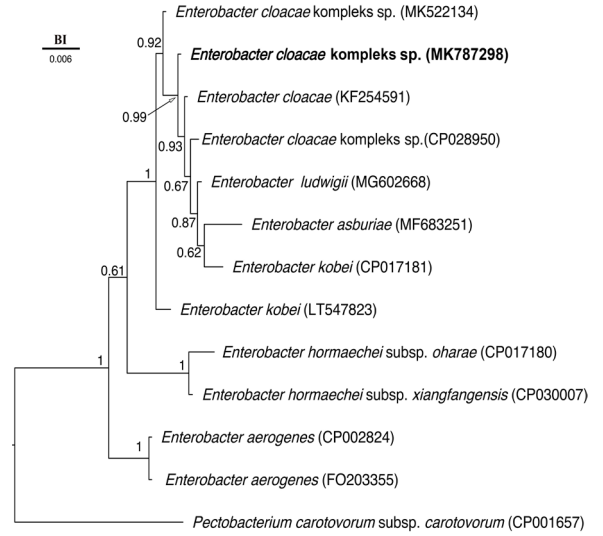
Şekil 8. Karbonhidrat oksidasyon testleri



Şekil 9. Amino asit dekarboksilasyon testleri

L-asparaginaz pozitif izolata ait, 16S rDNA gen bölgesi (1.411 nt) MK787298 erişim numarası ile GenBank'a kaydedilmiştir. BLAST analizi sonucunda *E. cloacae* Kompleks V1 şuşunun *E. cloacae* kompleks sp. (MK522134) şuşu ile %99.57 oranında benzerlik

oluşturduğu belirlenmiştir. Bayesian yaklaşımı ile oluşturulan filogenetik ağaç modellemesinde bu şuşun *E. cloacae* kompleks içerisinde yer alan türler ile birlikte kümelendikleri görülmüştür ve Bayesian filogenetik ağacında görüldüğü gibi *Enterobacter* genusu içerisinde küme oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. *Enterobacter cloacae* kompleks sp. V1 şuşu ve *Enterobacter* cinsinin üyeleri arasındaki ilişkiyi gösteren 16S rDNA gen sekanslarına dayanan Bayesian filogenetik ağacı

TARTIŞMA

Toprak örneklerinden izole edilen bakteri türlerinin L-asparaginaz enzimi üretme kabiliyetleri ve bu enzimin aktivite değerleri çeşitli araştırmalarda ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalarda *Pseudomonas proteolytica* S13D şuşunun maksimum aktivite değerinin 1.6 IU/ml olduğu ortaya konulmuştur (25). *Myroides gitamensis* türünün 24 saatlik inkübasyon aralığında ve 37 °C'de 85.7 IU/gds aktivite gösterdiği belirtilmiştir (26). *Bacillus aryabhatai* ITBHU02 şuşunun maksimum aktivite değerinin 6.35 mg-1 olduğu gösterilmiştir (27). *Streptococcus* spp. D1, *Bacillus polymyxa* ve *Streptococcus* spp. D2 türlerinin

sırasıyla, 11,6 U/mL, 8,8 U/mL ve 7,9 U/mL aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca bu türlerin enzim aktivitesi açısından optimum pH tercihlerinin pH 8.0 olduğu belirtilmiştir (28). *E. aerogenes* suşları ile yapılan çalışmalarda, araştırmacılar L-asparaginaz aktivitesini sırasıyla; 55 IU/mg (9), 20,17 IU/mL (11), 18,35 IU/mL (12) 0,11-0,50 IU/mL (19) ve 20,15 IU/mL (29) olarak belirlediklerini bildirmişlerdir.

Bu araştırmaya benzer bir araştırmada, *E. cloacae* BGCC 2389 suşunu kullanarak, ortam bileşiminin, L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir (13). Bu suşun pH 7,0'da ($3,7 \pm 0,12$ IU mL⁻¹), 40 °C'de sıcaklıkta ($4,31 \pm 0,15$ IU/mL⁻¹), 21 saatlik inkübasyon periyodunda ($1,3 \pm 0,04$ IU/mL⁻¹) ve 15 saatlik kültürden %2 oranında aşılama yapıldığında ($1,43 \pm 0,06$ IU/mL⁻¹) maksimum aktivite gösterdiğini ifade edilmiştir. Ayrıca aynı araştırmada, L-asparaginaz enzimi üretimi üzerine karbon kaynağı olarak Piruvatın ($7,01 \pm 0,15$ IU/mL⁻¹), azot kaynağı olarak yeast ekstratın ($9,80 \pm 0,32$ IU IU/mL⁻¹), mineral iyon olarak magnezyum ($11,76 \pm 0,39$ IU mL⁻¹) ve indükleyici olarak asparagin amino asitinin ($13,06 \pm 0,37$ IU/mL⁻¹), L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu etki gösterilmiştir.

Bu araştırmada *E. cloacae* kompleks V1 suşunun tarafından üretilen, L-asparaginaz enziminin, 48 saatlik inkübasyon aralığında ($16,02$ IU/mL), 35°C sıcaklıkta ($16,02$ IU/mL), pH 8,0 değerinde ($15,25$ IU/mL), karbon kaynağı olarak mannitol varlığında ($15,69$ IU/mL), organik azot kaynağı olarak yeast ekstrat varlığında ($14,55$ IU/mL) ve arginin amino asitinin varlığında ($17,63$ IU/mL) aktivite oluşturduğu tespit edilmiştir. Organik azot kaynağı olarak yeast ekstrat varlığında, maksimum aktivitenin görülmesi, *E. cloacae* BGCC 2389 suşu ile yapılan çalışma ile, bu araştırma arasında ortak noktayı oluşturmuştur.

L-asparaginaz pozitif V1 suşunun, Gram negatif çomak morfolojiye sahip olması, oksidaz testi açısından negatif olması ve hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda çoğalabilme özelliklerinden dolayı *Enterobacteriaceae* familyasına mensup

olduğuna tespit edilmiştir (20). Bu suşun pH 5,0 ile pH 9,0 arasında geniş bir pH aralığına tolerans gösterdiği belirlenmiştir. İlave olarak V1 suşunun 45 °C'de büyüme göstermesi termotolerant koliform grup içerisinde olduğunu da göstermiştir (30). Bu suşun, indol ve hidrojen sülfid üretimi yönünden negatif ve Sitrat testi açısından pozitif olması *Enterobacter* genusuna ait bir tür olduğu belirlenmiştir (31). Bu suşun; Voges-Proskauer testi, hareket testi açısından pozitif ve sukrozu karbon kaynağı olarak kullanması gibi fenotipik özelliklerinden dolayı *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei* ve *E. ludwigii* türlerinden birine ait olabileceği tespit edilmiştir (14).

Enterobacter cinsi içerisinde yer alan bu suşun, kesin tanısının yapılabilmesi için, 16S rDNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA gen dizilerine dayalı olarak, filogenetik analizlerde V1 suşu filogenetik ağaçta *E. cloacae* kompleks içerisinde konumlanmıştır. Bununla birlikte bu kompleks içerisinde değerlendirilen (32). *E. hormaechei* kompleks subsp. *oharae* (CP017180) ve *E. hormaechei* kompleks subsp. *xiangfangensis* (CP030007) suşlarının ağaç üzerinde *E. cloacae* kompleks içerisinde yer alan diğer üyelere daha uzak konumlanmıştır (Şekil 10). Bu durum *E. cloacae* kompleks içerisinde gruplandırılan suşların taksonomik pozisyonlarının yeniden değerlendirilmesi gereğini ortaya çıkarmıştır.

SONUÇ

Van Gölü Havzasından toplanan toprak örneklerinden, izole edilen bakteri izolatlarının, L-asparaginaz enzimini üretme kabiliyetlerinin araştırılmasıyla ilgili, gerçekleştirilen bu araştırma, ülkemizde konu ile ilgili ilk araştırmalar arasındadır. Bu araştırmada, *E. cloacae* kompleks sp. V1 suşunun, antineoplastik L-asparaginaz enziminin yönünden pozitif bulunması, mikrobiyal biyoteknoloji açısından son derece önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Shrivastava A, Khan AA, Khurshid M, Kalam, MA, Jain SK, Singhal PK. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016; 100(4): 1-10.
2. Sanawer S, Ali S, Mohsin T, Nasir A. Production, purification and advance applications of L-asparaginase. *IJSRST*, 2017; 3 (4): 351.
3. Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 1988; 195(1): 45-77.
4. Mahajan RV, Mihooliya KN, Saran S, Saxena RK. L-asparaginase from *Bacillus* sp. RKS-20: process optimization and application in the inhibition of acrylamide formation in fried foods. *Proteins and Proteomics*, 2014; 5(2): 15-132.
5. Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 2011; 117(2), 238-49.
6. Aydın S, Geçkil H, Çaylak E, Kılıç N. Mikroorganizmaların kanser tedavisinde kullanımı. *Firat Tıp Derg*, 2004; 9(2): 30-4.
7. Yadav S, Verma SK, Singh J, Kumar A. Industrial production and clinical application of L-asparaginase: a chemotherapeutic agent. *IJMRPS*, 2014; 8(1): 54-60.
8. Resnick AD, Magasanik B. L-asparaginase of *Klebsiella aerogenes*. Activation of its synthesis by glutamine synthetase. *J Biol Chem*, 1976; 251(9): 2722-8.
9. Mukherjee J, Joeris K, Riechel P, Scheper T. A simple method for the isolation and purification of L-asparaginase from *Enterobacter aerogenes*. *Folia Microbiol*, 1999; 44(1): 15-8.
10. Geckil H, Gencer S. Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004; 63(6): 691-7.
11. Baskar G, Muthukumaran C, Viruthagiri T, Reganathan S. Optimization of operating conditions for the production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes* MTCC 2823 using central composite design. *IJBST*, 2009; 2(2): 32-6.
12. Erva RR, Goswami AN, Suman P, Vedanabhatla R, Rajulapati SB. Optimization of L-asparaginase production from novel *Enterobacter* sp., by submerged fermentation using response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol*, 2017; 47(3): 219-28.
13. Sharma A, Husain I. Optimization of medium components for extracellular glutaminase free asparaginase from *Enterobacter cloacae*. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2015; 4(1): 296-309.
14. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol*, 2012; 7(7): 887-902.
15. Goldman E, Green, LH. Practical handbook of microbiology. In *Practical Handbook of Microbiology*, Third Ed. CRC Pres, 2015.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
17. Gulati R, Saxena RK, Gupta R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing microorganisms. *J Appl Microbiol*, 1997; 24(1), 23-6.
18. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 2014; 1(1-6): 41-55.
19. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. *Microbiology*, 1973; 76(1), 85-99.
20. Brenner DJ, Farmer III JJ. Family I. Enterobacteriaceae. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, Bone DR, Vos P, et al, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, New York, NY: Springer, 2005: 587-607.

21. Green MR, Sambrook J. Isolating DNA from Gram-negative bacteria. 2017 Cold Spring Harb Protoc; 2017; (3) : 2017(1).
22. Nikiforov YE, Howles PN. Polymerase chain reaction. In Ricardo VL, eds. Morphology Methods: Cell and Molecular Biology Techniques. New York: Humana Press, 2001:181-207.
23. Posada, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular biology and evolution, 2008; 25(7): 1253-56.
24. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Hohna S. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst Biol, 2012; 61(3): 539-42.
25. Shukla D, Shrivastav, VK, Jana AM, Shrivastav A. Exploration of the potential L-asparaginase producing bacteria from the soil of Gwalior (India). Int J Curr Microbiol Appl Sci, 2014; 3(5): 665-72.
26. Prasad Talluri VSSL, Bhavana M, Siva Kumar K, Anil Kumar P, Rajagopal, SV. Myroides gitamensis sp. nov., L-asparaginase producing bacteria isolated from slaughter house soil sample in Visakhapatnam India. J Microb Biochem Technol, 2014; 6(3): 144-7.
27. Singh Y, Gundampati RK, Jagannadham MV, Srivastava SK. Extracellular L-asparaginase from a protease-deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: purification, biochemical characterization, and evaluation of antineoplastic activity in vitro. Appl Biochem Biotechnol, 2013; 171(7): 1759-74.
28. Wakil SS, Adelegan AA. Screening, production and optimization of L-asparaginase from soil bacteria isolated in Ibadan, South-western Nigeria. Aust. J. Basic Appl Sci, 2015; 11: 39-51.
29. Reddy ER, Babu RS, Chandrasai PD, Madhuri P. Neural network modeling and genetic algorithm optimization strategy for the production of L-asparaginase from Novel *Enterobacter* sp. Int J Pharm Sci Res, 2017; 9(2): 124-130.
30. Shaheduzzaman M, Rahman MS, Nur IT. (2016). Influence of temperature on the growth of fecal coliform. SJ Microbiol, 2016; 6(1): 20-3.
31. Grimont PA, Grimont F. Enterobacter, In: Brenner LDJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edn, vol. 2, Springer, USA, 2005: 661-670.
32. Paauw A, Caspers MP, Schuren FH, Leverstein-van Hall MA, Delétoile A, Montijn RC. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. PLoS one, 2008; 3(8): e3018.

Assessment of knowledge about nosocomial infection among Cukurova University Vocational School of Health Services Students

Çukurova Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu öğrencilerinde nozokomiyal enfeksiyon bilgi düzeylerinin değerlendirilmesi

Pınar ETİZ¹, Sedegül YÜZBAŞIOĞLU-ARIYÜREK¹

ABSTRACT

Objective: Nosocomial infection is an infection if it becomes positive 48 hours or more after admission to the hospital or within 30 days of discharge. Nosocomial infection in healthcare facilities is a major public health problem in most developing countries. Basic infection control measures in any healthcare students setup can reduce the rates of healthcare-associated infections. Thus, it is important to identify the level of their knowledge, by correcting their deficiencies. The current study aimed to evaluate the level of knowledge regarding nosocomial infection among healthcare students.

Methods: A descriptive study was conducted among 565 healthcare students. A structured self-administered questionnaire was used to collect data. The questionnaire included two parts: demographic characteristic, level of knowledge among the healthcare students. Data was analyzed using IBM SPSS Statistics version 22 and the associations were tested with Kruskal Wallis and Mann Whitney U test with a p-value of <0.05.

Results: Five hundred and sixty-five students were included in the study. Students mean age was 20,99±2,64

ÖZET

Amaç: Nozokomiyal enfeksiyonlar, genellikle hasta hastaneye yattıktan 48 saat sonra daha veya sonrasında gelişen, ayrıca taburcu olduktan sonra 30 gün içinde ortaya çıkabilen enfeksiyonlardır. Gelişmekte olan ülkelerin çoğunda, sağlık kurumlarında nozokomiyal enfeksiyon önemli bir halk sağlığı sorunudur. Sağlık hizmetlerinde öğrenim gören öğrencilerin enfeksiyon kontrol önlemlerini bilmeleri sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyon oranlarını önemli ölçüde düşürebilir. Bu nedenle, öğrencilerin bilgi seviyesini belirleyerek eksikleri tamamlamak oldukça önemlidir. Bu çalışmada; sağlık hizmetlerinde öğrenim gören öğrencilerin nozokomiyal enfeksiyonlara ilişkin bilgi düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışma 565 sağlık hizmetleri öğrencisi üzerinde tanımlayıcı olarak yapılmıştır. Veriler öğrencilerin gözlem altında doldurdukları anket aracılığı ile toplanmıştır. Anket öğrencilerin demografik özelliklerini ve bilgi düzeylerini belirlemeye yönelik olarak iki bölümden oluşmaktadır. Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanılmıştır. Niceliksel verilerin ikiden fazla grup arası değerlendirmelerinde Kruskal Wallis testi, farklılığa neden olan grubun

¹Cukurova University Abdi Sutcu Vocational School of Health Services, Adana



İletişim / Corresponding Author : Pınar ETİZ

Çukurova Üniversitesi Abdi Sütücü Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu 01330 Adana - Türkiye
Tel : +90 530 202 44 86 E-posta / E-mail : pinaretiz@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 01.10.2018
Kabul Tarihi / Accepted : 09.08.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.69335

Etiz P, Yüzbaşıoğlu-Anyürek S. Assessment of knowledge about nosocomial infection among Cukurova University Vocational School of Health Services Students. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 69-78

(range, 17-37 years). The majority of the students (58.1%) were ≤ 20 year-old, (69.7%) were female, (57.7%) were attended occupational training program, 11.1% of them have working experience. The percentage of students' knowledge of hospital infections is between 10 and 100, with a mean knowledge level of 73.0 ± 17.23 and a median of 80.

Conclusion: The overall knowledge level for infection control indicated that instruction was effective; however, knowledge levels were different. A periodically check of healthcare students' knowledge would be advisable in order to fill any gaps, improve training, reduce nosocomial infections and increase prevention measures compliance. For this purpose continuing education programs and seminars should be arranged on regular basis.

Key Words: Nosocomial infection, health service students, knowledge level, questionnaire

tespitinde ise Mann Whitney U post hoc testi kullanılmıştır. Anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya 565 öğrenci dahil edilmiştir. Öğrencilerin yaşları 17 ile 37 yıl arasında değişmekte olup ortalaması $20,99 \pm 2,64$ 'dür. Öğrencilerin büyük çoğunluğu (%58,1) 20 yaşın altındaydı, %69,7'si kadını ve % 57,7'si daha önce mesleki eğitim programına katılmıştı, %11,1'inin de çalışma deneyimi vardı. Öğrencilerin hastane enfeksiyonları bilgi yüzdeleri 10 ile 100 arasında değişmekte olup, ortalaması $73,0 \pm 17,23$ ve medyanı 80'dir.

Sonuç: Enfeksiyon kontrolü için öğrencilerin genel bilgi seviyesi öğretimin etkili olduğunu gösterse de, bilgi düzeyleri arasında farklılıklar belirlenmiştir. Öğrencilerin bilgi seviyeleri arasındaki boşluğu doldurmak, eğitimi geliştirmek, nozokomiyal enfeksiyonları azaltmak ve enfeksiyonları önlemeye yönelik uyumu arttırmak için periyodik olarak bilgi seviyeleri belirlenmelidir. Bu amaçla düzenli olarak sürekli eğitim programları ve seminerler düzenlenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Nozokomiyal enfeksiyon, sağlık hizmetleri öğrencileri, bilgi düzeyi, anket

INTRODUCTION

Nosocomial infections also regarded as hospital acquired infections (HAIs) are infections acquired in hospitals by patients who are admitted for a reason other than that infection and first appear 48 h or more after hospital admission or with in 30 day after discharge (1).

Nosocomial infections happen worldwide and impress both developed and developing countries. Infections acquired in health care settings are among the major causes of mortality and increased morbidity among hospitalized patients(2). Developing countries were stated to have up to 20 times the risk of contracting a nosocomial infection compared with improved countries(3,4). A prevalent survey in 2002 conducted under the auspices of the World Health

Organization (WHO) in 55 hospitals of 14 countries representing four WHO regions (Europe, Eastern Mediterranean, South-East Asia and Western Pasific) indicated an average of 8.7% of hospital patients had nosocomial infections (5).

Although infections mostly originate from patients, health care workers also can be a main source of vectors for pathogenic agents (6). These diseases are usually caused by bacteria or viruses particularly hepatitis B and C viruses, human immunodeficiency virus, vancomycin-resistant *enterococci* (VRE), methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), avian or pandemic influenza viruses (7). There are various different exposure routes: through injury (cut, prick), through contact with the skin or mucous

membranes, through inhalation or through ingestion. There is an increasing number of healthcare workers both in developed and developing countries who have been exposed to pathogens while caring of patients (8). Prevention of healthcare-associated infections is the duty of all healthcare workers (9). Common pathogens may easily be transmitted through healthcare workers' hands, equipment, supplies and unhygienic practices (10). So, all healthcare workers should routinely use appropriate barrier precautions to prevent skin and mucous membrane exposure during contact with any patient's blood or body fluids that require universal precautions (11,12). Strict adherence by healthcare workers to standard infection control precautions may prevent a percentage of these risks.

Healthcare workers play a significant role in spreading the infection and they are regarded as key members of managing and controlling the hospital infections; thus, healthcare workers must have correct, up-to date and appropriate scientific information regarding varieties of hospital infections, their effects on afflicting patients, and increased hospital costs, recognition of people at risk and also the criteria to prevent and control. On the other hand, healthcare workers knowledge and practice regarding sanitary conditions play a vital role to guarantee the individual and ultimately social health, increased level of healthcare workers knowledge positively affects their performance (13).

Also healthcare students play a serious role in spreading nosocomial infections. Healthcare students are exposed early to the hospitals and to activities which increase their risk of acquiring and transmitting infections (8). To protect healthcare students from percutaneous injuries and to prevent nosocomial infection, students should have adequate knowledge before their initial training period at a hospital (14). Moreover, these individuals represent potential future healthcare professional or leaders in the fight against nosocomial infections, so it is significant that they know how to control the nosocomial infections

appropriately.

The aim of this study was to determine the level of knowledge regarding prevention of nosocomial infections among healthcare students.

MATERIAL and METHOD

Study Design

This research was designed as a descriptive study which evaluated knowledge of general principles of infection prevention and control of students in the public-sector university in Adana, Turkey. The study consisted of students attending one of the six 2-year programs (Anesthesia, Medical Documentation and Secretariat, Medical Imaging Techniques, Medical Laboratory Techniques, First and Emergency Aid, Oral and Dental Health, Dental Prosthesis Techniques, Physiotherapy, Aged Care) at the Cukurova University Vocational School of Health Services during the 2016-2017 academic year.

Ethical Considerations

Prior to the study, all participants were informed about the purposes and methods of the study. All potential respondents were clearly advised that participation in the study was voluntary and anonymous, so they could refuse to participate or withdraw from the study at any stage. All the participants completed and returned the questionnaire, giving a response rate of 100%. Ethical approval for this research was obtained from the ethical review committee of Cukurova University Medical Faculty in accordance with the Helsinki Recommendations.

Questionnaire Design

Data was collected using a structured self-administered questionnaire, which had been designed after an extensive literature search. The questionnaire consisting of 18 questions in descriptive type was divided into two main components. The first part contained parameters for determination of sociodemographic characteristics such as (age,

gender, year in the programme, employment status, participation record in the infection control education during the past years), the second part contained ten multiple-choice questions to evaluate their knowledge level about the prevention of nosocomial infection (immunization, hand hygiene, rational antibiotic use, standard precautions). The questionnaires were handout to the students in the classroom and collected at the end of the period. The participants were requested to respond to questions according to their own awareness about the subject.

Students' knowledge levels were measured by a multiple-choice questions questionnaire prepared by experts in their field. The number of correct answers that students give to all questions is divided by the total number of questions and a variable is determined that determines the level of knowledge in terms of percentage. Therefore, information levels range from 0% to 100%.

Data Analysis

All the responses were collected and analyzed statistically using IBM SPSS Statistics version 22. The normal distribution fitness of the variables was determined by the Kolmogorov Smirnov test, and the variables were not fit to normal distribution. Descriptive statistical methods (min-max, mean, standard deviation, median, frequency) as well as Mann-Whitney U test were used for the two groups of quantitative data. The Kruskal Wallis test was used for more than two intergroup evaluations of the quantitative data, and the Mann Whitney U with Bonferroni correction post-hoc test was used to determine the group causing the difference. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Five hundred and sixty-five students responded to the distributed questionnaires (100%). Students mean age was 20.99 ± 2.64 (range, 17-37 years), from whom 394 (69.7%) were female and 171 (30.3%) were

male. Table 1 showed demographic characteristics of the studied sample. The majority of them were ≤ 20 year old (58.1%) and female (69.7%). Responses to questions about hospital-acquired infections and the cleaning process were summarized in Table 2. The percentage of hospital infections information among students ranged from 10 to 100, with an average of 73.00 ± 17.23 and a median of 80. Students above 20 years had a statistically significant higher level of knowledge of nosocomial infections than from those under 20 years of age ($p < 0.01$). It was found that women had a statistically significant higher level of knowledge of nosocomial infections than men ($p < 0.01$) (Table 3).

Also the group who attended any occupational training program regarding infection control had the high knowledge of nosocomial infections than the non-attending group. There was a statistically significant relationship between knowledge and occupational training program ($p < 0.01$). There was a statistically significant difference for those who had previously been educated about hospital infections information among the places where they had been trained ($p = 0.025$). As a result of post hoc binary comparisons, it was found that the knowledge level percentage of hospital-acquired infections in school-educated subjects was significantly higher than those educated in other places and the ministry of health education. Knowledge level of the students working in the clinics was found statistically significantly higher than that of the students with non-working experience ($p < 0.01$) (Table 3).

Additionally there was a statistically significant relationship between knowledge level and teaching program ($p < 0.01$). As a result of post-hoc comparisons to determined which program originated the difference, the knowledge level of hospital infection in those teaching in the medical documentation and secretarial program students was significantly lower than those in the oral-dental health and aged care program students ($p < 0.0014$) (The corresponding

Table 1. Socio-demographic characteristics of respondents (n=565)

		Min-Max	Mean±SD (Median)
Age (year)		17-37	20.99±2.64 (20)
		n	%
Age Group	≤ 20 years	328	58.1
	> 20 years	237	41.9
Sex	Female	394	69.7
	Male	171	30.3
Teaching Program	Medical Laboratory Techniques	127	22.5
	Medical Imaging Techniques	105	18.6
	Physiotherapy	73	12.9
	Aged Care	20	3.5
	Dental Prosthesis Techniques	12	2.1
	Medical Documentation and Secretariat	35	6.2
	Anesthesia	65	11.5
	Oral and Dental Health	35	6.2
Class	First and Emergency Aid	93	16.5
	1 st year	249	44.1
Participated in nosocomial infections training in the past	2 nd year	316	55.9
	Yes	326	57.7
If yes, where did you participated in nosocomial infections training (n=326)	No	239	42.3
	Lesson	256	78.5
	Ministry of Health	27	8.3
Work experience in any health institution	Other	40	12.3
	Yes	62	11.0
	No	503	89.0

threshold p value was 0.05/36=0.0014). Evaluation of hospital infection knowledge levels according to socio-demographic characteristics of students were summerized in Table 3.

DISCUSSION

The study described and compared knowledge about nosocomial infection among 565 healthcare students. There are various studies which reveal the

Table 2. Frequent response to questions by study population (n=565)

		n	%
Is hepatitis B vaccination important in the prevention of hospital infections?	Yes*	513	90.8
	No	6	1.1
	Unknown	46	8.1
What is the role of rational antibiotic use in preventing nosocomial infections?	Significant*	425	75.2
	Insignificant	19	3.4
	Unknown	121	21.4
Which of the following measures is the most important role in the prevention of hospital infection and must be implemented?	wearing gloves	152	26.9
	Hand washing*	354	62.7
	Isolation	59	10.4
How should it be dried after the hands are washed?	With disposable towel*	536	94.9
	With gauze patch	12	2.1
	With warm hair	16	2.8
	With paper	1	0.2
Which one is true for hospital infections?	Infections acquired in hospitals by patients who are admitted for a reason other than that infection first appear 48 h or more after hospital admission or with in 30 day after discharge.*	427	75.6
	They are in the period of incubation at the time of application and infections that developed 48-72 hours after admission to the hospital.	90	15.6
	Infections that develop after 48 to 72 hours from one patient to another.	38	6.7
	Nosocomial infections occur within the first 48 hours of birth	10	1.8
Hospital infections can be reduced by 30-40% with full compliance of handwashing and hand hygiene of health personnel.	Yes*	536	94.9
	No	3	0.5
	Unknown	26	4.6
In hospital infections the permanent skin flora of health personnel is more important than temporary flora.	Yes*	258	45.7
	No	46	8.1
	Unknown	261	46.2
Which of the following is not a member of the Hospital Infection Control Committee?	Clinical microbiologist	84	14.9
	Laboratory technician*	437	77.3
	Infectious disease specialist	14	2.5
	Infection control nurse	30	5.3
In which of the following situations should sterile gloves be worn?	Endotracheal aspiration*	334	59.1
	Medical dressing	167	29.6
	Vessel path opening	36	6.4
	Bloodletting	28	5.0
Which one of the following is true about a patient who has airway isolation?	The room of the door can be left open	38	6.7
	Special ventilation is required for the patient room*	308	54.5
	The green clover leaf card should be hung on the door	71	12.6
	Surgical mask should be worn when entering the room	148	26.2

Correct Answer: *

Table 3. Evaluation of hospital infection knowledge levels according to socio-demographic characteristics of students (n=565)

General Characteristics	Median (Min-Max)	Knowledge Level (%)	p
Age Group	≤ 20	70 (10-100)	¹ 0.001**
	> 20	80 (10-100)	
Sex	Female	80 (10-100)	¹ 0.001**
	Male	70 (10-100)	
Teaching Program	Medical Laboratory Techniques	80 (20-100)	² 0.008**
	Medical Imaging Techniques	80 (30-100)	
	Physiotherapy	80 (30-100)	
	Aged Care	80 (40-100)	
	Dental Prosthesis Techniques	50 (10-90)	
	Medical Doc. and Secretariat	70 (30-100)	
	Anesthesia	80 (70-100)	
	Oral and Dental Health	70 (40-100)	
Class	1 st year	70 (10-100)	¹ 0.001**
	2 nd year	80 (30-100)	
Participated in nosocomial infections training in the past	Yes	80 (30-100)	¹ 0.001**
	No	70 (10-100)	
If yes, where did you participated in nosocomial infections training (n=326)	Lesson	80 (30-100)	² 0.025*
	Ministry of Health	70 (40-100)	
	Other	80 (40-90)	
Work experience in any health institution	Yes	80 (40-100)	¹ 0.001**
	No	80 (10-100)	

¹Mann Whitney U Test²Kruskal Wallis Test

*p<0.05

**p<0.01

importance of infection control practice in other professions. Nurses and physicians knowledge of standard and isolation precautions have been stated to be insufficient. Nevertheless, this questionnaire recorded only student responses. Few studies have reported on healthcare student's knowledge of nosocomial infections (9,15-17). In one research, 27% of participating healthcare students reported insufficient underlines on teaching about infection control in their training program, whilst 50% expressed a desire for more emphasis on isolation procedures throughout their training program (18).

In our study, it was detected that 57.7% of the students had already been educated about nosocomial infections and 78.5% of them had received formal teaching throughout the curriculum. Formal teaching during the curriculum was indicated to be the main source of information influencing students' knowledge about preventive measures for nosocomial infections. This proportion was relatively high compared with that obtained in a study by Bell et al, (3) in which 36% of sampled students citing formal training in curriculum as their main source of information. Teaching infection control to healthcare students

is a challenge both with respect to developing a cohesive program and encouraging students to adopt correct attitudes early in their careers (14). Sax et al. (19) reported that lack of knowledge is the major reason for nonadherence to standard and isolation precautions. Nobile et al. (20) stated that a positive attitude about hand disinfection was higher among healthcare students with a higher level of knowledge. However, educational background is one of the factors influencing compliance with good practices; indeed, education works synergistically with other factors: behavior and practice (14). Studies demonstrated that formal training program in curriculum of standard precautions can quickly develop students' knowledge of infection control in a short period of time.

Based on the results of the present study, 41.9% of the participating students were 20 years old and above. This result is similar to the result reported in previous studies carried out by Alrubaiee et al. (21) in Yemen, Ginny Kaushal et al. (22) in India. Nevertheless, our result is consistent with this previous study concerning the gender as Kaushal et al. (22), Brosio et al. (7) and Wasswa et al. (23) stated that most of the study participants were females. We think that women are more careful and selfless in preventing infections.

According to the results of this study, only a small percentage of students (11%) have experience working in the health institution (Table 1). Concerning to the students' work experience, this study result indicated significant relationship between the students' work experience and their knowledge of nosocomial infection, this might relate to received training about nosocomial infection from in-house programs and practices within the hospital. This result disagreed with the results obtained from a previous study done in Yemen showed that there is an insignificant association between the knowledge and work experience (11).

Much as knowledge of nosocomial infection is

significant to all health workers, our study appears to show that there is higher knowledge among oral and dental health and aged care students compared to medical documentation and secretariat students. First and amergency aid students showed weaknesses in knowledge level of nosocomial infections. It may be that the students don't care much about this topic. Whereas adequate infection and prevention control must be practiced at all times when administering first aid. Ojulong et al. (8) found that medical students appear to show that higher knowledge compared to nursing/radiography students. We think that the occupational practices of the students influence their knowledge levels. Learning practices are indispensable for improving student knowledge of nosocomial infection and the prevention of infection transmission (14,24-27). Teaching infection control to all healthcare students is a challenge both with respect to developing a cohesive program and encouraging students to adopt correct attitudes early in their careers (14).

In conclusion, knowledge and attitudes are believed to play a significant role in the acquisition of infection control practices, and all healthcare students' education has been recommended as an important strategy to develop compliance and to reduce nosocomial infection rates (8,9). We determined that knowledge about nosocomial infection of its significance among healthcare students was high from previously published studies on this topic. In general, studies include doctors, nurses and radiologists, while our study includes students who will serve in all areas of the healthcare industry (8).

Based on the findings of this study, we suggest that vocational school of health services should introduce the module of nosocomial infection at the earliest opportunity to healthcare students at the school. Teaching methods should be developed to increase knowledge of infection control. Also the education of healthcare students during the years of clinical practice is very important.

REFERENCES

1. Irene Ocran I, Tagoe DNA. Knowledge and attitude of healthcare workers and patients on healthcare associated infections in a regional hospital in Ghana. *Asian Pac J Trop Dis*, 2014; 4 (2): 135-9.
2. Sorte D. Nurses knowledge related to prevention of nosocomial infection. *Int J Sci Res*, 2015; 4 (7): 38-40.
3. Bello AI, Asiedu EN, Adegoke BOA, Quartey JNA, Appiah-Kubi KO, Owusu-Ansah B. Nosocomial infections: knowledge and source of information among clinical health care students in Ghana. *Int J Gen Med*, 2011; 4, 571-4.
4. World Health Organization. 10 facts on patient safety. Available from: <http://www.who.int/feature/factsfile/patientsafety/en/>, (Dated: October 8, 2018).
5. World Health Organization. Global Alert and Response. Geneva: World Health Organization; 2002. [Online] Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12/en/, (Dated: October 8, 2018).
6. Jayasinghe RD, Weerakoon BS. Prevention of nosocomial infections and standard precautions: knowledge and practice among radiographers in Sri Lanka. *J Med Allied Sci*, 2014; 4 (1): 9-16.
7. Brosio F, Kuhdari P, Stefanati A, Sulcaj N, Lupi S, Guidi E, et al. Knowledge and behaviour of nursing students on the prevention of healthcare associated infections. *J Prev Med Hyg*, 2017; 58: E99-E104.
8. Ojulong J, Mitonga KH, lipinge SN. Knowledge and attitudes of infection prevention and control among health sciences students at University of Namibia. *Afr Health Sci*, 2013; 13 (4): 1071-8.
9. Masavkar SP, Naikwadi AM. Knowledge, attitude and practice regarding nosocomial infections among general health practitioners and medical college students. *Sch J App Med Sci*, 2016; 4 (5): 1852-6.
10. Gichuhi AW, Kamau SM, Nyangena E, Otieno- Ayayo ZN. Health care workers adherence to infection prevention practices and control measures: A case of a level four district hospital in Kenya. *Am J Nurs Sci*, 2015; 4 (2): 39-44.
11. Gawad A. Assessment of Knowledge about Standard Precautions and Nosocomial Infection among Nurses Working in Hospitals of Sana'a City, Yemen. *Int J Caring Sci*, 2017; 10 (1): 169-175.
12. Kaur R, Kaur B, Walia I. Knowledge, attitude and practice regarding universal precautions among nursing Students. *Nurs Midwifery Res J*, 2008; 4 (4): 115-127.
13. Kalantarzadeh M, Mohammadnejad E, Ehsani SR; Tamizi Z. Knowledge and practice of nurses about the control and prevention of nosocomial infections in emergency departments. *Arch Clin Infect Dis*, 2014; 9 (4): e18278.
14. Tavolacci MP, Ladner J, Bailly L, Merle V, Pitrou I, Czernichow P. Prevention of nosocomial infection and standard precautions: knowledge and source of information among healthcare students. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008; 29: 642-7.
15. Askarian M, Honarvr B, Tabatabaee HR, Assadian O. Knowledge, practice and attitude towards standard isolation precaution in Iranian medical students. *J Hosp Infect*, 2004; 58: 292-6.
16. Mann CM, Wood A. How much do medical students know about infection control? *J Hosp Infect*, 2006; 64: 366-70.
17. Koenig S, Chu J. Senior medical students knowledge of universal precautions. *Acad Med*, 1993; 68: 372-4.
18. Suchitra JB, Lakshmidhevi N. Impact of education on knowledge, attitudes and practices among various categories of health care workers on nosocomial infections. *Indian J Med Microbiol*, 2007; 25: 181-7.
19. Sax H, Perneger T, Hugonnet S, Herrault P, Chraïti MN, Pittet D. Knowledge of standard and isolation precautions in a large teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2005; 26: 298-304.
20. Nobile C, Montuori P, Diaco E, Villari P. Healthcare personnel and hand decontamination in intensive care units: knowledge, attitudes and behaviour in Italy. *J Hosp Infect*, 2002; 51: 226-32.

21. Alrubaiee G, Baharom A, Shahar HK, Daud SM, Basaleem HO. Knowledge and practices of nurses regarding nosocomial infection control measures in private hospitals in Sana'a City, Yemen. *Saf Health*, 2017; (3) 16: 1-6.
22. Kaushal G, Doke P, Shah A, Verma V. An Analysis of Knowledge, Attitude and Practices regarding Standard Precautions of Infection Control and Impact of Knowledge and Attitude of ICU nurses on self-reported Practices of Infection Control. *Int J of Res Foundation Hosp and Healthc Adm*, 2015; (3) 2: 79-85.
23. Wasswa P, Nalwadda CK, Buregyeya E, Gitta SN, Anguzu P, Nuwaha F. Implementation of infection control in health facilities in Arua district, Uganda: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*, 2015; 15: 268.
24. Kim KM, Kim MA, Chung YS, Kim NC. Knowledge and performance of the universal precautions by nursing and medical students in Korea. *Am J Infect Control*, 2001; 29: 295-300.
25. Calabro K, Weltge A, Parnell S, Kouzekanani K, Ramirez E. Intervention for medical students: effective infection control. *Am J Infect Control*, 1998; 26: 431-6.
26. Jeffe DB, Mutha S, Kim LE, Evanoff BA, Fraser VJ. Evaluation of a preclinical, educational and skills-training program to improve students' use of blood and body fluid precautions: one year follow-up. *Preventive Med*, 1999; 29: 365-73.
27. Colombo C, Giger H, Grote J, Deplazes C, Pletscher W, Luthi R, et al. Impact of teaching interventions on nurse compliance with hand disinfection. *J Hosp Infect*, 2002; 51: 69-72.

Yemek fabrikası çalışanlarının portör muayenelerinin değerlendirilmesi

Evaluation of porter examination of food factory workers

İzzettin TOKTAŞ¹, Ali CEYLAN²

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı Diyarbakır il merkezindeki yemek fabrikası çalışanlarında; gaitada *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ve parazit, burunda ise stafilokok yönünden taşıyıcılık sıklığını belirlemek ve saptanan taşıyıcıların sağaltımını yaparak hastalıkların yayılmasını engellemektir.

Yöntem: Tanımlayıcı tipteki bu araştırma, 15 Kasım - 30 Aralık 2009 tarihleri arasında yürütülmüştür. Diyarbakır il merkezinde, Tarım İl Müdürlüğü kayıtlarına göre 15 yemek fabrikası bulunmakta ve bu yemek fabrikalarında toplam 568 personel çalışmaktadır. İldeki yemek fabrikalarında çalışanların %50'sinin örnekleme alınması hedeflenmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden 252 kişiye anket uygulanmıştır. Anket uygulanan tüm gıda çalışanlarından burun ve gaita örnekleri alınması planlanmış ve katılımcılardan yazılı onamları alınmıştır. Ancak numune yetersizliği veya numune alınamaması nedeniyle dokuz kişinin laboratuvar sonuçları olmadığı için 243 kişi (örneklemin %85.6'sı) araştırmaya dahil edilmiştir. 237 kişiden burun örnekleri ve 217 kişiden ise gaita örnekleri alınmıştır. Çalışanların gaita numuneleri yarım saat içinde değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler SPSS programı kullanılarak frekans, yüzde ve ortalama değerleri hesaplanmıştır. İstatistiksel analizde ki-kare,

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to determine the prevalence of *Salmonella* spp., *Shigella* spp. and parasites in the gaita and the prevalence of staphylococcus in the nose and to prevent the spread of diseases by treating the identified carriers the food factory workers in Diyarbakır.

Methods: This descriptive study was carried out between 15 November and 30 December 2009. According to the records of the Provincial Directorate of Agriculture in Diyarbakır province, there are 15 food factories and 568 personnel work in these food factories. 50% of the employees working in the food factories in the province were aimed to be sampled. A questionnaire was applied to 252 individuals who agreed to participate in the study. Nasal and stool samples were taken from all the food workers who were surveyed and written consent was obtained from the participants. However, since nine people did not have laboratory results due to lack of samples or sampling, 243 people (85.6% of the sample) were included in the study. Nasal specimens were collected from 237 subjects and stool specimens were taken from 217 subjects. Stool samples of the employees were evaluated within half an hour. The data obtained were calculated frequency, percentage and

¹Diyarbakır İl Sağlık Müdürlüğü, Diyarbakır

²Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Diyarbakır



İletişim / Corresponding Author : İzzettin TOKTAŞ

Diyarbakır İl Sağ. Müd. Ek Binası Halk Sağ. Hiz. Başkanlığı Bağlar 21070 Diyarbakır - Türkiye

Tel : +90 505 675 40 94

E-posta / E-mail : drizzettin@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 24.03.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 13.02.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.95815

Toktaş İ, Ceylan A. Yemek fabrikası çalışanlarının portör muayenelerinin değerlendirilmesi.
Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 79-86

Fisher's Exact testleri kullanılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Araştırma grubunun yaş ortalaması $30,9 \pm 8,9$ yıl olup, %93,4'ü erkek çalışanlardan oluşmaktadır. Tuvaleti kanalizasyona bağlı olmayan veya tuvaleti evin dışında olan çalışanlarda gaitada parazit görülme sıklığı daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Burunda *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı aşçılarda, diğer çalışanlara göre 5,49 kat daha yüksek bulunmuştur. Burunda *S. aureus* taşıyıcılığı %7,6 ve bağırsakta parazit taşıyıcılığı ise %7,4 olarak tespit edilmiştir. Gaita kültüründe ise *Salmonella* spp. ve *Shigella* spp. bakılmış ancak hiç birinde görülmemiştir.

Sonuç: Yemek fabrikası çalışanlarında bağırsakta parazit taşıyıcılığının ve burunda *S. aureus* taşıyıcılığının yüksek olması, çalışanlarda kişisel hijyenin eksik olduğunu göstermektedir. Aşçılarda burunda *S. aureus* taşıyıcılığı diğer çalışanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Portör muayenesinde taşıyıcı veya hasta olduğu tespit edilenlerin tedavileri sağlanmış ve çalışanlara hijyen eğitimleri verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aşçı, besin işlenmesi, parazitik intestinal hastalıklar, *Staphylococcus aureus*

mean values by using SPSS program. Chi-square, Fisher's Exact tests were used for statistical analysis. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The mean age of the study group was $30,9 \pm 8,9$ years and 93,4% of them were male. The incidence of parasites in stool was found to be higher in the workers whose toilet was not connected to the sewer system or whose toilet was outside the house ($p < 0,05$). *Staphylococcus aureus* carriage was found to be 5,49 times higher in the cooks than in the other employees. On the nose *S. aureus* carriage rate was 7.6% and parasite carriage in the intestine was 7.4%. In the Gaita culture, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. were observed but no growth was observed.

Conclusion: The high level of parasitic carriage and *S. aureus* carriage in the food factory workers indicate the lack of personal hygiene in employees. The *S. aureus* carriage was found to be higher in the nose of the cooks than the other workers. In the porter examination, the patients who were found to be carriers or patients were treated and hygiene training was provided to the employees.

Key Words: Cooker, food handling, parasitic intestinal diseases, *Staphylococcus aureus*

GİRİŞ

Günümüzün değişen koşulları nedeniyle her yıl daha fazla sayıda insan ev dışında beslenmek zorunda kalmaktadır. Ev dışında yenen yemeklerin güvenli olmaması nedeniyle, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde çok sayıda insan gıda kaynaklı hastalıklara yakalanmaktadır. Toplu beslenme yapılan yerlerde iki veya daha fazla kişinin, yediği yemeklerden sonra hastalanması "gıda kaynaklı hastalık" olarak tanımlanmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıklar bir taraftan insanların can güvenliğini tehdit ederek hastalanmalarına hatta ölmelerine yol açarken, diğer taraftan çok ciddi ekonomik kayıplara

neden olmaktadır. Günümüzde bütün dünyada, gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere gıda kaynaklı hastalıklar gittikçe büyüyen bir halk sağlığı problemi olarak görülmektedir. Gıda kaynaklı hastalıkların hepsinin sağlık kuruluşlarına bildirilmemesi, başvuran kişilerde bu hastalıklara her zaman tanı konamaması nedeniyle yıllık vaka sayıları ve dağılımları kesin olarak saptanamamaktadır (1).

Gıda kaynaklı hastalıkların en sık neden olduğu belirti ishaldir. İnsanlığın var olduğu dönemlerden beri önemli salgınlara yol açan bu hastalık grubu günümüzde yaklaşık dört milyon 0-4 yaş çocuk ölümüne

neden olmaktadır (2). Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre 2005 yılında yalnızca ishaller hastalıklardan 1.8 milyon insan hayatını kaybetmiştir. Bu vakaların büyük bir oranı gıda ve içme suyunun kontaminasyonuna bağlı ortaya çıkmıştır. Endüstrileşmiş ülkelerde her yıl gıda kaynaklı hastalıklara yakalananların nüfusa oranının %30'un üzerinde olduğu bildirilmiştir (3).

Su ve gıdalarla bulaşan hastalıklar, ülke ekonomisinde de önemli kayıplara neden olmaktadır. İş ve işgücü kaybı ile okula devamsızlığın en önemli nedeni bulaşıcı hastalıklardır. Bu hastalıkların tedavi masrafları da yüksek olduğundan önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (4). Türkiye'de ise DSÖ'ye 1999 ve 2000 yıllarına ait sırasıyla 84 bin ve 77 bin gıda kaynaklı hastalık bildirilmiştir. Her iki yılda da tüm vakaların %34 ile en sık *Salmonella* spp.'den kaynaklandığı belirtilmiştir. Sağlık Bakanlığının DSÖ'ye bildirdiği en sık diğer hastalıklar ise sırasıyla; *Amoebiasis*, *Bruselloz*, *Hepatit A*, *Shigellosis*'dir (5). DSÖ'nün tahminlerine göre, bildirilen gıda kaynaklı hastalık ve zehirlenmeler gerçek verilerin gelişmekte olan ülkelerde %1'i, gelişmiş ülkelerde ise %10'u kadardır ve bu bildirimlerin büyük çoğunluğu toplu zehirlenmelerdir (1).

Yemek fabrikaları son yılların önemli bulaşıcı hastalık kaynaklarıdır. Tek merkezde çok hızlı yemek üretimi yapılması ve çok sayıda iş yerine aynı ürünün dağıtılması, temel risk etmenleridir. En sık görülen bulaşıcı hastalıklar taşıyıcılarla olur. *Stafilokok*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *amebiyazis* ile *Hepatit A* ve *E* en çok beklenen etkenlerdir (6). Gıda maddeleri yapan ve satan yerlerde çalışanlarda taşıyıcılık yüksektir. İşçiler arasında taşıyıcı bulunması tavuk, yumurta ve pilav başta olmak üzere birçok ürünle bulaşa neden olabilir. Bu da gıda kaynaklı hastalıkları, mikrobiyolojik tehlikelere sebep olan büyüyen bir halk sağlığı problemi haline getirmektedir (6,7).

Bu çalışmanın amacı; Diyarbakır il merkezindeki yemek fabrikası çalışanlarında; gaitada *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ve parazit, burunda ise stafilokok

yönünden taşıyıcılık sıklığını belirlemek ve saptanan taşıyıcıların sağaltımını yaparak hastalıkların yayılmasının engellenmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Diyarbakır'da Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü kayıtlarına göre toplam 20 yemek fabrikası vardır. Diyarbakır il merkezinde 15 yemek fabrikası, ilçelerde ise beş yemek fabrikası faaliyet göstermektedir. İl merkezindeki yemek fabrikalardan 10 tanesi yemekleri kendi fabrikalarında, beş yemek fabrikası ise anlaştıkları kurumun mutfağında yemek üretmektedir. Kurumların mutfağında yemek üreten bu beş yemek fabrikası büro olarak kullanılmaktadır. Diyarbakır il merkezinde Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü kayıtlarına göre yemek fabrikalarında 568 personel çalışmaktadır. Diyarbakır Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü'nün ilgili biriminden gerekli izinler alınmıştır. Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü'nde görevli bir ziraat mühendisi ve bir gıda mühendisi ile birlikte yemek fabrikalar gezilerek, fabrika yöneticilerine ve çalışanlarına araştırmanın amacı hakkında bilgi verilmiştir. Tanımlayıcı olan bu çalışmada yemek fabrikalarında çalışanların %50'sinin örnekleme alınması hedeflenmiştir. Toplam 13 yemek fabrikası çalışanlarından araştırmaya katılmayı kabul eden 252 kişiye anket uygulanmıştır. Anket uygulanan tüm gıda çalışanlarından burun ve gaita örnekleri alınması planlanmış ve katılımcılardan yazılı onamları alınmıştır. Ancak numune yetersizliği veya numune alınamaması nedeniyle dokuz kişinin laboratuvar sonuçları olmadığı için 243 kişi (örneklerin %85,6'sı) araştırmaya dahil edilmiştir. Laboratuvar için burun sürüntüsü yeterli görülmeyen altı kişinin sadece gaita örnekleri, 26 kişinin ise gaita örnekleri alınmadığından veya laboratuvar için yeterli görülmediğinden sadece burun sürüntüsü incelenmiştir. Toplam 237 kişinin burun sürüntüsü ve 217 gaita örnekleri üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Anket ve girişimsel olmayan gaita ve burun sürüntüsü materyallerinde mikrobiyolojik

çalışma yapılarak katılımcılar üzerinde herhangi bir tıbbi müdahale yapılmadığı için Etik Kurul Onayı alınmamıştır. Veriler, 15 Kasım 2009 - 30 Aralık 2009 tarihleri arasında toplanmıştır.

Burun ve gaita örneklerin alınması ve değerlendirilmesi

Yemek fabrikasında ışıklı ve rahat bir ortam temin edildikten sonra burun sürüntü örnekleri her iki taraf burun konkasının 1/3'lük ön kısmından steril pamuk eküvyonlarla (COPAN, kodu CE 0344) sağa ve sola birkaç kez çevirmek suretiyle alınmıştır. Ertesi gün sabah çalışanlara plastik kaşıkla gaita kabı verilerek içine nasıl gaita bırakacaklarını anlatılmıştır. Çalışanların gaitaları yarım saat içinde Üniversitenin Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına ulaştırılarak örnekler değerlendirilmiştir.

Burun ve boğaz örneklerinin %5 Koyun Kanlı Agar besiyerine (Oxoid), dışkı örneklerinin SS (*Salmonella* -*Shigella*) agar besiyerine (Merck) tek koloni ekimleri yapılmıştır. 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Boğaz ve burun örneklerinde stafilokok ile uyumlu görülen kolonilerden Gram boyama, katalaz ve koagülaz deneyleri yapılmıştır. SS Agar besiyerinde laktaz negatif ve H₂S oluşturan kolonilerden TSI, üre ve hareket besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Ayrıca dışkı örneklerine serum fizyolojik solüsyonu ve Lugol'un iyot solüsyonu ile mikroskop ile direkt bakılmıştır.

Verilerin istatistiksel Analizi

Elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 10.0 paket programı kullanılarak frekans, yüzde ve ortalama değerleri hesaplanmıştır. İstatistiksel analizde Ki-kare, Fisher's Exact testleri kullanılmıştır. p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Araştırmaya 13 yemek fabrikasından 243 çalışan dahil edilmiştir. Araştırma grubunun %93,4'ünü

(227 kişi) erkekler oluşturmaktadır. Çalışanların yaşları 14-53 yıl arasında değişirken yaş ortalaması 30,9±8,9 yıl olarak bulunmuştur. Çalışanların diğer sosyodemografik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. Yemek fabrikası çalışanlarının laboratuvar sonuçlarına göre burunda *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı % 7,6 (18/237 kişi) ve gaitada parazit taşıyıcılığı ise %7,4(16/217 kişi) olarak tespit edilmiştir. Parazitlerin türüne göre çalışanların %4,1'inde (9/217 kişi) amip kisti ve %3,2'sinde (7/217 kişi) ise *Giardia* kisti tespit edilmiştir. Gaita kültüründe ise *Salmonella* spp. ve *Shigella* spp. bakılmış ancak hiç birinde üreme görülmemiştir (Tablo 2). Çalışanların görevleri ile taşıyıcılık arasında ilişki incelenmiştir. İdari görev yapan (3/35 kişi) ve servis hizmeti yapan (7/81 kişi) personelde parazit taşıyıcılığı %8,6; yemek hazırlama bölümlerinde çalışan personelde (5/74 kişi) ise parazit taşıyıcılığı %6.8 olarak bulunmuştur (p>0,05). Çalışanların görevleri ile parazit sıklığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05). Ancak burunda *S. aureus* taşıyıcılığı açıcılarda, diğer çalışanlara göre 5.49 kat daha yüksek bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 3). Araştırma sırasında ishal olduğu tespit edilen yemek fabrikası çalışanlarında, ishal olmayanlara göre gaitada parazit görülme sıklığı daha yüksek bulunmuştur (p<0,05). Evde kullanılan tuvaleti kanalizasyona bağlı olmayan çalışanlarda, kanalizasyona bağlı tuvalet kullanan çalışanlara göre gaitada parazit görülme sıklığı daha yüksek bulunmuştur (p<0,05). Tuvaleti evin dışında olan çalışanlarda, tuvaleti evin içinde olan çalışanlara göre gaitada parazit görülme sıklığı daha yüksek bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 4).

Portör muayenesinde taşıyıcı veya hasta olduğu tespit edilenlerin tedavileri sağlanmıştır. Taşıyıcı çalışanlar, tedaviden sonra tekrar yapılacak portör muayenesinde sonuçlar negatif çıkıncaya kadar gıda ile ilgili işlerden uzak tutulmaları sağlanmıştır. Araştırmada tespit edilen portör muayene sonuçları, Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğüne de bildirilmiştir. Gıda ile bulaşan hastalıkları azaltmak için çalışanlara hijyen eğitimleri verilmiştir.

Tablo 1. Yemek fabrikası çalışanlarının sosyodemografik özellikleri (n=243)

		Sayı	%
Cinsiyet (n=243)	Erkek	227	93,4
	Kadın	16	6,6
Yaş (n=224)*	14 - 19	25	11,2
	20 - 29	92	41,1
	30 - 39	64	28,6
	40 - 49	38	17
	50 - 53	5	2,2
Eğitim durumu (n=240)*	Okur-Yazar değil	4	1,7
	Okur-Yazar	2	0,8
	İlkokul	97	40,4
	Ortaokul	70	29,2
	Lise ve üzeri	67	27,9
Sağlık güvencesi (n=239)*	Var	223	93,3
	Yok	16	6,7
Oturlan konutta yaşayan toplam kişi sayısı (n=238)*	1-2 kişi	10	4,2
	3-4 kişi	58	24,4
	5-6 kişi	89	37,4
	7-8 kişi	58	24,4
	9 ve üzeri	23	9,7
Ev tipi (n=240)*	Apartman dairesi	170	70,8
	Tek katlı ev	59	24,6
	Köy evi	11	4,6
Evde içilen suyun çeşidi (n=243)	Şebeke suyu	232	95,5
	Damacana	5	2,1
	Kuyu	3	1,2
	Kaynak	3	1,2

*: Sosyodemografik özelliğini belirtmeyen kişiler tabloya dahil edilmemiştir.

TARTIŞMA

Ülkemizde Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı verilerine göre, 450 bin toplu beslenme ve gıda satış yeri, 27 bin gıda üretim yeri olmak üzere toplam 477 bin işyerinde, nüfusun %18.62'si çalışmaktadır. Yoğun insan gücüne dayalı olan gıda sektöründe çalışan insanların, sağlıkla ilgili alışkanlık ve davranışları tüketime sunulan gıdaların nihai güvenliğini direkt etkilemektedir (8). Gıda maddesi ile uğraşan, üreten, satan ve tüketenler ile iç içe olan esnafın portörlük

açısından önemi vardır (9). Ülkemizin çeşitli bölge ve illerinde yapılan araştırmalarda, gıda sektöründe çalışanlarda ve mutfak personeline saptanan parazit oranları %3,7 - %40,21 arasında bulunmuştur (10-15). Ören ve ark. (10), İstanbul'daki bir üniversitenin yemekhane ve kantininde çalışan dört kişide (%3,7), Yıldırım ve ark. (11), Antalya'da otel ve şehir içindeki restoranlarında çalışanlarda parazit taşıyıcılığı %5,9 olarak bulmuşlardır. Vançelik ve ark.(12), Erzurum'da %12,7'sinde, Kurtoğlu ve ark.(9) Van'da %17,7'sinde, Aycan ve ark. (13), Malatya'da %23'ünde, Yazıcı ve

Tablo 2. Yemek fabrikası çalışanlarının laboratuvar sonuçlarının durumu

Tetkik Türü	Sonuç	Sayı	%*
Burun kültürü	<i>S. aureus</i>	18	7.6
	Koagülaz Negatif Stafilokoklar	73	30.8
	Normal Burun florası	146	61.6
	Toplam	237	100.0
Gaita direkt mikroskopisi	Amip kisti	9	4.2
	<i>Giardia</i> kisti	7	3.2
	Negatif	201	92.6
	Toplam	217	100.0
Gaita kültürü	<i>Salmonella</i> spp.	-	0.0
	<i>Shigella</i> spp.	-	0.0
	Negatif	217	100.0
	Toplam	217	100,0

*: Sütun yüzdesi verilmiştir.

Tablo 3. Yemek fabrikası çalışanlarının görevi ile *S. aureus* sıklığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

	Burunda <i>S. aureus</i> Taşıyıcılığı						OR (%95 GA)
	Var		Yok		Toplam		
Görevler	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Aşçı	10	16,4	51	83,6	61	100,0	5,49 (1,79-16,83)*
Garson	-	-	65	100,0	65	100,0	***
Servis elemanı	-	-	14	100,0	14	100,0	***
Fırıncı	-	-	10	100,0	10	100,0	***
Salatacı	-	-	9	100,0	9	100,0	***
Bulaşıkçı	2	10,0	18	90,0	20	100,0	**
Temizlikçi	1	25,0	3	75,0	4	100,0	**
Yönetici	-	-	6	100,0	6	100,0	***
Şoför	1	16,7	5	83,3	6	100,0	**
Diğer	1	9,1	10	90,9	11	100,0	**
Toplam	15	7,3	191	92,7	206	100,0	

*: Aşçı görevi, diğer bütün görevler birleştirilerek ki-kare testi ile karşılaştırıldı.

** : Bu görev, diğer bütün görevler birleştirilerek ki-kare testi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

***: Bu görevler için karşılaştırma yapılmamıştır.

****: Görevi belli olmayan kişiler tabloya dahil edilmemiştir.

Tablo 4. Çalışanların ishal olma ve tuvalet durumu ile parazit görülme sıklığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

	Gaitada Parazit		OR (%95 GA)**
	Var (%)*	Yok (%)*	
Şu anda ishaliniz var mı?			
Evet (n=4)	50,0	50,0	14,1 (1,9 -108,1)
Hayır (n=212)	6,6	93,4	
Son 15 gün içinde ishal oldunuz mu?			
Evet (n=12)	16,7	83,3	p>0,05
Hayır (n=203)	6,9	93,1	
Son 1 yıl içinde ishal oldunuz mu?			
Evet (n=78)	10,3	89,7	p>0,05
Hayır (n=136)	5,9	94,1	
Kullanılan tuvaletin konumu			
Evin dışında (n=12)	25,0	75,0	4,9 (1,8-20,2)
Evin içinde (n=203)	6,4	93,6	
Kullanılan tuvalet tipi			
Kanalizasyona bağlı değil (n=4)	75,0	25,0	45,9 (4,5-472,8)
Kanalizasyona bağlı (n=212)	6,1	93,9	
Toplam (N=216)	7,4	92,6	

*: Satır yüzdesi verilmiştir.

** : Ki-kare, Fisher's exact testi kullanılmıştır.

ark. (14), Aydın'da %29,3'ünde, Yazar ve ark. (15) Kayseri'de %40,21'inde bağırsak paraziti bulmuşlardır. Bu çalışmada ise bağırsak paraziti taşıyıcılığı %7,4 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda parazit taşıyıcılığı, ülkemizdeki farklı illerde yapılan diğer çalışmaların ortalamasına yakın bulunmuştur. Ancak arzu edilen yemek fabrikası çalışanlarının parazit taşıyıcılığının olmamasıdır.

Gıda çalışanlarında taşıyıcılığı önemli olan bir diğer etken ise *S. aureus*'tur. *S. aureus*'un asemptomatik taşıyıcılığı özellikle gıda zehirlenmeleri ve duyarlı kişilere bakterinin geçişi açısından kaynak oluşturmaktadır. Sepin-Özen ve ark. (16), Antalya Hıfzıssıhha Laboratuvarı'na başvuran 526 gıda çalışanının (%3.37) burun kültüründen *S. aureus* izole edilmiştir. Gülbandılar (17), Kütahya'da yaptığı çalışmada, portör muayenesi için Halk Sağlığı Laboratuvarı'na başvuran 217 kişide (%7,1), Ören ve

ark. (10), İstanbul'daki bir üniversitenin yemekhane ve kantininde çalışan 17 kişide (%15,7), Vançelik ve ark.(12), Erzurum il merkezinde gıda üretimi yapan çeşitli iş kollarında 40 kişide (%28,2) burunda *S. aureus* taşıyıcılığını saptamıştır. Çalışmamızda ise 18 kişide (%7,6) burun kültüründe *S. aureus* taşıyıcılığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada; yemek fabrikasındaki çalışanların görevlerine göre açıcılarda burunda *S. aureus* taşıyıcılığı diğer çalışanlarına göre 5,49 kat daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda *S. aureus* taşıyıcılığı ülkemizde yapılan diğer çalışmalara benzerlik göstermiştir. *S. aureus* taşıyıcılığının yüksek olması çalışanlarda kişisel hijyenin eksik olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda; normal popülasyonda burunda %20 oranında devamlı,%50 kadar da geçici *S. aureus* taşıyıcılığı saptanmıştır (18). Bu durum ise hijyen eğitimlerinin dışında gıda ve benzer iş kollarında çalışanların *Staphylococcus*

aureus yönünden portör muayenelerinin düzenli yapılması gıda kaynaklı hastalıklardan korunması için halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. İnsanda aksilla, burun deliği, inguinal ve perianal gibi nemli vücut bölgelerinde yerleşen stafilokokların yoğunluğu 10^3 ile 10^6 koloni oluşturan birim (kob)/ cm^2 iken, daha kuru bölgelerde $10-10^2$ kob/ cm^2 kadardır (19). Aşçıların mutfak içinde oluşan buhara yoğun bir şekilde maruz kaldıkları için vücutlarında *S. aureus*

için uygun nemli ortamın oluştuğunu ve bu nedenle bu çalışmada aşçıların burunda *S. aureus* taşıyıcılığının daha yüksek çıktığı düşünülmüştür. Ancak bununla ilgili daha çok araştırma yapılması gerekmektedir. Çalışma ortamlarında yeterli havalandırma sistemlerinin kurulması başta olmak üzere bütün fiziki ve hijyen şartları sürekli gözden geçirilerek güncellenmeli ve gerekli denetimler sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Koçak N. Yiyecek içecek işletmelerinde gıda ve personel hijyeni. Ankara: Detay Yayıncılık, 2007.
2. Akın L. Su ve besinlerle bulaşan hastalıkların kontrolü. In: Güler Ç, Akın L. eds. Halk Sağlığı Temel Bilgiler. Hacettepe Üniversitesi Yayınları; 2006: 905-19.
3. Anonymous. Food safety and foodborne illness, Fact sheet No.237. World Health Organization, 2007. https://foodhygiene2010.files.wordpress.com/2010/06/who-food_safety_fact-sheet.pdf (Erişim tarihi: 01 Ekim 2018).
4. Anonymous. Su ve besinlerle bulaşan hastalıklar. T.C. Sağlık Bakanlığı, Sağlık Eğitimi Genel Müdürlüğü. 26/08/2005 tarih ve 2005/131 sayılı genelge.
5. Anonymous. WHO Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe 8th Report 1999-2000 Country Reports: TURKEY. <http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/CRs/tur.pdf>, (Erişim tarihi: 01 Ekim 2018).
6. Aksakoğlu G. Bulaşıcı hastalıkla savaşım. Üçüncü yazım. İzmir: DEÜ Rektörlük Basımevi, 2008.
7. Anonymous. The European health report 2002. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/98296/E76907.pdf (Erişim tarihi: 01 Ekim 2018).
8. Gökçe N. Gıda güvenliğinde insan faktörü, Gıda Güvenliği Dergisi 2008;5:3. http://www.ggd.org.tr/diger/2008_sayi_5.pdf, (Erişim tarihi: 01 Ekim 2018).
9. Kurtoğlu MG, Körkoca H, Çiçek M, Taş Cengiz Z. Van yöresinde gıda sektörü çalışanlarında bağırsak parazitlerinin yaygınlığı. 2007; 31 (4): 309-312.
10. Ören MM, Evciman A, Duman AA, Önal AE, Özyıldırım B, Öngen B ve ark. Bir tıp fakültesi hastanesinde gıda çalışanlarının periyodik sağlık taramalarının değerlendirilmesi. İstanbul Tıp Fakültesi Derg 2014;77 (4):51-54.
11. Yıldırım İ, Felek R. Gıda çalışanlarında barsak parazitlerinin incelenmesi. Türkiye 9. Gıda Kongresi. 24-26 Mayıs, Bolu-Türkiye. 2006.
12. Vançelik S, Özbek A, Güraksın A. Personal hygienic and carrier situation among the foodhandlers in Erzurum. MJAU 2004; 36:1-4.
13. Aycan ÖM, Atambay M, Karaman Ü, Miman Ö, Daldal N. Malatya'da gıda ile uğraşan bir şirketin personeline bağırsak parazitlerinin araştırılması. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2008; 15 (2): 99-101.
14. Yazıcı V, Sırken F, Ertabaklar H, Ertuğ S. Aydın il merkezindeki hastanelerde çalışan mutfak personeline bağırsak parazitlerinin araştırılması, 2007; 31 (2): 136-138.
15. Yazar S, Birhan M, Hamamcı B, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi mutfak personeline bağırsak parazitlerinin görülme sıklığı. Türkiye Parazitol Derg 2001; 25 (4): 359-61.
16. Sepin-Özen N, Tuğlu-Ataman Ş, Seyman D, Aldağ H, Emek M. Antalya ili gıda çalışanlarında nazal staphylococcus aureus taşıyıcılığının ve MRSA oranlarının üç farklı yöntem kullanılarak incelenmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2013; 70(2): 51-8.
17. Gülbandır A. Kütahya yöresinde burun mukozasındaki Staphylococcus aureus taşıyıcılığının ve antibiyotik duyarlılığının araştırılması. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2009;18:1-5.
18. Bozkurt H, Bayram Y, Gündüoğlu H, Berktaş M. YYÜ Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi personeline nazal staphylococcus aureus taşıyıcılığı ile metisiline direnç oranlarının araştırılması. Van Tıp Dergisi,2007; 14 (2):52-6.
19. Gülay Z. Koagülaz - Negatif Stafilokoklar: Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji ve Patogenez. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. eds. Önemli ve sorunlu Gram-pozitif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004:73-103.

Personal hygiene habits of some university students in Turkey

Türkiye'deki bazı üniversite öğrencilerinin kişisel hijyen alışkanlıkları

Demet HANÇER-AYDEMİR¹

ABSTRACT

Objective: In this descriptive study, it was aimed to examine the personal hygiene habits of university students from Vocational School of Health Services, Suleyman Demirel University in Isparta and from School of Physical Education and Sports, Mehmet Akif Ersoy University in Burdur according to their departments, economic status (income) and sex variables.

Methods: While evaluating, respective scores were assigned to some hygiene behaviors and then "the total hygiene score" was calculated by adding up these scores in order to analyze how the students' hygiene behaviors changed with their descriptive qualities. The data obtained from research were analyzed using SPSS package program. In the statistical analysis of the data frequency (f), percentage (%) and chi-square (X^2) analysis were applied in order to test the differences and $p < 0,05$ was accepted significant.

Results: It was determined that the personal hygiene habits of the students who participated in the study did not differ according to the department variable and economic status (income) ($p > 0,05$). It was found that the personal hygiene habits of the students significantly differed according to sex; compared to the

ÖZET

Amaç: Tanımlayıcı nitelikte bir araştırma olan bu çalışmada; Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu ile Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu'nda öğrenim görmekte olan üniversite öğrencilerinin kişisel hijyen alışkanlıklarının bölüm, ekonomik durum (gelir) ve cinsiyet değişkenlerine göre incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Değerlendirme yapılırken öğrencilerin hijyenle ilgili davranışlarının tanımlayıcı özellikleri ile nasıl değiştiğini analiz edebilmek amacıyla hijyenle ilgili bazı davranışları için ayrı ayrı puan verilip bu puanlar toplanarak "toplam hijyen puanı" hesaplanmıştır. Araştırmanın verileri SPSS paket programı kullanılarak değerlendirilmiş, istatistiksel analizlerde frekans (f), yüzde (%) ve farklılıkları test etmek için ise ki-kare (X^2) işlemleri uygulanmış ve $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Araştırmaya katılan öğrencilerin kişisel hijyen alışkanlıklarının bölüm değişkenine ve ekonomik gelir düzeylerine göre farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Araştırmaya katılan öğrencilerin kişisel hijyen alışkanlıklarının cinsiyete göre anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiş, erkek öğrenciler ile kıyaslandığı

¹Suleyman Demirel University, Isparta Vocational School of Health Services, Medical Services and Techniques Department, Isparta



İletişim / Corresponding Author : Demet HANÇER-AYDEMİR

Süleyman Demirel Üni. Isparta Sağlık Hizmetleri MYO Doğu Kampüsü 32260 Isparta - Türkiye
Tel : +90 506 632 64 09 E-posta / E-mail : demetaydemir@sdu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 07.07.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 13.02.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.04880

Hançer-Aydemir D. Personal hygiene habits of some university students in Turkey.
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 87-96

male students, the female students had significantly higher personal hygiene scores ($p<0.05$). Consequently, it was found that the female students were more sensitive with regard to the personal hygienic practices and attached more importance to personal hygiene.

Conclusion: In the light of these results, it can be said that the personal hygiene behaviors of the male students should be improved and both families and teachers be responsible as regards this issue. In order to develop positive behavioral changes among students with regard to personal hygiene, seminars and conferences may be held by experts, various educative sources (posters, brochures, booklets etc.) involving practical hints may be provided for students, school staff and families; school counselling services may hold educative activities for students with regard to personal hygiene. Educative public service ads on personal hygiene may be broadcast on mass media especially on television.

Key Words: Hygiene, habits, health, students

zaman kız öğrencilerin kişisel hijyen puanlarının anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Sonuç olarak, kız öğrencilerin kişisel hijyen uygulamaları konusunda daha duyarlı oldukları ve kişisel temizliğine daha fazla önem verdikleri tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu sonuçlara dayalı olarak; erkek öğrencilerin kişisel hijyen davranışlarının geliştirilmesi gerektiği ve bunun için aile ve öğretmenlere görevler düştüğü, öğrencilerde kişisel hijyen ile ilgili olumlu davranış değişikliklerinin geliştirilebilmesi amacıyla bu konuda uzman kişiler tarafından seminer ve konferanslar verilmesi, ilgili kurumlarca öğrencilere, okul personeline ve ailelere kişisel hijyen uygulamaları ile ilgili pratik bilgiler veren eğitici kaynaklar (afiş, broşür, el kitabı vb.) hazırlanarak sunulması, okullardaki rehberlik servislerinin kişisel hijyen konusunda okul personeli ve öğrencilere yönelik çalışmalar yapması, özellikle televizyon olmak üzere uygun kitle iletişim araçlarında kişisel hijyen ile ilgili eğitici filmlerin kamu spotu olarak verilmesi önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Hijyen, alışkanlıklar, sağlık, öğrenciler

INTRODUCTION

Self-care practices that individuals perform in order to maintain good health are termed personal hygiene. Hand cleaning, nail cleaning and care, face, eye and ear cleaning, hair care and cleaning, mouth and tooth care, foot cleaning, bathing regularly, good toilet habits and cleaning after toilet, wearing clean clothes and underwear, not sharing personal towel, hair brush, underwear, toothbrush and nail cutter etc. are all involved in personal hygiene concept (1, 2). Personal hygiene involves cleaning of the body through the removal of bodily secretions, wastes and transient microorganisms; providing a relaxation and comfort for the person; reducing muscle strain and removal of bad body odors (sweat odor), helping

the individual to have a better appearance, improve self-confidence, improving and maintaining the skin health (3).

Hand cleaning is the most basic stage of personal hygiene. Hands and nails are the primary mechanisms through which microorganisms enter the body. Hands, which are in contact with the materials around all the time, carry bacteria, which may cause numerous diseases from the simple cold to some fatal diseases (4).

Some body secretions are removed with sweating through the skin and the sweat having evaporated, the solid waste is left on the skin surface. Bathing removes from the body sweat, fat, body secretions

such as sebum, dead skin cells, some microorganisms and bad odors. If we do not have bathe regularly, the above-mentioned wastes are not removed, so bacteria growth on the skin increases and may cause many diseases. Besides, these wastes cause malodour (4). Bathing must be on a regular basis so that one's skin will remain clean. Under normal circumstances, an individual must have a bath at least twice a week. Factors such as individual choice, profession, climate conditions or having a skin which secrete too much sebum affect the frequency of a bath (5, 6).

Footcare and hygiene are among personal hygiene practices, too. Because feet become sweaty in shoes, they must be washed regularly; otherwise, malodor may disturb people around you and it may even lead to foot disorders. Therefore, feet must be washed with soapy water and dried. Cotton or woolen socks must be preferred depending on the season. These are quick-dry materials which absorb sweat. Socks must be changed everyday and it is important that one not wear another person's sock. If a person is not careful about his or her foot hygiene, fungal or bacterial infections may often occur (7).

One of the most important parts of personal hygiene is mouth and dental health. The most effective way to protect our teeth is to brush them regularly. Leftover food remaining in your mouth after a meal breed harmful bacteria. A toothbrush is a personal tool of hygiene; therefore, you must not use another person's toothbrush. Toothbrushes must be changed every three to four months or every six months at the latest (4).

Especially, in places where you have to share a toilet or bathroom, personal hygiene is of great importance. Personal hygiene practices are basic to the prevention of many diseases, notably contagious diseases (8, 9). At present, infectious diseases are among the diseases which occur and are deadly most (10). It is pointed out in the public health literature that 40 to 50 diseases may be prevented from spreading through the improvement of personal hygiene (11-14). It is pointed out in the study by

Aiello et al. (13) that 31% of gastrointestinal diseases and 21% of respiratory infections may simply be prevented through handwashing.

Personal hygiene habits and behaviours may be influenced by many factors such as beliefs, values, habits, body image, socio-economic and cultural background, knowledge level, individual choices, diseases and physiological periods (menstruation, pregnancy, puerperality etc.), familial tendencies, the physical and social circumstances of the place where he lives or works. Therefore, every individual's hygiene habits are different (3, 15-17).

Although there are many studies on the personal hygiene habits of pupils from primary schools (1, 2, 8, 9, 18-23), there are very few studies on the personal hygiene habits of university students in the literature (24-26).

Health care-associated infections continue to be a threat to hospital patients. Personal hygiene practices of health-care personnel are the simplest and most effective measure for preventing nosocomial infections and cross-infections (12). Sports activities are also one of the practices affecting hygiene habits. Sport activities supply oxygen and nutrients to the muscles, and they remove the affluents from the body. These affluents gather on the skin which gets dirty very quickly. People should take a bath in order to get rid of dirt and other microorganisms on the skin, dermal pores and surface cells rashes (8). In this respect, it is necessary to make programs that educate health profession and physical education teachers more conscious about personal hygiene. Therefore, in this study, two different college students who were trained as health technicians and physical education and sports teachers were targeted. In this study, it was aimed to examine the personal hygiene habits of university students from Isparta Vocational School of Health Services, Suleyman Demirel University in Isparta and from School of Physical Education and Sports, Mehmet Akif Ersoy University in Burdur according to their departments, economic status (income) and sex variables.

MATERIAL and METHOD

This descriptive study involved a total of 209 volunteer students (49% of target population) from Isparta Vocational School of Health Services, Suleyman Demirel University in Isparta and from School of Physical Education and Sports, Mehmet Akif Ersoy University in Burdur. The data in the study were collected by means of questionnaire by the researcher in April 2015 and official permission was gained from the schools so that the study could be conducted. The study was conducted based on voluntariness and only those students who agreed to fill in a questionnaire form were involved in the study. Names and other identity information were not included in the forms and the study was conducted during the weekdays when there were not any exams. Likewise the years of education of the students participating in the study are not noted. The students were informed about the study prior to the application. Verbal consent was obtained from the students and they were informed about the study prior to the application.

According to the importance of the hygiene habit, scores of 1, 2, 3 and 4 were given to each desired positive behavior in the questionnaire form. The other answers given for each question were rated as '0'. In order to analyze how the students' hygiene habits change depending on the descriptive characteristics, "total hygiene score" was calculated. Each hygiene habit was scored and these were added up to obtain the total hygiene score. And, a scale with a scoring range of 8 to 25 points. Poor score was considered to be a score < 10, and other scores categorized as good score 10-15, very good score 16-20 and excellent score >20. Scores for each hygiene habit are seen in Table 1 (27).

In the question form, which includes 11 questions, the first 3 question aim to find out descriptive qualities (department, sex, economic income) whereas the other eight aim to find out information related to personal hygiene habits. The questions

aimed to find out hand washing, foot washing, bathing, underwear changing, sock changing and tooth brushing frequency.

Statistical analyses were performed using SPSS software, version 16.0 (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA). In the statistical analyses, (f) represents frequency, (%) represents percentage. Chi-square (χ^2) procedures were applied in order to test the differences and $p < 0,05$ was accepted significant.

RESULTS

While 71.3% of the participants were from Isparta Vocational School of Health Services, 28.7% of them were from School of Physical Education and Sports. While 56.9% of the participants were female, 43.1% were male. The 24.4% of the participants had a family with a good income, 62.7% of them were from middle-income families; and 12.9% were from families with a low income (Table 2).

When the personal hygiene scores were analyzed according to the participant student's departments, it was determined that the personal hygiene habits did not alter according to the department variable ($p > 0.05$) (Table 3).

It was determined that the personal hygiene habits of the participants did differ significantly according to sex. Compared to the male students, the female students had personal hygiene scores significantly higher than the males ($p < 0.05$) (Table 4).

When the personal hygiene scores of the participants were analyzed according to their economic income level, it was found that personal hygiene habits did not differ according to economic income levels ($p > 0.05$) (Table 5).

DISCUSSION

In this study, which investigates the personal hygiene habits of some students who study at Isparta Vocational School of Health Services, Suleyman

Table 1. The scores included while calculating the total hygiene score on some hygiene habits of the students

Some Habits Related to Hygiene	Scoring	Some Habits Related to Hygiene	Scoring
Number of hand washing/day		Frequency of feet washing	
1 to 3 times	1	Fewer than one a day	1
4 to 6 times	2	Once a day	2
7 to 9 times	3	More frequent than 1 a day	3
10 or over.	4		
Duration of handwashing		Socks changing frequency	
<1 minute	1	Once every three days or less frequent	1
2 to 3 minutes	2	Every two days	2
>4 to 5 minutes	3	Once a day or more frequent	3
Frequency of bathing		Frequency of tooth brushing	
Once or twice a week	1	Once a day	1
3 to 6 times a week	2	Twice a day	2
Everyday or twice a day	3	3 times or more a day	3
Frequency of changing underwear		Frequency of changing a toothbrush	
Once or twice a week	1	Every six months or less frequent	1
Every other day	2	Every 2 to 5 months	2
Everyday or twice a day	3	Once a month	3

Table 2. The distribution of the participants according to their department, sex and economic income levels

		n	f
Department	Isparta Vocational School of Health Services	149	71.3
	School of Physical Education and Sports	60	28.7
	Total	209	100.0
Sex	Female	119	56.9
	Male	90	43.1
	Total	209	100.0
Economic income level	Good	51	24.4
	Middle	131	62.7
	Low	27	12.9
	Total	209	100.0

Table 3. The comparison of the participants' personal hygiene scores according to their departments

Department	Frequency and percent value	Hygiene score			X ²	p
		10 to 15 points	16 to 20 points	21 points and over		
Isparta Vocational School of Health Services	f %	37 24.8	91 61.1	21 14.1	2.230	.328
School of Physical Education and Sports	f %	20 33.3	30 50.0	10 16.7		
Total	f %	57 27.3	121 57.9	31 14.8		

Table 4. The comparison of the personal hygiene scores of the participants according to sex

Sex	Frequency and percent value	Hygiene score			X ²	p
		10 to 15 points	16 to 20 points	21 points and over		
Female	f	21	78	20	12.909	.002
	%	17.6	65.5	16.8		
Male	f	36	43	11		
	%	40.0	47.8	12.2		
Total	f %	57 27.3	121 57.9	31 14.8		

Table 5. The comparison of the personal hygiene scores of the participants according to their economic income levels

Economic income level	Frequency and percent value	Hygiene score			X ²	p
		10 to 15 points	16 to 20 points	21 points and over		
Good	f	15	24	12	6.886	.142
	%	29.4	47.1	23.5		
Middle	f	32	82	17		
	%	24.4	62.6	13.0		
Low	f	10	15	2		
	%	37.0	55.6	7.4		
Total	f %	57 27.3	121 57.9	31 14.8		

Demirel University in Isparta and School of Physical Education and Sports, Mehmet Akif Ersoy University in Burdur, it was determined that the personal hygiene habits of the participants did differ significantly according to sex; compared to the male students, the female students were found to have significantly higher personal hygiene scores ($p<0.05$). The findings from this study are similar to those in a study conducted by Kaya et al. (1) among 9th and 10th graders at a high-school in Ankara in order to determine the personal hygiene habits. Şimşek et al. (27) and Kırım and Hırça (28) conducted respective studies on high-school students and did not find a significant difference between the hygiene habits of the male and the female students. In other studies in which the personal hygiene habits of the students were investigated, the female students were found to be more sensitive as to hygiene habits such as handwashing and face washing in the morning, handwashing after meals, washing fruits or vegetables before eating, brushing teeth after breakfast, changing socks everyday and bathing more frequently (1, 25-27). Şimşek et al. (27) evaluated the results they found and pointed out that this was a reflection the behavioral patterns on the female students' part as a result of the society's expectation of them and added that this fact could lead to the males being characterized as the risk group because of the diseases which might emerge as a result of their inadequate hygiene.

Hands are the organs which have the most contact with the environment and thus the dirtiest in everyday life. Handwashing is the easiest, most effective and least costly way to prevent diseases (29). Anderson et al. (30) tried to determine the handwashing habits of the students at a university through observation. According to the results of this study, in which 1400 observations were done over a period of three weeks, 58.3% of the students were careful about their hand hygiene. In the same study, it was found that the female students washed their hands more often compared to the male students. In a study by Miko et al. (31), the female students (55.3%) were found to

wash hands five times or more a day compared to the male students (41.3%). Handwashing after toilet use was observed among the students in a study conducted by De Alwis et al. (32) on Malaysian medical students. As it was in the other studies, it was observed that the female students washed their hands more often and that the amount of bacteria on the door handle of the male rest room was more in number than those on the female rest room's door handle. It is possible to conclude that the female students are more sensitive about hand and foot hygiene compared to the male students according to the findings obtained in these studies.

People must have a bath as often as possible in order to remove parasites, dirt, dead cells and other compounds accumulated on the surface of the skin and to open skin pores. Bathing is not only important in terms of hygiene but also in terms of personal psychology. It contributes to general personal well-being and happiness (7). In a study by Arat et al. (33), it was determined that the female students washed their hair ($p<0.05$) and had baths more often in winter ($p<0.05$) compared to the male students. Again, in the same study, it was found that there was a significant difference (0.01) in favor of the female students as to the frequency of underwear and clothes and according to the comparison of hand hygiene in terms of sex it was found out that the female students washed their hands more often upon returning home from school ($p<0.05$). According to the results of this study, it may be concluded that the female students are more sensitive about body hygiene and care compared to the male students. It was determined in other studies conducted on students' personal hygiene habits that the female students, compared to the male students, were better as to body hygiene and were found to have baths more often (1, 26, 27, 29, 31).

Today, one of the most important public health concerns is dental cavities. It is pointed out that prevention of periodontal diseases is more important than treatment and the easiest way of which is to have

a good oral hygiene. In a study by Arat et al. (33), it was found out that there was a significant difference in favor of female students as to the frequency of tooth brushing according to sex ($p < 0.05$). When other studies were analyzed, it was observed that the female students were more sensitive about tooth brushing compared to the male students (25, 34).

In this study, after examining the personal hygiene scores of the participants according to the department, it was determined that department variable did not have an impact on personal hygiene habits ($p > 0.05$). However, it is among the striking findings in our study that while it was expected that the students from Isparta Vocational School of Health Services to have higher scores than those from School of Physical Education and Sports, it was seen that they had similar hygiene scores. Isparta Vocational School of Health Services students are expected to be role models by the nature of their occupational position and therefore, such an expectation that they should have higher scores is only natural. The fact that there were not any significant differences between personal hygiene scores according to schools students study at is in contradiction with the findings that “the average personal hygiene scores of students from Health Vocational High School is lower compared to those of the students from general high-schools” presented by Şimşek et al. (27). Karaoğlu and Pehlivan (35) attributed this to the fact the courses the students were studying did not have much positive effect on their knowledge and practice level, which meant that the courses did not reach the goal. Coşgun and Kara (36) determined that positive behavioral changes observed among the students after the hygiene training given to some secondary students was not much compared to the increase in their knowledge level. In their opinion, students’ knowledge, attitude and behaviors related to health may be influenced positively through a health training. However, the fact that behavioral changes require a longer time to happen necessitate that health education at schools must be permanent and instructors must be

supportive of students about good hygiene habits and be role models for them. This finding explains why students from a medical vocational high-school did not have the expected level of hygiene scores.

When the personal hygiene scores of the students taking part in the study were analyzed according to their economic income level, it was found that the personal hygiene habits did not differ according to their economic income level ($p > 0.05$). In another study conducted in two schools which were of different socio-economic status in Ankara, it was found out that the students from one of the schools, which was located in a quarter with a relatively higher socio-economic status generally washed their hands more often than those who were studying at the other school, which was located in a socio-economically low quarter (18). In a study by Doğan (37), 50 elementary school pupils were examined for coliforms, which are the indicator of fecal contamination and it was determined that the socio-economically low group had significantly more contamination. These results do not have any resemblance to the ones we obtained in our study. The findings in this study are not close to the ones obtained in ours. This fact makes one think that the health education which university students are given in high-school or primary school contributes positively to personal hygiene habits independent of the socio-economic background. However, both in this study and the others reviewed indicate that students do not have adequate knowledge as to personal hygiene and it is essential that hygiene practices, which the foremost behaviors required to prevent diseases, be developed and improved.

Personal care and hygiene are one of the most important circles in the cleaning chain which spreads from the individual to the general. In order to prevent cross contamination in common areas, to be good in relation between people, to feel good, and to have a positive external appearance, both healthcare technicians and sportsmen should give importance to personal hygiene. Particularly intense

physical activity in the sportsmen causes the amount of sweat coming out of the body to increase. In this case, bathing should be done and underwear should be changed. In the light of all this information, it is concluded that training programs about hygiene must be planned and given so that students studying at the schools where our study was conducted can adopt positive personal hygiene habits. Such training programs must be more comprehensive and take longer periods especially in areas with a low socio-economic level where good hygiene practices are usually inadequate.

To conclude with, female students are more sensitive as to personal hygiene practices compared to male students. On this basis, it may be suggested that the personal hygiene habits of male students

be improved and both families and teachers be responsible as regards this issue. In order to develop positive behavioral changes among students with regard to personal hygiene, seminars and conferences may be held by experts, various educative sources (posters, brochures, booklets etc.) involving practical hints may be provided for students, school staff and families; school counselling services may hold educative activities for students with regard to personal hygiene. Educative public service ads on personal hygiene may be broadcast on mass media especially on television. In addition to these, whether positive personal hygiene habits are developing at schools must be monitored, which, we think, might also enhance desired hygiene behaviors.

REFERENCES

1. Kaya M, Büyükşerbetçi M, Meriç MB, Çelebi AE, Boybeyi Ö, Işık A, et al. Ankara'da bir lisenin 9. ve 10. sınıf öğrencilerinin kişisel hijyen konusunda davranışlarının belirlenmesi. *STED*, 2006; 15 (10): 179-83.
2. Aslan D, Mermerkaya MU, Kaya FE, Kaya H, Esen E, Koban Y, et al. Ankara'da bir ilköğretim okulunda el yıkama konusunda yapılmış olan bir müdahale çalışması. *J Med Sci*, 2006; 26 (2): 157-62.
3. Ulusoy MF, Görgülü RS. Hemşirelik Esasları-Temel Kuram, Kavram İlke ve Yöntemler. 3. Baskı. Ankara: TDFO LTD. Ştd, 1997.
4. Bilici S. İlköğretim çocukları için el hijyeni. Ankara: Sağlık Bakanlığı-Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 2008.
5. Güler Ç. Hijyen, çevre ve halk sağlığı. 1. Ulusal Ev İdaresi Kongresi. 21-23 Ekim, Ankara. 1998.
6. Ulusoy MF, Görgülü RS. Hemşirelik Esasları-Temel Kuram, Kavram İlke ve Yöntemler. 5. Baskı. Ankara: 72 TDFO Ltd. Şti., 2001.
7. Güler Ç. Kişisel hijyen. *TSK Kor Hek Bül*, 2004; 3 (6): 119-32.
8. Önsüz MF, Hıdıroğlu S. İstanbul'daki farklı iki ilköğretim okulundaki öğrencilerin kişisel hijyen alışkanlıklarının belirlenmesi. *Adnan Menderes Üni Tıp Fak Derg*, 2008; 9 (1): 9-17.
9. Yılmaz E, Özkan S. Bir ilçede farklı yerleşim yerindeki ilköğretim okulu öğrencilerinin kişisel hijyen alışkanlıklarının karşılaştırılması. *Fırat Sağ Hiz Derg*, 2009; 4 (10): 1-18.
10. Nenstiel RO, White GL, Aikans T. Clinical alert: handwashing-a century of evidence ignored. *Clin Rev*, 1997; 7 (1): 55-8.
11. Grene VW. Personal hygiene and life expectancy improvements since 1850: historic and epidemiologic associations. *Am J Infect Control*, 2001; 29: 203-6.
12. Pittet D. Improving adherence to hand hygiene practice: a multidisciplinary approach. *Emerg Infect Dis*, 2001; 7: 234-40.
13. Aiello AE, Coulborn R, Perez V, Larson EL. Effect of hand hygiene on infectious disease risk in the community setting: a meta-analysis. *Am J Public Health*, 2008; 98 (8): 1372-82.
14. Ejemot RI, Ehiri JE, Meremikwu MM, Critchley JA. Hand washing for preventing diarrhoea. *Evid.-Based Child Health*, 2009; 4: 893-939.

15. İnanç N, Hatipoğlu S, Yurt V, Avcı E, Akbayrak N. Hemşirelik esasları. Ankara: GATA Hastanesi, 1994.
16. Akşit B. Toplum, Kültür ve Sağlık. Bertan M, Güler Ç, ed. Halk sağlığı temel bilgiler içinde. II. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti., 1995. s. 15-25.
17. Görgülü RS. Hijyen ve sağlığımız. Actual Med, 2000; 8 (11): 36-43.
18. Güleç M, Topbaş M, Kır T, Hadse M. Ankara'da sosyoekonomik düzeyi farklı iki yerleşim yerindeki iki ilköğretim okulunda seçilen öğrencilerde el yıkama alışkanlıkları. Türk Hij Den Biy Derg, 2000; 57: 71-6.
19. Guinan M, Mc Guckin M, Ali Y. The effect of a comprehensive handwashing program on absenteeism in elementary schools. Am J Infect Control, 2002; 30 (4): 217-20.
20. Örsal Ö, Tezcan S, Çakır B, Tokur M, Gülmez G. Öğrencilerin kişisel temizlik bilgileri ve durumlarının değerlendirilmesi. 8. Ulusal Halk Sağlığı Kongresi. 23-28 Eylül, Diyarbakır. 2002.
21. Çan G, Topbaş M, Kapucu M. Trabzon'da iki farklı yerleşim yerindeki ilköğretim öğrencilerinin kişisel hijyen alışkanlıkları. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 2004; 3 (8): 170-7.
22. Çetinkaya S, Arslan S, Nur N, Demir ÖF, Özdemir L, Sümer H. Sivas il merkezi'nde sosyoekonomik düzeyi farklı üç ilköğretim okulu öğrencilerinde kişisel hijyen alışkanlıkları. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi, 2005; 14 (10): 229- 36.
23. Kaya M, Aslan D. Ankara'da bir ilköğretim okulunda el yıkama konusunda bir müdahale çalışması. Erciyes Tıp Dergisi, 2009; 31 (2): 135-143.
24. Wong TW, Wai-San Tam W. Handwashing practice and the use of personal protective equipment among medical students after the SARS epidemic in HongKong. Am J Infect Control, 2005; 33 (10): 580-6.
25. Yetkin A, Yiğitbaş Ç. Sağlık yüksekokulu birinci ve dördüncü sınıf öğrencilerinin bireysel hijyen ile ilgili alışkanlıklarının karşılaştırılması. Atatürk Üni Hemşir Yüksekokul Derg, 2008; 11 (2): 71-84.
26. Erkal S, Şahin H. An application on determining hygiene behaviors of university students. Int J Bus Soc Sci, 2011; 2 (8): 170-6.
27. Şimşek Ç, Piyal B, Tüzün H, Çakmak D, Turan H, Seyrek V. Ankara il merkezindeki bazı lise öğrencilerinde kişisel hijyen davranışları. TSK Kor Hek Bül, 2010; 9 (5): 433-40.
28. Kırım C, Hırça N. Lise öğrencilerinin kişisel hijyen ve temizlik alışkanlıklarının fen okur-yazarlığına göre değerlendirilmesi. Bartın Üni Eğitim Fak Derg, 2015; 4 (2): 790-802.
29. Üner S, Sevensan F, Başaran E, Balcı C, Bilaloğlu B. Bir sağlık ocağına başvuran kişilerin sosyal el yıkama ile ilgili bazı bilgi ve tutumların saptanması. TSK Kor Hek Bül, 2009; 8 (3): 207-16.
30. Anderson JL, Warren CA, Perez E, Louis RI, Phillips S, Wheeler J, et al. Gender and ethnic differences in hand hygiene practices among college students. Am J Infect Control, 2008; 36 (5): 361-8.
31. Miko BA, Cohen B, Conway L, Gilman A, Seward SL, Larson E. Determinants of personal and household hygiene among college students in New York City. Am J Infect Control, 2011; 40: 940-5.
32. De Alwis WR, Pakirisamy P, San LW, Xiaofen EC. A study on hand contamination and hand washing practices among medical students. ISRN Public Health, 2012; 1-5
33. Arat A, Şimşek I, Erdamar G. Yatılı ilköğretim bölge okulu II.kademe öğrencilerinin kişisel hijyen uygulamaları. Gazi Üniv Endüst Sanat Eğit Fak Derg, 2014; 33: 58-72.
34. Taani DS, al-Wahadni AM, al-Omeri M. The effect of frequency of toothbrushing on oral health of 14-16 years old. J Irish Dent Assoc, 2003; 49: 15-20.
35. Karaoğlu L, Pehlivan E. Malatya il merkezinde farklı programlardaki lise son sınıf öğrencilerinin sağlıkla ilgili bilgi, tutum ve uygulamalarının incelenmesi. Turgut Özal Tıp Merk Derg, 1997; 4 (4): 391-8.
36. Coşgun M, Kara F. Öğrencilere verilen sağlık eğitiminin bilgi ve davranışlarına etkisinin değerlendirilmesi. Sürekli Tıp Eğit Derg, 2015; 24 (2): 55-63.
37. Doğan F. Farklı sosyo-ekonomik düzeyindeki ilkököl çocuklarında el kirliliği araştırması. Ege Tıp Dergisi, 1991; 30 (2): 264-6.

Enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifika sınavı amacına ulaştı mı?

Has the infection control nursing certificate exam reached its purpose?

Can Hüseyin HEKİMOĞLU¹, Selahattin GELBAL²

ÖZET

Amaç: Uzaktan eğitim tekniği ile yürütülmeye başlanan teorik eğitimleri ve ardından eğitim merkezlerinde gerçekleştirilen uygulamalı eğitimleri başarı ile tamamlayan enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifikalı eğitim programına katılan kursiyerlerin uzaktan 'online' sınav tekniği ile girdikleri bitirme sınavının geçerlik ve güvenilirliği ve amacına ulaşip ulaşmadığı bilinmemektedir. Bu kesitsel araştırmanın amacı enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifika sınavının amacına ulaşip ulaşmadığının belirlenmesidir. Bu araştırma enfeksiyon kontrol hemşireliği sınavının genel bir değerlendirmesini sağlayarak hem sınavın geliştirilmesine hem de eğitim programının değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır. Bundan sonraki eğitim ve sınavlar için geri bildirim sağlaması açısından araştırmanın sonuçları önemlidir.

Yöntem: Bu amaçla 12 Nisan 2019 tarihinde 'online' olarak gerçekleştirilen testin güvenilirliği, test istatistikleri ve madde analizleri incelenmiştir. Eğitim programına kabul edilen toplam 318 kursiyer arasından teorik ve pratik eğitimi başarı ile tamamlayarak sınava girme hakkı kazanan 266 kursiyerin tamamı sınava girmiş ve sınavı tamamlamıştır. Araştırmaya sınava katılan 266 kursiyerin tamamı alınmıştır.

Bulgular: Testten alınan ortalama ham puan 56,85

ABSTRACT

Objective: It is not known whether the infection control nursing trainees who completed both the theoretical trainings with distance education technique and the practical trainings in training centers successfully have reached the validity and reliability and the purpose of the final exam that they have taken with the 'online' test technique. The aim of this cross-sectional screening study is to determine whether the infection control nursing certification 'online' exam which held on 12 April 2019 has reached its goal. This research will provide an overall assessment of infection control nursing exam and will contribute to both the development of the exam and the evaluation of the training program. The results of the research are important to provide feedback for further training and examinations.

Methods: For this purpose, the reliability of the test, test statistics and item analysis were evaluated. Out of a total of 318 trainees admitted to the training program, 266 trainees who successfully passed the theoretical and practical training successfully took the exam. All 266 trainees participated in the study.

Results: The mean raw score from the test was 56.85 ± 9.45 and 120 (45%) of trainees were successful and 146 (55%) were unsuccessful. The percentage of success is

¹Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı, Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonların Önlenmesi ve Kontrolü Birimi, Ankara
²Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Eğitim Bilimleri Bölümü, Eğitimde Ölçme ve Değerlendirme Ana Bilim Dalı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Can Hüseyin HEKİMOĞLU
Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Adnan Saygun Cad. No:55 Ankara - Türkiye
Tel : +90 542 247 07 18 E-posta / E-mail : drchh@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 16.06.2019
Kabul Tarihi / Accepted : 20.08.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.37039

Hekimoğlu CH, Gelbal S. Enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifika sınavı amacına ulaştı mı?
Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 97-106

$\pm 9,45$ 'dir. Testte 120 (%45) kursiyer başarılı, 146 (%55) kursiyer başarısız olmuştur. Ham puanların standart hatası 3,35 ve güvenilirliği 0,874 bulunmuştur. Ham puanlara standart hata 4,0 alınarak eklendikten sonra kursiyerlerin %62 (n=165)'si başarılı ve %38 (n=101)'i başarısız bulunmuştur. Maddelerin ortalama gücü $0,71 \pm 0,23$ bulunmuştur. Test çoğunlukla kolay ve çok kolay maddelerden oluşmaktadır (n = 55, %69). Maddelerin ayıricılık güçleri ortalama $0,31 \pm 0,10$ 'dur. Olgu sorularının (n=13) diğer maddelere göre daha az doğru yanıtlandığı saptanmıştır (p<0,001).

Sonuç: Güvenirliğin yüksek, madde ayıricılık gücü ortalamasının $>0,30$ ve madde güçlüğünün ortalama 0,71 olması nedeniyle sınavın amacına uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Testin güvenilirliğini $>0,90$ düzeyine çıkarmak ve ayıricılık gücünü artırmak için testteki çok kolay ve çok zor maddeler yerine orta güçlükte maddeler seçilmelidir. Sınavın online olması nedeniyle beklenen tesadüfi hataların azaltılması için testin standart hatası ham puanlara eklenerek değerlendirme yapılmalıdır. Düşük test başarısı nedeniyle konunun uzmanlarınca eğitim ve başarı ölçütü yeniden değerlendirilmelidir. Eğitim kursiyerlerin olguları saptayabilme becerisini artırmaya yönelik olarak geliştirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Enfeksiyon kontrolü, madde analizi, güvenilirlik

lower than the previous exams. The standard error of the test raw scores was 3.35 and the reliability of the test was found 0.874. After adding the standard error as 4.0 to the raw scores, 62% (n = 165) of the trainees were successful and 38% (n = 101) of them were found to be unsuccessful. The mean power of the items is 0.71 ± 0.23 . The test consists mainly of easy and very easy items (n = 55, 69%). The mean of the item discriminative index of the test was found to be $0.31 (\pm 0.10)$. It was found that case items (n = 13) were answered correctly less than other items (p <0.001).

Conclusion: Since the high reliability of the test, the mean of the item discrimination index is >0.30 and the mean power of the items is 0.71, it is concluded that the exam is appropriate for its purpose. In order to increase the reliability of the test to >0.90 and increase the discriminative index, medium difficulty items should be selected rather than very easy and very difficult items. The evaluation of the test should be done by adding the standard error of the test to the raw scores to reduce the effect of the random errors that are expected to occur due to the fact that the exam is online. The low test success requires the re-evaluation of the training and achievement criterion by the experts. The training should be developed to increase the ability of trainees to identify cases.

Key Words: Infection control, item analysis, reliability

GİRİŞ

Sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlar, eski adıyla hastane enfeksiyonları, kontrol programları ve surveyansı 'Yataklı Tedavi Kurumları Enfeksiyon Kontrol Yönetmeliği'nin 2005 yılında yürürlüğe girmesi ile birlikte ülkemiz genelindeki tüm yataklı tedavi kurumlarında yürütülmeye başlanmıştır. İlgili yönetmelik gereğince tüm yataklı tedavi kurumlarında oluşturulan enfeksiyon kontrol komitelerinde enfeksiyon kontrol hemşireleri görevlendirilmektedir

(1). Enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifikalı eğitim programı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Eğitim ve Sertifikasyon İşlemleri Daire Başkanlığı tarafından yayınlanan 'Enfeksiyon Kontrol Hemşireliği Eğitim Standardı'na göre yürütülmektedir (2). Enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifikalı eğitimleri 2007 yılında başlamış olup en son eğitim 2018 yılında üç dönem olarak 318 kontenjanla Eylül 2018 - Ocak 2019 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir (3). Eğitimler

2017 yılına kadar Sağlık Bakanlığı tarafından yetkilendirilen eğitim merkezlerinde yapılırken, 2017 yılında itibaren eğitimin teorik kısmı uzaktan eğitim tekniği ile gerçekleştirilmekte olup; 15 iş günü süren pratik eğitimler eğitim merkezlerinde yürütülmektedir. Teorik eğitimde yedi modülde 40 konu 22 eğitimci tarafından anlatılmaktadır. 2018 yılı için toplam 17 ilde eğitim merkezi sayısı ikisi devlet hastanesi, 14'ü eğitim ve araştırma hastanesi ve 21'i üniversite hastanesi olmak üzere toplam 37'dir.

Teorik eğitimin uzaktan eğitim tekniği ile yürütülmeye başlanması ile birlikte eğitim programını bitirme sınavı (sertifika sınavı) uzaktan 'online' sınav tekniği ile yapılmaktadır. 2018 yılında yapılan eğitimler için sınav 12 Nisan 2019 tarihinde 10:00 - 11:40 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir. Toplam 100 dakika süren sınavda 80 çoktan seçmeli (5 seçeneqli) soru sorulmuştur. Sınavda yanlış doğruyu götürmemekte, her soru 1,25 puan olmak üzere değerlendirme 100 puan üzerinden yapılmaktadır. Sınavda 75 puan ve üzeri alanlar 'başarılı' kabul edilerek enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifikası almaya hak kazanmakta; 75 puanın altında alanlar bir sonraki eğitim döneminde yapılacak sınavta katılma hakkına sahip olmaktadırlar (2).

Uzaktan eğitim tekniği ile yürütülmeye başlanan teorik eğitimleri ve ardından eğitim merkezlerinde gerçekleştirilen uygulamalı eğitimleri başarı ile tamamlayan kursiyerlerin uzaktan 'online' sınav tekniği ile girdikleri bitirme sınavının geçerlik ve güvenilirliği ve amacına ulaşım ulaşmadığı bilinmemektedir. Sınavın amacı enfeksiyon kontrol hemşireliği eğitiminde edinilen kazanımların yeterliliğinin değerlendirilmesi ve enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifikası almayı hak eden kursiyerlerin belirlenmesidir. Bu araştırmanın amacı enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifika sınavının test istatistikleri, güvenilirliği ve madde analizlerinin değerlendirilmesiyle amacına ulaşım ulaşmadığının belirlenmesidir. Bu araştırma enfeksiyon kontrol hemşireliği sınavının genel bir değerlendirmesini

sağlayarak hem sınavın geliştirilmesine hem de eğitim programının değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır. Bundan sonraki eğitim ve sınavlar için geri bildirim sağlaması açısından araştırmanın sonuçları önemlidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma kesitel tipte bir araştırmasıdır. Kesitsel araştırmalarda betimlenecek özellikler tek seferde ölçülür (4). Bu araştırmada enfeksiyon kontrol sertifikalı eğitimine katılan kursiyerlerin enfeksiyon önleme ve kontrolüne yönelik bilgi ve becerileri aynı anda yapılan tek bir sınavla ölçülmüş ve bu sınavta ait sonuçlar değerlendirilmiştir. Eğitim programına kabul edilen toplam 318 kursiyer arasından teorik ve pratik eğitimi başarı ile tamamlayarak sınavta girme hakkı kazanan 266 kursiyerin tamamı sınavta girmiş ve sınavı tamamlamıştır. Araştırmaya sınavta katılan 266 kursiyerin tamamı alınmıştır. Veri toplama aracı uzaktan 'online' sınav tekniği ile 12 Nisan 2019 tarihinde gerçekleştirilen enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifika sınavının kendisidir. Kursiyerlerin sınavda sorulara verdikleri yanıtlar 'online' sınav yazılım programı tarafından kaydedilmiştir.

Araştırma verilerinin analizi Excel ve SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Versiyon 20 programında gerçekleştirilmiştir. Sınav ham puanlarının ortalama, standart sapma ve varyansı, maddelerin güçlüğü, maddelerin ayrıcılık gücü, sınavın iç tutarlılığı, sınav ham puanlarının standart hatası ölçütleri hesaplanmıştır. Olgu soruları ve diğer maddelerin güçlüğü Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Eğer p değeri <0,05 ise H0 hipotezi reddedilmiştir.

Bir maddenin güçlüğü, o maddeye doğru cevap verenler sayısının testi alanların sayısına oranıdır. Madde ayrıcılık gücü bir maddeyi (soruyu) bilenle bilmeyeni ayırt etme yüzdesidir. Madde güçlüğü 0,00 ile 0,19 arasındaysa madde çok zor, 0,20 ile 0,39 arasındaysa zor, 0,40 ile 0,59 arasındaysa orta güçlükte, 0,60 ile 0,79 arasındaysa kolay ve 0,80

ile 1,00 arasındaysa çok kolay olarak kategorize edilmiştir.

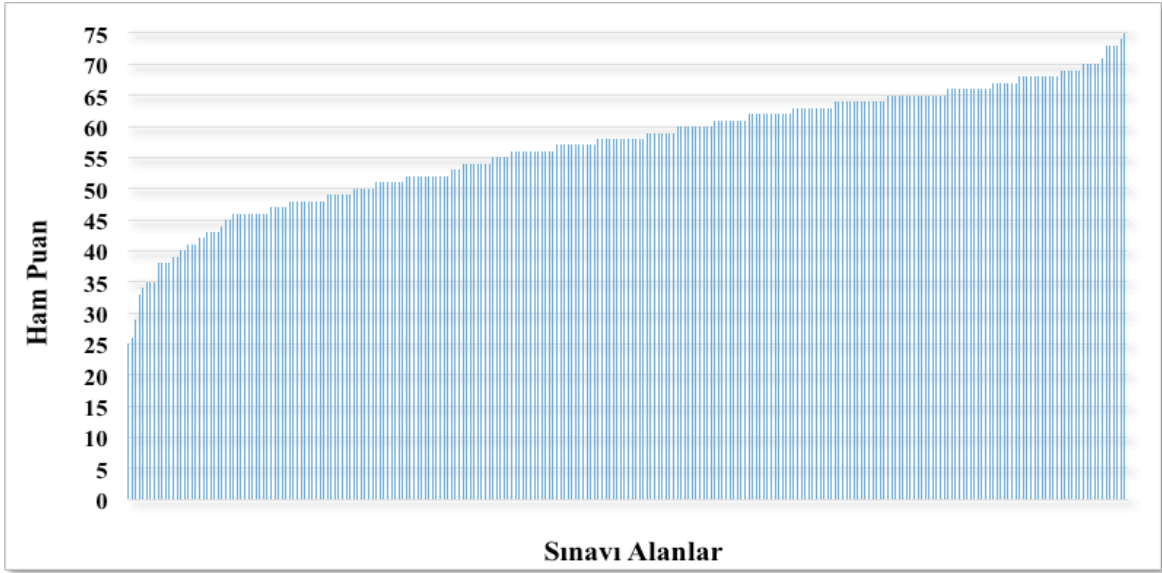
Sınava ait verilerinin elde edilmesi için Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nden yazılı olur alınmıştır.

BULGULAR

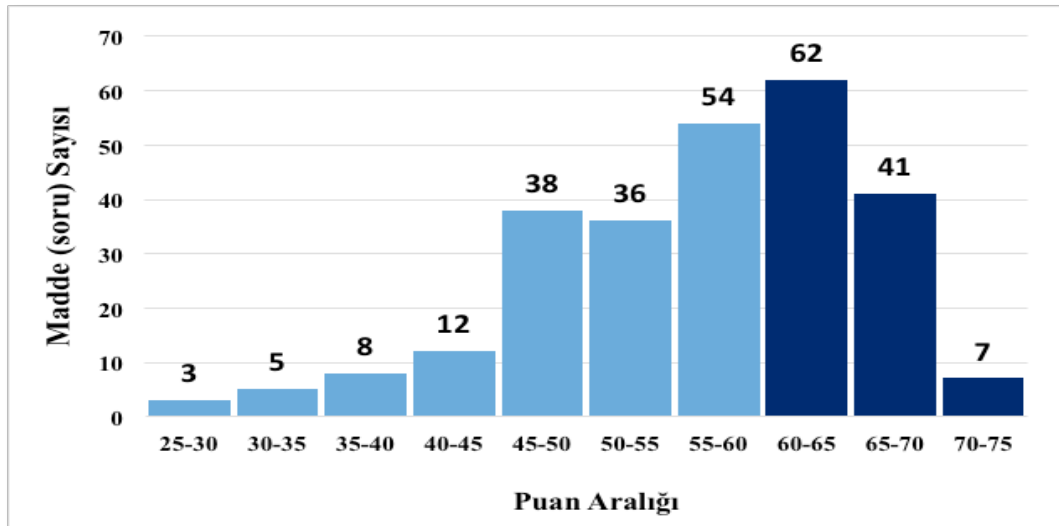
Testten alınan ortalama ham puan $56,85 \pm 9,45$

ve ortanca ham puan 58 (25-75)'dir. Ham puanların dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir.

Sınav başarısı 100 puan üzerinden değerlendirilmiş ve 75 puan başarı ölçütü kabul edilmiştir. Değerlendirme sonucunda 120 (%45) kursiyer başarılı, 146 (%55) kursiyer başarısız olmuştur. Ham puanların beş puanlı aralıklara göre dağılımı Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Ham puanların dağılımı

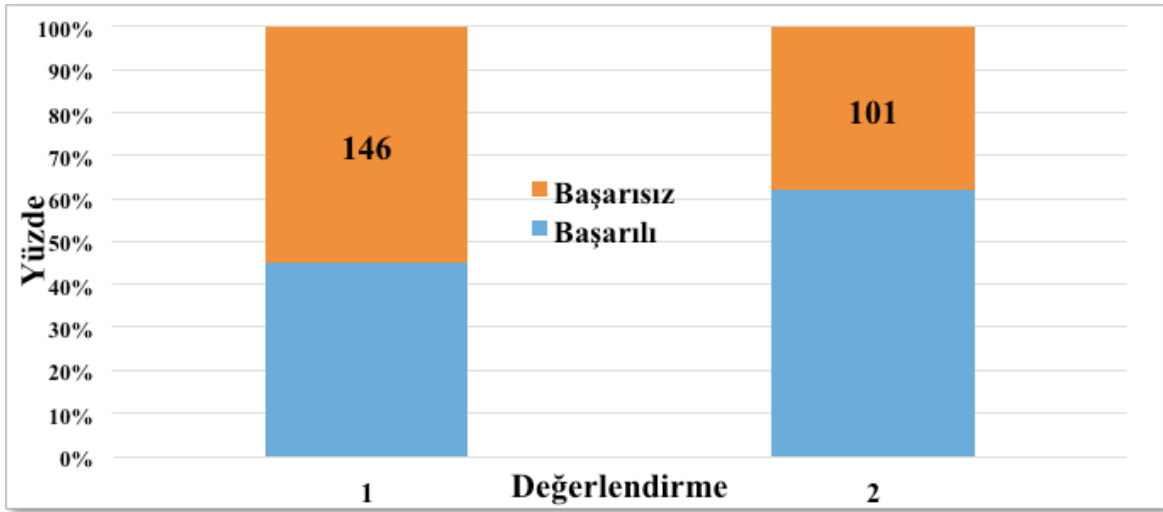


Şekil 2. Ham puanların beş puanlı aralıklara göre dağılımı

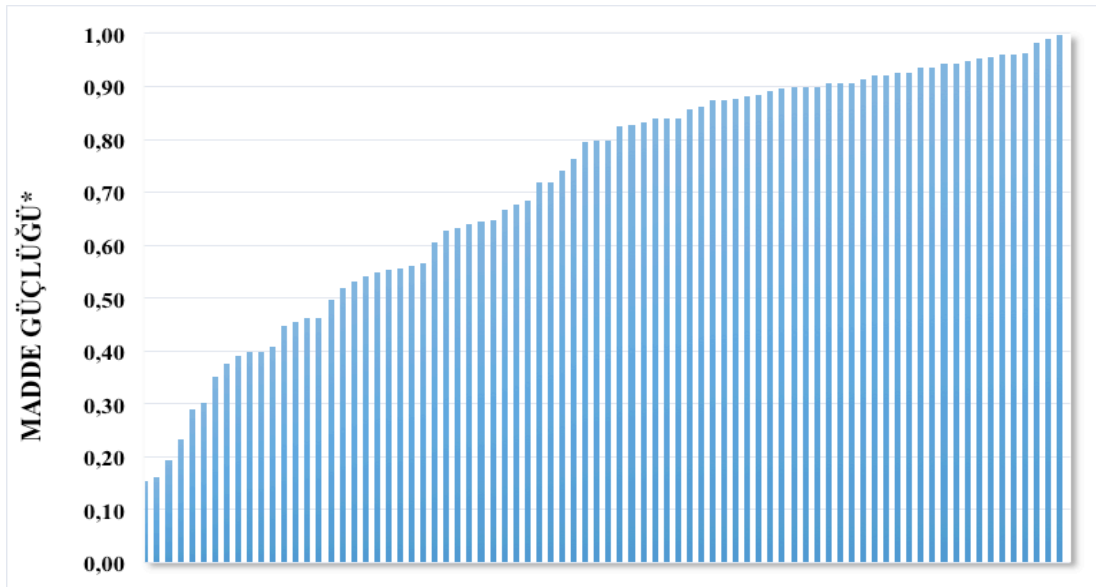
Hampuanların standart hatası 3,35 ve ortalama ham puanın %95 güven aralığı 50,28 - 63,43 bulunmuştur. Ham puanlara standart hata eklendikten sonra kursiyerlerin %62 (n=165)'si başarılı ve %38 (n=101)'i başarısız bulunmuştur. Standart hata eklenmeden ve eklendikten sonraki sınav değerlendirme Şekil 3'te gösterilmiştir.

Testin iç tutarlılığı anlamındaki güvenilirliği Kuder Richardson 20 formülü ile 0,874 bulunmuştur. Test

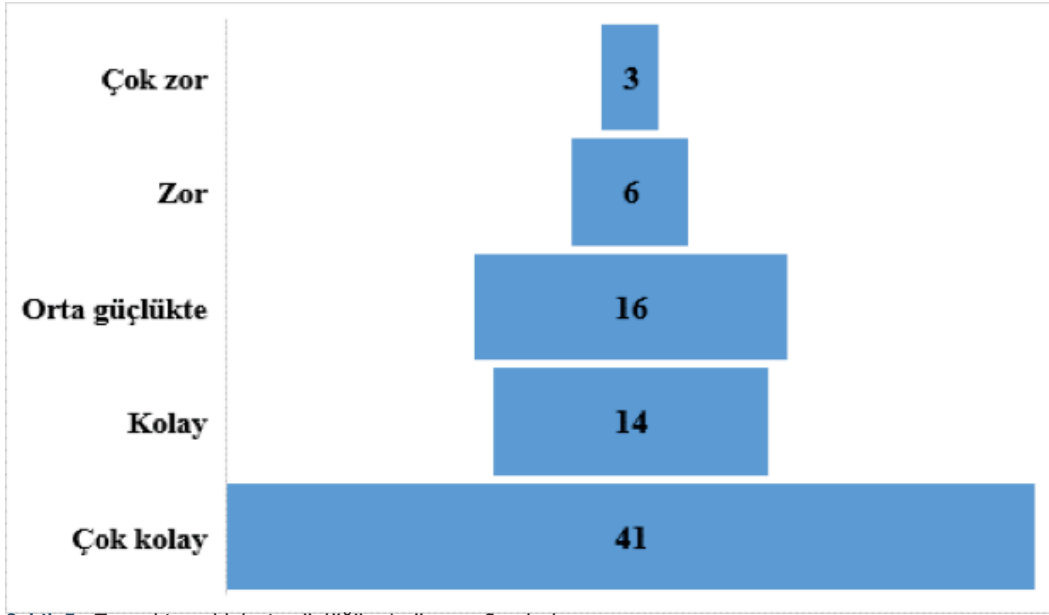
sorularının madde gücü ortalama 0,71 ($\pm 0,23$), ortanca 0,80 (0,15 - 0,99) bulunmuştur. Madde gücü dağılımı Şekil 4'te gösterilmiştir. Testteki maddelerin %20 (n=16)'si orta güçlükte, %51 (n=41)'i ise çok kolay maddelerden oluşmaktadır (Şekil 5). Genel olarak testin ağırlıklı olarak kolay ve çok kolay maddelerden (n=55, %69) oluştuğu görülmektedir. Zor ve çok zor maddelerin sayısı ise 9'dur.



Şekil 3. Standart hata eklenmeden (1) ve eklendikten sonra (2) sınav değerlendirmesi



Şekil 4. Testteki maddelerin güçlüğü'nün dağılımı

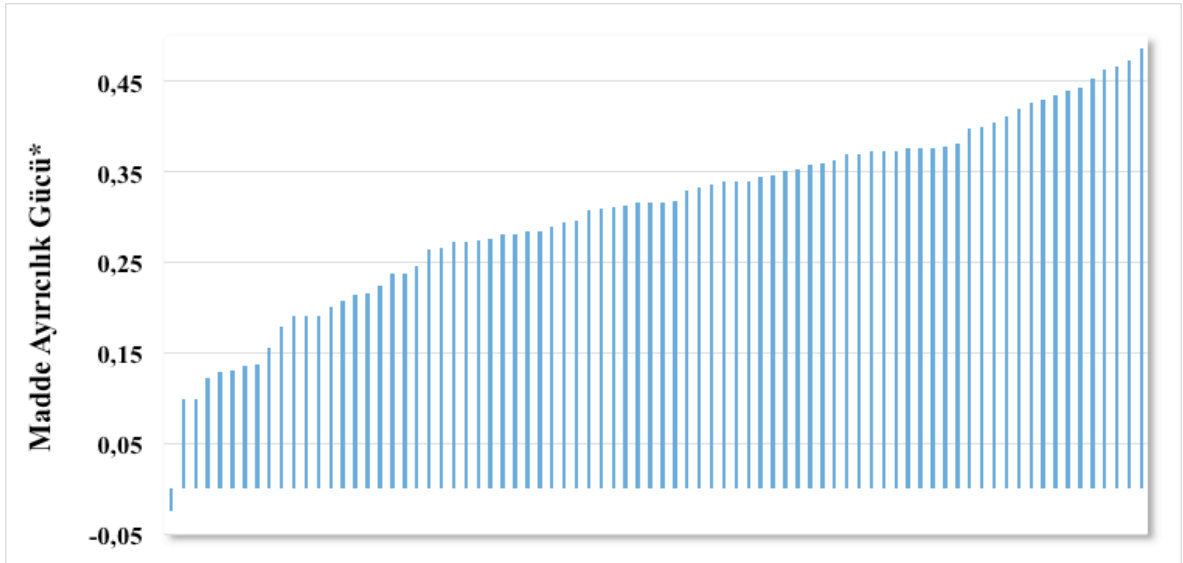


Şekil 5. Testteki maddelerin güçlüğüne* göre sınıflandırılması

* Bir maddenin güçlüğü, o maddeye doğru cevap verenlerin sayısının testi alanların sayısına oranıdır.

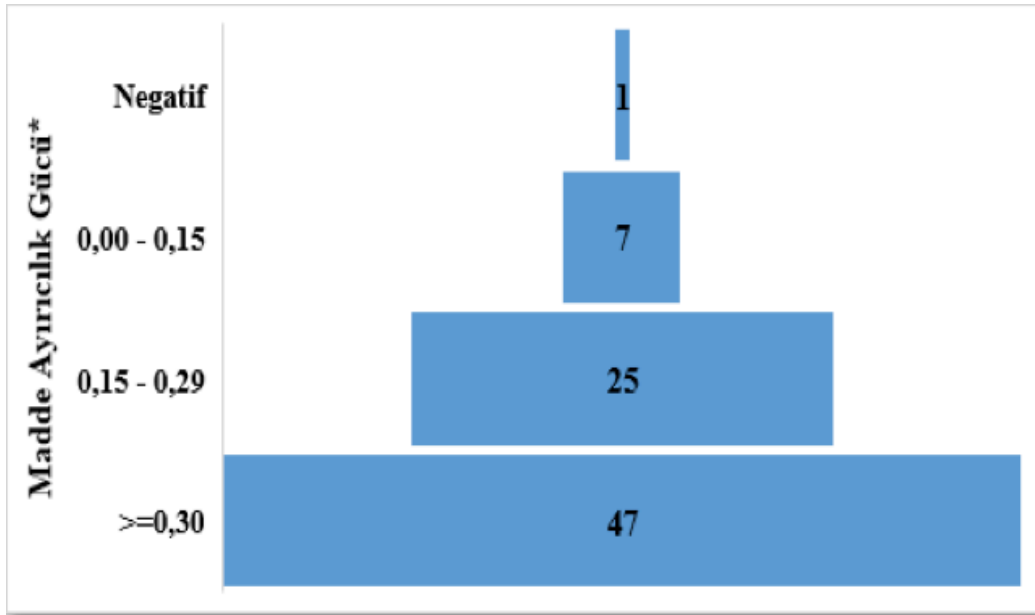
Testteki maddelerin ayıricılık güçleri ortalama $0,31 (\pm 0,10)$, ortanca $0,32 (-0,02 - 0,49)$ bulunmuştur. Madde ayıricılık güçlüklerinin dağılımı Şekil 6'da gösterilmiştir. Maddelerin %59 (n=47)'u $0,30$ ve

üzerinde ayıricılık gücüne sahipken, yalnızca bir maddenin ayıricılık gücü negatif bulunmuştur (Şekil 7).



Şekil 6. Madde ayıricılık güçlerinin dağılımı

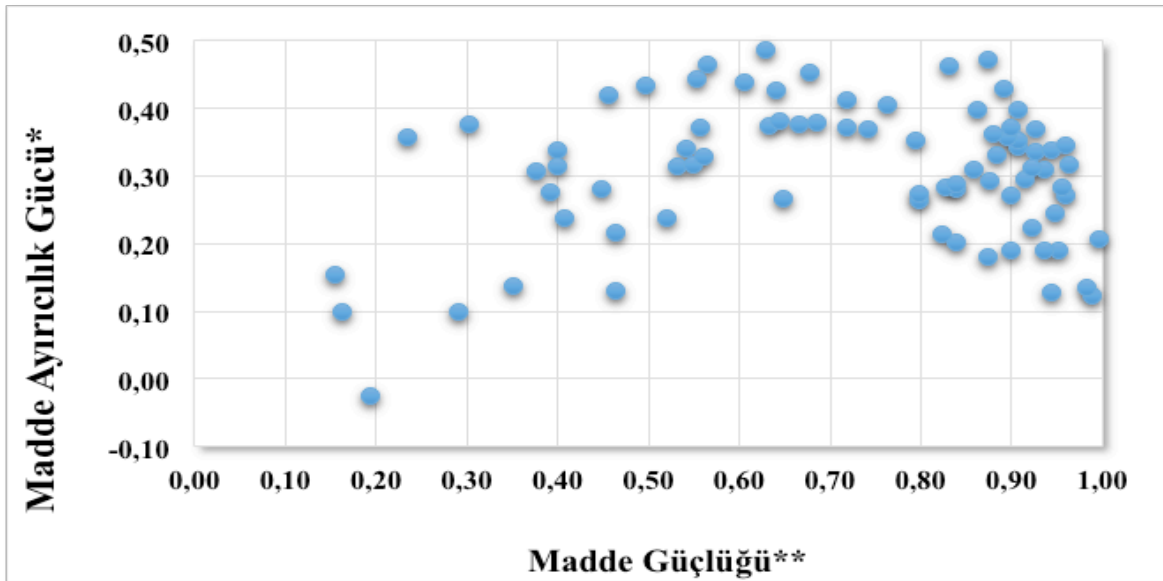
* Madde ayıricılık gücü bir maddeyi (soruyu) bilenle bilmeyeni ayırt etme yüzdesidir.



Şekil 7. Madde ayıricılık güçlerine göre maddelerin sınıflandırması

* Madde ayıricılık gücü bir maddeyi (soruyu) bilenle bilmeyeni ayırt etme yüzdesidir.

Maddelerin güçlüğü ile ayıricılık gücünün ilişkisi Şekil 8'deki serpm grafiğe gösterilmektedir.



Şekil 8. Maddelerin güçlüğü ile ayıricılık gücünün ilişkisi

* Madde ayıricılık gücü bir maddeyi (soruyu) bilenle bilmeyeni ayırt etme yüzdesidir.

** Bir maddenin güçlüğü, o maddeye doğru cevap verenlerin sayısının testi alanların sayısına oranıdır.

Olgu soruları diğer maddelerle karşılaştırıldığında madde güçlüğünün (doğru yanıt verenlerin oranının) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük olduğu saptanmıştır (Mann Whitney U test, $p < 0.001$). Olgu sorularının madde güçlüğü ortalama 0,43 iken, diğer soruların 0,76'tir (Şekil 9).

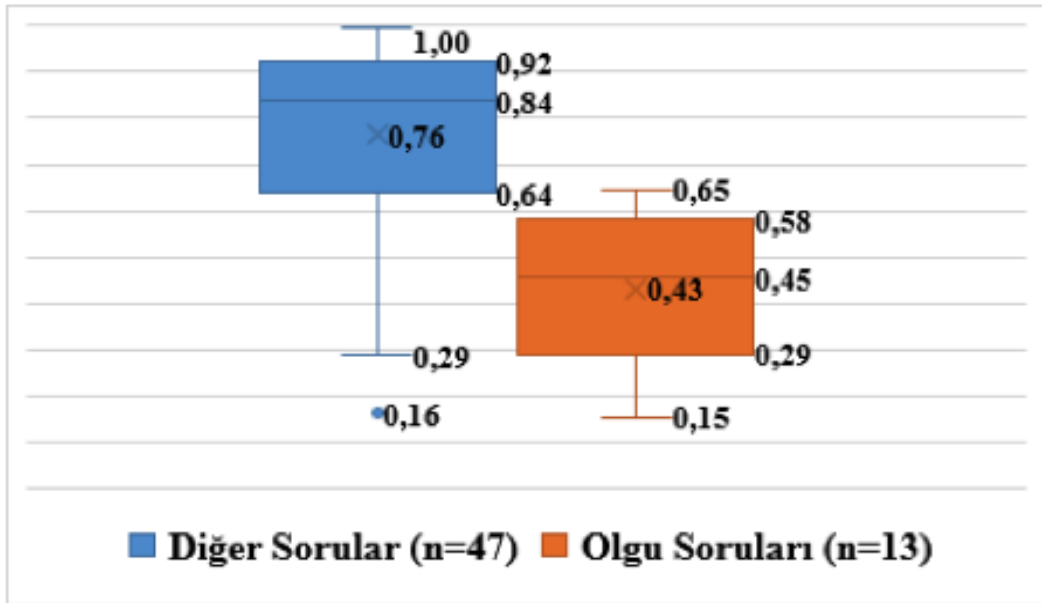
TARTIŞMA

Test sonucunda kursiyerlerin %45'inin başarısız olması beklentilerin altındadır. Testin genel olarak kolay olduğu ancak test puanlarının ortalama ve ortanca değerinin değerlendirmede kullanılan ölçütten düşük olduğu görülmektedir. Bu nedenle test başarısı yüksek bulunmamıştır (5-7).

Test ham puanlarına karışan tesadüfi hataların sınavın 'online' olması, mesai saatlerinde yapılması, kursiyerlerin 'online' uzaktan sınav tekniğine alışkanlıklarının farklılık gösterebilmesi gibi nedenlerle meydana gelmesi beklenmektedir. Bu tür hataların azaltılması için sınav öncesi bir

deneme sınavı yapılmıştır. Tesadüfi hatalar nedeniyle aslında başarılı olup başarısız bulunan kursiyerlerin olması istenmediği için nihai değerlendirme ham puanlara testin standart hatası 4,0'a yuvarlanarak yapılmıştır. Ancak bu durumda aslında başarısız olup başarılı olarak değerlendirilen kursiyerler bulunduğu unutulmamalıdır. (8, 9).

Testin geçerliğine ilişkin olarak; eğitim programında yer alan iki enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji profesörü ve bir çocuk enfeksiyon hastalıkları profesöründen oluşan bir komisyonca maddelerin konulara göre dağılımının ve ağırlıklarının belirlenmiş olması ve eğitimde yer alan tüm konulardan en az bir soru sorulmuş olması sınavın kapsam geçerliğinin yeterli olduğunu düşündürmektedir. Konunun uzmanları tarafından test maddelerinin hazırlanmış ve değerlendirilmiş olması ayrıca yapı geçerliğinin de yeterli olduğunun bir ölçütüdür. Ölçüt geçerliği ise herhangi başka bir ölçüt olmaması nedeniyle değerlendirilememiştir (9-11).



Şekil 9. Testteki olgu soruları ile diğer soruların tanımlayıcı istatistikleri

Testin iç tutarlılığı anlamındaki güvenilirliğinin 0,874 bulunmuş olması testin güvenilirliğinin yüksek ve testin benzer yeterliği ölçen maddelerden oluştuğunu göstermektedir. Ancak testin güvenilirliğini artırmak için madde analizlerine göre maddelerin düzenlenmesi faydalı olabilir (9, 11).

Ayırıcılık gücü $<0,30$ olan 33 maddenin 20 (%61)'si çok kolay madde olup, bu durum kursiyerlerin başarılı olmaları lehinedir. Çok zor 3 sorunun ayırt edicilik gücü beklenildiği gibi düşük bulunmuştur. Madde ayırıcılık gücü negatif bulunan madde tekrar incelenmiş, cevap anahtarında bir hata olmadığı görülmüştür. İlgili maddenin güçlüğü 0,19 (çok zor madde) olması nedeniyle, başarılı ve başarısız kursiyerlerin tümünün maddeyi cevaplamakta zorlandığı, başarısız gruptakilerin şans başarısının başarılı gruba göre daha yüksek olması nedeniyle maddenin ayırıcılık gücünün negatif bulunduğu düşünülmüştür. Madde ayırıcılığı $<0,20$ olan 13 maddenin 3'ü çok zor ve 7'si çok kolay maddedir (6, 7, 12, 13).

Testte toplam 13 tane olgu sorusu yer almaktadır. Bu maddeler Bloom taksonomisine göre kavrama düzeyinde sorulardır (8). Olgu soruları enfeksiyon kontrol hemşireliği günlük pratiğinde hastalarda gelişen sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonları tespit edebilme kazanımını ölçen maddeler olması nedeniyle özellikle önemlidir. Bu kapsamda olgu sorularında kursiyerlerin başarısının daha düşük olması eğitim programının geliştirilmesi açısından değerli bir bulgu

olmuştur. Eğitimin bu açıdan geliştirilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Bu araştırmada enfeksiyon kontrol hemşireliği sertifika sınavına eğitimi alan kursiyerlerin kendisinin katıldığı ve soruları yardım almadan yanıtladıkları varsayılmıştır. Testteki maddeler için çeldirici seçenek analizi yapılmamış olması bir kısıtlılıktır. Ayrıca kursiyerlerin eğitim programı dışında sınav başarılarına etki edebilecek yaş, meslek yılı, öğrenim derecesi, çalıştığı kurum türü gibi dışsal değişkenlerin etkisi incelenmemiştir.

Sonuç olarak testin güvenilirliğinin yüksek ve testin benzer yeterliği ölçen maddelerden oluştuğu belirlenmiş olsa da testin güvenilirliğini $>0,90$ düzeyine çıkarmak için testteki çok kolay ve çok zor soruların yerine orta güçlükte sorular seçilmelidir. Testin genel olarak kolay olması ancak test puanlarının ortalama ve ortanca değerinin değerlendirmede kullanılan ölçütten düşük olması sonucu gözlenen düşük test başarısı enfeksiyon önleme ve kontrolü konusunun uzmanlarınca değerlendirilmesi gerekmektedir. Testin ayırıcılık gücünü artırmak için özellikle çok kolay sorular yerine orta güçlükte sorular hazırlanmalıdır. Olgu sorularında kursiyerlerin gösterdiği başarısının daha düşük bulunması nedeniyle eğitim programının özellikle uygulamalı kısmında olguları saptayabilme kazanımına yönelik etkinliklere daha fazla ağırlık verilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Anonim. Yataklı Tedavi Kurumları Enfeksiyon Kontrol Yönetmeliği. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, 2005.
2. Anonim. Enfeksiyon Kontrol Hemşireliği Sertifikalı Eğitim Standardı. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, 2017.
3. Anonim. Sağlıkta Dönüşüm Programı, Hastane Enfeksiyonlarının Önlenmesi: Türkiye Deneyimi, Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, 2010.
4. Büyüköztürk Ş, Kılıç Çakmak E, Akgün ÖE, Karadeniz Ş, Demirel F. Eğitimde Bilimsel Araştırma Yöntemleri. 25.baskı. Ankara: Pegem Yayınları, 2018.
5. Büyüköztürk Ş, Kılıç Çakmak E, Akgün ÖE, Karadeniz Ş, Demirel F. Eğitimde Bilimsel Araştırma Yöntemleri. 25.baskı. Ankara: Pegem Yayınları, 2018.
6. Turgut MF, Baykul Y. Eğitimde Ölçme ve Değerlendirme. 7. Baskı. Ankara: Pegem Akademi Yayıncılık, 2015.
7. Tekin H. Eğitimde Ölçme ve Değerlendirme. 27. Baskı. Ankara: Yargı Yayınevi, 2018.
8. Baykul Y. Eğitimde ve Psikolojide Ölçme: Klasik Test Teorisi ve Uygulaması. 3. Baskı., Ankara: ÖSYM Yayınları, 2015.
9. Büyüköztürk Ş, Çokluk Ö. Köklü N. Sosyal Bilimler İçin İstatistik. 19. Baskı. Ankara: Pegem Akademi Yayıncılık, 2017.
10. Baykul Y. İstatistik Metodlar ve Uygulamalar. 1. Baskı. Ankara: Anı Yayıncılık, 1999.
11. Baykul Y, Gelbal S, Kelecioğlu H. Anadolu Öğretmen Liseleri İçin Eğitimde Ölçme ve Değerlendirme. 1. Baskı. Ankara: M.E.B. Devlet Kitapları, 2001.
12. Özçelik DA. Test hazırlama kılavuzu. 5. Baskı. Ankara: ÖSYM Yayınları, 2013.
13. Erkuş A. Psikometri Üzerine Yazılar. 1. Baskı. Ankara: Türk Psikologlar Derneği Yayınları, 2003.

PAK4, MCF-7 hücrelerinde E-kaderini baskılayarak PKC-bağımlı invaziv potansiyeli destekler

PAK4 promotes invasive potential of MCF-7 cells in PKC-dependent manner through downregulation of E-Cadherin

Suray PEHLİVANOĞLU¹, Çiğdem AYDIN-ACAR²

ÖZET

Amaç: Normal meme epitel hücrelerinde p21 ile aktive edilen kinaz 4 (PAK4) overekspresyonu sağlandığında tek başına tümörigenezis sürecini başlatabilmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, PAK4'ün meme kanserinde önemli bir onkojenik faktör olabileceğini ileri sürmektedir. Bu çalışmada, PAK4 overekspresyon eden ve etmeyen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde protein kinaz C aktivasyonu ve inhibisyonuna bağlı hücrelerin migrasyon kabiliyeti ve hücre-hücre kontaktını sağlayan E-Kaderin ekspresyon düzeylerinin araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Çalışmada, meme kanseri modeli olarak MCF7 hücre hattı kullanıldı. MCF7 hücrelerinde PAK4 plazmid kullanılarak yabancıl-tip insan PAK4 geninin ektopik ekspresyonu sağlandı. Kontrol vektör olarak ise p3XFLAG-CMV-10 plazmidini kullanıldı. PKC inhibitörü olarak RO318220 ve PKC aktivatörü olarak ise phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA / TPA) kullanıldı. PAK4 plazmid ve kontrol vektör ile transfekte edilen her iki gruptaki hücreler %0,2 FBS, %10 FBS, RO318220 (5µM) ve TPA (200 nM) olacak şekilde 48 saat süre ile kültüre edildi. Meme kanseri hücrelerinde hücre migrasyonu, Oris Hücre migrasyon deneyi ile değerlendirildi. E-kaderin ekspresyonunun değerlendirilmesi için Western blot yöntemi kullanıldı.

ABSTRACT

Objective: The p21-activated kinase 4 (PAK4) overexpression is sufficient to initiate the tumorigenesis process in normal breast epithelial cells. Recent studies suggested that PAK4 could be an important oncogenic factor in breast cancer. The aim of this study was to investigate the migration ability of cells due to protein kinase C activation and inhibition and the expression levels of E-cadherin which provides cell-cell contact in MCF-7 breast cancer cells that PAK4 overexpressing and non-overexpressing cells.

Methods: MCF7 cell line was used as a breast cancer model. Ectopic expression of the wild-type human PAK4 gene was achieved using PAK4 plasmid in MCF7 cells. Plasmid p3XFLAG-CMV-10 was used as control vector. RO318220 was used as PKC inhibitor and phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA / TPA) was used as PKC activator. Cells in both groups transfected with PAK4 plasmid and control vector were cultured for 0.2 h FBS, 10% FBS, RO318220 (5µM) and TPA (200 nM) for 48 hours. Cell migration in breast cancer cells was evaluated by Oris cell migration assay. Western blot method was used to evaluate the expression of E-cadherin.

¹ Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Konya
² Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Bucak Sağlık Yüksekokulu, Burdur



İletişim / Corresponding Author : Suray PEHLİVANOĞLU

Necmettin Erbakan Üni., Fen Fak., Mol. Biyo. ve Gen. Böl., B0-Blok No: 208 Konya - Türkiye
Tel : +90 505 900 58 06 E-posta / E-mail : spehlivanoglu@erbakan.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 08.01.2020
Kabul Tarihi / Accepted : 30.01.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.33340

Pehlivanoglu S, Aydın-Acar Ç. PAK4, MCF-7 hücrelerinde E-kaderini baskılayarak PKC-bağımlı invaziv potansiyeli destekler
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 107-116

Bulgular: Yüksek PAK4 ekspresyonu sağlanan MCF7 hücrelerinde mezenkimal-benzer fenotipin meydana geldiği ve podozomal yapıların sayılarının ve uzunluklarının arttığı belirlendi. Ayrıca TPA ile PKC aktivasyonu sağlanan hücrelerde PAK4 overekspresyonuna bağlı hücre migrasyonunda artış görüldü. Fakat PKC ile indüklenen invaziv etkiler PKC inhibitörü olan RO318220 ile muamele edilen hücrelerde bloke edildi. Bunun yansıması, PAK4 overekspresyon eden hücrelerde kontrole göre E-kaderin ekspresyonunda baskılanma meydana geldiği belirlendi.

Sonuç: E-kaderin, hücre-hücre kontaktını sağlayan ve hücre göçünü engelleyen temel yapılardan biridir. Birlikte değerlendirildiğinde, bu bulgular PKC ile aktive edilen PAK4 sinyalinin meme kanseri progresyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu nedenle, sonuçlarımız PKC-PAK4 sinyal yolağının inhibe edilmesinin meme kanseri tedavisi için potansiyel bir terapötik yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, PAK4, Protein kinaz C

Results: It was determined that mesenchymal-like phenotype was formed and the number and length of podosomal structures were increased in these PAK4 overexpressed cells. In addition, PKC activation via TPA treatment increased cell migration due to PAK4 overexpression. However, PKC-induced invasive effects were blocked by the PKC kinase inhibitor RO318220. In addition, PAK4 overexpression leads to downregulation of E-cadherin compared to control.

Conclusion: E-cadherin is one of the basic structures that provide cell-cell contacts and prevent cell migration. Taken together, these findings suggest that PKC-activated PAK4 signalling contributes to breast cancer progression. Therefore, our results show that inhibition of the PKC-PAK4 signaling pathway may be a potential therapeutic approach for the treatment of breast cancer.

Key Words: Breast cancer, PAK4, Protein kinase C

GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda kanserin sebebiyet verdiği ölümler arasında birinci sırada yer almaktadır. 2019 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde 268.600 kişi yeni tanı almış ve 41.760 kişi meme kanserinden hayatını kaybetmiştir (1). Günümüzde meme kanseri tedavisinde yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmektedir (2). Buna rağmen kanser tedavisi açısından etkili yöntemlere halen ihtiyaç duyulmaktadır. Genelde kansere bağlı ölümlerin ana nedeni metastazdır (3). Kanser metastazının biyolojik temellerinin daha iyi anlaşılması daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayacaktır. Bu bağlamda tanıya dayalı metastatik belirteçlerin tanımlanması ve bu belirteçlerin mekanizmasının anlaşılması, kanser hastaları için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için temel sağlayabilir.

PAK ailesi hem onkogeneizde hem de kanser progresyonunda rol oynayan bir serin-treonin kinaz ailesidir. Bu ailenin üyeleri grup-1 (Pak1-3) ve grup 2 (Pak4-6) olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. PAK protein ailesinin 2. grubunda yer alan PAK4 (P21-activated kinase 4), en iyi karakterize edilmiş üyesidir ve ilk olarak CDC42 sinyal yolağında filopodia oluşumunu kontrol eden hücre iskeletini düzenleyici proteinlerin araştırılmasının ardından keşfedilmiştir (4-7). PAK4 embriyonik süreçte ve doku gelişiminde temel olmakla birlikte, normal erişkin dokuların büyük bir kısmında belirgin düzeyde ifade edilmemektedir (8, 9). PAK4 ile yapılan çalışmalarda onkogenik süreçte birçok role sahip olduğu gösterilmiştir (10). PAK4'ün meme kanseri (11, 12), mide kanseri (13), hepatosellüler karsinoma (14), serviks (15) ve pankreas

kanserini (16) de kapsayan pek çok farklı kanser türünde ifade seviyesinde artış olduğu belirlenmiştir (11-16). PAK4 normal dokularda da düşük düzeylerde ifade edilmektedir (17). PAK4'ün hücre göçü ve hücre çoğalmasına aracılık ettiği de yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (18, 19). Aynı zamanda, MAPK ve PI3K yolları ilişkili onkojenik yolak ile etkileşime girdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (10, 19-22). Ayrıca, in vitro olarak fare meme epitelyal hücrelerinde PAK4'ün ifade seviyesinde aşırı artış sağlandığında hücrelerin tümör fenotipi kazandığı belirlenmiştir (23). Bu durum, PAK4'ün normal hücrelerde onkojenik transformasyonu indüklemeye yeteneği olduğunu işaret etmektedir (24, 25). PAK4 normal epitelyal dokuda çok az miktarda tespit edilirken, meme kanseri hücre hatlarında ve primer meme tümör dokularında sıklıkla aktive edildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (23, 26, 27). PAK4 ayrıca MDA-MB-231 hücrelerinde onkojenik fenotipi ve hücre göçünü arttırdığı belirlenmiştir (28, 29). Çalışmalardan elde edilen tüm bu bulgulara göre, PAK4'ün onkojenik bir protein ve dolayısıyla da potansiyel terapötik bir hedef olabileceğini göstermektedir.

MDA-MB-231 hücreleri östrojen, progesteron ve ERBB2(HER2) negatif (üçlü negatif) ve metastatik kabiliyeti yüksek fibroblast-benzer meme kanseri hücrelerdir. Bunun aksine, MCF-7 hücreleri ise östrojen pozitif ve zayıf metastatik potansiyele sahip epitelloid yapıda olan meme kanseri hücrelerdir. Bu iki hücre hattı protein kinaz C (PKC) aktivitesine bağlı olarak farklı invazyon özellikleri arz etmektedir. Forbol ester (TPA/PMA) ile PKC aktivasyonu sağlanan MCF-7 hücrelerinde hücre göçü kabiliyeti artarken, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre göçü kabiliyeti azalmakta ve epitelloid morfoloji gelişmektedir (30). Bu nedenle çalışmamızda, PAK4 aktivasyonu temelli hücre migrasyonunun PKC yolağı üzerinden düzenlenip düzenlenmediğini belirleyebilmek için deneylerimizde MCF-7 hücre hattını kullandık. Bu bağlamda, ektopik olarak yüksek düzeyde PAK4 ifade eden ve etmeyen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde PKC aktivasyonu ve inhibisyonuna bağlı olarak hücrelerin migrasyon

kabiliyeti ve hücre-hücre bağlantısını sağlayan E-Kaderin ifade düzeyleri araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Hattı ve Plazmitler

MCF-7 meme kanseri hücre hattı (HTB-22) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'ndan temin edildi. Hücreler, inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (FBS) (Sigma Aldrich Corp., 12106C, USA) ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma Aldrich Corp., D6429, USA) besiyeri içinde 37°C'de, %5 CO₂ ve 1 atmosfer basınç altında kültüre edildi. Bu çalışmada, MCF-7 hücrelerinde ektopik PAK4 ifadesi için Staffan Strömblad (Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, SE-141 83 Huddinge, Sweden) tarafından hibe edilen p3XFLAG-wild-type-PAK4 plazmid vektörü (Sigma-Aldrich Corp., E4401, USA) ve kontrol vektör olarak p3XFLAG-CMV-10 (Sigma Aldrich Corp., E4401, USA) plazmid vektörü kullanıldı. Plazmid vektörlerin MCF-7 hücrelerine transfeksiyonu Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ajanı kullanılarak ve kit talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. PKC inhibitörü olarak RO318220 (Abcam, ab120374, Cambridge, MA, USA) (5µM) ve PKC aktivatörü olarak Phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA / TPA) (Cell Signalling Tech, cat.4174, USA) (200 nM) kullanıldı ve uygulama konsantrasyonları belirlendi (31, 32).

Oris Hücre Migrasyon Deneyi

Hücrelerin migrasyon düzeyleri, ticari olarak temin edilen Oris hücre migrasyon deney kiti (Platypus Technologies, Madison, WI) kullanılarak gösterildi. Deneyde, Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Inc., USA) yardımı ile boş plazmid vektör (p3XFLAG-CMV-10) transfekte edildi; kontrol MCF-7 hücreleri ve ökaryotik PAK4 ifade vektörü (p3XFLAG-wild-type-PAK4) transfekte edilmiş MCF-7 hücreleri kullanıldı. Öncelikle, kit içeriğinde mevcut olan Oris hücre durdurucuları (stopper) migrasyon zonu

oluşturabilmek için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarının kuyucuklarına yerleştirildi. MCF-7 hücreleri her kuyucukta 3×10^2 hücre olacak şekilde ekildi ve hücrelerin tutunması için 24 saat kültüre edildi. Daha sonra durdurucu kaldırıldı ve tutunmayan hücreler 1XPBS (Capricorn Scientific GmbH, PBS-10XA, Ebsdorfergrund, Germany) ile yıkandı. Yıkama işlemini takiben kontrol ve ektopik PAK4 ifadesi sağlanan MCF-7 hücrelerini, serumsuz (%0,2 FBS), serumlu (%10 FBS), serumsuz RO318220(5 μ M) ve serumsuz TPA/PMA(200 nM) içeren besiyerlerinde 48 saat kültüre ederek Oris migrasyon yöntemini uyguladık. Süre sonunda hücreler metanol ile fikse edildi ve %5 Giemsa ile boyandı. Durdurucular ile oluşturulan yara alanı inverted mikroskop ile görüntülendi ve yara alanının boyutu Image-J programı kullanılarak analiz edildi. Deney üç defa tekrar edilerek sonuçlar değerlendirildi.

Western Blot

Toplanan hücre lizatları proteaz inhibitör kokteyli (1X) içeren liziz tamponu (RIPA) (Thermo Fisher Scientific, cat.89900, Waltham, Massachusetts, USA) kullanılarak elde edildi. Lizatların protein miktarı Bradford (BioRad Laboratories Inc., 500-0006, California, USA) reaktifi kullanılarak BSA (bovine serum albümin) standartı ile hesaplandı. Örneklerden 100'er μ g alınarak %10 poliakrilamid jele yüklendi. Yürüme sonunda PVDF membrana (Merck Millipore, IPVH00010, Massachusetts, USA) transfer gerçekleştirildi. Transfer aşamasından sonra blot %1 BSA (Sigma Aldrich Corp., B6917, USA) içeren PBST solüsyonunda bloklandı. Sonrasında, membran ikiye kesilerek primer E-Kaderin antikoru (Santa Cruz Biotechnology, sc8426, Texas, USA) ve beta-Aktin (ACTB) antikoru (Santa Cruz Biotechnology, sc8432, Texas, USA) ile işaretlendi ve yıkamanın ardından anti-mouse sekonder antikoru (Santa Cruz Biotechnology, sc516102, Texas, USA) ile işaretleme yapıldı. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasının ardından blot 1XPBST ile yıkandı. Üzerine enhanced chemoluminescence (ECL) reaktifi (GE Health care RPN2209, Illinois, USA)

ilave edildi ve 1 dk beklendikten sonra kemilüminas'a duyarlı film (Kodak, 8116428, New York, USA) ile görüntülendi. Üç ayrı deney tekrarından elde edilen protein lizatlarının Western Blot sonuçları Image-J yazılımı yardımı ile analiz edildi.

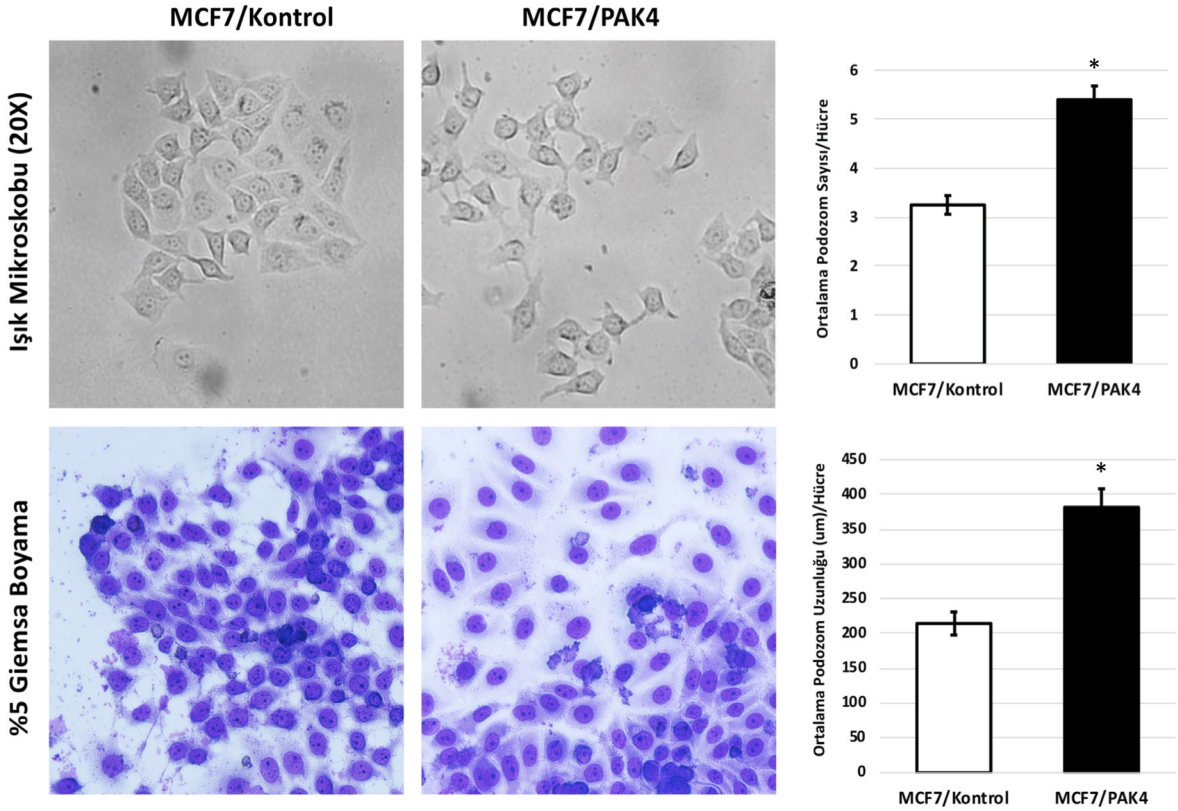
İstatistiksel Analiz

DeneySEL verilerin analizleri Microsoft Excel ve GraphPad Prism 8.0 yazılım programları aracılığıyla gerçekleştirildi. Sonuçların p değerleri One way ANOVA (Dunnet t-test) ile hesaplandı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar normalize edilerek ve \pm standart hata değerleri belirlenerek gösterildi.

BULGULAR

PAK4 MCF-7 hücrelerinde mezenkimalbenzer morfolojik değişimlere neden olur

İnsan PAK4 cDNA dizisi klonlanmış p3XFLAG-wild-type-PAK4 plazmid vektör ve kontrol olarak PAK4 içermeyen boş p3XFLAG-CMV-10 plazmid vektör transfekte edilen MCF-7 hücrelerinde morfolojik değişimler incelendi. Ektopik PAK4 ifadesi sağlanan MCF-7 hücrelerinde kontrole göre sitoskeletal organizasyonun değiştiği, hücre-hücre bağlantılarının zayıfladığı morfolojik olarak gözlemlendi. Hücrelerin podozom oluşturma sayılarını ve uzunluklarını image-J yazılımı yardımı ile değerlendirildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kontrol MCF-7 hücrelerinde morfolojik olarak ortalama 3,25; ektopik PAK4 ifade eden hücrelerde ise ortalama 5,4 podozom/hücre oluşturduğu belirlendi. Ayrıca hücrelerin oluşturduğu podozom uzunluklarına bakıldığında kontrol MCF-7 hücrelerde ortalama 214,55 μ m, ektopik PAK4 ifade eden hücrelerde ise ortalama 381,6 μ m olduğunu belirledi (Şekil 1).



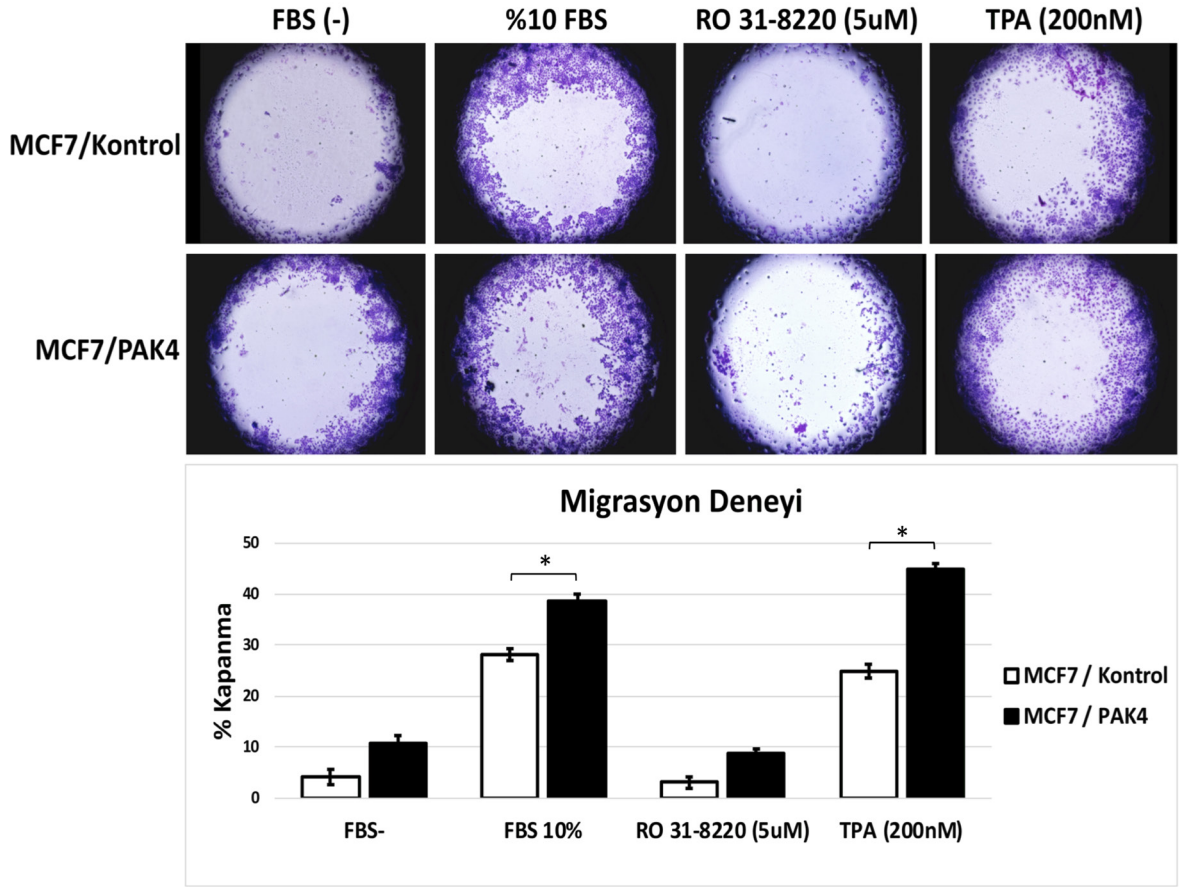
Ektopik PAK4 ifade eden MCF-7 (MCF-7/PAK4) hücrelerinin kontrol hücelere oranla daha fazla mezenkimal-benzer hücre morfolojisine sahip olduğu, podozom sayılarında yaklaşık 1,66-kat ve podozom uzunluklarında yaklaşık 1,77 kat artış belirlenmiştir (*p değeri <0,05).

Şekil 1. Boş plazmid vektör transfekte edilen kontrol ve ektopik PAK4 ifade eden MCF-7 hücrelerinin morfolojik görüntüsü ve hücrelerin podozomal yapı ve uzunluklarının analizi

PAK4, Protein Kinaz C aktivasyonu durumunda MCF-7 hücrelerinin migrasyon kabiliyetini artırır

Bu çalışmada, PAK4 destekli hücre migrasyonunun protein kinaz C (PKC) yolu üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği araştırıldı. Bu amaçla %0,2 FBS, %10 FBS, PKC aktivatörü TPA(PMA) ve PKC inhibitörü (RO 318220) varlığında kontrol ve ektopik PAK4 ifade eden hücrelerin migrasyon kabiliyetlerini belirlendi. Çalışmamızın sonuçlarına göre, %0,2 FBS muamele edilmiş hücrelerde çok düşük düzeyde migrasyon oranları saptandı, boşluk kapanma düzeyleri; kontrol hücrelerde %4,2, ektopik PAK4 ifade eden hücrelerde %10,9 olarak belirlendi. Beklendiği gibi %10 FBS

varlığında hücrelerin migrasyon kabiliyeti artmaktadır, buna ilaveten ektopik PAK4 ifade eden hücrelerde migrasyon oranı anlamlı olarak kontrole (%28,2 kapanma) göre 1,38 kat (%38,8 kapanma) yükseldi. RO 318220 inhibitörü varlığında hücre migrasyonunda anlamlı bir şekilde azalma belirlendi. Boşluk kapanma düzeyleri; kontrol hücrelerde %3,1, ektopik PAK4 ifade eden hücrelerde %8,7 olarak bulundu. PKC aktivatörü TPA/PMA ile muamele edilen hücelere bakıldığında ektopik PAK4 ifade eden hücreler (%44,9) kontrole (%24,9) göre ortalama 1,8 kat arttı (Şekil 2). Bu sonuçlara göre PAK4'ün PKC aktivasyonu aracılığıyla hücre migrasyonunu desteklediği belirlendi.



FBS varlığında ve ayrıca TPA uygulaması ile PKC yolağı aktive edilen MCF7/PAK4 hücreleri kontrole oranla daha yüksek migrasyon kabiliyetine sahiptir (*p değeri <0,05).

Şekil 2. Kontrol ve ektopik PAK4 ifade eden MCF-7 hücrelerinin PKC-indüklü migrasyon kabiliyeti

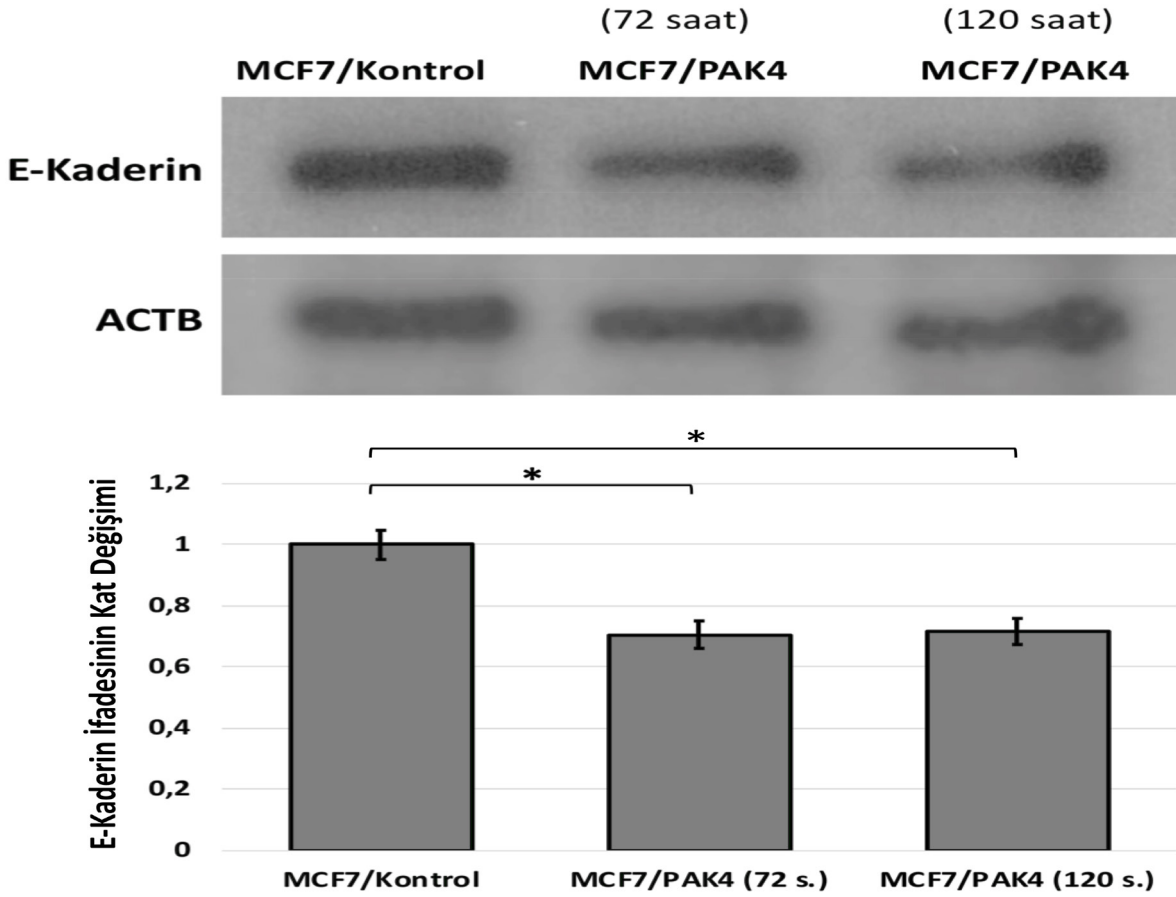
Yüksek PAK4 ifadesi E-Kaderini baskılamaktadır

E-Kaderin hücre-hücre bağlanma noktalarını oluşturan temel yapılardan biridir. E-Kaderin ifadesi azalan kanser hücrelerinde mezankimal-benzer hücre morfolojisi görülmekte, hücrelerin invazyon ve migrasyon kabiliyetleri artmaktadır (33-35). Çalışmamızda, ektopik PAK4 ifade eden hücrelerin E-Kaderin ifade düzeyleri Western blot yöntemi ile incelendi. Kontrol ve PAK4 cDNA'sı içeren plazmid vektörlerin MCF-7 hücrelerine transfeksiyonundan sonra 72. ve 120. saat kültürasyon zamanlarında hücre lizatları elde edildi. Bu örneklerin Western

Blot deney sonuçlarına göre ektopik PAK4 ifade eden MCF-7 hücrelerinde kontrole göre yaklaşık %30 oranında E-kaderin ifadesinin baskılandığını saptandı (Şekil 3). Bu durum hücrelerin birbirine bağlanma kabiliyetlerinin azaldığını göstermektedir.

TARTIŞMA

Günümüzde yapılan çalışmalar, PAK4'ün önemli bir terapötik hedef olabileceğini ileri sürmektedir (36, 37). Fare meme epitel hücrelerinde stabil yabancı tip PAK4 ifadesi arttırıldığında bu hücrelerin polaritelerini kaybettikleri belirlenmiştir (28). Ancak



MCF7/PAK4 hücrelerinde E-kaderin ifadesi kontrol hücelere oranla yaklaşık %30 oranında azaldığı belirlenmiştir (*p değeri <0,05).

Şekil 3. Kontrol ve ektopik PAK4 ifade eden MCF-7 hücrelerinin E-kaderin ifadesi

PAK4 ifadesi baskılandığında meme bezi gelişimi olumsuz yönde etkilenmemektedir (38). PAK4 özellikle üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edildiği bilinmektedir. PAK4 aktivasyonu, kanser hücrelerinin çoğalma ve migrasyon kabiliyetlerini arttırarak hastaların sağkalm oranlarını düşürmektedir. Bu nedenle kötü prognoz ilişkili üçlü negatif meme kanseri hücreleri açısından önemli bir terapötik hedefdir (37). Buna ilave olarak PAK4 östrojen pozitif meme kanserinde de hastalığın gelişmesini desteklemektedir (39). Östrojen, PAK4 aktivasyonunu tetikleyerek kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik kabiliyetlerini desteklemektedir (40). PAK4 gen ifadesinin baskılandığı çalışmalarda

ise onkojenik transformasyon gerilemektedir. PAK4 gen ifadesi baskılanan meme kanser hücrelerinde mTOR, RELB, CLDN4, PI3K/AKT, MEK/ERK gibi sinyal yolları olumsuz yönde etkilenmekte ve buna bağlı olarak kanser hücrelerinin çoğalma, invazyon ve migrasyon kabiliyetlerinde azalma, hastaların tümör büyüklüklerinde ve lenf bezi metastazı oranlarında azalma görülmektedir (22, 27, 36, 41, 42).

Bu çalışmada, zayıf metastatik özellikte olan MCF-7 hücrelerinde ektopik yüksek PAK4 ifadesi varlığında, önceki araştırmalardan farklı olarak PAK4'ün metastatik rolünün PKC yolağı ile ilişkisi açıklandı. Bunun için çalışmamızda MCF-7 hücrelerine

PAK4 cDNA'sını içeren vektörü ve kontrol olarak PAK4 cDNA'sı içermeyen boş vektörü lipofectamine 2000 aracılığıyla transfekte edildi. Bu hücrelerde PAK4 ifadesine bağlı olarak hücrelerin morfolojik özellikleri, migrasyon kabiliyetleri ve E-kaderin ifade seviyeleri belirlendi.

PAK4, PAK ailesi enzimlerdendir ve bu enzimler, özellikle hücre morfolojisinin, hücre iskeleti organizasyonunun, hücre proliferasyonunun, hücre döngüsü kontrolünün, hücre göçünün ve sağkalımın düzenlenmesinde önemli rolleri mevcuttur (43-46). Bu bilgiler ışığında, MCF-7 hücrelerinde ektopik PAK4 ifadesi sağladığımız in vitro koşullarda, hücrelerin mezenkimal-benzer bir fenotip kazandığını ve invazyon kabiliyeti açısından önemli olan podozomal yapıların sayısı ve uzunluklarının arttığını gözlemlendi. Bu sonuçlar, hücrelerde yeterince yüksek seviyede PAK4 geninin ektopik ekspresyonunu sağladığımızı ve hücre morfolojisini invaziv yönde değiştirdiğini göstermektedir.

PAK4'ün onkogenezi hangi hücrel mekanizmalar ile tetiklediği konusundaki araştırmalar halen devam etmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde PAK4 aktivasyonunun PI3K/AKT ve MEK/ERK gibi yollar ile sağlanabildiği gösterilmiştir (27, 42). Ancak meme kanserinde PAK ailesi genlerinin PKC ile ilişkisini gösteren bir çalışma şu an için mevcut değildir. Koh W. ve ark. (47) tarafından yapılan bir çalışmada PAK ailesinden PAK2 ve PAK4 genlerinin, endotel hücrelerinin lümen ve tüp oluşumunu PKC sinyal yolağı aracılığıyla gerçekleştirdiğini belirlemiştir. Dolayısıyla bu hücrelerde, PAK4 aktivasyonu PKC tarafından sağlanabilmektedir. Bu bilgiler ışığında, meme kanserinde ifadesi artan PAK4'ün PKC açısından önemli bir hedef olabileceği kanısına varıldı. Bu nedenle endojen düzeyde PAK4 ifade eden yani boş plazmid ile transfekte edilen kontrol MCF-7 hücrelerini ve ektopik olarak yüksek PAK4 ifadesi sağlanan MCF-7 hücrelerini TPA (12-O-tetradekanoilphorbol-13-asetat) / PMA (phorbol-12-miristat-13-asetat), RO318220 (metansülfonat) ve %10 fetal bovin serum

(FBS) ile muamele edildi ve hücre migrasyon deneyini uygulandı. TPA (PMA), iyi bilinen ve yaygın kullanılan bir phorbol esteridir. Bu ajan, PKC'ye bağlanarak enzimi aktive eder. RO318220 ise PKC aktivitesini baskılayan bir ajandır. Buna göre hücre migrasyonu sonuçlarına bakıldığında %10 FBS varlığında yüksek düzeyde PAK4 ifade eden hücrelerde çalışmalara uygun olarak migrasyon kabiliyeti kontrole göre 1,38 kat arttı. Buna ilave olarak, serumsuz TPA muamelesi yapılan hücrelerde ektopik PAK4 ifadesi hücre göçü kabiliyetini 1,8 kat arttı. RO318220 ile muamele edilen hücrelerde de beklenen azalma gösterildi. Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre, MCF-7 hücrelerinde PAK4-aracılı hücre migrasyonunun PKC aktivasyonuna bağlı olarak düzenlendiği ve dolayısıyla PAK4'ün PKC hedefi olabileceği söylenebilir. Ancak PKC-PAK4 arasındaki direkt ilişkinin ortaya konması için ilave çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Kanser hücrelerinde metastatik değişimi sağlayan temel süreç epitelyal-mezenkimal transisyon (EMT) sürecidir. EMT'de kanıtlanmış ilk değişim hücreler arası fiziki bağlantıların zayıflatılması ve hücrelerin bulunduğu yerden ayrılmasıdır. Kaderinler Ca^{2+} bağımlı hücre adhezyon molekülleridir ve hücreler arası bağlantıları sağlayan temel yapılardır. Bu yapılar, doğrudan iki hücre iskeletinin E-Kaderin aracılığıyla birbirine bağlanması ile oluşur. E-kaderinlerin oluşturduğu hücreler arası sıkı bağlantı E-kaderin/ β -katenin/ α E-katenin kompleks yapısından meydana gelmektedir. E-kaderin baskılandığı zaman β -katenin serbest kalır ve hücre çekirdeğine göç ederek mezenkimal belirteçler olan vimentin, fibronektin ve integrin sentezini artırır. Bu durum EMT sürecini başlatır ve hücrenin bulunduğu yerden göç etmesine neden olur (33, 35, 48). Bu bilgiler doğrultusunda, ektopik PAK4 ifadesi sağlanan MCF7 hücrelerinde E-kaderin ifadesinin yaklaşık %30 oranında baskılandığı saptandı. Bu sonuç; PAK4'ün hücre-hücre bağlantılarının zayıflatılmasında ve hücrelerin birbirinden ayrılmasında önemli rolü olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 2019; 69(1):7-34.
2. Mahjoubin-Tehran M, Rezaei S, Jalili A, Aghaee-Bakhtiari SH, Orafai HM, Jamialahmadi T, Sahebkar A. Peptide decoys: a new technology offering therapeutic opportunities for breast cancer. *Drug Discov Today*, 2020; pii: S1359-6446(20)30036-2.
3. Dillekas H, Rogers MS, Straume O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med*, 2019; 8(12):5574-6.
4. Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem*, 2003; 72:743-781.
5. Radu M, Semenova G, Kosoff R, Chernoff J. PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2014; 14:13-25.
6. Abo A, Qu J, Cammarano MS, Dan C, Fritsch A, Baud V, et al. PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J*, 1998; 17:6527-40.
7. Dan C, Kelly A, Bernard O, Minden A. Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol Chem*, 2001 ;276:32115-21.
8. Qu J, Li X, Novitch BG, Zheng Y, Kohn M, Xie JM, et al. PAK4 kinase is essential for embryonic viability and for proper neuronal development. *Mol Cell Biol*, 2003; 23:7122-33.
9. Arias-Romero LE, Chernoff J. A tale of two Paks. *Biologie Cellulaire*, 2008; 100:97-108.
10. Won SY, Park JJ, Shin EY, Kim EG. PAK4 signaling in health and disease: defining the PAK4-CREB axis. *Exp Mol Med*, 2019; 12;51(2):11.
11. Minden A. The pak4 protein kinase in breast cancer. *ISRN Oncol*, 2012; 2012:694201.
12. Yang JX, Han YJ, Zheng H, Luo RC. Expression of PAK4 in breast cancer and benign breast pathological changes. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2010; 30:981-3.
13. Li D, Zhang Y, Li Z, Wang X, Qu X, Liu Y. Activated Pak4 expression correlates with poor prognosis in human gastric cancer patients. *Tumour Biol*, 2015; 36:9431-6.
14. Xue J, Chen LZ, Li ZZ, Hu YY, Yan SP, Liu LY. MicroRNA-433 inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting p21 activated kinase (PAK4). *Mol Cell Biochem*, 2015; 399:77-86.
15. Shu XR, Wu J, Sun H, Chi LQ, Wang JH. PAK4 confers the malignance of cervical cancers and contributes to the cisplatin-resistance in cervical cancer cells via PI3K/AKT pathway. *Diagn Pathol*, 2015; 10:177.
16. Tyagi N, Marimuthu S, Bhardwaj A, Deshmukh SK, Srivastava SK, Singh AP et al. p-21 activated kinase 4 (PAK4) maintains stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells through activation of STAT3 signaling. *Cancer Lett*, 2016; 370:260-7.
17. Nekrasova T, Minden A. PAK4 is required for regulation of the cell-cycle regulatory protein p21, and for control of cell-cycle progression. *J Cell Biochem*, 2011; 112:1795-806.
18. Kumar R, Gururaj AE, Barnes CJ. p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006; 6(6):459-71.
19. King H, Thillai K, Whale A, Arumugam P, Eldaly H, Kocher HM, et al. PAK4 interacts with p85 alpha: implications for pancreatic cancer cell migration. *Sci Rep*, 2017;7:42575.
20. Liu Y, Chen N, Cui X, Zheng X, Deng L, Price S et al. Karantza V, Minden . The protein kinase Pak4 disrupts mammary acinar architecture and promotes mammary tumorigenesis. *Oncogene*, 2010; 29:5883-94.
21. Fu X, Feng J, Zeng D, Ding Y, Yu C, Yang B. PAK4 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells via PI3K/Akt- and MEK/ERK-dependent pathways. *Biosci Rep*, 2014; (2)1;34.
22. Wang F, Gao Y, Tang L, Ning K, Geng N, Zhang H, et al. A novel PAK4-CEBPB-CLDN4 axis involving in breast cancer cell migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019; 2;511(2):404-8.
23. Arias-Romero LE, Villamar-Cruz O, Pacheco A, Kosoff R, Huang M, Muthuswamy SK, et al. A rac-pak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells. *Oncogene*, 2010; 29:5839-49.
24. Arias-Romero LE, Chernoff J. p21-activated kinases in Erbb2-positive breast cancer: A new therapeutic target? *Small GTPases*, 2010; 1:124-8.
25. Callow MG, Clairvoyant F, Zhu S, Schryver B, Whyte DB, Bischoff JR, et al. Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines. *J Biol Chem*, 2002; 277: 550-8.
26. He LF, Xu HW, Chen M, Xian ZR, Wen XF, Chen MN et al. Activated-PAK4 predicts worse prognosis in breast cancer and promotes tumorigenesis through activation of PI3K/AKT signaling. *Oncotarget*, 2017; 8(11): 17573-85.

27. Wong LE, Chen N, Karantzis V, Minden A. The Pak4 protein kinase is required for oncogenic transformation of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncogenesis*, 2013; 2: e50.
28. Zhang H, Li Z, Viklund EK, Stromblad S. P21-activated kinase 4 interacts with integrin alpha v beta 5 and regulates alpha v beta 5-mediated cell migration. *J Cell Biol*, 2002; 158: 1287-97.
29. Van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 2008; 65(23): 3756-88.
30. Platet N, Prevostel C, Derocq D, Joubert D, Rochefort H, Garcia M. Breast cancer cell invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells. *Int J Cancer*, 1998; 2;75(5):750-6.
31. Brenner W, Beitz S, Schneider E, Benzing F, Unger RE, Roos FC, et al. Adhesion of renal carcinoma cells to endothelial cells depends on PKCmu. *BMC Cancer*, 2010; 6;10:183.
32. Goyal P, Pandey D, Behring A, Siess W. Inhibition of nuclear import of LIMK2 in endothelial cells by protein kinase C-dependent phosphorylation at Ser-283. *J Biol Chem*, 2005;280(30):27569-77.
33. Lau MT, So WK, Leung PC. Fibroblast growth factor 2 induces E-cadherin down-regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK signaling in ovarian cancer cells. *PLoS One*, 2013;8(3):e59083.
34. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*, 2008; 68(10): 3645-54.
35. Ramos-Alvarez I, Jensen RT. P21-activated kinase 4 in pancreatic acinar cells is activated by numerous gastrointestinal hormones/neurotransmitters and growth factors by novel signaling, and its activation stimulates secretory/growth cascades. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018; 315(2): 302-17.
36. Cordover E, Wei J, Patel C, Shan NL, Gionco J, Sargsyan D, et al. KPT-9274, an Inhibitor of PAK4 and NAMPT, Leads to downregulation of mTORC2 in triple negative breast cancer cells. *Chem Res Toxicol*, 2020; 9.
37. Arowosegbe MA, Amusan OT, Adeola SA, Adu OB, Akinola IA, Ogungbe BF, et al. Kaempferol as a potential PAK4 inhibitor in triple negative breast cancer: extra precision glide docking and free energy calculation. *Curr Drug Discov Technol*, 2019; 23.
38. Rabieifar P, Zhuang T, Costa TDF, Zhao M, Strömb-lad S. Normal mammary gland development after MMTV-Cre mediated conditional PAK4 gene depletion. *Sci Rep*, 2019; 8;9(1):14436.
39. Santiago-Gomez A, Kedward T, Simoes BM, Dragoni I, NicAmhlaoibh R, Trivier E, et al. PAK4 regulates stemness and progression in endocrine resistant ER-positive metastatic breast cancer. *Cancer Lett*, 2019; 28;458:66-75.
40. Li Y, Zhang H, Zhao Y, Wang C, Cheng Z, Tang L, et al. A mandatory role of nuclear PAK4-LIFR axis in breast-to-bone metastasis of ERα-positive breast cancer cells. *Oncogene*, 2019;38(6):808-21.
41. Costa TDF, Zhuang T, Lorent J, Turco E, Olofsson H, Masia-Balague M, et al. PAK4 suppresses RELB to prevent senescence-like growth arrest in breast cancer. *Nat Commun*, 2019; 9;10(1):3589.
42. Li SQ, Wang ZH, Mi XG, Liu L, Tan Y. MiR-199a/b-3p suppresses migration and invasion of breast cancer cells by downregulating PAK4/MEK/ERK signaling pathway. *IUBMB Life*, 2015;67(10):768-77
43. Kumar R, Sanawar R, Li X, Li F. Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases. *Gene*, 2017; 605: 20-31.
44. Shao YG, Ning K, Li F. Group II p21-activated kinases as therapeutic targets in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol*, 2016; 22: 1224-35.
45. Ye DZ, Field J. PAK signaling in cancer. *Cell Logist*, 2012; 2: 105-16.
46. Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem*, 2007; 101(4): 816-29.
47. Koh W, Mahan RD, Davis GE. Cdc42- and Rac1-mediated endothelial lumen formation requires Pak2, Pak4 and Par3, and PKC-dependent signaling. *J Cell Sci*, 2008; 1;121(Pt 7):989-1001.
48. Gavert N, Ben-Ze'ev A. beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem*, 2007; 102(4): 820-8.

Erişkin iki hastada el-ayak-ağız hastalığının değerlendirilmesi

Evaluation of hand-foot-mouth disease in two adult patients

Nuran SARI¹

ÖZET

Viral döküntülü hastalıklar çocuk hastalarda enfeksiyon yapmakla birlikte nadir olarak erişkinlerde de görülebilmektedir. El-ayak-ağız hastalığı (EAAH) genellikle beş yaş altındaki çocuklarda döküntü ile seyreden viral bulaşıcı bir hastalıktır. Tipik olarak el, ayak, oral kavite ve ağız çevresinde makülopapüler veya veziküler erupsiyonlarla karakterizedir. Hastalık insana fekal-oral, oral-oral, damlacık ve temas yoluyla bulaşabilmektedir. Etkenleri enterovirüs genusu içerisinde yer alan koksakivirüs (*Coxsackievirus*), ekovirüs (*Echovirus*) ve enterovirüslerdir (*Enterovirus*). İki erkek kardeş (18 ve 22 yaşlarında) ateş, baş ağrısı, boğaz ağrısı, halsizlik, iştahsızlık, yaygın kas ağrısı yakınmasından bir gün sonra döküntüler ortaya çıkması üzerine polikliniğe başvurmuşlardır. Benzer bulguların küçük kız kardeşlerinde de olduğunu bir hafta önce pediatri polikliniğinde el-ayak-ağız hastalığı tanısı ile tedavi aldığını bildirmişlerdir. İki kardeşin ağız çevresi, el ve ayak tabanlarında maküloveziküler döküntüler olduğu görülmüştür. El-ayak-ağız hastalığı ön tanısı ile semptomlara yönelik olarak parasetamol, antiseptikli boğaz gargarası, antihistaminik, yatak istirahati ve hidrasyon önerilerinde bulunulmuştur. Takip edilen hastaların muayenelerinde aktif lezyonlar olmakla birlikte komplikasyon veya ağır hastalık

ABSTRACT

Infections of viral rashes occurring frequently in pediatric patients even so it can be rarely seen in adult patients. Hand-foot-mouth disease (EAAH) is a viral infectious disease that is usually seen in children under the age of five. Typically it was characterized by maculopapular or vesical eruptions around the hands, feet, oral cavity and mouth. The disease could be transmitted to humans via fecal-oral, oral-oral, droplet and contact. The causative agents are the *Coxsackieviruses*, *Echoviruses* and *Enteroviruses* which are found in the enterovirüs genus. An adults two brothers (aged 18 and 22) applied to the out patient clinic after one day of fever, headache, sorethroat, fatigue, loss of appetite, rash complaints and common muscle pain. They reported that similar findings were present in their younger sisters and that were treated with a diagnosis of hand-foot-mouth disease in the pediatric outpatient clinic one week before. There were subfebril fever, oropharyngeal hyperemia and maculovesicular rashes to perioral, palm and foot in the examinations of two brothers. Paracetamol, antiseptic mouthwash, bed rest, antihistaminic and hydration were suggested for symptoms to diagnosis of hand-foot-mouth disease. Although there were active lesions in the follow-up examinations, there was no

¹Sincan Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Nuran SARI

Akıncı Cad. No: 4 Urhal Sitesi Platin 2 Konutları A Blok No: 9 Etimesgut/Ankara - Türkiye

Tel : +90 505 457 93 09 E-posta / E-mail : nuran_sari2003@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 02.09.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 05.09.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.79446

Sarı N. Erişkin iki hastada el-ayak-ağız hastalığının değerlendirilmesi.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 117-122

tablosu olmaması nedeni ile yatış yapılmamış, ayaktan semptomatik tedavi ile izlenmişlerdir. Hastalarda tanı, hastalık öyküsü ve cilt lezyonlarının tipik görünüm ve dağılımına dayanılarak konulmuş olup histopatoloji, viral seroloji veya diğer PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) çalışılmamıştır. Daha geniş hasta sayıları ve tanımlanmış viral etken eşliğinde yapılan çalışmaların daha faydalı olacağı düşünülmektedir. Erişkin hastalarda sık olmamakla birlikte EAAH görülebilmektedir. Komplikasyon veya ağır hastalık tablosu gelişmemesi açısından erken dönemde semptomatik ve destek tedavileri başlanmalıdır. Çevreye bulaş riskini en aza indirmek için alınacak önlemlerin hastalara bildirilmesi önem arz etmektedir. Benzer döküntülü hastalıklarda ön tanıda yer almasını sağlamak, erken tanı ve tedavi ile komplikasyonları önlemek, gerekli hijyen önlemleri ile toplumsal bulaş riskini azaltmak, hastalığı tekrar gündeme taşımak amacı ile aile içi temas öyküsü, anamnez, tipik döküntüler, klinik bulguları ile tanı konulan erişkin iki erkek kardeşle saptanan EAAH olguları paylaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Erişkin, döküntü, el-ayak-ağız hastalığı

complication or severe disease. Therefore they were followed by symptomatic treatment, hospitalization not considered. Diagnosis in our patients were based on the disease history and skin lesions, typical appearance. We couldn't studied distribution of histopathology, viral serology or PCR (polymerase chain reaction). Larger patient numbers and studies with a defined viral factor are thought to be more useful. Although it is not common in adult patients, EAAH can be seen. Early symptomatic and supportive therapies should be initiated to avoid complications or severe disease. It is important to inform patients about the measures to be taken to minimize the risk of social transmission. EAAH in two adult brothers who diagnosed with clinical findings were shared so purpose of the study to ensure that the early diagnosis is made in similar rash diseases, prevent complications by early diagnosis and treatment, reduce the risk of social transmission with necessary hygiene measures, update this disease again. EAAH cases were prescribed in two adult brothers diagnosed with history of family contact, typical rashes and clinical findings.

Key Words: Adults, rash, hand-foot-mouth disease

GİRİŞ

Viral döküntülü hastalıklar sıklıkla çocuk hastalarda tanı almakla birlikte, nadir olarak erişkin hastalarda da görülebilmektedir. El, ayak ve ağız hastalığı (EAAH) özellikle be yaş altı çocuklarda görülen oldukça bulaşıcı bir viral hastalıktır. Hastalık toplumda sıklıkla fekal-oral bulaşmakla birlikte oral-oral, damlacık ve temas yolu ile bulaş görülebilmektedir (1). Etkenleri enterovirüsler içerisinde yer alan koksakivirüs A-B, ekovirüs ve enterovirüslerden yirmiden fazla alt tipi içermektedir. En sık saptanan etkenler enterovirüs 71 ve koksaki virüs A16' dır (2). İnkübasyon dönemi 3-7 gün arasındadır. Halsizlik, iştahsızlık, miyalji,

ateş, lenfadenopati, sonrasında ağız içi, çevresi, el ve ayaklarda makülopapülerden vesiküle değişen karakterde lezyonlar ortaya çıkar. İyileşme 7-10 günde gözlenmektedir (3). Genellikle sorunsuz şekilde iyileşmekle birlikte nadiren menenjit, ensefalit, myelit ve solunum sistemi komplikasyonlarına neden olabilmektedir (4). Büyük çocuklarda ve yetişkinlerde de nadir olarak vaka bildirimleri bulunmaktadır (5-7). El-ayak-ağız hastalığı erişkinlerin yaklaşık %11'ini etkileyip, %1'inden azında klinik bulgu vermektedir (8). Komplikasyon veya ağır hastalık tablosu gelişmemesi açısından erken semptomatik ve destek

tedavileri başlanmalıdır. Hastalığı gündeme taşımak, benzer döküntülü hastalıklarda ön tanıda yer almasını sağlamak, komplikasyonları önlemek, gerekli hijyen önlemleri ile toplumsal bulaş riskini azaltmak için olgu paylaşımlarının önemli olduğu düşünülmektedir.

OLAY/OLGU

İki erkek kardeş (18 ve 22 yaşlarında) ateş, baş ağrısı, boğaz ağrısı, halsizlik, iştahsızlık, kas ağrısı yakınması sonrası döküntüleri olması üzerine polikliniğe başvurdular. Benzer bulguların beş yaşındaki kız kardeşlerinde de olduğu, kardeşinin kreşinde de hasta olan çocukların bulunduğunu,

ve bir hafta önce pediatri polikliniğine el-ayak-ağız hastalığı tanısı ile tedavi aldığını bildirdiler. İki kardeşin yapılan muayenelerinde subfebril ateş (37°C, 37,3°C), orofarenkslerde hiperemi, ağız çevresi, el ve ayak tabanlarında maküloveziküler döküntüleri mevcuttu. Tam kan tahlil tahlilleri, biyokimya, C-reaktif protein ve sedimentasyon değerlerinde anormal bulgu saptanmadı. El-ayak-ağız hastalığı tanısı, ailevi hastalık temas öyküsü ve cilt lezyonlarının tipik görünüm ve dağılımına dayanılarak konuldu. Hastalar ateş, el-ayak ve oral mukozada papül ve herpetik lezyonlar, döküntülerin etrafında enflamatuvar eritem, minimal sıvı içeren kabarcıklar olması ile EAAH olarak tanımlandı (Resim 1- 4).



Resim 1-2. 22 yaşında erkek hastanın ellerinde makülopapüler lezyonlar



Resim 3. 22 yaşında erkek hastanın ağız çevresinde maküloveziküler, deskuame lezyonlar



Resim 4. 18 yaşında erkek hastanın el ve ayak içinde makülopapüler lezyonlar

Hastalarda anamnez, temas öyküsü, lezyonların tipik görünümü ve yerleşim bölgesi olması nedeni ile klinik tanı konuldu. İki hastada seroloji, histopatolojik inceleme veya viral marker çalışması yapılmadı. Mevcut bulgular ile semptomlara yönelik olarak parasetamol, antiseptikli boğaz gargarası, antihistaminik, yatak istirahati ve hidrasyon önerilerinde bulunuldu. EAAH da hastalarda yüksek ateş, kusma, bilinç bulanıklığı gibi bulgular olduğunda aseptik menenjit ve ensefalit yönünden değerlendirilmesi ve yatırarak tedavi edilmesi önerilmektedir. Ayrıca kardiyak ve pulmoner komplikasyonlar açısından dikkatli olunmalı, gerektiğinde akciğer grafisi ve kalp grafisi gibi görüntülemeler de yapılmalıdır. Ancak takip edilen hastalarda komplikasyon düşündürecek semptomlar bulunmadığından yatış düşünülmedi, ek radyolojik tetkikler yapılmadı. Klinik yakınmalarda artma veya komplikasyon gelişmesi durumunda kontrol önerildi. Ancak hastaların kontrol için tekrar poliklinik başvurusu olmadı.

TARTIŞMA

El, ayak ve ağız hastalığı özellikle beş yaş altı çocuklarda görülen sıklıkla oral-fekal, damlacık ve temas yolu ile bulaşabilen viral hastalıktır. Nadiren daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde hastalık görülebilmektedir. Ateş, boğaz ağrısı, iştahsızlık, halsizlik bulguları ile birlikte ağız çevresinde, avuç içi ve ayak tabanında görülen döküntüler ile karakterize bir klinik tablodur. Döküntüler kırmızı, yuvarlak lezyonlar şeklinde olabildiği gibi bazen veziküller şeklinde de görülebilmektedir (1, 2). Hastalarımız 18 ve 22 yaşlarında erişkin hastalar olmakla birlikte aynı bulgular ile bir hafta önce beş yaşındaki kardeşlerinin EAAH tanısı almış olması nedeni ile aile içi bulaş düşünülmüştür. Hastalarda miyalji, halsizlik, subfebril ateş sonrası ağız çevresi ile başlayıp avuç içi ve ayak tabanlarında da oluşan döküntüler ile klinik olarak EAAH tanısı konulmuştur.

Hastalık etkenleri enterovirüs cinsi içerisinde

yer alan koksakivirüs, ekovirüs ve enterovirüs'lerdir. Virüs enfekte kişilerin nazofarengeal sekresyonları, veziküler döküntü içerisinde ve gaitalarında bulunur. Fekal-oral, temas, damlacık yolu, ile enfekte kişilerden duyarlı kişilere yayılım gösteren oldukça bulaşıcı bir hastalıktır (4). Hastalarımız, kardeşlerinin kreşinde de benzer bulgular olan çocuklar olduğunu bildirdiler. Kalabalık ortamlarda temas yoğunluğu nedeni ile bulaş riski artmaktadır. Genellikle hastalığın ilk haftasında bulaş oranı en yüksektir. Hastanın semptomatik dönemde yayılımı önlemek için evinde kalması, duyarlı kişiler ile temas etmemesi önerilmektedir (5). Bulaşı önlemek için su ve sabunla sık el yıkamaları, sık temas edilen yüzeyleri uygun şekilde dezenfekte etmeleri önerilmektedir. Hastalarımıza ve kreşe giden kardeşine el hijyeni, temas önlemleri ile ilgili uyarılarda bulunuldu. Hastalığın aşısı ve virüse özgün spesifik bir tedavisi yoktur. Semptomatik olarak yatak istirahati, analjezik, antipiretik, hidrasyon destek tedavileri önerilmektedir (6-8). Hastalarımıza da klinik bulgularına yönelik olarak parasetamol, antiseptikli boğaz gargarası ve antihistaminik tedaviler başlandı.

Döküntüler çoğunlukla kendi kendini sınırlar ve ağır hastalık tablosuna neden olmazlar. Hastalar yedi ile on gün içerisinde gelişen tüm bulguların kaybolmasıyla tamamen iyileşir. Özellikle immünespresif hastalarda komplikasyonlara yol açabilmektedir (9). Yüksek ateş, kusma, bilinç bulanıklığı gibi bulgular olduğunda aseptik menenjit ve ensefalit yönünden değerlendirilmelidir. Kardiyak ve pulmoner komplikasyonlara neden olabildiğinden gerektiğinde EKG (elektrokardiyografi) ve direkt akciğer grafisi gibi radyolojik incelemeler yapılmalıdır (10). Takip edilen hastaların muayenelerinde aktif lezyonlar yoğun olmakla birlikte komplikasyon veya ağır hastalık tablosu görülmemesi nedeni ile yatış düşünülmedi, ayaktan semptomatik tedavi ile izlendiler.

El-ayak-ağız hastalığında gelişen lezyonların ayırıcı tanısında su çiçeği ve herpetik viral enfeksiyonlar, eritema multiforme, sekonder sifilide görülen

avuç içi ve ayak maküler lezyonları, ilaç allerjileri, infektif endokardit, septik emboliler ve vaskülit akla gelmelidir. Geç dönemde görülen el ve ayaklardaki deskuamatif lezyonlar fungal enfeksiyonları da taklit edebilmektedir (5-9). Hastalarımızda tanı, hastalık öyküsü ve cilt lezyonlarının tipik görünüm ve dağılımına dayanılarak konulmuş olup histopatoloji, viral seroloji veya PCR çalışılmadı. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün viroloji laboratuvarlarında tanı için virüsün bulunması muhtemel alanlardan (burun, boğaz sürüntüsü, gaita, döküntü sıvıları) alınan numunelerden PCR yöntemi ile virüs izole edilebilir. Ayrıca serolojik olarak kanda hastalığa sebep olan virüslere karşı oluşan antikorlar tespit edilebilmektedir. Moleküler yöntemler ile virüs varlığı tespit edilip, ileri hücre kültürü ve subtip tanımlamaları yapılabilmektedir (1,5). Elde edilen veriler sürveyans çalışmalarında çok değerli olacaktır.

El-ayak-ağız hastalığı sıklıkla çocuklarda görülen bir hastalık olmasına rağmen nadir de olsa erişkinde de görülebilmektedir. Yoğun stres, düşük kişisel hijyen, yorgunluk, immunsupresif tedaviler ve hastalarla yakın temasta olmanın erişkinde hastalığın ortaya çıkışını tetikleyebileceği düşünülmektedir. Ancak patojenik mekanizma halen net olarak bilinmemektedir. Erişkinde EAAH genellikle asemptomatik veya hafif şiddetli seyretmektedir (10,11). Artan global seyahat koşulları nedeniyle hafif semptomatik veya subklinik hastaların viral taşıyıcı olarak rol oynayabilmektedir.

Son yıllarda EAAH, değişik suşlarla farklı bölgelerde endemik olabilmektedir. Çin, Japonya, Malezya ve Tayvan gibi uzak doğu ülkelerinde

hastalık endemik olarak görülmekte ve vaka seri bildirimleri bulunmaktadır (3,10,11). Ayrıca Avrupa ve Amerika'dan olgu bildirimleri mevcuttur (12,13). Yapılan çalışmalarda en sık izole edilen etkenlerin koksakivirüs 6-10 ve enterovirüs 71 olduğu görülmektedir (14-16). Ülkemizde erişkin hastalarda EAAH ile ilgili yapılmış sınırlı sayıda yayın olup bunlar olgu sunumları şeklindedir (5,17,18). Serolojik veya histopatolojik olarak etkenlerin tanımlanabildiği daha geniş ölçekli çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Ülkemizde toplam A, B, C, D ile sınıflandırılan 51 tane bildirim zorunlu hastalık bulunmaktadır (19). Ancak EAAH hastalığı bu bildirim listesinde yer almamaktadır. Ayrıca hastanelerde kullanılmakta olan uluslararası ICD-10 (International Classification of Diseases - Uluslararası Hastalık Sınıflaması) kodlama sisteminde mevcut değildir, EAAH tanısı sisteme girilememektedir. Örnek göndermek zorluğu nedeni ile mikrobiyolojik tespitlerde de sıkıntı yaşanabilmektedir. Toplu verilere ulaşmak zorlaşmaktadır. Olgu bilgileri paylaşımının bu nedenlerle çok önem taşıdığı düşünülmektedir.

Hem çocuk hem de erişkinlerde EAAH insidansında artış görülmesi nedeni ile salgınlara yol açmasının önüne geçmek için hekimlerin klinik bulgular konusunda farkındalığının artması gerekmektedir. Komplikasyon gelişiminin engellemesinde erken semptomatik ve destek tedavi başlanması önemlidir. Hasta ve hasta yakınlarına temas ve damlacık izolasyonu, hijyen ve kontrol önlemleri konularında uygun bilgilendirme yapılması, uyumun sağlanması ile bulaş riski en aza indirilebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Somer A. Çocukluk çağı viral infeksiyonları. In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, eds. Viral infeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2011: 293-394.
2. Brenda WL, Lerner KL. Hand, Foot, and Mouth Disease. Infectious Diseases: In Context. 2008; 355-357.
3. Yin DQ, Wang CB, Zhou X, Ji SX. Epidemiology characteristics of human coxsackievirus A16 and enterovirus 71 circulating from 2009 to 2017 in Linyi, China. Jpn J Infect Dis. 2018; 2-18.
4. Krafchik BR, Tellier R. Viral Exanthems. In: Harper J, Oranje A, Prove N, eds. Textbook of Pediatric Dermatology. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2006: 418-49.
5. Topkarcı Z, Erdoğan B, Yazıcı Z. El-ayak-ağız hastalığının klinik ve demografik özellikleri. Bakırköy Tıp Derg 2013;9(1):12-5.
6. Ramirez-Fort MK, Downing C, Doan HQ, Benoist F, Oberste MS, Khan F, et al. Coxsackievirus A6 associated hand, foot and mouth disease in adults: clinical presentation and review of the literature. J Clin Virol. 2014;60(4):381-6.
7. Lipe DN, Affleck S. Atypical presentation of hand, foot, and mouth disease in an adult. Clin Pract Cases Emerg Med. 2018 17;2(2):179-180.
8. Second J, Velter C, Calès S, Truchetet F, Lipsker D, Cribier B. Clinico pathologic analysis of atypical hand, foot, and mouth disease in adult patients. J Am Acad Dermatol 2017;76(4):722-9.
9. Xing W, Liao Q, Viboud C, Zhang J, Sun J, Wu JT. Epidemiological characteristics of hand-foot-and-mouth disease in China, 2008-2012. Lancet Infect Dis. 2014; 14(4): 308-318. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70342-6.
10. Bian L, Wang Y, Yao X, Mao Q, Xu M, Liang Z. Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide. Expert Rev Anti Infect Ther. 2015;13(9):1061-71.
11. Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Ughetto S, Antona D, Boilly JL, et al. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with Coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large city wide, prospective observational study. Clin Microbiol Infect 2012;18:110-8.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Notes from the Field: Severe hand, foot and mouth disease associated with Coxsackievirus A6 - Alabama, Connecticut, California, and Nevada, November 2011-February 2012. MMWR 2012;61:213-4.
13. Shin JU, Oh SH, J. H. A case of hand-foot-mouth disease in an immunocompetent adult. Ann Dermatol. 2010. 22(2), 216-8.
14. Ni H, Yi B, Yin J, Fong T, He T, Du Y, et al: Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Ningbo, China, 2008-2011. J Clin Virol 2012;54:342-8.
15. Zhou H, Guo SZ, Zhou H, Zhu YF, Zhang LJ, Zhang W: Clinical characteristics of hand, foot and mouth disease in Harbin and the prediction of severe cases. Chin Med J, 2012;125:1261-5.
16. Koh WN, Bogich T, Siegel K, Jin J, Cang EY, Tan CY, et al. The epidemiology of hand, foot and mouth disease in Asia: A systematic review and analysis. Pediatr Infect Dis J. 2016; 35 (10): 285-300.
17. Kuşçu F, Kömür S, Ulu A. Erişkin bir hastada el, ayak ve ağız hastalığı. Flora, 2016;21 (2): 93-4.
18. Sağiroğlu PÇ, Eray İK, Babırhan DK. Gebelikte el-ayak-ağız hastalığı: Olgu sunumu. Ankara Med J, 2016;16(3):319-323.
19. Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Hakkında Tebliğ. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı. 2004.

Hızla yayılan çoklu ilaca dirençli maya mantarı: *Candida auris*

Rapidly spreading multi-drug resistant yeast: *Candida auris*

Tuğba AYHANCI¹, Mustafa ALTINDIŞ²

ÖZET

Candida auris, tanımlanmasından bu yana kısa bir süre içinde çeşitli ülkelerden rapor edilen ve çoklu ilaca direnç gösteren yeni bir *Candida* türüdür. İlk olarak dış kulaktan izole edildiği için bu ismi alan mantarın doğal rezervuarı bulunamamış, şu ana kadar sadece hastane ortamlarında izole edilmiştir. Konvansiyonel yöntemler ile yanlış tanımlanabilen mantarın gerçek prevalansı, bu nedenle bilinmemektedir. *C. auris*, diğer kandida türlerinde olduğu gibi kan dolaşımı enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonu, otit, cerrahi yara enfeksiyonları, kateter ilişkili cilt apseleri, miyokardit, menenjit, kemik enfeksiyonları ve yara enfeksiyonları gibi çeşitli invaziv enfeksiyonlara neden olmakta ve birçok hastane salgınından sorumlu tutulmaktadır. Geniş spektrumlu antibiyotik ve antifungal ajan kullanımı, diabetes mellitus, abdominal ve vasküler cerrahi, merkezi venöz kateterlerin varlığı, idrar kateterizasyonu, post-operatif dren yerleştirme, kronik böbrek hastalığı, kemoterapi, kan transfüzyonları, hemodiyaliz, total parenteral beslenme, yoğun bakımda kalış süresi, immünsüpresif durum diğer enfeksiyonlarda olduğu gibi *C. auris* için de artan risk faktörlerini oluşturmaktadır. *C. auris*; adherans, biyofilm oluşumu, fosfolipaz ve proteinaz enzimleri gibi çeşitli virülans faktörlerine sahiptir ve yaptığı enfeksiyonlar yüksek mortalite ile

ABSTRACT

Candida auris is a new type of *Candida* that has been reported in several countries and has been resistant to multiple drugs in a short time since its identification. This fungus, whose natural reservoir cannot be found, is almost exclusively isolated in hospital settings. The actual prevalence of mushroom misidentifiable by conventional methods is therefore not known. As with other *Candida* species, *C. auris* causes various invasive infections such as bloodstream infections, urinary tract infection, otitis, surgical wound infections, catheter-associated skin abscesses, myocarditis, meningitis, bone infections and wound infections, and is responsible for many hospital outbreaks. Use of broad-spectrum antibiotics and antifungal agents, diabetes mellitus, abdominal and vascular surgery, presence of central venous catheters, urinary catheterization, post-operative drain placement, chronic kidney disease, chemotherapy, blood transfusions, hemodialysis, total parenteral nutrition, duration of intensive care unit, the immunosuppressive condition also constitutes risk factors for *C. auris* as in other infections. *C. auris*; adherence has various virulence factors such as biofilm formation, phospholipase and proteinase enzymes, and infections may result in high mortality. Survival of

¹Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya

²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya



İletişim / Corresponding Author : Tuğba AYHANCI

İstiklal Mah. 383 Sok. No.5 Daire 19 54100 Adapazarı - Türkiye

Tel : +90 544 236 22 46 E-posta / E-mail : tugba.ayhanci@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 20.05.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 22.09.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.26879

Ayhancı T, Altındış M. Hızla yayılan çoklu ilaca dirençli maya mantarı: *Candida auris*.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 123-136

sonuçlanabilmektedir. Dış yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmesi ve dezenfektanlara kısmen dirençli olması, mantar ile kolonizasyon ve sonrasında enfeksiyonu kolaylaştırmaktadır. Çoğu izolat, yüksek flukonazol ve amfoterisin B MİK (minimal inhibitör konsantrasyon) değerleri göstermektedir. Ekinokandinlere direnç durumunun ise farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Bazı izolatlara, üç ana antifungal sınıfa da direnç göstermekte ve persistan enfeksiyonlara neden olmaktadır. *C. auris*'in birinci basamak tedavisinde ekinokandin sınıfı antifungaller kullanılmaktadır. Ekinokandinlere direnç durumunda ise kombinasyon tedavileri önerilmektedir. Laboratuvarların rutin tanısında genel olarak yanlış tanımlanması, antifungal ajanlara direnç göstermesi ve küresel anlamda hızla yayılması bu patojen için endişe uyandırmaktadır. Bu derlemenin amacı, yeni tanımlanan bir tür olan *C. auris*'in mikrobiyolojik özellikleri, virülans faktörleri, antifungal direnç mekanizmaları ve küresel yayılımının irdelenmesi ile klinik açıdan farkındalık oluşturmaktır.

Anahtar Kelimeler: *C. auris*, antifungal ilaç direnci, azalmış biyofilm formasyonu

external surfaces and partial resistance to disinfectants facilitate colonization with fungi and subsequent infection. Most isolates show high at a finding of an elevated minimum inhibitory concentration (MIC) fluconazole and amphotericin B values. Resistance to echinocandins has been reported to differ. Some isolates are resistant to three major antifungal classes and cause persistent infection. In the first-line treatment of *C. auris*, echinocandin class antifungals are used. In case of resistance to echinocandins, combination therapies are recommended. The general misconfiguration of laboratory diagnoses, resistance to antifungal agents and rapid spread in the global sense arouses concern for this pathogen. The aim of this review is to describe *C. auris*, a newly described species; microbiological characteristics, virulence factors, antifungal resistance mechanisms and global dissemination are examined to create a clinical awareness.

Key Words: *C. auris*, antifungal drug resistance, biofilm formation

GİRİŞ

C. auris, keşfedilmesinden bu yana kısa bir süre içinde birçok bölgeden izole edilen ve mevcut antifungallere direnç oranı yüksek olduğu saptanan yeni bir patojendir. Doğal rezervuarı bulunamayan bu mantar, neredeyse sadece hastane ortamlarında izole edilmiştir (1). İlk olarak 2009 yılında hospitalize bir Japon hastanın dış kulak örneğinden izole edilen mantar (2), daha sonra Kore'de 15 hastada kronik otitis media etkeni olarak saptanmıştır (3). 'Auris' latince kulak anlamına gelmektedir. *C. auris* de adını ilk olarak tanımlandığı enfeksiyondan almıştır. Fakat bu mantar da diğer *Candida* türlerinde olduğu gibi sadece kulak enfeksiyonu değil birçok invaziv enfeksiyon ile ilişkili bulunmuştur. *C. auris* ile ilgili

bilinen en eski vaka, 1996 yılında Güney Kore'de bulunan pediatrik cerrahi hasta kanının DNA sekans analizi ile retrospektif olarak taranması sonucu tanımlanmıştır (4). Rapor edilen vakalar sonucu; *C. auris* ile enfeksiyonun çoğunlukla hospitalize ve kritik hasta grubunda görüldüğü, yüksek mortalite ile seyrettiği, antifungallere direnç gösterdiği ve mikrobiyolojik tanısının zor olduğu gözlenmiştir (5-10).

C. auris, kuru ve nemli ortamlar dahil dış yüzeylerde 14 güne kadar canlı kalabilmektedir (11). Bu nedenle mantar ile kontamine olmuş yüzeyler, patojenin yayılmasında aracılık etmektedir. Antimikrobiyal özellikleri olan sentetik polimerlerin

tıbbi cihazlardaki potansiyel kullanımı, çok sayıda organizmaya karşı etkili olmasına rağmen *C. auris*'e karşı etkili bulunmamıştır (12). Dezenfektanların *C. auris*'e karşı etkinliği hakkında ise az sayıda veri bulunmaktadır. Kuaterner bileşiklere ve katyonik yüzey aktif ürünlere karşı dirençli görünen mantarın dezenfeksiyonunda, klor bazlı yüzey dezenfektanları en etkili ürün grubunu oluşturmaktadır. Aynı zamanda, hasta taburcu olduktan sonra çevresel dekontaminasyonda kullanılan ultraviyole ışığı ve hidrojen peroksit buharının da mantar üzerinde aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, dezenfeksiyon işlemlerine rağmen, *C. auris*'in hastane ortamından izolasyonu, patojen ve yüzeyler arasındaki etkileşim ve dezenfektanlara maruz kalma süresinin de önemini ortaya koymaktadır (13).

C. auris'in Mikrobiyolojik Özellikleri

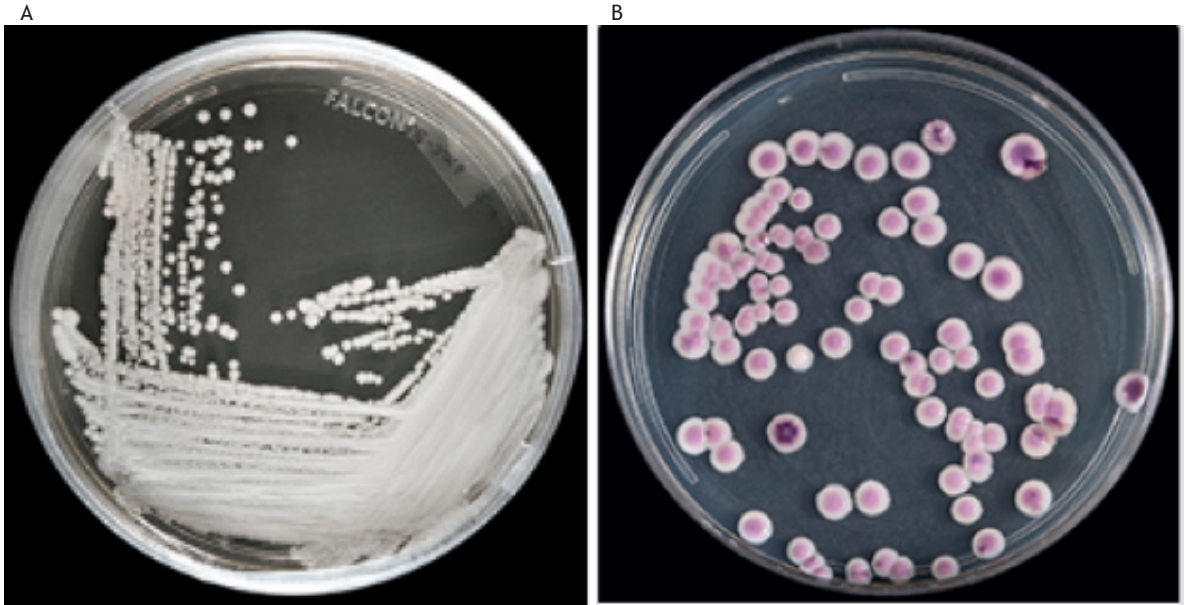
C. auris, Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerinde kenarları düz ve beyaz-krem renkli koloniler oluşturmaktadır. Kandidaların tanımlanmasında kullanılan CHROM Agar besiyerinde ise soluk veya koyu pembe bazen de bej renge görünmektedir (Şekil 1). *C. auris* kolonilerinin CHROM Agar besiyerindeki renk ve koloni morfolojileri, tanımlanmaya yardımcı olsa da tek tanı testi olarak kullanılmamalıdır. Çünkü *C. auris*'i diğer kandida türlerinden ayırt etmek zordur ve ek testlerin kullanılması gerekmektedir. *C. auris*, germ tüp oluşturmaz. Bazı suşların kültür ortamında; deterjan, ultraviyole ışığı veya diğer temizlik yöntemlerinin nüfuz etmesine izin verebilecek agregatlar oluşturduğu rapor edilmiştir.

Organizma, tuzlu ortam ve yüksek ısıya karşı tolerans göstermektedir. 42°C'de üreyebilmesi, özellikle *C. haemulonii* ve diğer kandida türleri ile ayırıcı tanısında kullanılmaktadır (5). Mikroskopik olarak incelendiğinde psöдохif oluşturmayan, oval yapılar gözlenirken; yüksek sodyum klorür konsantrasyonlarının kullanıldığı farklı kültür ortamlarında psöдохif benzeri yapılar oluşturmaktadır (14).

Genom analizleri, *C. auris*'in, *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii* ve *C. pseudohaemulonii* ile genetik olarak yakınlığını göstermiştir (15). Bu sebeple *C. auris*, genellikle biyokimyasal yöntemlerin kullanıldığı rutin tanısal laboratuvarlarda, sıklıkla *C. haemulonii* olarak yanlış tanımlanabilmektedir. Bunun yanı sıra API AUX 20C, VITEK-2 YST, BD Phoenix, and MicroScan gibi biyokimyasal bazlı ticari testlerde; *C. famata*, *C. sake*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces*, *C. catenulate*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* ve *C. parapsilosis* gibi hatalı tanımlama sonucu verdiği gözlenmiştir (Tablo 1). Son çalışmalarda ise BioMerieux 'un VITEK-2 paneline bu mantarı eklemesi ile doğru sonuçlar elde edildiği raporlanmıştır. Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF), *C. auris*'i diğer kandida türlerinden güvenilir şekilde ayırt edebilir. Ancak, MALDI-TOF cihazlarının referans veri tabanlarının tümü bu ayrımı gerçekleştirilememektedir (16). Yine, 28s rDNA'nın D1-D2 bölgesinin veya rDNA'nın internal transkribe bölgesinin (ITS) dizilimine dayanan PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) bazlı moleküler yöntemler de doğru ve güvenilir sonuç verse de bu yöntemler maliyet etkin olmadıkları için rutin tanıda kullanılmamaktadır (17).

Epidemiyolojisi

C. auris tanımlanmasında, konvansiyonel yöntemlerin yetersiz olduğu ve rutin laboratuvarlarda bu maya mantarının sıklıkla yanlış tanımlandığı görülmüştür. Bu nedenle gerçek prevalans ve epidemiyoloji bilinmemektedir (18). Tanıda yaşanan zorluklar nedeniyle, bu mayanın son zamanlarda ortaya çıkıp çıkmadığını, geçmişte yanlış tanımlanıp tanımlandığını araştırmak amacıyla yapılan retrospektif SENTRY (Antimikrobiyal Surveyans Programı) çalışmasında dört kıtadan toplanan 15.271 izolat içerisinde 2009 öncesine ait *C. auris* izolatı bulunamamıştır. Fakat aynı çalışma grubu 2008 yılında Pakistan'da daha önce tanımlanmamış bir *C. auris* izolatı tanımlamıştır (19). 2011 yılında ise



Şekil 1. *C. auris*'in koloni morfolojisi A: SDA besiyeri B: CHROM Agar besiyeri (15).

Tablo 1. Farklı tanı testleri ile gerçekleştirilen yanlış tanımlama sonuçları (17. Kaynaktan uyarlanmıştır).

Tanı Testi	Yanlış Tanımlama Örnekleri
API 20CAUX	<i>Rhodotorula glutinis</i> <i>C. sake</i>
API Candida	<i>C. Famata</i>
Phoenix (BD Diagnostics)	<i>C. haemulonii</i> <i>C. catenulate</i>
Vitek	<i>C. haemulonii</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. famata</i> <i>C. famata</i> <i>C. lusitaniae</i>
MicroScan (Beckman Coulter)	<i>C.guilliermondii</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>
MALDI-TOF MS	<i>C. albicans</i> <i>C. haemulonii</i>
Vitek MS (bioMérieux)	Not identified

Lee ve ark., (4); yüksek düzeyde antifungal direnci gösteren ve invaziv enfeksiyona neden olan ilk üç

fungemi vakası rapor etmiştir. Eldeki verilere göre, 1996 yılı öncesine ait tanımlanmamış bir *C. auris*

şu bulunmaktadır (13). *C. auris*, ilk izolasyonundan sonra genomik sekans sonucu Kore’de 15 hastada kronik otitis media etkeni olarak saptanmıştır (3). Daha sonra ise Hindistan, Pakistan Güney Kore, Malezya, Güney Afrika, Kenya, İsrail, Kuveyt, Birleşik Arap Emirlikleri, Çin, Birleşik Krallık, Venezuela, Rusya, Kanada, Panama, Kolombiya’ya da içeren en az 30 ülkeden rapor edilmiştir (Şekil 2). Bu süreçte, sporadik vakaların yanı sıra birçok ülkeden salgın bildirimleri yapılmıştır. Avrupa’da 2013-2017 yıllarında arasında yaşanan dört salgında rapor edilen 620 vaka; Kolombiya, Hindistan, Pakistan, Panama,

İspanya, İngiltere, ABD ve Venezuela’da (20) yaşanan diğer salgınlar, mantarın kısa süre içerisinde hızla yayıldığına kanıt oluşturmaktadır (13).

Birçok ülkeden kısa süre içerisinde bildirilen salgın ve sporadik vakalardaki *C. auris* izolatlarının klonal ilişkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan genom analiz çalışmalarında; izolatların klonal olarak yakın oldukları fakat küçük farklılıklar içerdiği, bu nedenle *C. auris*’in ortaya çıkışının bağımsız olduğu ve her birinin yerel olarak yayıldığı görülmüştür (19). Şekil 3’de kronolojik sıraya göre rapor edilen *C. auris* enfeksiyonları gösterilmiştir.

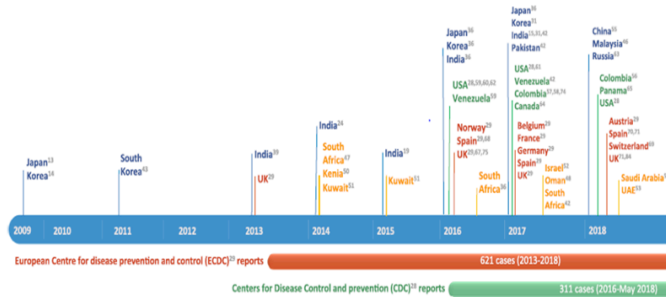


Tek bir *C. auris* vakası; Avusturya, Belçika, İran, Malezya, Hollanda, Norveç, İsviçre, Tayvan ve Birleşik Arap Emirlikleri’nden bildirilmiştir.

Çoklu *C. auris* vakası; Avustralya, Kanada, Çin, Kolombiya, Fransa, Almanya, Hindistan, İsrail, Japonya, Kenya, Kuveyt, Umman, Pakistan, Panama, Rusya, Suudi Arabistan, Singapur, Güney Afrika, Güney Kore, İspanya, İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri (öncelikle New York City, New Jersey ve Chicago bölgesinden) ve Venezuela; Bu ülkelerin bazılarında, birden fazla hastanede *C. auris*’in yaygın transmisyonu belgelenmiştir.

ABD’de *C. auris* vakası; son zamanlarda Hindistan, Kenya, Kuveyt, Pakistan, Güney Afrika, Birleşik Arap Emirlikleri ve Venezüella’daki sağlık hizmetlerinde kalmış hastalarda bulunmuş ve maya transmisyonu belgelenmiştir.

Şekil 2. 31 Mart 2019 itibariyle *C. auris* vakalarının rapor edildiği ülkeler (18. kaynaktan uyarlanmıştır).



Şekil 3. Kronolojik sıraya göre rapor edilen *C. auris* olguları (13).

Klinik Semptomları ve Risk Faktörleri

C. auris, ilk olarak kulak enfeksiyonundan izole edilmiş olsa da, bu mantarın da diğer kandida türleri gibi çeşitli invaziv enfeksiyonlara neden olduğu görülmüştür. Kan dolaşımı enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonu, otit, cerrahi yara enfeksiyonları, kateter ilişkili cilt apseleri, miyokardit, menenjit, kemik enfeksiyonları ve yara enfeksiyonları gibi birçok enfeksiyon, mantarın ilişkili bulunduğu enfeksiyonlardır (6,8). Yaptığı sistemik enfeksiyonlarda, bulgular spesifik değildir ve diğer sistemik enfeksiyonlardan ayırt etmek zordur. Ayrıca her yaşta görülebilmektedir. Bu durumlarda mortalite oranları %35, 2-60 gibi yüksek oranlarda seyretmektedir (21,22). Yapılan çalışmalarda *Candida* enfeksiyonlarının neden olduğu mortalite oranlarının diğer ülkelere kıyasla ülkemizde daha yüksek seyrettiği görülmüştür (23). Bununla birlikte mantar; akciğerler, idrar yolu, cilt ve yumuşak doku ve genital sitemde kolonize olabilmektedir. Bu durumlarda enfeksiyon belirti ve bulguların varlığı, diğer mantar türlerinde olduğu gibi *C. auris* için de kolonizasyon ve enfeksiyon ayırımı yapmak için yardımcı olmaktadır (24). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) *C. auris*'in steril olmayan vücut bölgelerinden izolasyonunda, enfeksiyon klinik belirtileri yok ise diğer mantar türlerinde olduğu gibi *C. auris* için de tedavi önermemektedir (25).

C. auris enfeksiyonuna bağlı risk faktörlerinin belirlenmesi için Rudramurthy ve ark., (8) Hindistan yoğun bakımdaki 27 vakayı *C. auris* ve non- *auris* olmak üzere analiz etmiş ve risk faktörleri açısından bir farklılık gözlenmemiştir. Diğer kandida türlerinde olduğu gibi; geniş spektrumlu antibiyotik ve antifungal ajan kullanımı, diabetes mellitus, abdominal ve vasküler cerrahi, merkezi venöz kateterlerin varlığı, idrar kateterizasyonu, post-operatif dren yerleştirme, kronik böbrek hastalığı, kemoterapi, kan transfüzyonları, hemodiyaliz, total parenteral beslenme, yoğun bakımda kalış süresi, immünsüpresif

durum *C. auris* için de artan risk faktörlerini oluşturmaktadır (26). Ayrıca, *C. auris* insidansı; hematolojik malignitelerin supresif tedavisinde, kemik iliği supresyonunda ve transplantasyon sonrası immünsüpresif ajanların kullanıldığı durumlarda belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur (27).

Virülans Faktörleri

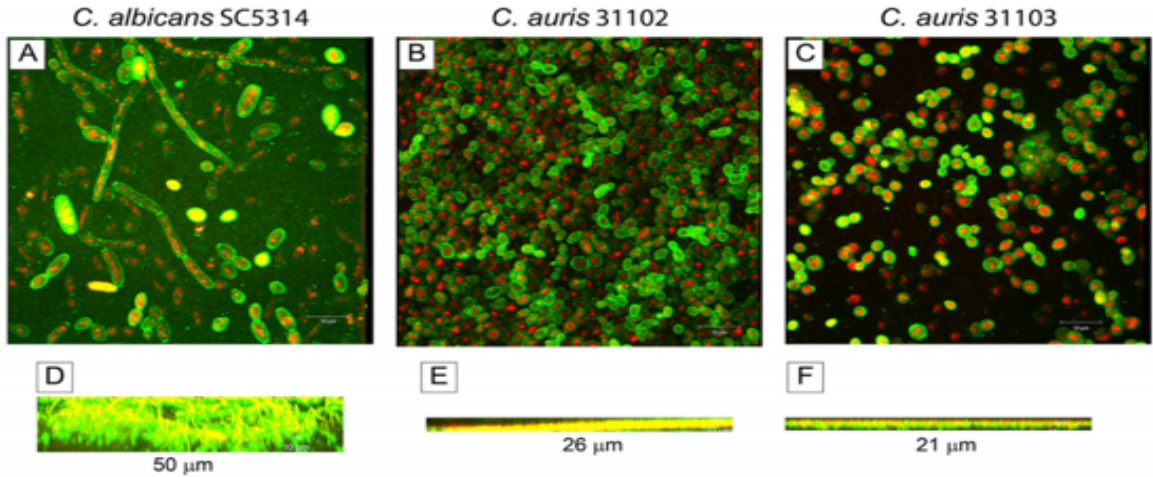
C. auris; adherans, biyofilm oluşumu, ekstraselüler enzim üretimi (fosfolipaz, proteinaz) gibi çeşitli virülans faktörlerine sahiptir. Tablo 2'de *C. auris*'in virülans faktörleri ve direnç genleri sunulmaktadır. Larkin ve ark. (28); Japonya, Hindistan, Güney Kore ve Almanya'dan izole edilen 16 *C. auris* izolatının morfolojik ve virülans karakterlerini araştırdıklarında; *C. albicans*'a kıyasla *C. auris*'te azalmış biyofilm oluşumu gözlemlemiştir. Ayrıca, *C. auris*'in oluşturduğu biyofilm tabakası mikroskopik olarak incelendiğinde maya hücreleri görülürken; *C. albicans*, maya ve hif yapılardan oluşan heterojen bir görünüm sergilemiştir (Şekil 4) (28). Sherry ve ark., (29) da *C. auris*'in üç ana antifungal sınıfına karşı, antifungal dirençli biyofilm oluşturma kabiliyetini tanımlamıştır. *C. auris*'in patojenitesinin araştırıldığı bir çalışmada, maya izolatlarının farklı formlar sergilediği ve agregatif formların agregatif olmayan formlara göre daha az patojen özellik gösterdiği gözlenmiştir (30).

C. auris'in Antifungal Direnç Profili ve Mekanizması

C. auris'in; sıklıkla azol ve poliyenlere yüksek oranda dirençli olduğu, ekinokandinlere ise değişen oranlarda direnç gösterdiği görülmüştür. Yapılan çalışmalar da diğer *Candida* türlerinin de en sık azol ve poliyen direnci gösterdiği ekinokandinlere karşı oluşan direncin daha az olduğu görülmüştür (31). Bazı suşlar ise her üç sınıfa da dirençli olup panrezistan özellik göstermektedir. Genellikle yüksek flukanazol direnci gösteren bu maya mantarı için Hindistan ve Kolombiya'da 2-8 mg/L gibi düşük MIK değerlerinin etkili olduğu kaydedilmiştir (32-35). Vorikonazol, amfoterisin B ve kaspofungin için ise yüksek MIK değerleri raporlanmıştır. Sekiz yıllık bir süre boyunca

Tablo 2. *C. auris* virülans ve direnç faktörleri (13. Kaynaktan uyarlanmıştır).

Virulans genleri
Hemolisin, aspartil proteinazlar, lipazlar, fosfatazlar, mannosil transferazlar, fosfolipaz, integrinler, adezinler, Zn (II) 2 cys 6 transkripsiyon faktörü
Direnç genleri
Azoller direnci
Taşıyıcı proteinleri ve effluks pompaları (ATP bağlayıcı kaset ABC; majör kolaylaştırıcı süper aile MFS; CDR1, CDR2, MDR1 upregülasyonu)
ERG 11 mutasyonları (Y132F, K143R ve F126T)
ERG 11 upregülasyonu
Ekinokandin direnci
FKS1 / 2 (ekinokandin ilaç hedefi 1,3-beta-glukan sentaz)
Yüzeyle ve plastik malzemelere (örneğin kateterler) yapışma
Biyofilm oluşumu
Hüresel morfoloji (aggregatif ve non-aggregatif form)
Rudimanter psödohif oluşumu

**Şekil 3.** Biyofilm formasyonu. A: *C. albicans*'ın oluşturduğu heterojen (maya ve hif) görünüm. B-C: *C. auris*'in homojen maya formasyonu D-E: yandan görünüm (27).

Hindistan'daki 10 hastaneden elde edilen 350 izolat ile gerçekleştirilen *C. auris* antifungal duyarlılık testinde, mantar suşlarının %90'ının flukonazole (MIK \geq 32-64 mg/L), %2'sinin ekinokandinlere (MIK \geq 8 mg/L), %8'nin amfoterisin B (MIK \geq 2 mg/L) ve %2,3'ünün vorikonazole (MIK \geq 16 mg/L) dirençli olduğu saptanmıştır (34). Kolombiya'da, klinik kan örnekleri, vücut swap örnekleri ve hastanelerdeki çevresel örneklerden elde edilen tüm izolatların

ise vorikonazol, itrakonazol, izokonazol ve ekinokandinlere düşük MIK gösterdiği gözlemlenmiştir. Görüldüğü gibi *C. auris*'in genel olarak azol ve poliyen direnci gösterdiği bilinse de bu antifungallere duyarlı olduğu saptanan bölgeler de bulunmaktadır. Azollere duyarlılık oranlarının coğrafi bölgelere göre farklılık göstermesi, bu bölgelerde klonal olarak bağımsız çoğalması gibi direnç gelişiminin de lokalize olduğunu göstermektedir (13).

Azol Direnci

Azol grubu antifungal ilaçlar, mantar hücre zarında bulunan ergosterol sentezi için gerekli, lanostreol-ergosterol dönüşümünü sağlayan ve bir sitokrom p450 enzimi olan 14 a-demetilaz enziminin inhibisyonu ile aktivite gösterir. *C. auris* ise 14 a-demetilaz enziminin sentezlendiği gende (ERG11) gerçekleştirdiği nokta mutasyonları ile bu ilaçlara karşı direnç geliştirmektedir. Yapılan çalışmalarda dirençli *C. auris* suşlarının gen bölgelerinde; Y132F, K143R, F126L aminoasit rezidülerinde değişimler gözlenmiştir. Önceki çalışmalarda *C. auris*'te gözlenen Y132F, K143R ve F126L gibi spesifik ERG11 substitüsyonlarının *C. albicans*'ta da görüldüğü ve doğrudan dirençle ilişkili olduğu ayrıca *Saccharomyces cerevisiae*'deki heterolog ekspresyonda da

azolere azalmış duyarlılık gösterdiği gözlenmiştir (36, 37). Ayrıca *C. albicans*'ta tanımlanmış azol direncindeki diğer mekanizmalardan olan ERG11 gen ekspresyonundaki artışın ve CDR1, CDR2, MDR1 gibi effluks pompalarının upregülasyonunun, *C. auris* izolatlarında da direnç gelişimine neden olduğu görülmüştür (35).

Ekinokandin Direnci

Ekinokandin direncinin ana mekanizmasını, ilaç hedefi olan 1,3-beta-glukan sentazı kodlayan FKS1 genindeki mutasyonlar oluşturmaktadır. Hindistan'da spesifik FKS primerlerinin kullanılarak yapıldığı gen analizinde 38 izolatın dördünün pan-ekinokandin direnci (MIK >8 mg/L) olduğu gözlenmiştir (34). Dirençli izolatlarda, *C. albicans*'a benzer şekilde

Tablo 3. Yetişkin ve iki yaşından büyük çocuklarda *C. auris* enfeksiyonları için başlangıç tedavisi (24.kaynaktan uyarlanmıştır).

Ekinokandin	Yetişkin doz	Pediyatrik doz
Anidulafungin	Yükleme dozu 200 mg IV, Sonra günlük 100 mg IV	Çocuklarda kullanımı yoktur
Kaspofungin	Yükleme dozu 200 mg IV, Sonra günlük 100 mg IV	Yükleme dozu 70mg / m ² / gün IV, sonra 50mg / m ² / gün IV (vücut yüzey alanına göre)
Mikafungin	Günlük 100 mg IV	2 mg / kg / gün IV 40 kg çocuklarda 4 mg / kg / güne çıkılabilir

Tablo 4. Yenidoğan ve iki yaşından küçük infantlarda *C. auris* enfeksiyonları için başlangıç tedavisi (24. Kaynaktan uyarlanmıştır).

Ekinokandin	Yetişkin doz
Kaspofungin	25 mg / m ² / gün IV (vücut yüzey alanına göre)
Mikafungin	Günde 10 mg IV

S639F amino substitisyonu tespit edilmiştir. Ayrıca Londra'daki kardiyotorasik salgından elde edilen hem ekinokandinlere hem de 5-flusitazine karşı dirençli bir *C. auris* izolatında, S652Y aminoasit substitüsü görülmüştür (38).

Amfoterisin B Direnci

C. auris'in neden olduğu Amfoterisin B direncinin temel mekanizması bilinmemektedir (13).

Tedavi

Ekinokandinler, genel olarak azollere ve amfoterisin B'ye direnç gösteren *C. auris* enfeksiyonları için birinci basamak tedaviyi oluşturmaktadır (Tablo 3 ve 4). Ekinokandinlere direnç durumunda ise lipozomal amfoterisin B tek ajan olarak veya ekinokandinler ile kombinasyon tedavisi olarak reçete edilebilir (26, 27, 39, 40). Direnç durumunda, bulaşıcı hastalıklar uzmanıyla konsültasyon önerilmektedir. Ayrıca itrakonazol, posakonazol ve izavukonazol gibi azollerin in vitro etki gösteren MİK değerleri düşük bulunmuştur. Genel olarak yüksek azol direnci gösteren mayanın, bu antifungallerde düşük MİK sergilemesi, maya izolatlarının daha önce bu ilaçlar ile karşılaşmamış olması ve azolün hedef proteinin farklı yapısı gibi nedenlerle açıklanmaktadır (21). Öte yandan mikafungin ve vorikanazolün sinerjistik etkisinin araştırıldığı in vitro incelemeler, özellikle dirençli suşlarda kombinasyon tedavisi için umut vericidir.

C. auris'in çoklu ilaca direnç gösterdiği ve yüksek prelevans ile seyrettiği göz önüne alındığında, yeni antifungal sınıflarına ihtiyaç görülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda yeni bir antifungal olan 1,3-B-D-glukan sentez inhibitörü SCY-078'in, ekinokandinlere dirençli *C. auris* izolatlarında in vivo ve in vitro aktivite gösterdiği ve biyofilm oluşumunu engellediği görülmüştür. Ayrıca oral alınması ve protein hedeflerindeki mutasyonlardan etkilenmemesi bu ilaç için avantaj oluşturmaktadır (41). VT-1598, *C. auris* izolatları dahil mantarlar üzerinde geniş aktiviteye sahip yeni üretilmiş başka bir azol ilacıdır

(MİK aralığı 0,03-8 mg/L) (42, 43). Eldeki verilere göre, çoklu ilaca dirençli enfeksiyonların potansiyel tedavisinde kullanılan ve antimikrobiyal peptidlerden olan θ -defensinler, gelecekte antifungal tedavi için de bir şablon olacaktır (44). APX001 ise antifungallere dirençli suşlar ve invazif mantar enfeksiyonlarının tedavisi için geliştirilmiş, geniş spektrumlu yeni antifungal ajanlardandır (45).

C. auris Bulaşması

C. parapsilosis'in yoğun bakım ünitelerinde yaptığı salgınlar dışında, tarihsel olarak kandida türlerinin hastane ortamlarında salgın yaptığı düşünülmemiştir (46-48). *C. auris* ise hastane ortamlarında kolayca yayılmasından dolayı, diğer maya türleri arasında farklılık göstermektedir (49).

Kolonizasyon, *C. auris* ile enfeksiyonda ve mantarın yayılmasında önemli bir faktördür. Aslında, çoğu kandida türü gastrointestinal yol, deri, tırnak ve diğer vücut bölgelerinde kommensal olarak bulanmaktadır (50). *C. auris*'in deriye tropizmi olduğu görülmektedir. Kolonizasyon bölgelerinin araştırıldığı çalışmalarda; *C. auris* en çok aksilla, kasık ve daha sonra burun deliklerinden izole edilmiştir. İdrar, dışkı, vajina ve rektum bunu takip eden diğer örneklerdir (11). *C. auris* ile enfekte bireylerde, genel olarak enfeksiyon sonrası özellikle deride kolonizasyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte kolonizasyon, enfeksiyon olmadan da gerçekleşebilmektedir (39). Her ne kadar *C. auris* ile asemptomatik kolonizasyonda antifungal tedavi gerekmez de kolonizasyonun invaziv enfeksiyona dönüşmesi ve bireyler arası aktarımın önlenmesi için kolonize hastaların mutlaka tanımlanması gerekmektedir.

C. auris, hastanede yatan hastalar arasında geçiş sağlayabilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, enfekte hastaların yakın temas ettiği kişiler *C. auris* kolonizasyonu açısından tarandığında %12'sinin bu patojen ile kolonize olduğu görülmüştür (39). Aynı şekilde, Hindistan'da yapılan taramalarda ise indeks vaka ile temas sonucu hastaların %21'inde kolonizasyon tespit edilmiştir. Bu çalışmalar, *C. auris*

ile kolonizasyonun, birkaç saat ya da birkaç gün gibi kısa sürede ve hızla gerçekleştiğini göstermiştir (51).

Sağlık personeli, *C. auris*'in bir hastadan diğerine bulaşmasında önemli rol oynayabilmektedir. Özellikle el hijyeni ve temas önlemlerinin yetersiz olması, kontamine ekipmanların taşınması ve kullanılması bu patojen için bulaşı kolaylaştırmaktadır. Kuzey Hindistan'da yapılan bir çalışmada, dört sağlık çalışanının elinde (%2,8) *C. auris* tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda bu durumun el hijyeni yetersizliğinden kaynaklandığı anlaşılmıştır (39). Birleşik Krallık'ta yapılan salgın araştırmasında ise burun, aksilla, kasık ve boğazlar örnekleri taranan 250'den fazla sağlık çalışanı içerisinde bir hemşirenin *C. auris* ile kolonize olduğu saptanmıştır (52).

C. auris Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol

C. auris'in; birçok ülkede hızla yayılması, yüksek mortalite ile seyreden invaziv enfeksiyonlara neden olması ve mevcut antifungal ajanlara dirençli olması bu patojen için enfeksiyon kontrol önlemlerinin önemini göstermektedir. Enfeksiyonunu önlenmesi ve kontrolü için İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Güney Afrika'da çeşitli rehberler yayınlanmıştır. Ortaya çıkan bu patojen hakkında sınırlı veri olduğundan kılavuzun çoğu, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (CRE) gibi diğer dirençli organizmalardan elde edilen verilerin tahminine dayanarak hazırlanmıştır (17).

Çevre izolasyonu çalışmalarda *C. auris*, genel olarak hastane ortamlarından izole edilmiştir. Hastanın temas ettiği alanlar da mantar ile kontaminasyona neden olmakta ve böylece hastane salgınlarına neden olduğu görülmektedir. Bu aşamada *C. auris*'in klinik ve enfeksiyon kontrol komitesine derhal bildirilmesi, enfeksiyon kontrol önlemlerinin zamanında uygulanması ve kolonizasyonu bulunan hastalarda enfeksiyon gelişiminin engellenmesi için oldukça önemlidir. Bir *C. auris* vakası tespit edildiği zaman olgu, ayrıntılı olarak araştırılmalı ve hasta ile yakın teması olan kişiler taşıyıcılık açısından

taranmalıdır.

Hastanelerde alınabilecek enfeksiyon kontrol önlemleri arasında; temas önlemleri, tek kişilik oda izolasyonu, kolonize veya enfekte olan hastalar için özel hemşire uygulamaları bulunmaktadır. Ayrıca, hali hazırda dekolonizasyon için bir protokol bulunmadığından ve izolasyonun sonlandırılmasının ne zaman güvenli olduğu bilinmediğinden, bu önlemlerin hastanın hastaneden taburcu oluncaya kadar uygulanması gerekmektedir. Hasta taburcu olduktan sonra ise kalmış olduğu odanın; klor bazlı dezenfektanlar (1000 ppm konsantrasyonunda), hidrojen-peroksit veya fungusit aktivitesi olan diğer dezenfektanlar ile terminal temizlik ve dezenfeksiyonu, mantarın trasmisyonun engellenmesi için önemlidir. Kuarterner amonyum bileşikler, *C. auris* üzerinde düşük aktivite gösterdiğinden tercih edilmemelidir.

Salgın durumunda, ortak ekipmanlar yerine tek kullanımlık ya da *C. auris* ile enfekte veya kolonize olan hastaya özgü ekipman kullanmak uygulanması gereken diğer bir önlemdir. İzleme cihazları, termometreler, nabız oksimetreler, kan basıncı ölçüm cihazları gibi yeniden kullanılabilir ekipmanların kullanıldığı durumlarda, bu aletlerin temizlik ve dezenfeksiyonunun üreticinin talimatlarına göre yapılması da önemlidir. Çevre örneklerinin veya sağlık çalışanlarının rutin taranması ise önerilen çalışmalar arasında bulunmamaktadır.

Salgın yönetiminde, tüm sağlık gruplarında farkındalık yaratmak ve eğitim vermek temel aşamayı oluşturmaktadır. Burada salgının kaynağını belirlemek için yapılacak epidemiyolojik araştırmaların bir an önce başlatılması ise başka vakaların önlenmesi için yararlı olacaktır. Salgın kontrolünde en etkili yol, hasta izolasyonu ile birlikte çevre temizlik ve dezenfeksiyonudur. Sağlık çalışanlarının el hijyeni ile uyumluluğunu geliştirmek için eğitim ve uygulama denetimleri, temas önlemleri ve çevresel temizliğin uygulanmasının denetlenmesi önemli destekleyici müdahalelerdir. El hijyeni, enfeksiyon kontrolünün

en temel bileşenlerinden biridir. *C. auris* için el dezenfeksiyonunda; sabun ve su, alkol bazlı el losyonları veya alkol-klorheksidin bazlı el losyonları kullanılabilir. Bununla birlikte, enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygun bir biçimde uygulanması için gerekli kaynakları sağlamak amacıyla hastane üst düzey yönetim desteğine ihtiyaç bulunmaktadır (53).

SONUÇ

C. auris, invaziv enfeksiyonlara neden olan ve mevcut antifungallere dirençli yeni bir maya türü olarak karşımıza çıkmaktadır. Tanımlanmasının

ardından kısa süre içinde birçok bölgeden rapor edilmesi, bu maya mantarının hızla yayıldığını göstermektedir. *C. auris*, birçok ülkede hastanelerde yatan hastalarda ciddi salgınlara neden olmakta ve yüksek mortalite ile seyretmektedir. Antifungallere gösterdiği direnç ise hızlı yayılımı kadar önem arz eden diğer bir konudur. Bu patojenin kontrolü için organizmanın doğru tanımlanması, uygun tedavi edilmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin zamanında uygulanması oldukça önemlidir. Özellikle tedaviye yanıt vermeyen olgularda *C. auris* akılda tutulmalı ve antifungal duyarlılık testi sonuçlarına göre antifungal terapi revize edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Ku TSN, Walraven CJ, Lee SA. *Candida auris*: disinfectants and implications for infection control. *Front Microbiol*, 2018; 9: 726.
2. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* spp. a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol*, 2009; 53: 41-4.
3. Kim MN, Shin JH, Sung H, Lee K, Kim EC, Ryoo N, et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin Infect Dis*, 2009; 48: 57-61.
4. Lee WG, Shin JH, Uh Y, Kang MG, Kim SH, Park KH, et al. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *J Clin Microbiol*, 2011; 49: 3139-42.
5. Kathuria S, Singh PK, Sharma C, Prakash A, Masih A, Kumar A, et al. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. *J Clin Microbiol*, 2015; 53: 1823-30.
6. Chowdhary A, Voss A, Meis JF. Multidrug-resistant *Candida auris*: "new kid on the block" in hospital-associated infections? *J Hosp Infect*, 2016; 94: 209-12.
7. Kim TH, Kweon OJ, Kim HR, Lee MK. Identification of uncommon *Candida* species using commercial identification systems. *J Microbiol Biotechnol*, 2016; 26: 06-13.

8. Rudramurthy SM, Chakrabarti A, Paul RA, Sood P, Kaur H, Capoor MR, et al. Candida auris candidaemia in Indian ICUs: analysis of risk factors. *J Antimicrob Chemother*, 2017; 72: 1794-801.
9. Ben-Ami R, Berman J, Novikov A, Bash E, Shachor-Meyouhas Y, Zakin S, et al. Multidrug-resistant Candida haemulonii and C. auris, Tel Aviv, Israel. *Emerg Infect Dis*, 2017; 23: 195-203.
10. Osei SJ. Candida auris: a systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *Microbiologyopen*, 2018;7(4): e00578.
11. Welsh RM, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A, Rose LJ, et al. Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast Candida auris on a plastic health care surface. *J Clin Microbiol*, 2017; 55: 2996-3005.
12. Chauhan R, Loonker S. Synthesis, characterization and biological evaluation of chitosan epoxy n-methyl piperazine as antimicrobial agent. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2017; 45: 266 -70.
13. Cortegiani A, Misseri G, Fasciana T, Giammanco A, Giarratano A, Chowdhary A. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by Candida auris. *J Intensive Care*, 2018; 6: 69.
14. Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen Candida auris and other key pathogenic Candida species. *Clin Sci and Epidemiol*, 2016;1: e00189-16.
15. Munoz JF, Gade L, Chow NA, Loparev VN, Juieng P, Farrer RA, et al. Genomic basis of multidrug-resistance, mating, and virulence in Candida auris and related emerging species. *bioRxiv*, 2018: 299917.
16. Anonymous. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/recommendations.html>, (Erişim Tarihi: 15.05. 2019).
17. Jeffery-Smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM, Borman A. Candida auris incident management team, Manuel R, Brown CS. Candida auris: a review of the literature. *Clin Microbiol Rev*, 2018; 31: e00029-17.
18. Anonymous. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>, (Erişim Tarihi: 15.05. 2019).
19. Lockhart SR, Berkow EL, Chow N, Welsh RM. Candida auris for the clinical microbiology laboratory: not your grandfather's Candida species. *Clin Microbiol Newsl*, 2017; 39: 99-103.
20. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant Candida auris on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis*, 2017;64(2): 134-40.
21. Sayeed MA, Farooqi J, Jabeen K, Awan S, Mahmood SF. Clinical spectrum and factors impacting outcome of Candida auris: a single center study from Pakistan. *BMC Infect Dis*, 2019; 19: 384.
22. Morales-López SE, Parra-Giraldo CM, Ceballos-Garzón A, Martínez HP, Rodríguez GJ, Álvarez-Moreno CA, et al. Invasive infections with multidrug-resistant yeast Candida auris, Colombia. *Emerg Infect Dis*, 2017; 23(1): 162-4.
23. Çetin Ş, Sav H, Çelik İ, Bolat E, Afsar-Çagır F, Bulut T, et al. Yoğun bakım ünitesinde gelişen sağlık bakımı ile ilişkili Candida infeksiyonlarının değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2019; 76(2): 169-76.
24. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2016; 15:62(4): e1-50.
25. Anonymous. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-treatment.html>, (Erişim Tarihi: 15.05. 2019).

26. Azar MM, Turbett SE, Fishman JA, Pierce VM. Donor-derived transmission of *Candida auris* during lung transplantation. *Clin Infect Dis*, 2017; 65: 1040-2.
27. Vallabhaneni S, Kallen A, Tsay S, Chow N, Welsh R, Kerins J, et al. Investigation of the first seven reported cases of *Candida auris*, a globally emerging invasive, multidrug-resistant fungus-United States, May 2013- August 2016. *Am J Transplant*, 2017;17: 296-9.
28. Larkin E, Hager C, Chandra J, Mukherjee PK, Retuerto M, Salem I, et al. The emerging pathogen *Candida auris*: growth phenotype, virulence factors, activity of antifungals, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017; 61(5): pii: e02396-16.
29. Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, et al. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis*, 2017;23: 328-31.
30. Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen *Candida auris* and other key pathogenic *Candida* species. *MSphere*, 2016;1: e00189-16.
31. Aydemir Ö, Demiray T, Köroğlu M, Aydemir Y, Altındış M. Emerge of non-*albicans* *Candida* species; evaluation of *Candida* species and antifungal susceptibilities according to years. *Int J Med Sci*, 2017; 28: 6.
32. Escandón P. Notes from the field: surveillance for *Candida auris* Colombia, September 2016-May 2017. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2018;67: 459-60.
33. Escandón P, Chow NA, Caceres DH, Gade L, Berkow EL, Armstrong P, et al. Molecular epidemiology of *Candida auris* in Colombia reveals a highly related, country-wide colonization with regional patterns in amphotericin B resistance. *Clin Infect Dis*, 2019; 1: 68(1): 15-21.
34. Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, Kordalewska M, Kumar A, Sarma S, et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2018;73: 891-9.
35. Mathur P, Hasan F, Singh PK, Malhotra R, Walia K, Chowdhary A. Five-year profile of candidemia at an Indian trauma center: high rates of *Candida auris* blood stream infections. *Mycoses*, 2018;61: 674-80.
36. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010;66: 373-84.
37. Xiang M-J, Liu J-Y, Ni P-H, Wang S, Shi C, Wei B, et al. Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*, 2013;13: 386-93.
38. Rhodes J, Abdolrasouli A, Farrer RA, Cuomo CA, Aanensen DM, Armstrong- James D, et al. Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris*. *Emerg Microbes Infect*, 2018; 7:43.
39. Tsay S, Welsh RM, Adams EH, Chow NA, Gade L, Berkow EL, et al. Notes from the field: ongoing transmission of *Candida auris* in health care facilities - United States, June 2016-May 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2017; 66: 514-5.
40. Ruiz Gaitan AC, Moret A, Lopez Hontangas JL, Molina JM, Aleixandre Lopez AI, Cabezas AH, et al. Nosocomial fungemia by *Candida auris*: first four reported cases in continental Europe. *Rev Iberoam Micol*, 2017;34: 23-7.
41. Berkow EL, Angulo D, Lockhart SR. In vitro activity of a novel glucan synthase inhibitor, SCY-078, against clinical isolates of *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017;61: e00435-17.

42. Wiederhold, NP, Patterson HP, Tran BH, Yates CM, Schotzinger RJ, Garvey EP. Fungal-specific Cyp51 inhibitor VT-1598 demonstrates in vitro activity against *Candida* and *Cryptococcus* species, endemic fungi, including *Coccidioides* species, *Aspergillus* species and *Rhizopus arrhizus*. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73, 404-8.
43. Wiederhold NP, Lockhart SR, Najvar LK, Berkow EL, Jaramillo R, Olivo M. The fungal cyp51-specific inhibitor vt-1598 demonstrates in vitro and in vivo activity against *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019; 63(3): pii: e02233-18.
44. Basso V, Garcia A, Tran DQ, Schaal JB, Tran P, Ngole D, et al. Fungicidal potency and mechanisms of theta-Defensins against multidrug-resistant *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018;62: e00111-8.
45. Hager CL, Larkin EL, Long L, Zohra Abidi F, Shaw KJ, Ghannoum MA. In vitro and in vivo evaluation of the antifungal activity of APX001A/APX001 against *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018; 62 (3): pii: e02319-17.
46. Magobo RE, Naicker SD, Wadula J, Nchabeleng M, Coovadia S, Hoosen A, et al. Detection of neonatal unit clusters of *Candida parapsilosis* fungaemia by microsatellite genotyping: results from laboratory-based sentinel surveillance, South Africa, 2009-2010. *Mycoses*, 2017; 60: 320-7.
47. Pinhati HM, Casulari LA, Souza AC, Siqueira RA, Damasceno CM, Colombo AL. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. *BMC Infect Dis*, 2016; 16: 433.
48. Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, et al. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 2002; 40 (7): 2363-9.
49. Forsberg K, Woodworth K, Walters M, Berkow EL, Jackson B, Chiller T, et al. *Candida auris*: the recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Med Mycol*, 2019, 57(1): 1-12.
50. Richardson M, Richardson MD, Warnock DW. *Fungal Infection: Diagnosis and Management*, 4th ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2012.
51. Biswal M, Rudramurthy SM, Jain N, Shanth AS, Sharma D, Jain K, et al. Controlling a possible outbreak of *Candida auris* infection: lessons learnt from multiple interventions. *J Hosp Infect*, 2017; 97: 363-70.
52. Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2016; 5: 35.
53. Anonymous. <http://www.promedmail.org/post/20180425.5767936>, (Erişim Tarihi: 15.05.2019).

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE



HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

...../...../20...

Makale Türü/Article Type:

(...) Araştırma/Research (..) Derleme/Review (..) Olgu Sunumu/Case Report (..) Editöre Mektup/Letter to Editor

Makale Başlığı/Article Entitled :

Sayın Editör,

Yayımlanması dileğiyle Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;

1. Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orjinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Makalenin; derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
3. Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
4. Yayın haklarının Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here, we affirm and warranty as the author(s) of this manuscript submitted to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology that;

1. The article I / We submitted to the Bulletin is original and responsibilities are belong to us ethically and scientifically,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under the evaluation of this bulletin,
3. The article contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights,
4. The article publishing rights belong to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.

(...1) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...2) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...3) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...4) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...5) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

Not / Note : 1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)

2. Formu aşağıdaki adrese faks/posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below by faks or mail or deliver personally

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 E Blok Park Girişi 06100 Sıhhiye-ANKARA-TURKEY

Tel/Phone : +90 312 565 55 80

Faks/Fax : +90 312 565 55 91

e-posta/e-mail : hsgm.thdbd@saglik.gov.tr

