

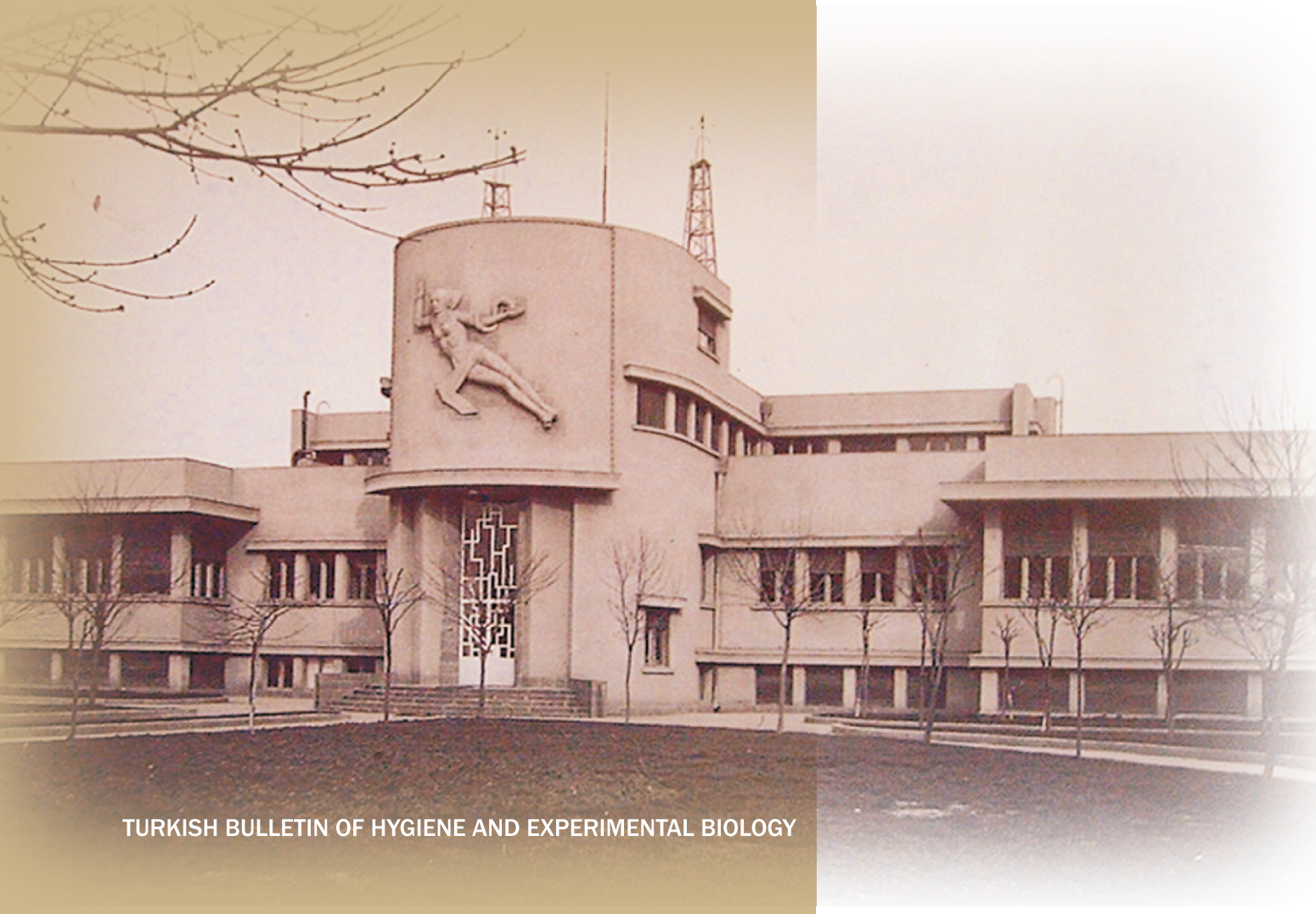


T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 72 ■ Sayı/Number 1 ■ Yıl/Year 2015





T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

T.R.
THE MINISTRY OF HEALTH
PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

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

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 72 ■ Sayı/Number 1 ■ Yıl/Year 2015

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

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu adına
On behalf Public Health Institution of Turkey

İrfan ŞENCAN, Başkan (President)

İDARI KURUL / ADMINISTRATIVE BOARD

Kamil TÜRKMEN
Alev YÜCEL
Bekir KESKİNKILIÇ
Seher MUSAONBAŞIOĞLU
Zeki KORKUTATA

EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Hasan IRMAK

EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Yavuz UYAR
Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN
Demet CANSARAN-DUMAN
Nurhan ALBAYRAK
Pınar KAYNAR

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Fatih BAKIR
Mestan EMEK
Selin NAR-ÖTGÜN
Dilek YAĞCI-ÇAĞLAYIK
Mehmet Kürşat DERİCİ
Meryem JEFFERIES
Özcan ÖZKAN
Şule ŞENSES-ERGÜL
Arşun ESMER
Sibel KARACA

TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Ahmet Murad BAYRAM
Murat DUMAN
Zeynep KÖSEOĞLU
Selahattin TAŞOĞLU

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayınlanır / Published four times per year
Asitsiz kağıt kullanılmıştır / Acid free paper is used

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu / Public Health Institution of Turkey
Destek Hizmetleri / Supportive Services
Satınalma ve İdari İşler Daire Başkanlığı /
Purchasing and Administrative Affairs Department

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

Koza Basım~Yayın
Özveren Sok. No: 13/A Kızılay-Ankara
Tel: +90 312 229 37 41-42
e-posta: anilgroupkoza@hotmail.com

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

2015

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, Sweden

Anna PAPA, Greece

Aziz SANCAR, USA

Cristina DOMINGO, Germany

Daniel MOTLHANKA, Botswana

Dwight D. BOWMAN, USA

Isme HUMOLLI, Kosovo

Isuf DEDUSHAJ, Kosovo

Iva CHRISTOVA, Bulgaria

Johan LINDH, Sweden

Kosta Y. MUMCUOĞLU, Israel

Manfred WEIDMANN, U.Kingdom

Paul HEYMAN, Belgium

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Cuba

Sıraç DİLBER, Sweden

Susana RODRIGUEZ-COUTO, Spain

Takashi AKAMATSU, Japan

Varalakshmi ELANGO, India

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Ahmet KART, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Arsun ESMER, Ankara

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Ayhan FİLAZİ, Ankara

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Çorum

Banu ÇAKIR, 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, Ankara

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Duygu TUNCER, Ankara

Dürdal US, Ankara

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fatih KÖKSAL, Adana

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

- Gülnur TARHAN, Adıyaman
Hakan ABACIOĞLU, İzmir
Hakan LEBLEBİCİOĞLU, Samsun
Haluk VAHABOĞLU, İstanbul
Hasan TEZER, Ankara
Hilal ÖZDAĞ, Ankara
Hürrem BODUR, Ankara
Işıl MARAL, İstanbul
İ.Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir
İrfan EROL, Ankara
İrfan ŞENCAN, Ankara
İsmail CEYHAN, Ankara
Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara
Koray ERGÜNAY, Ankara
Levent AKIN, Ankara
Mahinur AKKAYA, Ankara
Mehmet Ali ONUR, Ankara
Mehmet Kürşat DERİCİ, Ankara
Meryem JEFFERIES, Ankara
Mestan EMEK, İzmir
Metin KORKMAZ, İzmir
Mithat ŞAHİN, Kars
Muhsin AKBABA, Adana
Murat DİZBAY, Ankara
Murat GÜNAYDIN, İstanbul
Murat HÖKELEK, İstanbul
Mustafa KAVUTÇU, Ankara
Mutlu ÇELİK, Kocaeli
Mükerrem KAYA, Erzurum
Nazmi ÖZER, Ankara
Nilay ÇÖPLÜ, Ankara
Nur AKSAKAL, Ankara
Nur Münevver PINAR, Ankara
Nuran ESEN, İzmir
Nurhan ALBAYRAK, Ankara
Nuri KIRAZ, İstanbul
Oğuz GÜRSOY, Denizli
Orhan BAYLAN, İstanbul
Orhan YILMAZ, Ankara
Ömer Faruk TEKBAŞ, Ankara
Özcan ÖZKAN, Ankara
Özlem KURT AZAP, Ankara
Pınar KAYNAR, Ankara
Pınar OKYAY, Aydın
Rahmet GÜNER, Ankara
Recep AKDUR, Ankara
Recep KEŞLİ, Afyon
Recep ÖZTÜRK, İstanbul
Rıza DURMAZ, Ankara
S. Aykut AYTAÇ, Ankara
Sami AYDOĞAN, Kayseri
Seçil ÖZKAN, Ankara
Seda KARASU YALÇIN, Bolu
Seda TEZCAN, Mersin
Selçuk KAYA, Trabzon
Selçuk KILIÇ, Ankara
Selim KILIÇ, Ankara
Selin NAR ÖTGÜN, Ankara
Sema BURGAZ, Ankara
Sercan ULUSOY, İzmir
Sibel KARACA, Ankara
Sultan ESER, İzmir
Suzan ÖZTÜRK YILMAZ, Sakarya
Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa
Sümer ARAS, Ankara
Şule SENSES ERGÜL, Ankara
Tevfik PINAR, Kırıkkale
Yavuz UYAR, İstanbul
Yeşim ÇETİNKAYA ŞARDAN, Ankara
Yeşim ÖZBAŞ, Ankara
Yeşim TUNÇOK, İzmir
Zafer ECEVİT, Ankara
Zafer KARAER, Ankara
Zati VATANSEVER, Kars
Zehranur YÜKSEKDAĞ, 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 incelemeye gerek görülmez yazılarına 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, çatışılan kurumlara ait birimler, yazışma işini üstleneni yazının 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 staflok, streptokok gibi dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir. Antibiyotik isimleri dil bütünlüğü açısından okunduğu gibi yazılmalı; uluslararası standartlara uygun olarak kısaltılmamalıdır.

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 bırakılmamalıdır.

8. Yazarlar araştırma ve yayın etiğine uymalıdır. Klinik araştırmalarda, çalışmaya katılanlardan bilgilendirilmiş olur alındığının gereği 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”nı göndermelidir.

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

10. Hasta kimliğini tanıttak 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 sayfayı 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 numaralandırılmamalıdır. Numaralar, parantez içinde cümle sonlarında verilmelidir. Kaynakların yazılımlı 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/>) bakılmamalıdır.

Süreli yayın: Yazar(lar)ın Soyadı Adının baş harf(ler)i (altı veya daha az yazar varsa hepsi yazılmalıdır; yazar sayısı yedi veya daha çoksa 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 numarası.

• Standart 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 pancreas (Editorial). Br Med J, 1981; 283: 628.

• Dergi eki için örnek: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional 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 Immune 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 numarası.

• Örnek: 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 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, Mascaró 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 savaklarının hidrolik karakteristiklerinin deneysel olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.

GenBank/DNA dizisi 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.

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 edilen 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. Olgular sunularında metin yedi sayfayı aşmamalıdır. Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet ve anahtar kelimeler ayrıca giriş, olgu ve tartışma bölümleri bulunmalıdır. Olgular 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 iletilmesini amacıyla yazılan yazılar, Yayın Kurulu'nun inceleme ve değerlendirilmesinin 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.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

Tel : (0312) 565 55 79

Faks : (0312) 565 54 55

e-posta : turkhijyen@thsk.gov.tr

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.turkhijyen.org through the Online "Manuscript Submission, Tracking, Evaluation Program".

Manuscripts are checked according to 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 Parazit 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 papers: 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.

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)".

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

Public Health Institution of Turkey

Tel : +90 312 565 55 79

Fax : +90 312 565 54 55

e-mail : turkhijyen@thsk.gov.tr

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

- Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 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 standart 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 “Public Health Institute of Turkey (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu)” 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.



DOAJ
DIRECTORY OF
OPEN ACCESS
JOURNALS



INDEX
COPERNICUS
INTERNATIONAL



SCIRUS
for scientific information only

Academic Journals Database
disseminating
quality controlled scientific knowledge



Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (Türk Hij Den Biyol Derg); CAB Abstracts (Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, Diagnosis of Human Diseases, Tropical Diseases Bulletin, Global Health, AgBiotech, Veterinary Abstracts, Food Contamination, Residues and Toxicology, Human Toxicology and Poisoning), DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Ulrichsweb and Serials Solutions, NewJour, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, Ovid Link Solver, BASE (Bielefeld Academic Search Engine), EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Libsearch, Medoanet, SCOPUS, Türkiye Atıf Dizini, Türk-Medline ve TUBITAK-ULAKBİM Türk Tıp Dizini'nde dizinlenmektedir.

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (Türk Hij Den Biyol Derg) is indexed in CAB Abstracts (Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, Diagnosis of Human Diseases, Tropical Diseases Bulletin, Global Health, AgBiotech, Veterinary Abstracts, Food Contamination, Residues and Toxicology, Human Toxicology and Poisoning), DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Ulrichsweb and Serials Solutions, NewJour, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, Ovid Link Solver, BASE (Bielefeld Academic Search Engine), EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Libsearch, Medoanet, SCOPUS, Türkiye Atıf Dizini, Türk-Medline, and TUBITAK-ULAKBİM Türk Tıp Dizini.



İLETİŞİM

CORRESPONDENCE

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Public Health Institution of Turkey
Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. Nu: 55 Refik Saydam Yerleşkesi 06100 Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 55 79

Faks: 0312 565 54 55

e-posta: turkhijyen@thsk.gov.tr

[http: www.thsk.gov.tr](http://www.thsk.gov.tr)

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Hastane kaynaklı enterokok izolatlarının pulsed-field jel elektroforezis yöntemiyle moleküler tiplendirilmesi

Molecular typing of nosocomial enterococci by pulsed-field gel electrophoresis

Dilek GÜLDEMİR, Alper KARAGÖZ, Tuba DAL, Alicem TEKİN, Tuncer ÖZEKİNCİ, Rıza DURMAZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.94695 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

1 - 10



2. Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi'ne başvuran akut gastroenteritli çocuklarda rotavirüs enfeksiyonunun sıklığı

Frequency of rotavirus infection in children with acute gastroenteritis in Kırıkkale Yüksek İhtisas Hospital

Serap SÜZÜK, Havva AVCIKÜÇÜK, Mehmet KAVAK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.53386 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

11 - 16



3. Yatan hasta örneklerinden izole edilen *Candida* izolatlarının tür dağılımlarının ve antifungal duyarlılık profillerinin değerlendirilmesi

Evaluation of species distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida* isolates from hospitalized patients

Gülşen HAZIROLAN, Dilara YILDIRAN, İrmak BARAN, İpek MUMCUOĞLU, Neriman AKSU
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.75010 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

17 - 26



4. Evaluation of systemic tissue involvement in mice following intraperitoneal inoculation of *Toxoplasma gondii* RH Ankara strain

Toxoplasma gondii RH Ankara suşu ile intraperitoneal olarak enfekte edilen farelerde sistemik doku tutulumunun değerlendirilmesi

Emine ŞAMDANCI-TÜRKMEN, Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN, Cahit BABÜR, Mesut MUNGAN, Nasuhi Engin AYDIN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.32448 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

27 - 36



5. Vakum manifold sistemi kullanılarak içme kullanma sularında klorlu pestisitlerin katı - sıvı ekstraksiyon yöntemi ile analizi

Determination of chlorinated pesticide residues in drinking water by liquid-solid extraction and vacuum manifold system

Gündüz ÇİFTÇİOĞLU, Deniz KARLIK, Metin ATEŞ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.52385 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

37 - 44



6. Identification of some *Lecidea*, *Porpidia* and *Lecidella* species (lichen-forming ascomycetes) distributed in Turkey by sequence analysis of rDNA ITS region

Türkiye'de yayılış gösteren bazı *Lecidea*, *Porpidia* ve *Lecidella* türlerinin (liken oluşturan ascomycetes) rDNA ITS bölgesinin dizi analizi yöntemi ile tanımlanması

Esin BAŞARAN, Demet CANSARAN-DUMAN, İlker BÜYÜK, Sümer ARAS
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.23540 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

45 - 58



■ Olgu Sunumu / Case Report

7. *Pantoea agglomerans*'ın neden olduğu kateter ilişkili bir sepsis olgusu

A catheter related sepsis case caused by *Pantoea agglomerans*

Fadime YILMAZ, Sercan SAVCI, Elvin PAZAR-YILDIRIM, Nevriye GÖNÜLLÜ, Işıl BAVUNOĞLU, Fatma KÖKSAL-ÇAKIRLAR, Yavuz UYAR, Hrisi Bahar TOKMAN, Murat GÜNAYDIN, Nuri KIRAZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.90267 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

59 - 62



■ Derleme / Review

8. Molecular techniques for clinical diagnostic bacteriology

Klinik bakteriyoloji tanısında moleküler teknikler

Nevriye GÖNÜLLÜ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.32704 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

63 - 72



9. Kuşlarda ve insanlarda *Chlamydomphila psittaci* enfeksiyonu

Chlamydomphila psittaci infection of birds and humans

Bülent BAŞ, Gökçen DİNÇ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.13281 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

73 - 78



10. Laktik asit bakterilerinde çoğunluğu algılama mekanizması

Quorum sensing mechanism in lactic acid bacteria

Hatice YILMAZ-YILDIRAN, Aynur Gül KARAHAN, Gülden BAŞYİĞİT-KILIÇ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.04695 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

79 - 90



Hastane kaynaklı enterokok izolatlarının pulsed-field jel elektroforezis yöntemiyle moleküler tiplendirilmesi

Molecular typing of nosocomial enterococci by pulsed-field gel electrophoresis

Dilek GÜLDEMİR¹, Alper KARAGÖZ¹, Tuba DAL², Alicem TEKİN³, Tuncer ÖZEKİNCİ³, Rıza DURMAZ¹

ÖZET

Amaç: Enterokoklar hastaneden kaynaklanan üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının ikinci, bakteriyemilerin ise üçüncü en sık nedenidir. Günümüzde, özellikle vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşları nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olarak morbidite, mortalite ve tedavi maliyetlerini artıran önemli patojenlerdir. Hastane kaynaklı VRE salgınlarnın önlenmesi, kontrolü ve epidemiyolojik analizlerinin yapılması son derece önem taşımaktadır. Pulsed-field jel elektroforezis (PFGE) yöntemi enterokokal enfeksiyonların moleküler epidemiyolojik analizinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmanın amacı, hastane kaynaklı enterokok izolatları arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek ve olası çapraz bulaşı ortaya koymaktır.

Yöntem: Kasım 2010 - Haziran 2012 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi (DÜTF) Hastanesinin çeşitli kliniklerinde yatan ve hastane kaynaklı enfeksiyon tanısı alan hastalardan izole edilen 36 enterokok suş çalışıldı. 36 suşun 18'i idrar, altısı kan, beşi bronkoalveolar lavaj (BAL), beşi yara, biri vajinal sürüntü ve biri ise kataterden izole edilmiş olup, dokuzu VRE olarak tanımlanmıştır. İzolasyon ve tanımlanan DÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Tanımlama için

ABSTRACT

Objective: Enterococci are the second most common cause of nosocomial urinary tract and wound infections, also third most common cause of nosocomial bacteremia. Currently, especially vancomycin-resistant enterococci (VRE) are one of the significant pathogens that cause nosocomial infections and increase mortality, morbidity, and healthcare costs. Therefore prevention and control of the nosocomial VRE outbreaks and epidemiological analysis of the infection are important. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) is accepted as a "gold standard" method in the molecular epidemiological analysis of enterococcal infections. The aims of this study are to determine the clonal relationship among the nosocomial enterococcal isolates and the rate of cross-contamination between them.

Method: Thirty-six *Enterococcus* strains isolated from hospitalized patients with nosocomial infection in different clinics of Dicle University Hospital between November 2010 and June 2012 were included in this study. A total of 36 isolates were obtained from various clinical samples including urine (n=18), blood (n=6), bronchoalveolar lavage (BAL) fluid (n=5), wound biopsy sample (n=5), vaginal smear (n=1) and catheter tip (n=1). Nine of the thirty-six isolates were VRE. Isolation and identification of the isolates were conducted in the

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, ANKARA

² Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA

³ Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, DİYARBAKIR



İletişim / Corresponding Author : Dilek GÜLDEMİR

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, ANKARA

Tel : +90 312 565 5449

E-posta / E-mail : dilekg06@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received : 02.10.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 04.12.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.94695

Güldemir D, Karagöz A, Dal T, Tekin A, Özekinci T, Durmaz R. Hastane kaynaklı enterokok izolatlarının pulsed-field jel elektroforezis yöntemiyle moleküler tiplendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 1-10.

konvansiyonel yöntemler ve BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, MD, USA) tam otomatik mikrobiyoloji sistemi kullanıldı. *Enterococcus* spp. suşlarının tam otomatik mikrobiyoloji sistemi ile Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü (CLSI) önerilerine uygun olarak antibiyotik duyarlılıkları belirlendi. İzolatların vankomisin duyarlılıkları E-test yöntemi ile de çalışıldı. Kalite kontrolü için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı. Enterokok izolatları aralarındaki çapraz bulaş oranlarını belirlemek için PFGE çalışıldı. PFGE çalışması Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Kromozomal DNA; SmaI enzimi ile kesildi. DNA restriksiyon fragmanları CHEF DR II (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) sistemi kullanılarak gösterildi. İzolatlar arasındaki klonal ilişki, BioNumerics Software Program (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak oluşturulan dendrogram ile değerlendirildi.

Bulgular: PFGE yöntemiyle izolatların DNA fragment paternleri elde edildi ve bu paternlerin dendrogramı yapıldı. DNA paternlerinin birebir karşılaştırılması sonucu 26 *Enterococcus faecium* suşunun dört küme ve bir ana grup, 10 *Enterococcus faecalis* suşunun ise üç küme ve bir majör grup oluşturduğu saptandı. 26 *E. faecium* izolatının, %97 benzerlikle ortak aynı grupta yer aldıkları görüldü. Kümeleşme oranı %77 (20/26) olup, kümelerin 2-14 arasında suş içerdiği belirlendi.

Sonuç: Bu çalışmada, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde "Kasım 2010 - Haziran 2012" tarihleri arasında hastane kaynaklı enfeksiyona neden olan enterokok suşları arasında çapraz bulaş oranının yüksek olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları, enfeksiyon kontrol programlarının daha etkin biçimde uygulanmasının önemini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Enterokok, pulsed-field jel elektroforezis, hastane enfeksiyonları klonal ilişki

bacteriology laboratories of Dicle University Medical Faculty, Department of Medical Microbiology. The conventional methods and BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, MD, USA) fully automated microbiology system were used for the identification. Antimicrobial susceptibilities of enterococcal strains were determined by a fully automated microbiology system according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). In addition, vancomycin susceptibilities of the isolates were performed by E-test method. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain was used for quality control. PFGE was studied for determining of rate of cross-contamination. PFGE was performed in National Molecular Microbiology Reference Laboratory, Public Health Institution of Turkey (PHIT). DNA restriction fragments were obtained by cutting bacterial DNA with the SmaI enzyme. DNA restriction fragments were used by CHEF DR II (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) system. PFGE results were evaluated by Bionumerics software system (version 6.01; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

Results: DNA patterns of the isolates were obtained by PFGE, and dendrogram of DNA patterns were made. Comparison of DNA patterns obtained by PFGE showed that 26 *E. faecium* strains were divided into four different clusters and one major group, 10 *E. faecalis* strains were three clusters and one major group. Twenty-six *Enterococcus faecium* isolates were involved in a joint cluster (97% similarity). The cluster rate was found to be 77% (20/26), number of *E. faecium* strains in each cluster ranged from 2 to 14 strains.

Conclusion: In this study, cross-contamination was highlighted among enterococcal strains causing nosocomial infections in Dicle University Hospital between November 2010 and June 2012. Our data revealed that more effective infection control programs should be implemented to prevent cross-transmission.

Key Words: *Enterococcus*, pulsed-field gel electrophoresis, nosocomial infections, clonal relationship

GİRİŞ

Gastrointestinal sistem ve safra yollarının normal florasında bulunan, düşük oranda da olsa vajen ve erkek üretrasında görülebilen enterokoklar, antimikrobiyal ajanlara dirençli

olmaları nedeniyle son yıllarda önemli enfeksiyon hastalıkları etkenlerindedir (1-3). Enterokok türleri; komplike üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, intra-abdominal ve pelvik enfeksiyonlar,

yara ve yumuşak doku enfeksiyonları, neonatal sepsis ve nadiren menenjitte yol açabilmesinin yanı sıra, nozokomiyal bakteremilerin üçüncü, nozokomiyal üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının ise ikinci sıklıkta saptanan etkenleridirler (1, 4). Ayrıca virülansı düşük olmasına rağmen penisilinlere ve çoğu sefalosporinlere dirençli olması, yüksek düzey aminoglikozit direnci kazanabilmesi ve günümüzde karşımıza çıkan kazanılmış glikopeptit (vankomisin ve teikoplanin) direnci nedeniyle enterokoklar geniş spektrumlu antimikrobik kemoterapi alan hastalar arasında ciddi enfeksiyonlara da neden olmaktadır (1, 5). Özellikle vankomisin rezistans enterokok (VRE) suşları nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olarak morbidite, mortalite ve tedavi maliyetlerini artıran önemli patojenlerdir (6-8).

İnsanlarda klinik örneklerden en sık (%80-90) izole edilen enterokok türü *Enterococcus faecalis*'tir. İkinci sıklıkta (%5-10) karşımıza çıkan izolat *Enterococcus faecium*'dur. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda ise oranlar tersine dönmüş olup en sık karşılaşılan tür *E. faecium*'dur. Diğer enterokokal türler ise nadiren izole edilmektedir (1, 9).

İlk vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşları 1988 yılında İngiltere ve Fransa'dan bildirilmiştir (10, 11). Daha sonraki yıllarda dünyanın birçok bölgesinden VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu bildirimleri olmuştur (12, 13). Ülkemizde de 1998 yılındaki ilk klinik izolatı takiben artan sayıda bildirimler yapılmıştır (14, 15).

Hastane kaynaklı VRE salgınlarını kontrol altına almak ve yayılmasını engellemek için hastaneye yatan intestinal VRE taşıyıcıları erkenden saptanmalı ve suşların salgın ile ilişkisi gösterilmelidir. Salgın suşları arasındaki ilişkinin belirlenmesi önceleri fenotipe dayalı yöntemlerle gerçekleştirilirken, düşük tekrarlanabilirlik, zayıf ayırım gücü, pahalı ve zaman alıcı olmaları gibi dezavantajları sebebi ile bu yöntemler yerlerini yüksek ayırım gücüne sahip, yüksek tekrarlanabilirlik özelliği gösteren

moleküler yöntemlere bırakmışlardır. Rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD), multilokus sekans tiplleme (MLST) ve pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) gibi genotipe dayalı moleküler yöntemler sık kullanılmaktadır (16-19). Salgın suşları arasındaki ilişkinin saptanması ve kaynağın belirlenmesinde, ayırım gücü en yüksek olan PFGE yöntemi; yararlı ve güvenilir bir genotiplleme yöntemidir ve "altın standart" kabul edilmektedir (20, 21).

Enterococcus spp. türleri özellikle de VRE suşları intestinal kolonizasyon ve çevre kontaminasyonu, hastane çalışanlarından veya hastadan hastaya temas yoluyla kolayca yayılabilmektedirler. Hastane kaynaklı salgınların önlenmesi için enfeksiyon kaynağının ve yayılma yollarının belirlenmesi ve belirli aralıklarla kontrol edilmesi gerekmektedir (22). Bu çalışmada; pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ile hastane kaynaklı *Enterococcus* spp. izolatları arasındaki klonal ilişki ve çapraz bulaş oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin toplanması

Bu çalışmaya, Kasım 2010 - Haziran 2012 tarihleri arasında DÜTF Hastanesinin çeşitli servislerinde yatan ve hastane kaynaklı enfeksiyon tanısı alan hastalar dahil edilmiştir. Bu dönemde, hastalardan alınan çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının sayısı 36 olarak değerlendirilmiştir. Hastane kaynaklı enfeksiyonlar, ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) kriterleri dikkate alınarak tanımlanmıştır (23). Her hastaya ait aynı ve/veya farklı klinik örneklerden elde edilen tek bir izolat çalışmaya alınmış olup, aynı hastaya ait birden fazla örnekten enterokok izole edilmesi durumunda kan izolatı tercih edilmiştir. Her hasta için; yaş, cinsiyet, yattığı servis, klinik örnek tipi, izole edilen enterokok türü ve ilk izolasyon tarihi kaydedilmiştir.

Örneklerin izolasyonu ve tanımlanması

Hastane kaynaklı enfeksiyon gelişen hastaların çeşitli klinik örneklerinden rutin mikrobiyolojik tanı testleri ile ilk bakteri izolasyonları yapılmıştır. Gram pozitif izolatlar geleneksel yöntemler (10 ve 45 °C'de üreme, %6,5 NaCl'de üreme, pH 9,6'da üreme, %40 safralı ortamda eskülünü hidrolize etme, PYR üretimi vb.) ve BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, MD, USA) tam otomatik mikrobiyoloji sistemi ile tanımlanmıştır. *Enterococcus* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıkları tam otomatik mikrobiyoloji sistemi ile Klinik Laboratuvar ve Standartlar Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)'nin önerilerine uygun olarak belirlenmiştir. Ayrıca, izolatların vankomisin duyarlılıkları E-test yöntemi ile de çalışılmıştır. Bu amaçla kültür besiyeri olarak Mueller-Hinton agar (Oxoid) ve üzerinde vankomisin konsantrasyonu gradienti (0,016-256 µg/mL) bulunan E-test şeritleri (BioMerieux) kullanılmıştır. Suşların %5 koyun kanlı agardaki kültüründen elde edilen saf kolonilerden steril serum fizyolojik içinde 0,5 McFarland bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta hazırlanan doğrudan koloni süspansiyonları Mueller-Hinton agar yüzeyine yayılarak inoküle edilmiştir. Yüzeyine E-test şeritleri yerleştirilen plaklar 35±2 °C'de aerobik atmosfer koşullarında 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası CLSI kriterlerine göre vankomisin için minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri; ≥2 µg/mL ise duyarlı, 4-8 µg/mL ise orta duyarlı, ≤16 µg/mL ise dirençli olarak kabul edilmiştir. Kullanılan yöntemlerin kalite kontrolünü yapmak amacıyla standart suş olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kullanılmıştır.

Pulsed Field Jel Elektroforezis (PFGE)

Enterokok suşları arasındaki çapraz bulaş oranlarını belirlemek için PFGE kullanılmıştır. PFGE çalışması Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, Mulvey ve ark.'nın (24), optimize ettikleri PFGE protokolü uygulanmıştır.

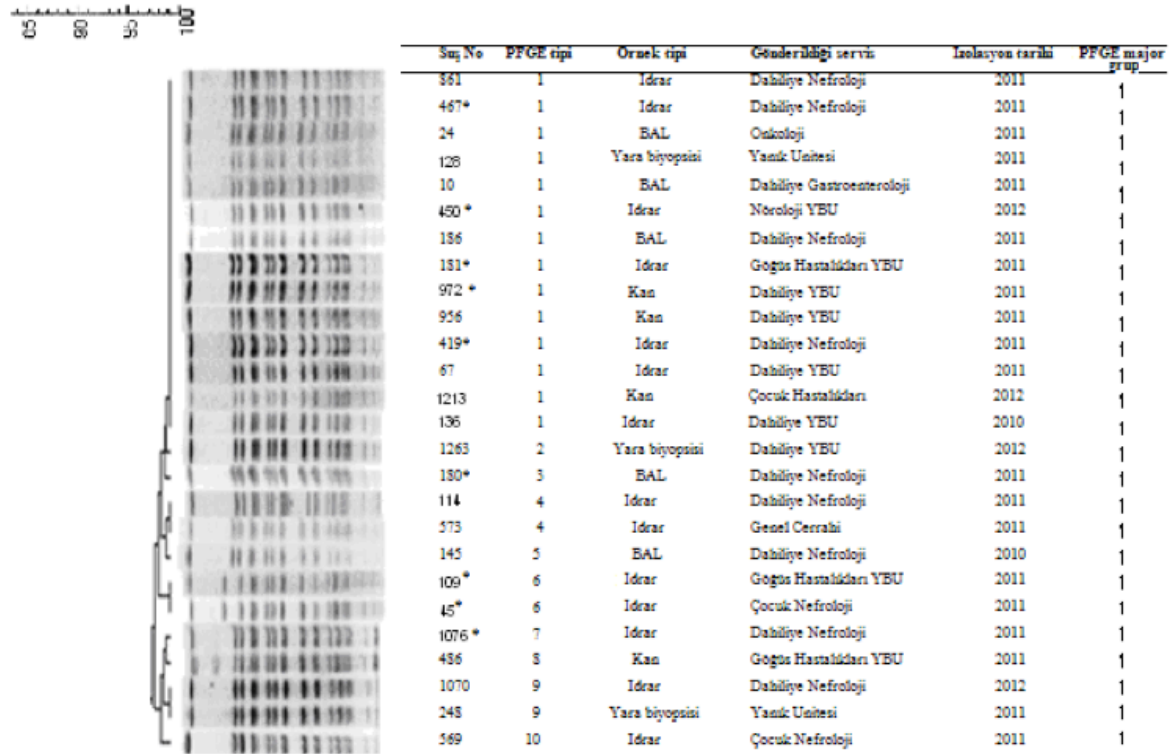
Smal enzimi ile kesilerek elde edilen DNA restriksiyon fragmanları %1'lik agaroz jelde CHEF DR II (Bio-Rad) sisteminde 6 V/cm akım, 14 °C'de ve 0,5 TBE içerisinde başlangıç ve bitiş zamanları 5,3 ve 34,9 sn olacak şekilde 20 sa yürütülerek gösterilmiştir. Suşlar arasındaki klonal ilişki, PFGE sonrasında jelde oluşan DNA bant paternlerinden Tenover ve ark. (21) tarafından tarif edilen kriterlere göre değerlendirilmiştir. BioNumerics Software Program (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak dendrogram oluşturulmuştur.

BULGULAR

Kasım 2010-Haziran 2012 tarihleri arasında hastane kaynaklı enfeksiyon gelişen ve yaşları 1-91 arasında değişen 20'si erkek ve 16'sı kadın olmak üzere toplam 36 hastadan enterokok izole edilmiştir. 36 suşun 18'i idrar, altısı kan, beşi bronkoalveolar lavaj (BAL), beşi yara, biri vajinal sürüntü, biri kataterden izole edilmiştir. Suşların dokuzu (%25) VRE olarak tanımlanmıştır. Tür dağılımı incelendiğinde; suşların 26'sının (%72) *E. faecium*, 10'unun (%28) ise *E. faecalis* olduğu saptanmıştır (Tablo 1). VRE suşlarının tamamı *E. faecium* içinde yer almıştır.

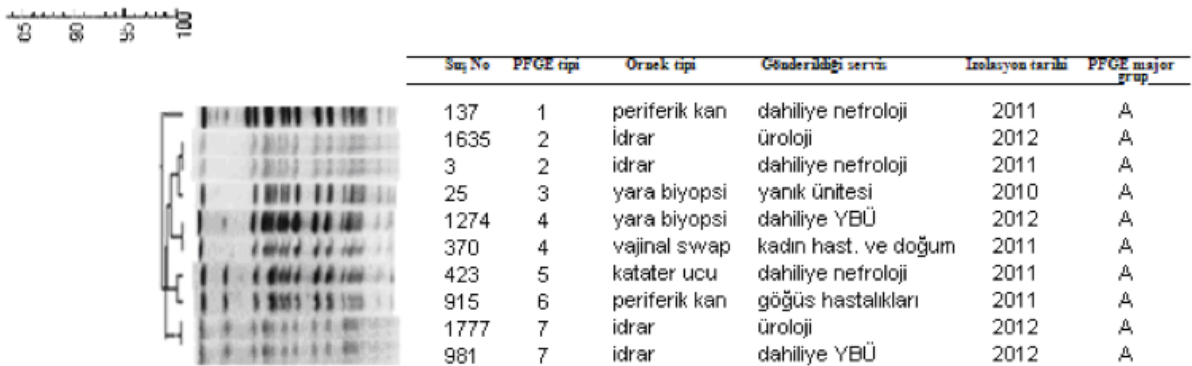
E. faecium izolatlarına ait PFGE paternlerinin dendrogramı yapılmıştır (Şekil 1). 26 izolatın DNA paternlerinin birebir karşılaştırılması sonucunda 10 PFGE tipi (pulsotip) saptanmıştır. Saptanan pulsotiplerden altı tanesinde birer suş bulunmaktadır. Küme sayısı dört olarak belirlenmiş ve her bir küme içindeki suş sayısı 2-14 arasında değişiklik göstermiştir. Toplam kümeleşme oranı 20/26 (%77) olarak saptanmış olup, bir major PFGE grubu bulunmuştur. Majör grup 1 içerisinde yer alan 26 suş %97 oranında benzerlik göstermiştir.

E. faecalis izolatlarına ait PFGE paternlerinin dendrogramı ise Şekil 2'de verilmiştir. On izolatın DNA paternlerinin karşılaştırılması sonucunda yedi pulsotip saptanmıştır. Bu pulsotiplerden dört tanesinde birer suş bulunmaktadır. Küme sayısı üç olarak belirlenmiş olup, her bir küme içindeki suş sayısı 2-3 arasında



Şekil 1. *E. faecium* suşlarına ait PFGE paternlerinin dendogramı. Örnek sayısı = 26

E. faecium suşlarına ait PFGE paternlerinin dendogramına baktığımızda 10 tane pulsotip ve toplam dört tane küme (1, 4, 6, 9 numaralı PFGE tipleri), altı tane özgü profil (2, 3, 5, 7, 8, 10 PFGE tipleri) görülmektedir. * : VRE suşları



Şekil 2. *E. faecalis* suşlarına ait PFGE paternlerinin dendogramı. Örnek sayısı = 10

E. faecalis suşlarına ait PFGE paternlerinin dendogramında; yedi pulsotip ve üç küme (2, 4, 7 numaralı PFGE tipleri) ile dört özgü profil (1, 3, 5, 6 numaralı PFGE tipleri) görülmektedir.

değişiklik göstermiştir. Toplam kümeleşme oranı 6/10 (%60) olup, bir majör PFGE grubu saptanmıştır. Major

grup A içerisinde yer alan 10 suş arasında %98 oranında benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 1. İzolatların klinik örnek tipine, gönderildiği servislere ve izolasyon tarihine göre dağılımları

Sıra No	Örnek No	Örnek Tipi	İzolat Adı	Gönderildiği Servis	İzolasyon Tarihi
1	861	İdrar	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Nefroloji	Ekim 2011
2	467	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Dahiliye Nefroloji	Temmuz 2011
3	24	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	<i>E. faecium</i>	Onkoloji	Ocak 2011
4	137	Periferik kan	<i>E. faecalis</i>	Dahiliye Nefroloji	Mart 2011
5	10	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Gastroenteroloji	Ocak 2011
6	1635	İdrar	<i>E. faecalis</i>	Üroloji	Mayıs 2012
7	186	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Nefroloji	Mart 2011
8	181	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Göğüs Hastalıkları YBÜ	Mart 2011
9	3	İdrar	<i>E. faecalis</i>	Dahiliye Nefroloji	Şubat 2011
10	956	Periferik kan	<i>E. faecium</i>	Dahiliye YBÜ	Kasım 2011
11	419	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Dahiliye Nefroloji	Mayıs 2011
12	67	İdrar	<i>E. faecium</i>	Dahiliye YBÜ	Ocak 2011
13	25	Yara biyopsi materyali	<i>E. faecalis</i>	Yanık Ünitesi	Kasım 2010
14	1274	Yara biyopsi materyali	<i>E. faecalis</i>	Dahiliye YBÜ	Şubat 2012
15	1263	Yara biyopsi materyali	<i>E. faecium</i>	Dahiliye YBÜ	Şubat 2012
16	180	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	<i>E. faecium</i> (VRE)	Dahiliye Nefroloji	Mart 2011
17	370	Vajinal swap	<i>E. faecalis</i>	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Haziran 2011
18	573	İdrar	<i>E. faecium</i>	Genel Cerrahi	Temmuz 2011
19	145	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Nefroloji	Aralık 2010
20	423	Kateter ucu	<i>E. faecalis</i>	Dahiliye Nefroloji	Haziran 2011
21	915	Periferik kan	<i>E. faecalis</i>	Göğüs Hastalıkları	Ekim 2011
22	1777	İdrar	<i>E. faecalis</i>	Üroloji	Haziran 2012
23	486	Periferik kan	<i>E. faecium</i>	Göğüs Hastalıkları YBÜ	Temmuz 2011
24	1070	İdrar	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Nefroloji	Mart 2012
25	248	Yara biyopsi materyali	<i>E. faecium</i>	Yanık Ünitesi	Nisan 2011
26	569	İdrar	<i>E. faecium</i>	Çocuk Nefroloji	Temmuz 2011
27	128	Yara biyopsi materyali	<i>E. faecium</i>	Yanık Ünitesi	Mart 2011
28	981	İdrar	<i>E. faecalis</i>	Dahiliye YBÜ	Şubat 2012
29	450	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Nöroloji YBÜ	Nisan 2012
30	972	Periferik kan	<i>E. faecium</i> (VRE)	Dahiliye YBÜ	Kasım 2011
31	1213	Periferik kan	<i>E. faecium</i>	Çocuk Hastalıkları	Ocak 2012
32	136	İdrar	<i>E. faecium</i>	Dahiliye YBÜ	Aralık 2010
33	114	İdrar	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Nefroloji	Ocak 2011
34	109	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Göğüs Hastalıkları YBÜ	Şubat 2011
35	45	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Çocuk Nefroloji	Ocak 2011
36	1076	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Dahiliye Nefroloji	Aralık 2011

YBÜ : Yoğun Bakım Ünitesi

TARTIŞMA

Günümüzde enterokokların hastane enfeksiyonlardaki önemi giderek artmaktadır. Hastane kaynaklı bakteriyemilerin ikinci en sık nedeni (%15) enterokok türleridir (25). Enterokoklar, hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarının beşinci sıklıkta (%8,5) nedenidir (26). Enterokoklar, başta glikopeptid grubu antibiyotikler olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı kökenler arasında kolayca aktarılabilen direnç göstermekte ve intestinal florada asemptomatik persistan kolonizasyon oluşturarak endojen kökenli enfeksiyonlara yol açabilmektedirler (27). Hastane kaynaklı enterokok enfeksiyonlarında antibiyotiklere karşı direnç giderek artmaktadır (28). Ayrıca, enterokoklar ile kolonizasyon ve enfeksiyon, başta yoğun bakım kliniklerinde yatan hastalar olmak üzere altta yatan hastalığı olan hastaları daha çok etkilemektedir (29, 30). Bu çalışma, dahiliye bölümündeki hastaların %44 (16/36)'ü de yoğun bakım, yanık ünitesi, onkoloji ve cerrahi servislerinde yatmakta olup, hastane kaynaklı enfeksiyon geliştiren hastalarda yapılmıştır.

İlk VRE suşları, 1988 yılında önce İngiltere sonra da Fransa'dan bildirilmiştir (10, 11). VRE enfeksiyonları, ABD'de ilk kez 1990 yılında görülmesine karşın, çok hızlı bir yayılım göstermiştir (31). Daha sonraki yıllarda dünyanın birçok bölgesinden VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu bildirimleri giderek artmıştır (12, 13). 2003 yılında sekiz Avrupa ülkesinden 13 mezkezi kapsayan bir çalışmaya göre, Avrupa'da VRE prevalansı %0-20 arasında değişmektedir (32). Ülkemizde 1998 yılında ilk VRE suşunun saptanmasının ardından günümüze değin farklı bölgelerden artan sayıda bildirimler yapılmıştır (14, 15, 33, 34). Çalışmamızda; enterokok suşlarının dörtte biri gibi önemli bir oranı VRE olarak saptanmıştır. Hastanemizdeki VRE oranının yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu yüksek direnç oranının hastanenin yetersiz enfeksiyon kontrol önlemlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Enterokok enfeksiyonlarında klinik örneklerden en sık (%80-90) elde edilen izolat *E. faecalis*'tir. İkinci sıklıkta (%5-10) karşımıza çıkan izolat *E. faecium*'dur. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda ise en sık karşılaşılan tür *E. faecium*'dur (9). Gerek hastane enfeksiyonları gerekse kolonizasyonla ilişkili olarak izole edilen VRE türleri arasında *E. faecium* oranının giderek arttığı dikkat çekmektedir. Özellikle bakteriyemiye yol açan *E. faecium* izolatları arasında VRE oranının (%19), *E. faecalis* izolatları arasındaki VRE oranına (%4) göre daha yüksek olduğu 2005 yılında yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (35). Kuzucu ve ark. (36), tarafından yapılan bir çalışmada da, fekal kolonizasyonda *E. faecium*'un (%71) hakim olduğu gösterilmiştir. Çalışmaya aldığımız 36 suşun 26'sının *E. faecium* (%72) olduğu, bunların ise dokuzunun VRE (%35) olduğu saptanmıştır.

Hastane kaynaklı VRE salgılarının önlenmesi, kontrolü ve epidemiyolojik analizlerinin yapılması önemli bir halk sağlığı çalışmasıdır. Bir monoklonal salgın kontrol altına alınmazsa endemite gelişebilecektir (30). Hastane kaynaklı VRE suşlarının moleküler tiplendirmesinde MLST, multi lokus variable number tandem repeat (MLVA) ve PFGE yöntemlerinin karşılaştırıldığı; 2006 yılında yapılan bir çalışmada, PFGE paternlerinin daha yüksek rezolüsyon gösterdiği tespit edilmiştir (37). 2008 yılında yapılan bir diğer çalışmada, VRE suşlarının moleküler tiplendirmesinde MLVA ve PFGE yöntemleri karşılaştırılmış, PFGE'nin ayırım gücünün daha fazla olduğu tespit edilmiştir (38). Fransa'dan 2011 yılında yapılan bir çalışmada, 2001-2008 yılları arasında 195 hastanenin VRE salgılarının değerlendirilmiş; PFGE analizi ile 161 farklı patern saptanmış ve genel olarak hastanelerde predominant bir klonun hakim olduğu bildirilmiştir (39). 2012 yılında yapılan bir çalışmada; yeni doğan yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilen 20 hastane kaynaklı enterokok suşu değerlendirilmiş ve PFGE yöntemiyle izolatlar arasındaki çapraz bulaş gösterilmiştir (40). Çalışmamızda, PFGE yöntemiyle elde ettiğimiz

bulgular, *Enterococcus* spp. izolatlarının klonal yönden ilişkili olduğunu ve dolayısıyla çapraz kontaminasyonun varlığını göstermektedir.

Sonuç olarak, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Kasım 2010 - Haziran 2012 tarihleri arasında yatan ve hastane kaynaklı enfeksiyon tanısı alan hastalardan izole edilen enterokok suşları arasında çapraz bulaş oranının yüksek olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın sonucunda enterokokların izlenmesinde genotiplendirme çalışmaları yapılmasının, PFGE

ile hastanede bulunan enterokok suşlarının rutin olarak ve kısa periyotlarda değerlendirilmesinin, hastanelerde enfeksiyon kontrol programının iyileştirilmesi için sağlık çalışanlarının el hijyeninin sağlanması, medikal cihazlar ve kontamine yüzeylerin etkili bir şekilde dezenfeksiyonu ve sağlık personelinin eğitimi gibi enfeksiyon kontrol önlemlerinin yeterli ve etkili şekilde alınmasının önemini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Moellering RC. *Enterococcus species*, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc species*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. New York. Churchill Livingstone, 2005: 2411-21.
2. Eliopoulos GM. Vancomycin-resistant enterococci. Mechanism and clinical relevance. Infect Dis Clin North Am, 1997; 11 (4): 851-65.
3. Papanicolaou GA, Meyers BR, Meyers J, Mendelson MH, Lou W, Emre S, et al. Nosocomial infections with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* liver transplant recipients: risk factors for acquisition and mortality. Clin Infect Dis, 1996; 23 (4): 760-6.
4. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbiol etiology of nosocomial infections. Am J Med, 1991; 91(Suppl B): 72-5.
5. Yüce A, Karaman M, Gülay Z, Yulug N. Yeni doğanlarda vankomisin dirençli enterokokların fekal taşıyıcılığı. ANKEM, 1999; 13: 7-11.
6. Linden PK, Pasculle AW, Manez R, Kramer DJ, Fung JJ, Pinna AD, et al. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin-susceptible *E. faecium*. Clin Infect Dis, 1996; 22 (4): 663-70.
7. Woodford N, Johnson AP, Morrison D, Speller DC. Current perspectives on glycopeptide resistance. Clin Microbiol Rev, 1995; 8 (4): 585-615.
8. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N Eng J Med, 2000; 342: 710-21.
9. English BK, Shenep JL. Enterococcal and viridans streptococcal infections. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 5th edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 2004: 1175-92.
10. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet, 1988; 1 (8575-6): 57-8.
11. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med, 1988; 319 (3): 157-61.
12. Woodford N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. Microb Drug Resist, 2001; 7: 229-34.
13. Anonymous. Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin in the United States, 1989-1993. MMWR 1993;42:597-9.

14. Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D, Gültekin M, Çolak D, Yeşilipek A, ve ark. Vankomisine dirençli *Enterococcus casseliflavus* suşu. ANKEM, 1998; 12 (2): 113.
15. Basustaoglu A, Aydoğan H, Beyan C, Yalcin A, Unal S First glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolate from blood culture in Ankara, Turkey. Emerg Infect Dis, 2001; 7: 160-1.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
17. Top J, Schouls LM, Bonten MJM, Willems RJ. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. J Clin Microbiol, 2004; 42 (10): 4503-11.
18. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol, 2002; 40: 1963-71.
19. Kühn I, Burman LG, Haeggman S, Tullus K, Murray BE. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. J Clin Microbiol, 1995; 33: 2812-7.
20. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol, 1995; 33: 24-7.
21. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol, 1995; 33 (9): 2233-9.
22. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev, 2000; 13: 686-707.
23. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control, 1988; 16(3): 128-40.
24. Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, et al. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 2001; 39 (10): 3481-5.
25. Esel D, Doganay M, Alp E, Sumerkan B. Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish university hospital: epidemiology, microbiology and patient outcome. Clin Microbiol Infect, 2003; 9(10): 1038-44.
26. Leblebicioglu H, Esen S. Turkish nosocomial urinary tract infection study group. hospital-acquired urinary tract infections in Turkey: a nationwide multicenter point prevalence study. J Hosp Infect, 2003; 53 (3): 207-10.
27. Arslan U, Demir E, Oryaşın E, Türk Dağı H, Tuncer I, Fındık D, et al. MLST types of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from blood cultures. Mikrobiyol Bul, 2013; 47 (3): 432-41.
28. Akan O, Kanra G, Ecevit Z, Ceyhan M, Seçmeer G, Berkman E. Antibiotic susceptibilities of enterococci isolated from Turkish children. Turk J Pediatr, 1997; 39 (1): 13-7.
29. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, Healthcare infection control practices advisory committee. management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. Am J Infect Control, 2007; 35 (Suppl 2): S165-93.
30. Hayden MK. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis, 2000; 31: 1058-65.
31. Mato R, de Lencastre H, Roberts RB, Tomasz A. Multiplicity of genetic back grounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City Hospital. Microbiol Drug Res, 1996; 2: 309-17.
32. Goossens H, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and *in vitro* susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. J Antimicrob Chemother, 2003; 51 Suppl 3: iii5-12.
33. Çolak D, Naas T, Gunseren F, Fortineau N, Ogunc D, Gultekin M, et al. First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. J Antimicrob Chemother, 2002; 50: 397-401.
34. Comert FB, Kulah C, Aktas E, Ozlu N, Celebi G. First isolation of vancomycin-resistant enterococci and spread of a single clone in a university hospital in northwestern Turkey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007; 26: 57-61.

35. Rudy M, Zientara M, Bek T, Martirosian G. Occurrence of antibiotic resistant enterococci in clinical specimens from a pediatric hospital. *Pol J Microbiol*, 2005; 54 (1): 77-80.
36. Kuzucu C, Cizmeci Z, Durmaz R, Durmaz B, Ozerol IH. The prevalence of fecal colonization of enterococci, the resistance of the isolates to ampicillin, vancomycin, and high-level aminoglycosides, and the clonal relationship among isolates. *Microb Drug Resist*, 2005; 11 (2): 159-64.
37. Abele-Horn M, Vogel U, Klare I, Konstabel C, Trabold R, Kurihara R, et al. Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, 2006; 44 (11): 4009-13.
38. Top J, Banga NM, Hayes R, Willems RJ, Bonten MJ, Hayden MK. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in a setting of polyclonal endemicity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect*, 2008; 14 (4): 363-9.
39. Bourdon N, Fines-Guyon M, Thiolet JM, Maugat S, Coignard B, Leclercq R, et al. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother*, 2011; 66 (4): 713-21.
40. Böhme H, Königsmark C, Klare I, Zischka M, Werner G. Cross-transmission rates of enterococcal isolates among newborns in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Rep*, 2012; 4(1): e15.

Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi'ne başvuran akut gastroenteritli çocuklarda rotavirüs enfeksiyonunun sıklığı

Frequency of rotavirus infection in children with acute gastroenteritis in Kırıkkale Yüksek İhtisas Hospital

Serap SÜZÜK¹,

Havva AVCIKÜÇÜK¹,

Mehmet KAVAK¹

ÖZET

Amaç: Akut gastroenterit (GE), küçük yaşta çocuklarda yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden önemli bir sağlık sorunudur. Rotavirüs, süt çocukları ve küçük çocuklardaki viral gastroenteritlerin en önemli etkeni olup yaşamın ilk iki yılında gastroenteritlere bağlı hastaneye yatışların çoğundan sorumludur. Rotavirüs gastroenteritlerinin bölgemizdeki epidemiyolojisi iyi bilinmemektedir. Bu çalışmada, bölgemizdeki akut gastroenteritli çocuklarda rotavirüs antijen pozitifliğinin immünokromatografik yöntemle araştırılması ve yaşa bağlı dağılımının incelenmesi amaçlandı.

Yöntem: Ekim 2013-Nisan 2014 tarihleri arasında Kırıkkale ilindeki hastanemize ishal şikayeti ile başvuran 883 çocuk hastanın taze dışkı örneklerine ait kayıtlar retrospektif olarak incelendi. Dışkı örneklerinde rotavirüs antijen varlığı, spesifik monoklonal antikolar içeren ve hızlı sonuç veren kalitatif immünokromatografik yöntem ile araştırıldı. Hastalar, 0-2, 3-5 ve 6-16 olarak üç yaş grubuna ayrıldı. Veriler SPSS 15,0 (Statistical Package for Social Sciences version 15,0) kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık için p değeri <0,05 alındı.

Bulgular: Çalışmaya alınan 883 dışkı örneğinin 147'sinde (%16,65) rotavirüs antijeni pozitif bulundu. Test istenen 883 hastanın 561'i (%63,53) erkek, 322'si (%36,47) kız çocuğu idi. Rotavirüs antijen pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı; 0-2 yaş grubunda 118

ABSTRACT

Objective: Acute gastroenteritis is a major health problem associated with high morbidity and mortality in children. Rotavirus is shown to be the most important agent of viral gastroenteritis in infants and young children, responsible for the majority of hospitalizations for this illness within the first two years of life. The epidemiology of rotavirus gastroenteritis is not well known in our region. In this study, we aimed to investigate the presence of rotavirus antigen positivity by using an immunocromatographic method and to assess age-related distribution in pediatric patients with acute gastroenteritis in our region.

Method: Fresh stool specimens from a total of 883 pediatric patients admitted to our hospital in Kırıkkale during October 2013 and April 2014 due to acute gastroenteritis were studied. Presence of rotavirus antigen in stool specimens was tested by using a rapid result giving commercial kit which consists of specific monoclonal antibodies. Patients were divided into three age groups; 0-2, 3-5 and 6-16. Data was analyzed using SPSS 15.0 (Statistical Package for Social Sciences version 15.0). For statistical significance p-value <0.05 was considered.

Results: 147 (16.65%) of 883 stool samples were found to have rotavirus antigen. Of 883 patients tested, 561 (63.53%) were male, 322 (36.47%) were female. Of the patients detected as rotavirus antigen positive 118 cases (80.72%) were between 0-2 years old, 26 cases

¹ Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, KIRIKKALE



İletişim / Corresponding Author : Serap SÜZÜK

Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, KIRIKKALE

Tel : +90532 682 49 23

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

Geliş Tarihi / Received : 25.05.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 22.10.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.53386

Süzük S, Avcıküçük H, Kavak M. Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi'ne başvuran akut gastroenteritli çocuklarda rotavirüs enfeksiyonunun sıklığı. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 11-6.

olgu (%80,72), 3-5 yaş grubunda 26 olgu (%17,69) ve 6-16 yaş grubunda 3 olgu (%2,04) olarak saptandı. 147 pozitif olgunun 88'i (%59,86) erkek, 59'u (%40,14) kadındı. Yapılan istatistiksel analizde cinsiyet arasında anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen yaş grupları arasında anlamlı farklılık tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızda elde edilen veriler, rotavirüs enfeksiyonlarının çocukluk çağı ishalleri arasında hala önemli bir yere sahip olduğunu gösterdi. Klinik bulgular virüse özgü olmadığı için dışkı örneklerinde immünokromotografik yöntemler ile viral antijen analizi yapılması tanı için oldukça kullanışlıdır.

Anahtar Kelimeler: Rotavirüs, akut gastroenterit, çocukluk çağı, immünokromotografi

(17.69%) were between 3-5 years old and 3 cases (2.04%) were 6-16 years old. Of 147 patient with rotavirus antigen positive, 88 (59.86%) were male and 59 (40.14%) were female. In the statistical analysis, although there was no a significant difference between sex, significant difference was detected between age groups.

Conclusion: The data obtained in this study indicated that rotavirus infections still remain one of the important childhood diarrhea. The clinical signs are nonspecific; so, the analysis of viral antigen in the stool specimen is important for the diagnosis. Immunochromatographic assay is useful for diagnosis in this infection.

Key Words: Rotavirus, acute gastroenteritis, childhood, immunochromatography

GİRİŞ

Önemli bir halk sağlığı sorunu olan akut gastroenteritler, gelişmekte olan ülkelerde solunum yolu enfeksiyonlarından sonra çocuk morbiditesinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (1). Tüm dünyada özellikle çocuklarda en sık rastlanan gastroenterit etkeni rotavirüstür. Virüs, dış ortamlara dayanıklı olup bulaşıcılığı oldukça yüksektir. Ayrıca dışkı ile uzun süre atılmaları ve düşük dozda enfeksiyon oluşturmalarından dolayı virus, salgınlara yol açabilmektedir (1, 2). Rotavirüs salgınları ülkemizde olduğu gibi diğer ılıman iklime sahip ülkelerde de kış aylarında ve ilkbahar başında görülmektedir (3). Özellikle beş yaş altı çocuklarda görülen rotavirüs gastroenteritinde vakaların büyük bir kısmı ayaktan tedavi (25 milyon vaka/yılda) edilebilirken bir kısmı da yatarak tedavi (2 milyon vaka/yılda) edilmektedir. Yılda 527.000 çocuk ise rotavirüs kaynaklı gastroenterit nedeniyle ölmektedir (4).

Rotavirüsler, incebağırsak villuslarındaki enterositleri enfekte ederek hücrenin transport mekanizmasına zarar vermekte, ayrıca virüsün kodladığı NSP4 proteini viral enterotoksin olup hücreden sıvı sekresyonunu indüklemektedir.

Bu dönemde dışkı ile birlikte çok sayıda virüs atılmaktadır (5). Dışkıda viral antijenin gösterilip hızla tanı konması tedavi yaklaşımı için büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla, akut dönemde alınan taze dışkı örneklerinde immünokromotografik (İK) yöntemler kullanılabilir. Bu tip yöntemlerin akut dönemde hem duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması hem de çok kısa sürede sonuç vermesi gibi özelliklerinden dolayı hastanelerde tanı amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir (6).

Bu çalışmada, rotavirüs enfeksiyonlarının görüldüğü dönemde ishal, karın ağrısı, kusma ve ateş gibi şikayetler ile hastanemiz çocuk kliniklerine başvuran ve akut gastroenterit tanısı alan 0-16 yaş arası çocukların dışkı örneklerinde rotavirüs sıklığı ve enfeksiyonun yaş ve cinsiyet arasındaki dağılımının değerlendirilmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Rotavirüsün daha sıklıkla etken olarak izole edildiği sonbahar sonu, kış ve ilkbahar başı dönemlerini kapsayan Ekim 2013-Nisan 2014 tarihleri arasında, 0-16 yaş grubu akut gastroenterit tanısı alan, ayaktan

veya yatarak tedavi gören ve hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gelen 883 çocuktan alınan taze dışkı örneği değerlendirmeye alındı. Çalışmada rotavirüs grup A'nın VP6 antijenine karşı monoklonal antikoları içeren kalitatif İK yöntem (Genx, Kocaeli, Türkiye; duyarlılık %99,3, özgüllük %97,6) kullanıldı. Çalışma ve değerlendirme üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Hastalara ait yaş ve cinsiyet bilgileri ile test sonuçları hastane bilgi yönetim sisteminden hasta dosya numarası baz alınarak alındı. Rotavirüs enfeksiyonunun inkübasyon süresinin 8-10 gün olmasından dolayı tekrarlayan örneklerde pozitif çıkan dışkı örneği varsa sadece pozitif çıkan dışkı örneği değerlendirmeye alındı, negatif çıkan ve aynı hastaya ait dışkı örnekleri için ise tek bir dışkı örneği çalışmaya dahil edildi. Negatif çıkan dışkı örnekleri çalışmaya dahil edilmedi ve her ay için her hastada tekrarlandı. Hastalara ait veriler, hastane bilgi yönetim sisteminden alındığından hastaların aşılama durumu sorgulanamadı. Rotavirüs sıklığının aylara, hastaların yaşlarına ve cinsiyetlerine göre dağılımı ki-kare testi ile değerlendirildi ve istatistiksel analiz için SPSS 15,0 kullanıldı. Değerlendirmelerde $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada, akut gastroenterit tanısı ile değerlendirilen 883 dışkı örneğinin 147'sinde (%16,65) rotavirüs antijeni pozitif olarak bulundu. Hastaların 561 (%63,53)'i erkek, 322 (%36,47)'si kız idi. Rotavirüs antijen pozitif bulunan toplam 147 olgunun ise 88 (%59,86)'i erkek ve 59 (%40,14)'u kız çocuğu olarak belirlendi. Her aya ait gelen hasta sayısı ve kız-erkek hasta dağılımı ile rotavirüs antijen pozitifliği ve kız-erkek hasta pozitifliği Tablo 1'de yer almaktadır.

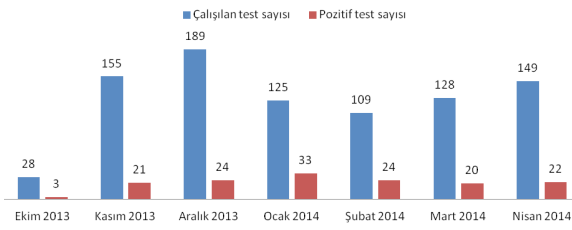
Çalışmaya dahil edilen hastalar 0-16 yaş grubunda yer almakla birlikte rotavirüs enfeksiyonunun sıklıkla 0-5 yaş arası çocuklarda görülmesinden dolayı çalışmaya dahil edilen çocukların yaşları 0-2, 3-5 ve 6-16 yaş olmak üzere üç gruba ayrıldı. Çalışmada yer alan vakaların 118 (%80,72)'inin 0-2 yaş grubu arasında yer aldığı belirlendi. Çalışmada yer alan 3-5 yaş grubunda 26 olguda %17,69 ve 6-16 yaş grubunda 3 olguda antijen pozitif olarak saptandı. Rotavirüs antijen pozitifliğinin aylara göre dağılımı Şekil 1'de verildi. Yaş gruplarına göre yapılan değerlendirmede; 0-2 yaş grubu diğer yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,05$). Cinsiyete göre yapılan değerlendirmede ise rotavirüs antijen pozitifliği bakımından anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 1. Akut GE tanısı alan ve rotavirüs antijen pozitif hastaların aylara ve cinsiyetlere göre dağılımı

Aylar	Akut GE* tanısı alan hasta sayısı (n)			Rotavirüs antijeni pozitif hasta sayısı (n)			Dağılım (%)
	Toplam	Erkek	Kız	Toplam	Erkek	Kız	
Ekim 2013	28	20	8	3	1	2	2,04
Kasım 2013	155	114	41	21	14	7	14,29
Aralık 2013	189	138	51	24	14	10	16,33
Ocak 2014	125	71	54	33	19	14	22,45
Şubat 2014	109	66	43	24	15	9	16,33
Mart 2014	128	69	59	20	14	6	13,61
Nisan 2014	149	83	66	22	11	11	14,97
Toplam	883	561 (%63,53)	322 (%36,47)	147 (%16,65)	88 (%59,86)	59 (%40,14)	100.00 (%100)

* GE: Gastroenterit

($p>0,05$). Ayrıca çalışmanın yapıldığı aylar ile rotavirüs antijen pozitifliği bakımından yapılan istatistiksel değerlendirmede Ekim ayı diğer aylara göre pozitiflik bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). Ekim ayında hastanemiz, yeni hastane binasına taşındı ve bu nedenle ekim ayında hastaneye hasta kabul sayısında genel bir düşüklük yaşandı. Ekim ayında uzun bir bayram tatilinin bulunması da hasta sayısının düşük olmasına sebep olabilir. Yapılan değerlendirmede bölgemiz için en yüksek pozitiflik test sonucu Ocak ayında görüldü.



Şekil 1. Rotavirüs antijen pozitifliğinin aylara göre dağılımı

TARTIŞMA

Akut viral gastroenteritler, tüm dünyada yaygın olarak görülen önemli bir halk sağlığı sorunu olmakla birlikte sağlık harcamaları açısından ekonomik yönden de önemli bir sorun oluşturmaktadır (4). Özellikle çocukluk çağı döneminde kış aylarında karşımıza etken olarak sıklıkla rotavirüs çıkmaktadır. Rotavirüs pozitiflik oranı ülkeden ülkeye hatta aynı ülkenin farklı bölgelerinde değişiklik gösterebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre Avrupa'da %20-40, Amerika'da %5-25, Asya'da %20-40 ve Afrika'da %10-65 arasındadır (7). Ülkemizde yapılan çalışmalara ait veriler; çalışmayı yapan araştırmacı, çalışmanın yapıldığı dönem, yer, çalışma yöntemi ve rotavirüs pozitiflik oranı Tablo 2'de verilmiştir (5, 6, 8-17). Çalışmamız sonucunda, ülkemizde rotavirüs antijen pozitiflik oranı %10,6-34,4 olarak tespit edildi. Bulunan rotavirüs antijen pozitiflik oranının (%16,65) bu oranlar arasında olduğu görüldü. Ülkemizdeki pozitiflik oranlarının geniş bir dağılım göstermesi; çalışmaların farklı bölgelerde yapılmış olması ve çalışmaya dahil edilen hasta sayısının farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Tablo 2. Ülkemizde rotavirüs antijen pozitifliği üzerine yapılmış olan bazı çalışmalara ait veriler

Araştırmacı	Tarih Aralığı	Çalışmanın Merkezi	Olgu Sayısı	Pozitif Olgu Sayısı	<2 Yaş Antijen Pozitifliği*	Yöntem
Yousefi ve ark (8)	Ocak 2005 - Haziran 2008	Ankara	2.962	483 (%16,30)	Çalışmada bu yaş aralığı için pozitiflik bildirilmemiştir	İK**
Yüksel ve ark (5)	Ocak 2006 - Aralık 2009	İstanbul	302	75 (%25)	36 (%48,00)	İK
Tekin (6)	Ekim 2008 - Eylül 2009	Mardin	941	157 (%16,7)	119 (%75,79)	İK
Otağ ve ark (9)	Ocak 2009 - Aralık 2011	Mersin	781	226 (%28,9)	132 (%58,40)	İK
Atalay ve ark (10)	Ocak 2009 - Aralık 2012	Kayseri	2.636	663 (%25,2)	496 (%74,81)	İK
Köksal ve ark (11)	Ocak - Haziran 2010	Ankara	240	68 (%23,8)	45 (%66,17)	İK
Gültepe ve ark (12)	Ocak 2010 - Haziran 2011	Van	955	205 (%21)	91 (%44,39)	LA***
Borsa ve ark (13)	Mayıs 2010 - Nisan 2011	Mardin	944	192 (%20,3)	157 (%81,77)	İK
İnci ve ark (14)	Ocak 2010 - Ocak 2013	Artvin	270	32 (%10,6)	23 (%71,87)	İK
Konca ve ark (15)	Mart 2012 - Şubat 2013	Adıyaman	3.607	597 (%16,5)	439 (%73,53)	İK
Türk Dağı ve ark (16)	Ocak 2010 - Aralık 2013	Konya	2.795	273 (%9,8)	162 (%59,30)	İK
Balkan ve ark (17)	Eylül 2010 - Eylül 2011	Erzurum	340	117 (%34,4)	78 (%20,10)	İK
Bu çalışma	Ekim 2013 - Nisan 2014	Kırıkkale	883	147 (%16,65)	118 (%80,72)	İK

* Bu veri rotavirüs antijen pozitif olgulardaki yüzde olarak hesaplanmıştır (tüm çalışmalar için)

** İmmünokromotografi

*** Lateks aglütinasyonu

Ülkemizde yapılan çalışmalarda özellikle rotavirüs kaynaklı akut viral gastroenterit vakalarında cinsiyet açısından yapılan değerlendirmelerde anlamlı bir farkın görülmediği belirtilmektedir (8, 12, 15, 16). Çalışmamızda da hastaneye başvuran erkek hasta sayısının kızlardan fazla olmasına rağmen, rotavirüs antijen pozitifliği açısından cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Rotavirüs enfeksiyon insidansının en yüksek olduğu dönem 7-24 aylık çocuklardır. Virüse karşı duyarlılığın altıncı aydan itibaren artış gösterdiği bu dönem, anneden gelen koruyucu antikörlerin kaybolduğu döneme denk gelmektedir (10). Aslında her yaş grubunda görülebilmekle beraber semptomatik rotavirüs enfeksiyonu sıklıkla iki yaş ve altı çocuklarda görülmektedir (15). Tablo 2’de verilen çalışmalarda da 0-2 yaş grubu arasındaki antijen pozitifliğinin diğer yaş gruplarına göre yüksek olduğu tespit edildi. İlgili çalışmaların 0-2 yaş arasındaki pozitiflik oranları %20,10-81,77 arasında bir dağılım göstermektedir. Çalışmamızda yer alan hastalar rotavirüs enfeksiyonunun bu özelliği dikkate alınarak 0-2, 3-5 ve 6 yaş ve üstü olmak üzere üç yaş grubuna ayrıldı. Yapılan değerlendirmede 0-2 yaş grubu pozitiflik oranı %80,72 (118 hasta) olarak belirlendi. Bu değer diğer yaş gruplarındaki pozitiflik yönünden değerlendirildiğinde anlamlı yüksek bulundu ($p<0,05$).

Ülkemizin de içinde bulunduğu ılıman iklim kuşağında rotavirüs enfeksiyonları sonbahar sonu, kış ve ilkbahar başı gibi soğuk aylarda görülmektedir (12). Özellikle bu aylarda bölgemizdeki rotavirüs sıklığını belirlemeyi amaçladığımız bu çalışmada, ekim ayında hastane koşullarından kaynaklı olarak hastaneye başvuran hasta sayısının düşük olmasına rağmen başvuran hastalar arasında da pozitifliğin çok düşük olduğunu belirledik. Ekim ayında hastanemizin yeni binasına taşınmasına bağlı olarak bu ayda hasta kabul sayısında genel bir düşüklük yaşandığı görüldü. Ayrıca Ekim ayında uzun bir bayram tatilinin bulunması da hasta sayısının düşük olmasına sebep olduğu düşünülebilir. Kasım ayında havaların soğumasıyla bölgemizde rotavirüs enfeksiyonunun görülme sıklığının artmaya başladığı tespit edildi. Bu durum

klinisyenlerin tedavi protokollerinin belirlenmesi açısından önemli bir epidemiyolojik veridir. Çalışmada antijen pozitifliğinin en yüksek olduğu ay Ocak ayı olarak tespit edildi (%22,45). Yapılan değerlendirmede Kırıkkale yöresi için en yüksek pozitiflik test oranı Ocak ayında görüldü. Değerlendirmeye alınan ve Tablo 2’de yer alan çalışmaların verileri ile birlikte değerlendirildiğinde; rotavirüs gastroenteritlerinin ülkemizde sıklıkla Kasım-Nisan arasında görüldüğü söylenebilir. Ancak çalışmaların farklı coğrafik ve iklimsel bölgelerde yapılmasına bağlı olarak en yüksek pozitiflik oranının görüldüğü aylar arasında farklılıklar olması muhtemeldir.

Virüs kaynaklı akut gastroenterit vakalarında; öykü, klinik özellik, mevsimsel özellik, vakanın yaşı gibi özellikler yol gösterici olsa bile laboratuvar testleri ile kesin tanının konması önemlidir. Son yıllarda hızla kullanıma giren İK yöntem, hızlı ve kullanım kolaylığı gibi özelliklerinden dolayı tanıda tercih edilmektedir. Ayrıca antijen pozitif sonuçların enzim immünoassay (ELISA) sonuçları ile uyumlu olması, duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olması da bu tercihte önemli özellikleri arasındadır (5). Değerlendirmeye alınan ve Tablo 2’de yer alan çalışmalarda; İK yönteminin hastanelerde sıklıkla tercih edilen bir yöntem olduğu görüldü. ELISA ve İK yöntem karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışma, iki yöntem arasındaki uyumun mükemmel yakın olduğunu göstermektedir (18). Uyumun yüksek olmasından dolayı, hastanelerde daha ucuz, daha hızlı ve daha kolay uygulanabilir bir tanı yöntemi olan İK yönteminin tercih edildiği söylenebilir.

Rotavirüs enfeksiyonu geçiren kişilerde kısmi bir bağışıklığa neden olur ve daha sonraki enfeksiyonlarda bağışıklık yanıtı artar. Bu nedenle enfeksiyon daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde asemptomatik olarak seyrederken çocuklarda daha ciddi tablolar görülmektedir (6). Çalışmamızda da benzer şekilde altı yaşından büyük çocuklarda rotavirüs antijen pozitifliği çok düşük oranda görüldü. Bağışıklık yanıtının önemli olduğu rotavirüs enfeksiyonu için doğal bağışıklıktan ziyade aşılama ile koruyuculuğun sağlanması bebek sağlığı için önemlidir. Rotavirüs aşılarının mortalite ve morbiditeyi azalttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (19, 20). Ülkemizde rotavirüs aşısı henüz çocukluk

çağı aşı takviminde yer almamakla birlikte ücretli ve isteğe bağlı olarak yapılabilir.

Ülkemizde yaygın olarak görülen rotavirüs akut gastroenterit enfeksiyon iki yaş ve altı çocuklar için ciddi bir enfeksiyon sorunu olup ülkemiz epidemiyolojik verilerine bölgesel veri sağlaması ve yapılacak olan aşılama programları için veri

kaynağı oluşturması açısından bu çalışmaların önemli olabileceği kanısındayız. Ayrıca hızlı ve duyarlılığı yüksek İK yöntemin, tedavi protokolünün belirlenmesinde klinisyene katkı sağlayacak bir yöntem olarak hastanelerde ve diğer sağlık merkezlerinde kullanımının da uygun olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Anonymous. WHO: Global Burden of disease: 2004 update. Geneva: World Health Organisation, 2008.
2. Albayrak N, Yağcı Çağlayık D, Altaş AB, Korukluoğlu G, Ertek M. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı, 2009 yılı akut viral gastroenterit verilerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2011; 68(1): 9-15.
3. Anonymous. WHO: Weekly epidemiological record. 2007; 32: 285-96.
4. Wobudeya E, Bachou H, Karamagi CK, Kalyango JN, Mutebl E, Wamani H. Breastfeeding and risk of Rotavirüs diarrhea in hospitalized infants in Uganda: a matched case control study. *BMC Pediatrics*, 2011; 11: 17.
5. Yüksel P, Çelik DG, Güngördü Z, Zevhide T, İzmirli S, Yakar H ve ark. Çocukluk yaş grubu gastroenteritlerinde rotavirüs antijen pozitifliğinin değerlendirilmesi. *KLİMİK*, 2011; 24(1): 48-51.
6. Tekin A. Mardin'deki akut gastroenteritli çocuklarda rotavirüs ve enterik adenovirüs sıklığı. *J Clin Exp Invest*, 2010; 1(1): 41-5.
7. Anonymous. Global rotavirüs information and surveillance bulletin Volum 4: October 2011.
8. Yousefi Rad A, Gözalan A. Detection of Rotavirüs and enteric adenovirus antigens in outpatients with gastroenteritis. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2010; 30(1): 174-9.
9. Otağ F, Direkel Ş, Özgür D, Delialioğlu N, Aslan G, Emekdaş G. Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirüs ve enterik adenovirüs. *Mersin Üniv Sağ Bil Derg*, 2012; 5(3): 18-23.
10. Atalay MA, Kandemir İ, Gökahmetoğlu S. Üçüncü basamak bir hastanedeki gastroenteritli çocuklarda rotavirüs enfeksiyonu sıklığı. *Dicle Med J*, 2013; 40(2): 212-5.
11. Köksal AO, Köksal T. Ankara'da 0-5 yaş arası akut gastroenteritli çocuklarda rotavirüs sıklığı. *Yeni Tıp Derg*, 2013; 30(2): 121-3.
12. Gültepe B, Gündüçoğlu H, Çıkman A, Parlak M, Berktaş M. Van yöresinde gözlenen gastroenteritlerde Rotavirüs ve adenovirus sıklığı. *Sakarya Tıp Derg*, 2013; 3(3): 131-4.
13. Borsa BA, Tokman HB, Çağatay P. Mardin kadın doğum ve çocuk hastalıkları hastanesi'nde 0-5 yaş arası akut gastroenteritli çocuklarda rotavirüs ve adenovirüs sıklığının belirlenmesi. *ANKEM Derg*, 2013; 27(2):75-9.
14. İnci A, Urhan B. The frequency of rotavirus in children with acute gastroenteritis. *J Clin Anal Med*, 2013; DOI:10.4328/JCAM.2156.
15. Konca Ç, Tekin M, Akgün S, Bülbül M, Çoban M, Kahramaner Z. et al. Prevalance of rotavirus in children with acute gastroenteritis, seasonal distribution, and laboratory findings in the Southeast of Turkey. *J Pediatr Inf*, 2014; 8: 7-11.
16. Türk Dağı H, Fındık D. Akut gastroenteritli hastalarda rotavirüs ve adenovirüs antijenlerinin araştırılması. *J Clin Exp Invest*, 2014; 5(2): 256-60.
17. Balkan Ç, Çelebi D, Çelebi Ö, Altıparlak Ü. Erzurum'da 0-5 yaş arası çocuklarda Rotavirüs ve adenovirus sıklığının araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2012; 42(2): 51-4.
18. Regagnon C, Chambon M, Archimbaud C, Charbonné F, Demeocq F, Labbé A, et al. Rapid diagnosis of rotavirus infections: comparative prospective study of two techniques for antigen detection in stool. *Pathol Biol*, 2006; 54(6): 343-6.
19. Munos MK, Walker CLF, Black RE. The effect of rotavirus vaccine on diarrhoea mortality. *Int J Epidemiol*, 2010; 39(Suppl 1): i56-62.
20. Şimşek Y, Bostancı İ, Bozdayı G, Öner N, Kamruddin A, Rota S ve ark. 0-5 yaş çocuklarda akut gastroenteritte Rotavirüs sıklığı ve serotip özellikleri. *Türkiye Klin J Pediatr*, 2007; 16: 165-70.

Yatan hasta örneklerinden izole edilen *Candida* izolatlarının tür dağılımlarının ve antifungal duyarlılık profillerinin değerlendirilmesi

Evaluation of species distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida* isolates from hospitalized patients

Gülşen HAZIROLAN¹, Dilara YILDIRAN¹, Irmak BARAN¹, İpek MUMCUOĞLU¹, Neriman AKSU¹

ÖZET

Amaç: Ciddi ya da invazif *Candida* enfeksiyonları, başta nötropenik hastalar olmak üzere genel olarak bağışıklık sisteminin baskılandığı, "özel konak" olarak tanımlanan hasta gruplarında sıklıkla gelişmekte ve yüksek mortalite oranı ile seyretmektedir. Ancak son iki dekattır ciddi *Candida* enfeksiyonlarının yalnızca nötropenik hasta ve özel konakla ilişkili bir klinik tablo olmadığı, özellikle hastanede yatan tüm kritik hastalarda gelişebileceği bilinmektedir. Bu çalışmada, hastanemizde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin tiplendirilerek antifungal duyarlılıklarının araştırılması hedeflenmiştir.

Yöntemler: Şubat 2013 - Şubat 2014 tarihleri arasında, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden üreyen 187 örnek çalışmaya dahil edilmiş ve retrospektif olarak incelenmiştir. Laboratuvara gönderilen klinik örnekler, Sabouraud dekstroz agar (BD Diagnostic Systems) ve koyun kanlı agar besiyerine (BD Diagnostic Systems) mantar aranması amacıyla ekilmiştir. İzole edilen maya mantarlarına Gram boyama ve germ tüp testi uygulanmıştır. Mayaların tanımlanması ve antifungal duyarlılık testleri için Vitek 2 (Biomerieux) otomatize sistemi kullanılmıştır.

ABSTRACT

Objective: Serious or invasive *Candida* infections, often occur in immune suppressed patients like neutropenic patients and cause high mortality rates. However in the last two decades it is known that serious *Candida* infections are not a clinical condition associated with specific hosts like neutropenic patients, they can develop in any critically ill patients. In this study, we aimed to investigate types of *Candida* species isolated from clinical materials of hospitalized patients and determine their antifungal susceptibilities

Methods: 187 specimens isolated from various specimens of hospitalized patients in Ankara Numune Training and Research Hospital between February 2013 and February 2014 were included to this study and examined retrospectively. Clinical specimens sent to our laboratory were inoculated to Sabouraud dextrose agar (BD Diagnostic Systems) and %5 sheep blood agar (BD Diagnostic Systems) for inspection of yeast species. Gram staining and germ tube tests were applied to isolated yeasts. Vitek 2 (Biomerieux) automated system was used for identification and antifungal susceptibility test of yeasts.

¹ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Gülşen HAZIROLAN

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ANKARA

Tel : +09 312 508 44 77

E-posta / E-mail : drgulsencetin@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 01.07.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 17.09.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.75010

Hazirolan G, Yildiran D, Baran I, Mumcuoğlu İ, Aksu N. Yatan hasta örneklerinden izole edilen *Candida* izolatlarının tür dağılımlarının ve antifungal duyarlılık profillerinin değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 17-26.

Bulgular: Toplam 187 izolatin 56'sı (%29,9) *C. albicans*, 57'si (%30,4) *C. glabrata*, 20'si (%10,6) *C. tropicalis*, 12'si (%6,4) *C. parapsilosis* 11'i (%9,8) *C. krusei*, 11'i (%5,8) *C. kefyar*, sekizi (%4,2) *C. famata*, beşi (%2,6) *C. sphaerica*, üçü (%1,6) *C. dubliniensis*, biri (%0,5) *C. norvegensis*, biri (%0,5) *C. lusitaniae*, biri (%0,5) *C. guilliermondii*, biri (%0,5) *C. haemulonii* olarak tanımlanmıştır. Klinik örneklerin 107'si (%57,3) yoğun bakım servislerinden izole edilmiştir. Tüm *Candida* türlerinde flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B, flusitozin, ve kaspofungin için elde edilen duyarlılık oranları sırasıyla %92,52, %98,85, %95,97, %91,95 ve %100 olarak saptanmıştır.

Sonuç: *Candida* türlerinin tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının bildirilmesi, tedaviyi yönlendirmek için önem arz etmektedir. Etkin ve doğru enfeksiyon kontrol stratejileri geliştirebilmek adına, hastanelerin enfeksiyon etkenlerinin dağılımını ve bunların direnç paternlerini bilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Candida*, tür dağılımı, antifungal duyarlılık profili

Results: A total of 187 isolates were distributed as follows: 56 (29.9%) *C. albicans*, 57 (30.4%) *C. glabrata*, 20 (10.6%) *C. tropicalis*, 12 (6.4%) *C. parapsilosis*, 11 (5.8%) *C. krusei*, 11 (5.8%) *C. kefyar*, 8 (4.2%) *C. famata*, 5 (2.6%) *C. sphaerica*, 3 (1.6%) *C. dubliniensis*, 1 (0.5%) *C. norvegensis*, 1 (0.5%) *C. lusitaniae*, 1 (0.5%) *C. guilliermondii* and 1 (0.5%) *C. haemulonii*. 107 (57,3%) of species were isolated from ICUs. Antifungal susceptibility results for fluconazole, voriconazole, amphotericine B, flucytosine and caspofungine were 92.52%, 98.85%, 95.97%, 91.95% and %100 respectively.

Conclusion: Identification and antifungal susceptibility testing are important for management of appropriate therapy. In order to develop effective and true infection control strategies, distribution of infective agents in hospitals and antimicrobial resistance patterns should be known.

Key Words: *Candida*, species distribution, antifungal susceptibility profiles

GİRİŞ

Günümüzde tanı ve tedavi yaklaşımlarındaki gelişmelere paralel olarak doğada bulunan mantar türleri, tıpta da giderek artan bir önem kazanmaya başlamıştır. Mantar enfeksiyonları; organ ve doku transplantasyonu, kemoterapi, kortikosteroid kullanımı, AIDS gibi bağışıklık sistemi baskılanmış hasta popülasyonundaki artış ile birlikte artmaktadır. Son iki dekat içinde özellikle hematolojik malignitesi olan nötropenik hastalarda antifungal ilaçlara dirençli ve nadir olarak enfeksiyona yol açan mantarlar, etken olarak artan sıklıkta izole edilmeye başlanmıştır (1). Mantar enfeksiyonlarında etken olarak en sık *Candida* türleri, özellikle de *C. albicans* saptanmaktadır. Son yıllarda ise *albicans* dışı *Candida* türlerinde bir artış söz konusudur. Bugün 150 den fazla *Candida*

türü bilinmektedir ve bunlardan sadece 15 tanesi enfeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir. Bunlar *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyar*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida rugosa*, *Candida inconspicua*, *Candida norvegensis*'dir. Enfeksiyonların etkenleri değişiklik gösterse de son 20 yılda bildirilen enfeksiyonların %95'i *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* ile gerçekleşmiştir (2-5).

Candida türleri birçok bitki üzerinde, memelilerin sindirim kanalı florasında, insanın mukoza ve derisinde bulunduğundan dolayı klinik örneklerde *Candida*

türlerinin saptanması, kolonizasyon, kontaminasyon ya da gerçek hastalık etkeni olup olmadıklarının ayrımını gerektirmektedir (6, 7).

Mantarlara bağlı sistemik enfeksiyonların artışı, yeni antifungal ilaçların keşfi, epidemiyolojik incelemeler ve başarılı bir klinik sağaltıma yön verebilmesi amacı ile antifungal duyarlılık testleri ile ilgili çalışmalar da artmaktadır. Antifungal duyarlılık testleri, etken mantar türüne karşı etkili olduğu düşünülen antifungal ilaç ile tedaviye yanıt alınmadığında, alternatif ilaçların araştırılmasında, seçilen ilaca karşı o mantar türünün dirençli olduğu bilindiğinde, yeni bir antifungal ilaç kullanıldığında, *in vitro* sonuçlar ile *in vivo* yanıt arasındaki uyumun belirlenmesinde, epidemiyolojik çalışmalarda uygulanmalıdır.

Günümüzde mayaların antifungal duyarlılık testlerinde *in vitro* standardizasyonu sağlayan Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) referans yöntemleri kullanılmaktadır. Mikrodilüsyon (CLSI [M27-A3], EUCAST [E.Dis 7.1] ve disk diffüzyon (CLSI [M44-A2]) yöntemleri ile standardizasyon sağlanmıştır. CLSI M27-A3 kılavuzu mayalar için, amfoterisin B, flusitozin, ekinokandinler (kaspofungin, mikafungin, anidulafungin), flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve yeni azollerin (posakonazol, ravukonazol) antifungal duyarlılık test yöntemlerini içermektedir (8-10).

Standart yöntemleri uygulamadaki teknik zorluklar ve görsel değerlendirmenin subjektif olması gibi nedenlerle, rutin laboratuvarlarda daha kolay uygulanabilecek alternatif yöntemlere başvurulmuştur. E test, 'flow' sitometri, agar dilüsyon, ergosterol miktarı tayini, kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemler ve çeşitli otomatize sistemler alternatif yöntemler olarak kullanılmaktadır (9, 11). Vitek 2 (Biomerieux) tam otomatize ticari bir sistemdir. Vitek 2 ile maya üremesi spektrofotometrik olarak değerlendirilerek eş zamanlı tanımlama ve antifungal duyarlılık testi yapılabilir. Tanımlama mayanın çeşitli biokimyasal

özelliklerine göre yapılırken AST-YS06 kartı ile amfoterisin-B, flukonazol, vorikonazol, flusitozin ve kaspofungin *in vitro* duyarlılık profilleri saptanabilir (12).

Uygun ve etkin antifungal tedavi rejimleri için, tür düzeyinde tanımlama ve antifungal duyarlılık testlerinin yapılması önem arz etmektedir. Bu amaçla çalışmamızda, Şubat 2013 - Şubat 2014 tarihleri arasında hastanemizde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen kandida izolatlarının tür düzeyinde tanımlanarak, antifungal duyarlılıklarının araştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Şubat 2013 - Şubat 2014 tarihleri arasında Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden, mantar etkeni aranması amacıyla Sabouraud dekstroz agar (BD Diagnostic Systems) ve koyun kanlı agar besiyerlerine (BD Diagnostic Systems) ekim yapılmıştır. Toplam 187 klinik örnekte 120'si (%64,1) idrar, 37'si (%19,8) kan, 10'u (%5,3) trakeal aspirat, altısı (%3,2) yara yeri, beşi (%2,7) balgam, dördü (%2,1) periton sıvısı ve üçü (%1,6) kateter ve ikisi (%1,06) abse olmak üzere maya mantarı izole edilmiştir. İzole edilen maya mantarlarına Gram boyama ve germ tüp testi uygulanmıştır. Mayaların tanımlanması ve antifungal duyarlılık testleri için Vitek 2 (Biomerieux) otomatize sistemi kullanılmıştır. Mantar tanımlanması için YST kartları ve antifungal duyarlılık için AST-YS06 kartları kullanılmıştır. Kandida izolatlarının bulanıklığı %0,45 steril NaCl ile 2.0 McFarland (1.8-2.2; DensiCheck, BioMérieux) olarak ayarlanmıştır. AST-YS06 kartları amfoterisin B, flusitozin, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin için sırası ile 0,25-16, 0,25-4, 1-64, 1-64, 0,12-8 µg/mL aralıklarında ilaç dilüsyonlarını içermektedir. Sonuçlar, Amfoterisin B için: duyarlı (S), ≤1µg/mL; orta duyarlı, 2 µg/mL; dirençli (R), ≥4 µg/mL olarak, flusitozin için: S, ≤4 µg/mL; orta duyarlı, 8-16 µg/mL; R, ≥32 µg/mL olarak, Flukonazol için: S, ≤8 µg/mL; doza bağımlı duyarlı

(DBD), 16-32 µg/mL; R, ≥64 µg/mL, vorikonazol için: S, ≤1 µg/mL; DBD, 2 µg/mL; R, ≥4 µg/mL olarak, kaspofungin için ise S, ≤2 µg/mL: duyarlı değil; ≥4 µg/mL olarak değerlendirilmiştir (11). Çalışmamızda, *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 suşları kalite kontrol suşları olarak kullanılmıştır.

BULGULAR

Klinik örneklerden izole edilen suşların 56'sı (%29,9) *C. albicans*, 57'si (%30,4) *C. glabrata*, 20'si (%10,6) *C. tropicalis*, 12'si (%6,4) *C. parapsilosis*, 11'i (%5,8) *C. krusei*, 11'i (%5,8) *C. kefyri*, sekizi (%4,2) *C. famata*, beşi (%2,6) *C. sphaerica*, üçü (%1,6) *C. dubliniensis*, biri (%0,5) *C. norvegensis*, biri (%0,5) *C. lusitanae*, biri (%0,5) *C. guilliermondii* ve biri (%0,5) *C. haemulonii* olarak tanımlanmıştır. Tüm örnek gruplarında *C. albicans* en sık izole edilen tür olmuştur. Kandida türlerinin klinik örnekler göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Klinik örneklerin 107'si (%57,2) yoğun bakım ünitelerinden (YBÜ), 46'sı (%24,6) dahili birimlerden, yedisi (%3,7) genel cerrahiden ve 27'si (%14,4) diğer cerrahi servislerden saptanmıştır. Kandida türlerinin izole edildikleri kliniklere göre dağılımı Tablo 2'de sunulmuştur.

Çalışmanın gerçekleştiği bir yıllık sürede çeşitli klinik örneklerden *Candida* spp. üremesi saptanan hastalar yaş gruplarına ve cinsiyet dağılımına göre incelenmiştir. Hastaların 114'ü (%60,96) kadın, 73'ü (%39,04) erkektir. *Candida* spp. üremesi saptanan 0-20 yaş arasında sadece beş hasta bulunur iken hastaların 79'u (%42,2) 71 ve üstü yaş grubundadır. Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 3'de gösterilmiştir. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 187 kandida izolatının 174'üne antifungal duyarlılık testi çalışılmıştır. Vitek 2 antifungal test sonuçları yapılan klinik çalışmalarda *C. famata* ve *C. sphaerica* suşları için istenilen kriterlerde çıkmadığından valide

Tablo 1. *Candida* spp. suşlarının klinik örnekler göre dağılımı

İzole Edilen Kandida Türü	ÖRNEK								TOPLAM (%)
	İdrar (%)	Kan (%)	Balgam (%)	Abse (%)	Kateter (%)	Periton (%)	Trakeal Aspirat (%)	Yara (%)	
<i>C. glabrata</i> (n= 57)	45 (78,94)	10 (17,54)	--	--	--	--	2 (3,5)	--	57 (30,48)
<i>C. albicans</i> (n= 56)	23 (41,07)	18 (32,14)	4 (7,14)	2 (3,57)	3 (5,35)	2 (3,57)	3 (5,35)	1 (1,78)	56 (29,94)
<i>C. tropicalis</i> (n= 20)	12 (60)	5 (25)	--	--	--	--	3 (15)	--	20 (10,69)
<i>C. parapsilosis</i> (n= 12)	6 (50)	3 (25)	--	--	--	--	1 (8,33)	2 (16,67)	12 (6,41)
<i>C. krusei</i> (n= 11)	10 (90,91)	--	--	--	--	--	--	1 (9,09)	11 (5,88)
<i>C. kefyri</i> (n= 11)	8 (72,72)	--	1 (9,09)	--	--	1 (9,09)	1 (9,09)	--	11 (5,88)
<i>C. famata</i> (n= 8)	6 (75)	1 (12,50)	--	--	--	--	--	1 (12,50)	8 (4,27)
<i>C. sphaerica</i> (n= 5)	4 (80)	--	--	--	--	1 (20)	--	--	5 (2,67)
<i>C. dubliniensis</i> (n= 3)	3 (100)	--	--	--	--	--	--	--	3 (1,60)
<i>C. guilliermondii</i> (n= 1)	--	--	--	--	--	--	--	1 (100)	1 (0,53)
<i>C. haemulonii</i> (n= 1)	1 (100)	--	--	--	--	--	--	--	1 (0,53)
<i>C. lusitanae</i> (n= 1)	1 (100)	--	--	--	--	--	--	--	1 (0,53)
<i>C. norvegensis</i> (n= 1)	1 (100)	--	--	--	--	--	--	--	1 (0,53)
TOPLAM (%)	120 (64,17)	37 (19,78)	5 (2,67)	2 (1,06)	3 (1,60)	4 (2,13)	10 (5,34)	6 (3,21)	187 (100)

Tablo 2. *Candida* spp. suşlarının izole edildikleri kliniklere göre dağılımı

Kandida Türü	Yoğun Bakımlar* n (%)	Genel Cerrahi n (%)	Diğer Cerrahi** n (%)	Dahili Birimler*** n (%)	TOPLAM n (%)
<i>C. glabrata</i> (n= 57)	27 (47,36)	1 (1,75)	10 (17,54)	19 (33,33)	57 (30,48)
<i>C. albicans</i> (n= 56)	39 (69,64)	3 (5,35)	5 (8,92)	9 (16,07)	56 (29,94)
<i>C. tropicalis</i> (n= 20)	17 (85)	--	1 (5)	2 (10)	20 (10,69)
<i>C. parapsilosis</i> (n= 12)	7 (58,33)	1 (8,33)	1 (8,33)	3 (25)	12 (6,41)
<i>C. kefyr</i> (n= 11)	5 (45,45)	1 (9,09)	1 (9,09)	4 (36,36)	11 (5,88)
<i>C. krusei</i> (n= 11)	3 (27,27)	--	5 (45,45)	3 (27,27)	11 (5,88)
<i>C. famata</i> (n= 8)	4 (50)	--	2 (25)	2 (25)	8 (4,27)
<i>C. sphaerica</i> (n= 5)	1 (20)	1 (20)	--	3 (60)	5 (2,67)
<i>C. dubliniensis</i> (n= 3)	3 (100)	--	--	--	3 (1,60)
<i>C. guilliermondii</i> (n= 1)	--	--	1 (100)	--	1 (0,53)
<i>C. haemulonii</i> (n= 1)	1 (100)	--	--	--	1 (0,53)
<i>C. lusitaniae</i> (n= 1)	--	--	--	1 (100)	1 (0,53)
<i>C. norvegensis</i> (n= 1)	--	--	1 (100)	--	1 (0,53)
TOPLAM (%)	107 (57,21)	7 (3,74)	27 (14,43)	46 (24,59)	187 (100)

* Yoğun Bakımlar: Acil Dahiliye YB, Anestezi YB'lar, C Blok 3. Kat YB, Cerrahi YB'lar, Koroner YB'lar, Nöroloji YB, Yanık Tedavi YB

** Diğer Cerrahi: Beyin Cerrahi, Kadın Hastalıkları ve Doğum, Kulak-Burun-Boğaz, Kalp ve Damar Cerrahi, Ortopedi, Plastik Cerrahi, Üroloji

*** Dahili Birimler: Acil Tıp Kliniği, İç Hastalıkları, Dermatoloji, Endokrinoloji ve Metabolizma, Enfeksiyon Hastalıkları, FTR, Gastroenteroloji, Hematoloji, Nefroloji, Tıbbi Onkoloji

edilmemiştir. Çalışmamızda, sekiz *C. famata* ve beş *C. sphaerica* suşu için Vitek iki antifungal test sonucu verilememiştir. Vitek iki izole edilen kandida suşlarına göre antifungal duyarlılık sonuçları Tablo 4'de verilmiştir. Tüm *Candida* türlerinde flukonazol, vorikonazol, flusitozin, amfoterisin B ve kaspofungin için elde edilen duyarlılık oranları sırasıyla %92,52, %98,85, %91,95, %95,97 ve %100 olarak saptanmıştır.

Antifungal duyarlılık testleri ile amfoterisin B'ye bir izolatta direnç (*C. kefyr*) tespit edilmiştir. Vorikonazol direnci bir izolatta (*C. glabrata*), flusitozin direnci de bir izolatta (*C. albicans*) saptanmıştır. *C. glabrata* ve *C. krusei* suşlarında flusitozine orta duyarlılık gözlenmiştir. *C. albicans*, *C. kefyr* ve *C. krusei* suşlarında da amfoterisin B'ye orta duyarlılık

Tablo 3. Hastaların yaş gruplarına göre cinsiyet dağılımı

Yaş Aralığı	Kadın	Erkek	Toplam
0-20 yaş	3	2	5
21-40 yaş	21	5	26
41-60 yaş	20	19	39
61-70 yaş	26	12	38
71 ve üstü	44	35	79
Toplam (n%)	114 (%60,96)	73 (%39,04)	187 (%100)

gözlenmiştir. Bir periton örneğinden izole edilen *C. albicans* suşu amfoterisin B'ye dirençli, vorikonazole dirençli ve flusitozine az duyarlı bulunmuştur.

Tablo 4. İzole edilen *Candida* spp. suşlarının türe göre antifungal duyarlılık yüzdeleri

Kandida Türü	FLC n (%)	VOR n (%)	FLS n (%)	AMP-B n (%)	CAS n (%)
<i>C. glabrata</i> (n= 57)	56 (98,24)	56 (98,24)	56 (98,24)	57 (100)	57 (100)
<i>C. albicans</i> (n= 56)	56 (100)	55 (98,21)	54 (96,42)	52 (92,87)	56 (100)
<i>C. tropicalis</i> (n= 20)	20 (100)	20 (100)	20 (100)	20 (100)	20 (100)
<i>C. parapsilosis</i> (n= 12)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)
<i>C. kefyr</i> (n= 11)	11 (100)	11 (100)	11 (100)	9 (81,81)	11 (100)
<i>C. krusei</i> (n= 11)	-	11 (100)	8 (72,72)	10 (90,9)	11 (100)
<i>C. dubliniensis</i> (n= 3)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
<i>C. guilliermondii</i> (n= 1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	-
<i>C. haemulonii</i> (n= 1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>C. lusitaniae</i> (n= 1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>C. norvegensis</i> (n= 1)	-	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
TOPLAM (n= 174)	161 (92,52)	172 (98,85)	160 (91,95)	167 (95,97)	173 (100)

FLC: Flukonazol, VOR: Vorikonazol, FLS: Flusitosin, AMP-B: Amfoterisin B, CAS: Kaspofungin

TARTIŞMA

Opportunistik enfeksiyonların, özellikle de fungal enfeksiyonların sayısında artışa kanser, HIV/AIDS gibi hastalarda kullanılan tedavi rejimleri, organ transplantasyonu, yoğun bakım tedavisine ihtiyaç duyan hasta sayısında çoğalma gibi çeşitli faktörler neden olmaktadır. Fungal enfeksiyon için risk faktörü taşıyan hastalarda en sık enfeksiyon etkeni olarak kandida türleri saptanmaktadır (1). Amerika'da nozokomiyal kan dolaşım enfeksiyonlarında %8-10 oranında kandida türleri saptanırken, yapılan surveyans çalışmalarında kandida enfeksiyonları 8/100.000 oranında raporlanmaktadır (1-4). Kandida enfeksiyonları tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen hala yüksek mortalite oranları ile seyretmektedir (2-5). Son 20 yılda, kandidiyazis olgularından izole edilen kandida türlerinde bir değişim gözlenmektedir. albicans dışı *Candida* türlerinde *C. albicans*'a göre bir artma söz konusudur.

Çalışmamızda; çeşitli klinik örneklerden izole edilen kandida türlerinin dağılımında en sık %30,4 oranında *C. glabrata* tespit edilirken, ikinci sırada %29,9 oranında *C. albicans* saptanmıştır. Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinden bildirilen raporlarda da *C. albicans* izolasyonunda azalma ve *C. glabrata* izolasyonunda artma gözlenmektedir (13). Çalışmamızda; izole edilen kandida türlerinin %70,1'i albicans dışı *Candida* izolatlarıdır. Bu durum, tüm dünyada olduğu gibi hastanemizde de albicans dışı *Candida* türlerinin giderek daha da önem kazandığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda; kandidemi etkenleri arasında tür dağılımına bakıldığında ise *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* sırası ile %48,6, %27,02, %13,5, %8,1, oranında tespit edilmiştir. Yapar ve ark. (14) yaptıkları çalışmada, çalışmamıza benzer olarak kandidemi etkenleri arasında sırası ile *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* izolatlarını bildirirken, Çalışkan ve ark. (15), kandidemi etkenleri

arasında sırası ile %57 *C. albicans*, %14 *C. parapsilosis*, %14 *C. tropicalis* ve %10 *C. glabrata* izolatlarını bildirmişlerdir.

YBÜ'de yatış, özellikle de süre uzadıkça artan invazif girişimler nedeniyle doğal bariyerlerin kırılarak enfeksiyon oluşmasına zemin hazırlamaktadır (16). Çalışmamızda; kandida enfeksiyonlarının %57,2 (107/187)'i YBÜ'de izlenen hastalardır. Hastaların yaş dağılımı incelendiğinde; 156 tanesinin (%83,4) 40 yaşın üstünde ve bunların da 79 tanesinin (%42,2) 71 ve üstü yaş grubunda olduğu gözlenmiştir. Kandida enfeksiyonları, her yaş grubunda (0-87) gözlemlense de yaşla birlikte immün sistemin zayıflaması ve kronik hastalıkların sıklığının artması nedeniyle özellikle ileri yaşlarda daha sık gözlenmektedir. Yatarak tedavi gören ileri yaş hastalar kandida enfeksiyonları açısından takip edilmelidir.

Kandida enfeksiyonlarının örnekler göre dağılımı incelendiğinde; hastanemizde ilk sırada idrar örneklerinin (120/187), ikinci sırada ise kan örneklerinin (37/187) yer aldığı görülmüştür. Acar ve ark. (17), YBÜ'de saptadıkları kandida enfeksiyonlarında çalışmamızın sonuçlarına paralel olarak kandidemi ve üriner sistem enfeksiyonlarını (ÜSE) ilk sıralarda bulmuşlardır (kandidemi: %42,9, ÜSE: %37,1). Çekin ve ark. (18), yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole ettikleri kandida türlerinin örnekler göre dağılımı incelendiğinde ilk sırada (102/221) idrar örnekleri, ikinci sırada kandideminin (81/120) yer aldığını saptamışlardır.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında antimikrobiyal duyarlılık testlerinin hızlı ve doğru olarak yapılması, tedaviyi yönlendirme ve enfeksiyon kontrolü açısından önemlidir. Antifungal duyarlılık testlerinde, *in vitro* standardizasyonu sağlayan CLSI ve EUCAST referans yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemler ile sonuç almanın 48 saati bulabilmesi, bilgili ve deneyimli çalışan gerektirmesinden dolayı yoğun iş akışı olan laboratuvarlarda kullanımı pratik değildir. Bugün bir çok merkez hızlı ve uygulaması

daha kolay olan Etest, Vitek 2, Sensititre Yeast One gibi otomatize sistemler tercih etmektedir. Yapılan çalışmalarda ticari yöntemler ile referans yöntemler arasında iyi bir essansiyel uyum (+2 dilüsyon aralığı) ve katogerisel uyum (duyarlı, orta duyarlı ve dirençli suşlarda uyum) tespit edilmiştir (12). Çalışmamızda, kandida türlerinin tanımlanması ve antifungal duyarlılık testlerinde Vitek 2 otomatize sistemi kullanılmıştır. Kandida türlerinin antifungal duyarlılık profilleri bu sistemde, CLSI M27-S3 kılavuzunda önerilen direnç sınır değerlerine göre belirlenmiştir. Flukonazol maya enfeksiyonlarının tedavisinde ilk tercih olan, maliyeti düşük ve etkin bir triazoldür. Flukonazol nadir izole edilen bir tür olan *C. krusei*'ye karşı etkisizken *C. glabrata*'ya karşı da sınırlı etki göstermektedir (19). Çalışmamızda, flukonazol direnci *C. krusei* ve *C. norvegensis* suşlarında saptanmıştır. Azevedo ve ark. (20), 4.625 kandida suşunda, flukonazol direncini *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. rugosa* suşlarında, %5,8 oranında bildirmişlerdir. Çekin ve ark. (18) ise flukonazol direncini kandida suşlarında %4,5 oranında saptamışlardır. Vorikonazol başlangıç tedavisinde flukonazol yerine kullanılabilen geniş bir etki spektrumuna sahip bir diğer triazoldür. Wang ve ark. (19) çalışmalarında, 817 *Candida* spp. izolatında vorikonazol duyarlılığını disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlardır. *C. albicans* (%0,7), *C. glabrata* (%17,8), *C. krusei* (%11,1), *C. lipolytica* (%90) ve *C. tropicalis* (%5,7) suşlarında vorikonazol direncini bildirmişlerdir. Odds ve ark. (21) çalışmalarında da, 289 *Candida* spp. izolatu incelemişler, *C. glabrata* izolatlarında %4,5 (3/66) oranında vorikonazol direnci bildirmişlerdir. Çalışmamızda tüm suşlar vorikonazole duyarlı bulunurken sadece bir *C. glabrata* (%1,8) suşunda vorikonazole direnç tespit edilmiştir. Uluslararası SENTRY Antimikrobiyal Sürveys Programı kan kültüründe izole ettikleri 1201 *Candida* izolatında flusitozin duyarlılık oranını %95,5 olarak bildirmiştir. Flusitozin direnci *C. albicans* (%2,4), *C. glabrata* (%0), *C. parapsilosis* (%0,5), *C. tropicalis* (%10,3) izolatlarında saptanmıştır (22). Sook-In

ve ark. (23) ise kandidemi etkenlerinde Vitek 2 sistemini ile flusitozin duyarlılık oranını %97,3 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda, kandida izolatlarında flusitozin duyarlılık oranı %91,95 olarak saptanmıştır. Flusitozine orta duyarlılık profili *C. glabrata* ve *C. krusei* suşlarında saptanmıştır. Amfoterisin B Kandida türlerine etkin bir antifungaldır. Amfoterisin B'ye en duyarlı tür *C. albicans*'tır. *C. glabrata* ve *C. krusei* suşlarında *C. albicans* ile kıyaslandığında amfoterisin B'ye azalmış duyarlılık gözlenebilir (24). *C. lusitaniae* suşları ilk izole edildiklerinde amfoterisin B'ye genellikle duyarlı iken amfoterisin B tedavisi altında sıklıkla direnç gelişmektedir (25). Ülkemizdeki bazı merkezlerden ve dünyanın çeşitli yerlerinden yapılan çalışmalarda amfoterisin B direnci %2-20 gibi farklı oranlarda bildirilmiştir (26-29). Çalışmamızda, amfoterisin B'ye *C. albicans*, *C. kefir* ve *C. krusei* türleri dışındaki tüm kandida türlerinde %100 duyarlılık tespit edilmiştir.

Ekinokandin grubu antifungaller kandida türlerine oldukça etkindirler. Özellikle *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* suşlarında ekinokandinlere yüksek duyarlılık gözlenirken, *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* suşlarında ekinokandinlere yüksek

MİK değerleri saptanabilmektedir. Kaspofungin kandida türlerine *in vitro* ve *in vivo* olarak etkin bir fungisidal aktive göstermektedir. Azol direnci gözlenen kandida türlerinin tedavisinde tercih edilmektedir (30). Çalışmamızda *Candida* suşlarının hiçbirinde kaspofungin direnci saptanmamıştır. Yapılan farklı çalışmalarda çalışmamıza benzer olarak kaspofungin duyarlılık oranı %98-100 olarak tespit edilmiştir (31, 32). Kandida türlerinde kaspofungin MİK değerlerinin *C. parapsilosis* suşları dışında, düşük bulunduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır (13, 31, 32). Çalışmamızda, *C. parapsilosis* dışında kandida türlerine kaspofungin için MİK aralığı 0,5-0,25 µg/mL olarak tespit edilmiştir. *C. parapsilosis* suşlarında diğer türler ile kıyaslandığında kaspofungine 1-2 dilüsyon yüksek MİK değerleri (MİK aralığı 0,5-2 µg/mL) saptanmıştır.

Sonuç olarak, kandida izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması ve antifungal duyarlılıklarının bildirilmesi, tedaviyi yönlendirmek için önemlidir. Ülkemizden bildirilen sonuçlar eşliğinde, her hastanenin izole ettiği kandida türlerinin dağılımını ve antifungal direnç oranlarını tespit ederek ampirik tedaviyi yönlendirmeleri gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Cornely OA. Aspergillus to zygomycetes: causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive fungal infections. *Infection*, 2008; 36 (4): 296-313.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent problem. *Clin Microbiol Rev*, 2007; 20 (1): 133-63.
3. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*, 2006; 20 (3): 485-506.
4. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012; 73 (1): 45-8.
5. Lewis RE. Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr Med Res Opin*, 2009; 25 (7): 1732-40.

6. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, Cryptococcus ve Tıbbi Önemi Olan Diğer Mayalar, 9ncu baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık, 2009.
7. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. Clinical Mycology. 2nd, Churchill Livingstone: Elsevier Inc, 2009.
8. Anonymous. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.
9. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev, 2001; 14 (4): 643-58.
10. Anonymous. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline 2nd, CLSI document M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2009.
11. Anonymous. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved Standard, 3rd ed. CLSI document M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2008.
12. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Maria J, et al. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the sensititre yeast one and Etest techniques for *in vitro* detection of antifungal resistance in yeast isolates. Clin Microbiol, 2010; 48 (5): 1782-6.
13. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). J Clin Microbiol, 2011; 49 (1): 396-9.
14. Yapar N, Pullukcu H, Avkan-Oguz V, Sayin-Kutlu S, Ertugrul B, Sacar S. Evaluation of candidemia: a multicenter case-control study. Med Mycol, 2011; 49 (1): 26-31.
15. Çalışkan E, Dede A, Biten G. Kan Kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. ANKEM, 2013; 27 (1): 25-30.
16. Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. Clin Infect Dis, 1998; 27 (4): 781-8.
17. Acar A, Öncül O, Küçükardalı Y, Özyurt M, Haznedaroğlu T, Çavuşlu Ş. Yoğun bakım ünitelerinde saptanan *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojik özellikleri ve mortaliteye etki eden risk faktörleri. Mikrobiyol Bul, 2008; 42(3): 451-61.
18. Çekin Y, Pekintürk N, Cekin AH. Evaluation of species distribution and antifungal resistance of *Candida* isolates from hospitalized patients. J Clin Anal Med, 2015; 6(1): 8-11.
19. Wang H, Xiao M, Chen SC, Kong F, Sun ZY, Liao K, et al. In vitro susceptibilities of yeast species to fluconazole and voriconazole as determined by the 2010 National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) study. J Clin Microbiol, 2012; 50 (12): 3952-9.
20. Azevedo AC, Bizerra FC, da Matta DA, de Almeida LP, Rosas R, Colombo AL. In vitro susceptibility of a large collection of *Candida* strains against fluconazole and voriconazole by using the CLSI disk diffusion assay. Mycopathologia, 2011; 171 (6): 411-6.
21. Odds FC, Hanson MF, Davidson D, Jacobsen MD, Wright P, Whyte JA, et al. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. J Med Microbiol, 2007; 56 (8): 1066-75.
22. Messer SA, Jones RN, Moet GJ, Kirby JT, Castanheira M. Potency of anidulafungin compared to nine other antifungal agents tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp. results from the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008) J Clin Microbiol, 2010; 48 (8): 2984-7.
23. Sook-In J, Jong HS, Hyun-Jung C, Min-Young JMS, Soo-Hyun K, Wee Gyo L, et al. Korean Study Group for Candidemia. Antifungal susceptibility to amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and flucytosine in *Candida* bloodstream isolates from 15 tertiary hospitals in Korea. Ann Lab Med, 2012; 32(6): 426-8.

24. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2009; 48 (5): 503-35.
25. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 2007; 20 (1): 133-63.
26. Doğruman AL, Aktaş AE, Tuncel E, Ayyıldız A, Yiğit N. Yenidoğan kan kültürlerinden izole edilen *Candida* kökenlerinin standart makrodilüsyon ve E test yöntemleriyle antifungal duyarlılıklarının saptanması. XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 8-13 Ekim, Antalya-Türkiye. 2000.
27. Fındık D, Tuncer İ, Arslan U. *Candida albicans* türü maya mantarlarında antifungal ilaç direnci. XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Ekim 8-13, Antalya-Türkiye. 2000.
28. Zer Y, Balcı İ. Yoğun Bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen *Candida* suşlarının identifikasyonu ve antifungal duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2002; 32(3): 230-4.
29. Cheng MF1, Yu KW, Tang RB, Fan YH, Yang YL, Hsieh KS. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004; 48 (1): 33-7.
30. Sun HY, Singh N. Characterisation of breakthrough invasive mycoses in echinocandin recipients: an evidence-based review. *Int J Antimicrob Agents*, 2010; 35 (3): 211-8.
31. Spiliopoulou A, Vamvakopoulou S, Bartzavali C, Dimitracopoulos G, Anastassiou ED, Christofidou M. Eleven- year retrospective survey of candidemia in a University Hospital in Southwestern Greece. *Clin Microbiol Infect*, 2010; 16 (9): 1378-81.
32. Saracli MA, Gumral R, Gul HC, Gonlum A, Yildiran ST. Species distribution and *in vitro* susceptibility of *Candida* bloodstream isolates to six new and current antifungal agents in a Turkish tertiary care military hospital, recovered through 2001 and 2006. *Mil Med*, 2009; 174 (8): 860-5.

Evaluation of systemic tissue involvement in mice following intraperitoneal inoculation of *Toxoplasma gondii* RH Ankara strain*

Toxoplasma gondii RH Ankara suşu ile intraperitoneal olarak enfekte edilen farelerde sistemik doku tutulumunun değerlendirilmesi

Emine ŞAMDANCI-TÜRKMEN¹, Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN^{2,3}, Cahit BABÜR³, Mesut MÜNGAN³, Nasuhi Engin AYDIN⁴

ABSTRACT

Objective: This study aimed to pathologically evaluate systemic tissue involvement in acute toxoplasmosis in mice inoculated with *Toxoplasma gondii* RH Ankara strain.

Method: Forty-two *Mus musculus* albino mice were divided into four groups with the control group receiving no inoculation, the group consisting of mice that were not sacrificed after intraperitoneal inoculation and the groups consisting of mice euthanasia were performed on day runner up or day fourth following intraperitoneal inoculation. A 48-50-hour intraperitoneal passage of *T. gondii* RH Ankara strain in mice was used for inoculation and each mouse received 5×10^4 tachyzoites. The mice sacrificed by euthanasia were macroscopically examined and then collected tissue samples fixed in 10% formalin. The preparations set by from the tissues blocked in paraffin were stained with hematoxylin-eosin and histopathological examination was performed.

Results: Necrosis in the serosa of the intestine and parenchyma of the liver, spleen, kidneys, pancreases and omentum and many free groups of tachyzoites were observed. Tachyzoites were identified in alveolar capillary lumens in the lungs. No pathological finding was observed in the cerebrum and cerebellum but few tachyzoites. It was observed that tissue necrosis and the density of *Toxoplasma gondii* tachyzoites were directly

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, intraperitoneal yolla *Toxoplasma gondii* RH Ankara suşu inoküle edilen farelerde oluşan akut tokzoplazmozisde sistemik doku tutulumunun patolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: *Mus musculus* varyete albino cinsi 42 adet fare, herhangi bir inokülasyonun yapılmadığı kontrol grubu, intraperitoneal inokülasyondan sonra sakrifiye edilmeyen ve intraperitoneal inokülasyondan ikinci gün ve dördüncü gün sakrifiye edilenler olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Farelerin intraperitoneal inokülasyonunda *T. gondii* RH Ankara suşunun farelerdeki 48-50 saatlik intraperitoneal pasajları kullanılmış ve her bir fareye 5×10^4 takizoit verilmiştir. Sakrifiye edilen hayvanlar makroskopik olarak incelendikten sonra alınan doku örnekleri %10 formalinde tespit edilmiştir. Parafin bloklara alınan dokulardan hazırlanan preparatlar hematoksilen-eozin ile boyanarak histopatolojik olarak incelenmiştir.

Bulgular: Karaciğer, dalak, ince bağırsaklar, böbreklerin parankimi ve serozasında nekrozlar ve çok sayıda serbest takizoit grupları gözlenmiştir. Akciğerin alveolar kapiller lümenlerinde de takizoitler saptanmıştır. Beyin ve beyincikte ise herhangi anlamlı bir patolojik değişiklik izlenmemiştir. Dokulardaki nekroz ve *Toxoplasma gondii* takizoidlerinin yoğunluğunun, inokülasyon süresi ve temas yüzeyi ile doğru orantılı olduğu

* Presented at the 19th National Pathology Congress at Girne, Cyprus, October 07-11, 2009.

¹ İnönü University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology, MALATYA, TURKEY

² Hitit University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, CORUM, TURKEY

³ Public Health Institution of Turkey, National Parasitology Reference Laboratory, ANKARA, TURKEY

⁴ İzmir Katip Celebi University, Department of Medical Pathology, IZMIR, TURKEY



İletişim/Corresponding Author : Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

Hitit University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, CORUM, TURKEY

Tel : +09 312 458 24 74

E-posta / E-mail : aysegultaylanozkan@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 16.07.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 07.11.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.32448

Şamdancı-Türkmen E, Taylan-Özkan A, Babür C, Müngan M, Aydın N.E. Evaluation of systemic tissue involvement in mice following intraperitoneal inoculation of *Toxoplasma gondii* RH Ankara strain. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 27-36.

proportional to the duration of post inoculation. All infected mice that received no intervention died on day sixth. In this study in mice, it was found that *T. gondii* RH Ankara strain induced the same pathological findings as the RH strain belonging to the virulent Type I group.

Conclusion: Mice inoculation can be used for diagnosis and this model may also be used in studies investigating vaccination, drugs and pathogenesis.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, pathogenesis, mice

gözlenmiştir. Herhangi bir müdahalede bulunulmayan enfekte farelerin tamamı altıncı günün sonunda ölmüştür. Bu çalışmada *T. gondii* RH Ankara suşunun farelerde virulan Tip I gruba bağlı RH suşlarındakine benzer patolojik bulgular oluşturduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Fare inokülasyonu tanı amacıyla kullanılabileceği gibi aşı, ilaç ve patogeneze yönelik çalışmalarda da bu modelden yararlanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *Toxoplasma gondii*, patogenez, fare

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite which is common worldwide and has a high prevalence in the communities. The definitive host of *T. gondii* is the cat and the intermediate hosts are vertebrates such as human beings, birds, cattle, sheep and goats. The parasite has three infective stages: trophozoites (tachyzoites), bradyzoites, and oocysts. Tachyzoites are the form of the parasites that rapidly multiplies in nucleated cells of the host by endodiogeny and can be produced in experimental animals and tissue cultures. Bradyzoites are the stage of the parasite that slowly multiplies in tissue cysts. Oocysts are the final product of the sexual stage in the intestinal epithelium of felines and are excreted in feces. Although the main mode of transmission in humans is the oral intake of oocysts, the disease may also be transmitted via products such as raw meat and milk that have the tissue cysts of the disease. Furthermore, toxoplasmosis is also acquired from other humans via maternofetal transmission or by organ transplantation and blood transfusion. After the acquisition of the parasites by any route, they enter macrophages and start to divide and hide from the humoral and cellular immune system during this period. *T. gondii* within the macrophages disseminate to all organs via the lymphatic system and blood (1-3).

Toxoplasmosis is prevalent in warm and humid climates and generally asymptomatic in individuals with a healthy immune system. However, immunocompromised patients as well as pregnant

women and their fetuses are at risk. It was reported that the pathology in the host tissue induced by *T. gondii* infection has an important role in latent infection and reactivation processes, but the pathological features in humans induced by acute toxoplasmosis could be documented only in a few reports (1).

The diagnosis of toxoplasmosis is made by direct and indirect methods. Direct diagnosis is based on the demonstration of the causative agent in biopsy or autopsy/necropsy. The histopathological causative agent itself may be identified, while inoculation into cell culture or experimental animals may also be performed. This method is particularly useful in immunosuppressive patients or in cases such as AIDS where antibody production is low or late. Identification of the typically crescent-shaped *T. gondii* organisms by using various staining methods is a definitive diagnostic finding, but differentiation requires experience. For indirect diagnosis, immunological methods such as ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test), and SFDT (Sabin Feldman Dye Test) are used. However, the decision regarding diagnosis of acute toxoplasmosis using indirect methods is quite difficult (3-6). Haholu et al. (5), suspected this infection in a patient based on the presence of many histiocytes in the lymphatic tissue samples obtained by fine-needle aspiration and the presence of particles in the cytoplasm of these histiocytes and made the definitive diagnosis by PCR. Although molecular

methods have come to foreground particularly in congenital toxoplasmosis, immunosuppressive patients or toxoplasmic encephalitis during the recent years, the combined use of the methods increases the possibility of success. PCR with amniotic fluid, fetal blood and peripheral maternal blood, inoculation into mouse peritoneum and culture were reported to be the most valid methods for the diagnosis of congenital toxoplasmosis in pregnancy (3-6).

Investigation of the physiopathology of toxoplasmosis is very important for the development of diagnosis, treatment and vaccination or other protective measures. These types of studies are performed *in vivo* and/or *in vitro* using strains with various levels of virulence and different animal models. It is noted that animal models would be useful in experimental modeling of chronic toxoplasmosis as well as disseminated toxoplasmosis seen in AIDS patients (1, 6 - 12).

This study aimed to pathologically evaluate the systemic tissue involvement in acute toxoplasmosis in mice induced by the intraperitoneal inoculation of RH Ankara strain.

MATERIALS AND METHODS

3-6-week-old healthy white male Swiss-Albino mice weighing approximately 20 g (*Mus musculus* albino) were provided from the Experimental Animal Production Laboratory of Refik Saydam Hygiene Center (RSHC). Care of mice and antigen production was provided by staff with Certificate of Experimental Animal use and performed under the approval of the Experimental Animals Local Ethics Committee of RSHC. Calf fattening meal and sterile water were used for feeding the animals throughout the study. Temperature, light and humidity were continuously controlled.

Although the mice used in the study are produced as "specifically pathogen-free (SPF)", they were examined for *T. gondii* antibodies using Sabin Feldman Dye Test (SFDT) by taking blood samples (2). Forty-two male *Mus musculus* albino mice, determined to be

seronegative for *T. gondii* infection were included in the study. The animals were divided into the following groups: I) control group - intact animals (6 mice); II) control group - infected animals (6 mice); III) the animals sacrificed on day two following intraperitoneal inoculation (15 mice); and IV) the animals sacrificed on day four following intraperitoneal inoculation (15 mice).

48-50-hour passages of *T. gondii* RH Ankara strain in mice currently used as antigen in SFDT and IFAT in RSHC were used to established toxoplasmosis infection. Peritoneal exudates obtained from mice were adjusted so as to provide a tachyzoite count of 2.5×10^5 /mL on Thoma slide by dilution with sterile normal saline and this prepared inoculum was administered to the mice in Group II, III and IV at a dose of 200 μ L (5×10^4) by intraperitoneal injection (2, 13).

On day two and four following injection, necropsies were performed and tissue samples were taken from all organs systemically and the samples were fixed in 10% formalin after the mice were administered carbon dioxide. Following routine tissue examination, the samples were embedded in paraffin, cut into 5- μ sections and stained with hematoxylin-eosin (H-E). The lesions induced by *Toxoplasma* that were found in the sections examined using light microscopy were evaluated for expansion and severity of involvement (14).

Control groups also sacrificed and histopathologically investigated at the end of the experiment.

RESULTS

Acute toxoplasmosis was detected in all intraperitoneally inoculated mice. No signs were found in the uninfected mice in Group I. Of the mice in Group II which were infected but did not undergo necropsy, four died on day five and two died on day 6. It was observed that the mice infected with toxoplasmosis had hair erection and their mobility and feeding/drinking activities were decreased (Table 1).

Table 1. Comparison of the pathological findings in all intraperitoneally infected and uninfected groups of mice with *T. gondii*

Features of Mice		Features of necrotic foci					Histopathological findings					
Group (# mice)	Application	Euthanasia (E) /death spontaneously (DS)	General Appearance	Exudative fluid in abdominal cavity	Grey exudative fibrinous membranes	T. gondii content in all organs	T. gondii content in cerebellum	Cerebellum	Lung	Liver & Spleen	Pancreas	Omental fat tissue
I (6)	Control, uninfected	E 7. day	Healthy	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II (6)	Control, IP inoculation	DS 5. & 6. days	Hair erection + Mobility/feeding/drinking activities ↓	+++	Thickest, diffusely covering the surfaces of the liver, spleen, gut and kidneys	++	++	++	++	++	++	++++ Necrosis & # of parasites
III (15)	IP inoculation	E 2. day	Hair erection + Mobility/feeding/drinking activities ↓	+	Thick, focally covering the surfaces of the liver, spleen, gut and kidneys	+	+/-	+	+	+	+	++ Necrosis & # of parasites
IV (15)	IP inoculation	E 4. day	Hair erection + Mobility/feeding/drinking activities ↓	+++	Thickest, diffusely covering the surfaces of the liver, spleen, gut and kidneys	++	+	++	++	++	++	+++ Necrosis & # of parasites

All mice which were given the causative agent intraperitoneally and euthanasia performed (Group III and IV) had 0.5-1 mL of exudative fluid in their abdominal cavity, a finding which was more pronounced on day four. Grey exudative fibrinous membranes focally or diffusely covering the surfaces of the liver, spleen, gut and kidneys were observed (Figure 1, 2 a, 2 b). Similar findings were seen Group II, too.

Microscopic examination revealed that the number of the necrotic foci and the microorganism content in these foci were higher in mice where euthanasia was performed on day 4. In both groups, an appearance consistent with the parasite was very rare in the cerebrum of the mice and no significant pathological finding was observed in the cerebellums of the mice.

Parasites were found in interlobar septa and alveolar capillary lumens in the lungs (Figure 3, 4). Tachyzoite forms were observed in diffuse necrotic foci and sinusoids in the liver and spleen (Figure 5). The presence of necrosis together with the parasite was found scattered in the parenchyma and interlobular septa in the pancreas. The density of both necrosis and parasites were determined to be higher in omental fat tissue compared to other tissues (Figure 6). The thickness of the fibrous exudative membrane covering the surface of the organs, the presence of necrotic foci and the density of parasites were higher in the group that was sacrificed on day four, directly proportional to the duration of infection.

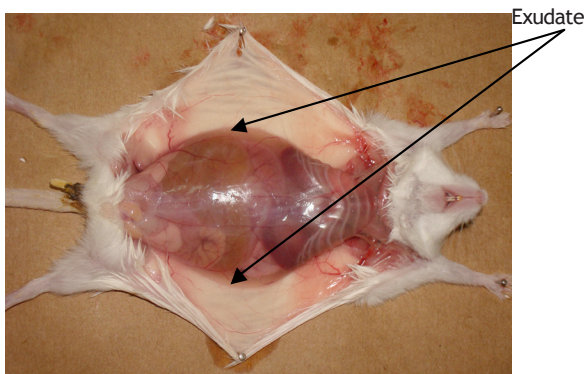


Figure 1. Appearance of the internal organs and formed exudate in a mouse euthanasia were performed 2 days after intraperitoneal inoculation of *T. gondii* RH Ankara strain.

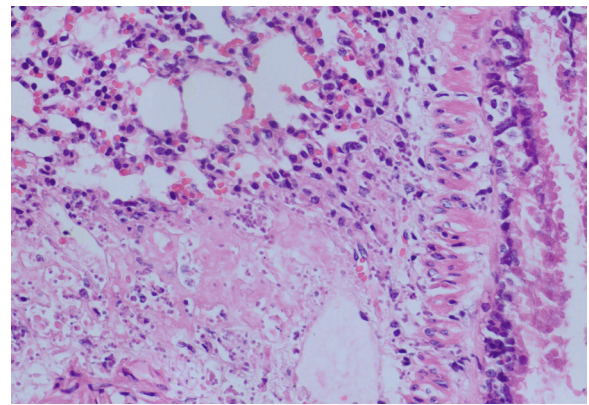


Figure 3. Trophozoites localized peribronchiolar (H-E X400)

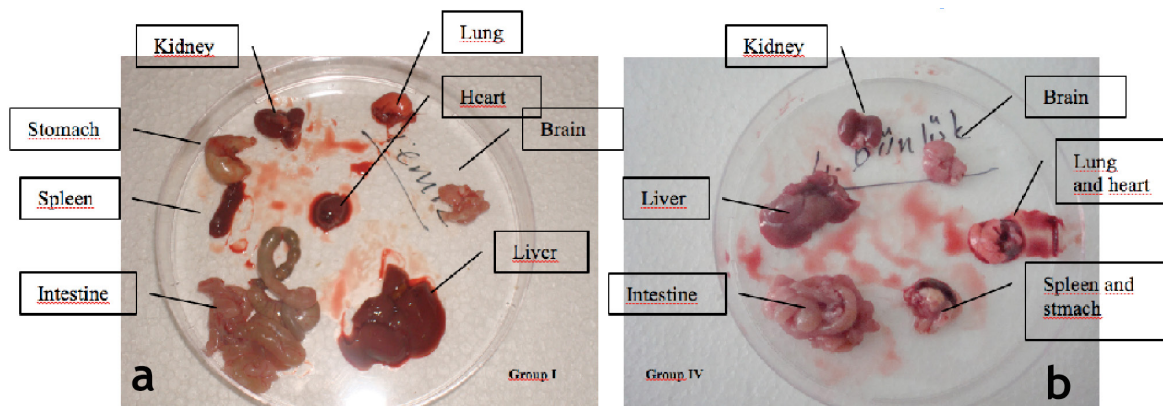


Figure 2. a) Appearance of the internal organs of the mice in Group I (Control group - intact mice) and b) Group IV (euthanasia were performed 4 days after intraperitoneal inoculation of *T. gondii* RH Ankara strain).

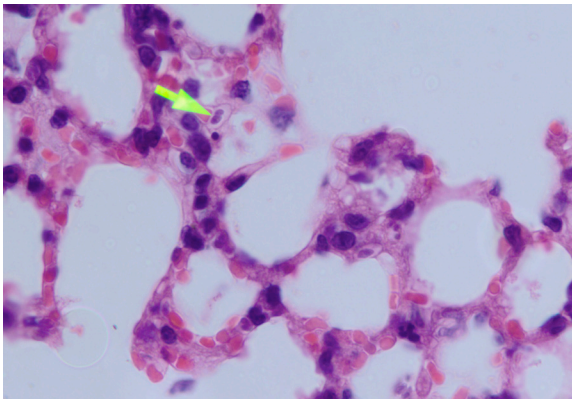


Figure 4. *Toxoplasma* parasite in alveolar capillaries (H-E X1000)

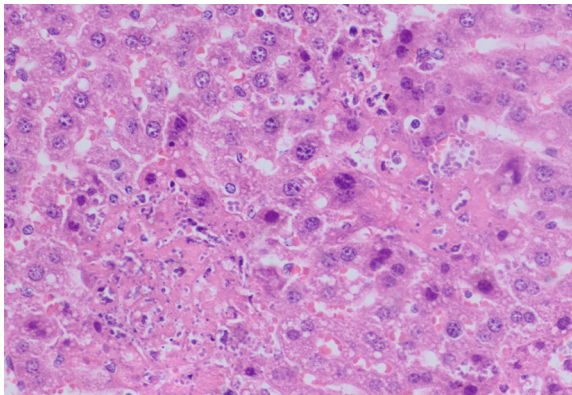


Figure 5. Necrotic foci and *Toxoplasma* parasites in the liver (H-E X400)

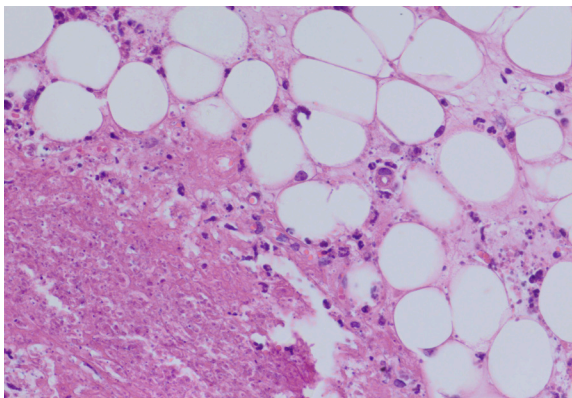


Figure 6. A necrotic area and dense *Toxoplasma* tachyzoites in the omentum (H-E X400)

DISCUSSION

Toxoplasma gondii can spread to the most distant organs by the lymphatic system and/or blood. In general, the first finding is necrosis in the intestinal and mesenteric lymph nodes in case of oral transmission of oocysts. Subsequently, focal necrosis areas may develop in many other organs. *Toxoplasma* produces no toxins and necrosis is caused by intracellular proliferation of tachyzoites. The clinical picture is determined by the damage in vital and sensitive organs such as eyes, adrenal glands, and heart and the immune system of the host. In humans, the symptoms of the infection are seen at a rate of 10% (3).

T. gondii has three main genotypes namely Type I, Type II and Type III. Type II strain is responsible for most of the toxoplasmosis cases affecting humans. The speed of infection of the host cell depends on the virulence of the *Toxoplasma* strain and this difference affects host and tissue selection of the parasite. In *in vitro* and *in vivo* studies, Type I strains were demonstrated to spread more rapidly and infect more cells compared to Type II and Type III. The lifecycles of virulent and avirulent strains of *T. gondii* in nature are also different and virulent strains more rarely form oocysts or tissue cysts (8, 15-20).

In studies using cell cultures, it was reported that 40% of cells were caught by the causative agent at 20 minutes of the infection with the RH strain. Furthermore, cells are destroyed within 24-48 hours of infection, while this period varies depending on the cell type (16). In studies conducted in our country, it was reported that the Ankara strain has the same structure as the RH strain, does not show a different performance than the RH strain in tests like ELISA and IFAT although Western blot analysis reveals some different protein bands and kills mice that are intraperitoneally infected within 4-6 days (7, 10, 15, 16, 21).

In mice in which acute toxoplasmosis was established by intraperitoneal inoculation, it was found that the activities of the animals were decreased, all hairs were erected, the water and food intake was

rare, the animals lost weight and died in seven days (22). In a study investigating four different strains in mice and hamsters, it was reported that RH, T-1, and T-45 strains were always fatal in mice, while in hamsters RH strain caused the same outcome and Ts-4 caused milder infections in both species (17). It was noted that rats are more resistant to toxoplasmosis compared to mice and although it is believed that this resistance increases with age, the main effect depends on the strain and the administered dose (23).

The RH Ankara strain that we used in our study markedly showed the virulence features of Type I genotype and caused the death of all mice that were infected and received no intervention within six days as in the studies of Waree et al. (22) and Elwell and Frenkel (17).

In rats in which acute toxoplasmosis was established by intraperitoneal administration of *T. gondii* RH strain, the surface of the intraabdominal organs were covered by a white fibrinous exudate which was more intense on the liver, spleen and stomach, accompanied by thickening and adhesions in the omentum, pale spots in the liver sections and enlargement of the pelvic organs. In mice, it was noted that parasitic invasion was more intense in the liver and intracellular forms were present both in Kupffer cells and in the liver cells themselves and moreover, although necrosis were found in the surface of spleen, pancreas, stomach and kidneys, no abnormalities were observed in the cerebrum, spinal cord and meninges (24). In a similar study, it was reported that characteristic signs developed in the lymphoid system of mice and a marked enlargement of spleen and a decrease in lymphocyte count were observed and, moreover, the hypertrophy in the spleen started at the 6th hour and the enlargement lasted until death (18, 25).

In our study we also observed similar macroscopic appearances and presence of tachyzoites with an intensity that increased in direct proportion with the duration of infection in the spleens of all groups of mice that were sacrificed after *T. gondii* inoculation.

In a study in mice, *T. gondii* RH strain caused a more serious disease presentation compared to the avirulent Beverly strain and diffuse consolidation and severe congestion in the lungs, hyaline degeneration in cardiac muscle, focal necrotic areas in the liver, spleen and kidneys as well as thickening in the meninges were found (20). Intraperitoneal inoculation of Prugnialud strain resulted in dissemination to the brain in mice and rats among other organs (11, 26). In two separate studies in mice using intraperitoneal inoculation, significant congestion and necrosis in the liver, spleen and pancreas and mild to moderate congestion in the cerebral parenchyma were detected, while no or very few *T. gondii* tachyzoites were observed and no pseudocysts could be found in the brain (1, 22).

In our study, our findings were similar to the findings of other investigators (1, 20, 22, 26) with the exception of low number of tachyzoites in the brain and congestion in the heart.

Hazıroğlu et al. (14), reported that in rabbits they infected by intraperitoneal inoculation, necrotic lesions started from the serosal surfaces of the abdominal organs and their expansion and depth depended on the time elapsed since the inoculation in the group with both intravenous and intraperitoneal lesions. Macroscopically a yellowish fibrinous exudate covered all abdominal organs and serous surfaces and there were petechial hemorrhages in addition to the subcapsular necrotic foci in organs and focal pneumatic areas in the lungs. Microscopically, the necrotic areas starting from the serosal surfaces of the internal organs in the abdominal cavity increased in depth in the following days. It was found that inflammatory cells transformed into mononuclear cells and while the lesions were particularly localized in the liver, spleen and serosal surfaces in abdominal cavity (intestine, stomach, pancreas, urogenital system) they were relatively rare in the pancreatic interstitial tissue. Although lung lesions were found in a small number of rabbits, the lesions were reported to be mild in the brain and kidneys (14).

In our study, the tachyzoite forms of RH Ankara strain that has similar characteristics with Type I genotype RH strain (the most virulent strain) were given intraperitoneally and in mice that euthanasia were performed on day two and four, intense necrotic areas were detected in the liver, spleen and pancreas, while a small number of tachyzoites or pseudocysts were found in the cerebrum and no tachyzoites or pseudocysts were observed in the cerebellum. These findings are similar to the findings of Sukthana et al. (1), Waree et al., Armstrong and Fulton and Hazıroğlu et al., while they are different from the findings of Eissa et al. and Zenner et al. (14, 20, 22, 24, 26).

The susceptibility of the host, the stage of the parasite and the route of administration of the antigen affect the virulence of *T. gondii*. Different strains may cause different clinical presentations; some of these may be virulent and fatal, while others may result in cystic forms in the brain and muscles by causing chronic infection. It was reported that, in rats, the chronology of the infected organs changed depending on the route of administration of RH tachyzoites; with intraperitoneal inoculation, the organs in the peritoneal cavity were initially infected and subsequently all organs were infected via the bloodstream, while with oral route, initially mesenteric lymph nodes and then the spleen were infected, followed by dissemination to all organs via the bloodstream (26). Hence, in the study of Eissa et al. (20), the cysts in the brain occurred following

chronic infection established by using a different strain. The studies of Zenner et al. (11, 26), also suggest that different routes of administration and different animal models as well as use of strains that cause chronic infection cause the differences in the results. Knowing the route of dissemination would be useful in predicting the path that the parasite will follow according to the mode of infection with *T. gondii*.

In conclusion, it was found that the morphological changes induced by the most virulent genotype of RH Ankara *T. gondii* strain following its intraperitoneal inoculation increased in direct proportion to the duration of direct contact and exposure to the causative agent. As determined in previous studies, RH Ankara strain is a virulent strain and caused pathological signs in organs similar to RH strain. We think that this study will be useful in understanding the pathogenesis of *T. gondii* tachyzoites in systemic organs and in establishing an experimental model for use in further diagnosis, treatment and vaccination studies. Moreover, this study aimed to demonstrate that animal inoculation could be used in the diagnosis of congenital infection in pregnancy or in people with impaired antibody production, including patients with AIDS or malignancy, and to attract the attention of our colleagues to the importance of cytopathology in the etiology of lymphadenopathy and hepatosplenomegaly.

REFERENCES

1. Sukthana Y, Waree P, Pongponratn E, Chaisri U, Riganti M. Pathologic study of acute toxoplasmosis in experimental animals. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2003; 34(1): 16-21.
2. Ozkan AT, Celebi B, Babür C, Lucio-Forster A, Bowman DD, Lindsay DS. Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cats of the Ankara region of Turkey using the Sabin-Feldman dye test and an indirect fluorescent antibody test. J Parasitol, 2008; 94(4): 817-20.
3. Dubey JP. *Toxoplasma gondii* in medical microbiology Baron S, ed. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
4. Buffalano W, Beghetto E, Del Pezzo M, Spadoni A, Cristina M, Petersen E, et al. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. J Clin Microbiol, 2005; 43: 5916-24.

5. Haholu A, Yıldırım S, Kuru O, Ardiç N, Baloglu H. Toksoplazma gondii lenfadenitinin sitolojik tanısı: Olgu sunumu. Türk Patoloji Dergisi, 2006; 22(1): 57-60.
6. Piergili Fioretti D. Problems and limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of toxoplasmosis in humans and animals. Parasitologia, 2004; 46(1-2): 177-81.
7. Döskaya M, Degirmenci A, Çiçek C, Ak M, Korkmaz M, Gürüz Y, et al. Behaviour of *Toxoplasma gondii* RH Ankara strain tachyzoites during continuous production in various cell lines. Parasitology, 2006; 132(Pt 3): 315-9.
8. Djurković-Djaković O, Nikolić A, Bobić B, Klun I, Aleksić A. Stage conversion of *Toxoplasma gondii* RH parasites in mice by treatment with atovaquone and pyroliidine dithiocarbamate. Microbes Infect, 2005; 7(1): 49-54.
9. Araujo FG, Remington JS. Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice. Antimicrob Agents Chemother, 1974; 5(6): 647-51.
10. Delibas SB, Ertabaklar H, Ertug S. Evaluation of antigenic variations between two virulent *Toxoplasma* strains. J Medical Microbiol, 2006; 55: 1333-5.
11. Zenner L, Foulet A, Caudrelier Y, Darcy F, Gosselin B, Capron A, et al. Infection with *Toxoplasma gondii* RH and prugnauud strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection. Pathol Res Pract, 1999; 195(7): 475-85.
12. Sibley LD, Mordue D, Howe DK. Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis. Immunobiology, 1999; 201(2): 210-24.
13. Ekmen H, Altıntaş K. Bir köpekten *Toxoplasma* izolmanı. Turk Hij Tec Biol Derg, 1973; 33: 17-20.
14. Hazıroğlu R, Altıntaş K, Atasever A, Gulbahar MY, Kul O, Tunca R. Pathological and immunohistochemical studies in rabbits experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Turk J Vet Anim Sci, 2003; 27:285-93.
15. Yaman K, Aral Akarsu G, Güngör C, Ataoğlu H. *Toxoplasma gondii*'nin çeşitli suşlarının proteinlerinin karakterizasyonu. Turk Parazitol Derg, 2011; 35: 133-6.
16. Yaman K. *Toxoplasma gondii* antijenlerinin karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
17. Elwell MR, Frenkel JK. Acute toxoplasmosis in hamsters and mice: measurement of pathogenicity by fever and weight loss. Am J Vet Res, 1984; 45(12): 2663-7.
18. Csóka R, Császár S. The lymphoid system of *Toxoplasma* infected mice. Acta Microbiol Hung, 1983; 30(1): 43-6.
19. Djurković-Djaković O, Klun I, Khan A, Nikolić A, Knezević-Usaj S, Bobić B, et al. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. Microbes Infect, 2006; 8(8): 2206-12.
20. Eissa MH, Antonious SN, Salama MM, Fikry AA, Morsy TA. Histopathological studies of acute, chronic and congenital infections of toxoplasmosis in mice. J Egypt Soc Parasitol, 1990; 20(2): 805-16.
21. Degerli K, Kilimcioglu AA, Kurt O, Tamay AT, Ozbilgin A. Efficacy of azithromycin in a murine toxoplasmosis model, employing a *Toxoplasma gondii* strain from Turkey. Acta Trop, 2003; 88: 45-50.
22. Waree P, Ferguson DJ, Pongponratn E, Chaisri U, Sukthana Y. Immunohistochemical study of acute and chronic toxoplasmosis in experimentally infected mice. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2007; 38(2): 223-31.
23. De Champs C, Pelloux H, Dechelotte P, Giraud JC, Bally N, Ambroise-Thomas P. *Toxoplasma gondii* infection in rats by the RH strain: inoculum and age effects. Parasite, 1998; 5(3): 215-8.
24. Armstrong JA, Fulton JD. Observations on the pathology of toxoplasmosis in the cotton rat. Br J Exp Pathol, 1959; 40(3): 225-31.

25. Szeri I, Csóka R. Studies on the lymphoid system of mice with lethal acute toxoplasmosis. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*, 1976; 23(3): 235-7.

26. Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol*, 1998; 90(1): 86-94.

Vakum manifold sistemi kullanılarak içme kullanma sularında klorlu pestisitlerin katı - sıvı ekstraksiyon yöntemi ile analizi

Determination of chlorinated pesticide residues in drinking water by liquid-solid extraction and vacuum manifold system

Gündüz ÇİFTÇİOĞLU¹, Deniz KARLIK¹, Metin ATEŞ¹

ÖZET

Amaç: İçme kullanma sularında klorlu pestisitlerin, vakum manifold sistemi kullanılarak, miktar tayininin yapılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Klorlu pestisitlerin içme kullanma sularında miktar analizi, katı-sıvı faz ekstraksiyon yöntemiyle ve GC/μECD cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Bulgular: Klorlu pestisitlerin analizinde 1 L su örneği, C₁₈ organik faz içeren kolondan geçirilerek ekstrakte edilmiştir. Su örneği vakum manifold sistemi kullanarak 4 mmHg basıncında geçirilmiştir. Bu ekstraktın zenginleştirmesinde evaporatör kullanılmıştır. Klorlu pestisitlerde geri kazanım miktarlarının %53,7 ile %95,6 arasında değiştiği bulunmuştur. Kesinlik değeri %4,1 ile %19,8 arasında değişmektedir. Raporlama limiti hesaplamasında, her bir parametre için deneysel olarak hesaplanan standart sapmanın sayısal değerinin 10 katı alınmıştır. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik incelendiğinde izin verilen kalıntı limitleri aldrin, dieldrin, heptaklor, heptaklorepoksit için 0,03 μg/L, diğer pestisit parametreleri için ise 0,1 μg/L'dir. Çalışmada klorlu pestisitlerde raporlama limiti 0,01 μg/L ile 0,07 μg/L arasındadır. Raporlama limiti değeri Beta HCH (beta heksaklorosikloheksan) için 0,07 μg/L

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to determine the chlorinated pesticide residues in drinking water using a vacuum manifold system.

Method: The liquid- solid extraction method and GC/μECD were used for the determination of chlorinated pesticides residues in drinking water.

Results: Chlorinated pesticides residues analysis are extracted from a 1 L water sample by passing of sample water through a cartridge with C₁₈ organic phase. The water sample is passed through the vacuum manifold system at 4 mmHg pressure. This extract is concentrated further by evaporation. It was found that the recovery values increased from 53.7% to 95.6%. It was found that the precision values increased from 4.1% to 19.8%. In calculating the limit of quantitation, the standard deviation's numerical value which is calculated for each parameter experimentally was multiplied by 10. Analyzing the, Regulation on Concerning Water Intended for Human Consumption the permitted maximum residue limits for Aldrin, Dieldrin, Heptaklor and Heptaklorepoksit is 0.03 μg/L and it's 0.1 μg/L for other pesticide parameters. The reporting limit in chlorinated pesticides which are tested is between 0.01 μg/L and 0.07 μg/L. The reporting limit for Beta HCH (beta hexachlorocyclohexane) was found as 0.07 μg/L.

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, İzmir Halk Sağlığı Laboratuvarı, Toksikoloji Laboratuvarı, İZMİR



İletişim/Corresponding Author : Gündüz ÇİFTÇİOĞLU

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, İzmir Halk Sağlığı Laboratuvarı, Toksikoloji Laboratuvarı, İZMİR

Tel : +09 232 285 31 62 - 338

E-posta / E-mail : pestisit@myynet.com

Geliş Tarihi / Received : 01.07.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 07.01.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.52385

Çiftçiöğlü G, Kartık D, Ateş M. Vakum manifold sistemi kullanılarak içme kullanma sularında klorlu pestisitlerin katı - sıvı ekstraksiyon yöntemi ile analizi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 37-44.

bulunmuştur. Yönetmelikte belirtilen 0,1 µg/L bu değerin altında kaldığı için uygun görülmüştür. Dieldrin için bulunan 0,01 µg/L raporlama limiti değeri Yönetmelikte belirtilen 0,03 µg/L değerinin altında olduğundan uygun bulunmuştur. Heptaklor ve heptaklorepoksit için bulunan 0,03 µg/L raporlama limiti değeri yönetmelikte belirtilen 0,03 µg/L değerini karşılamıştır.

Sonuç: Vakum manifold sistemlerinde, kalıntı tespitinde basınç önemli bir faktördür. Manifold sistemde kolon şartlamada , örnek geçiş aşamalarında basınç sabit tutularak ve evaporasyon işlemlerinde sisteme azot gazı verilerek pestisitlerin geri kazanım oranlarındaki tekrarlanabilirliğinin yeterliliği sağlanmıştır. Vakum manifoldunun dezavantajı olan sıvı toplama hacmi küçüklüğü ise vakum pompası ile vakum manifold arasına takılan depolama tankı ile çözülmüştür. Hesaplanan raporlama limitleri İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelikte kalıntı maddeler için bildirilen limit değerlerin altında bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Pestisid kalıntısı, gaz kromatografi, vakum manifold

Since it was below 0.1 µg/L value specified in the regulations, it was found to be appropriate. The 0.01 ug/L measured value which was specified in the regulations for dieldrin was found to be suitable, for it was below 0.03 µg/L. The 0.03 ug/L measured value for heptaklorepoksit and heptaklor corresponded to the value of 0.03 µg/L which was specified in the regulations.

Conclusion: Pressure is a very important factor in determining pesticide residues in vacuum manifold systems. Pressure stayed stable in manifold system cartridge conditioning and sample loading. Nitrogen gas was used in the evaporation process. As a result the recovery rate of pesticides was consistent. The disadvantage of the vacuum manifold system's small capacity of the liquid collection was removed via the storage tank which was put in between the vacuum pump and the vacuum manifold. The measured values are below the maximum residue limits of the regulations about the water that is purposive of human consumption.

Key Words: Pesticide residue, gas chromatography, vacuum manifold

GİRİŞ

Gıda maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanmaları sırasında, gıdaların beslenme değerini bozan ve gıdalarda zarara yol açan, haşereleri, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları (pestleri) yok etmek için kullanılan fiziksel, kimyasal veya biyolojik savaş maddelerine pestisitler denir. Ekonomik zehirler sınıfına giren pestisitler kullanma yerlerine göre insektisitler (böceklere karşı), herbisitler (yabancı otlara karşı), fungusitler (mantarlara karşı), molusisitler (yumuşakçalara karşı), rodensitler (kemiricilere karşı), akarasitler (uyuz böcekleri ve parazitlere karşı) ismini alırlar (1).

Pestisitler kullanıldıkları yerde toprağı, suyu kirlettikleri gibi, buldukları yerden biyolojik ve fiziksel yollarla çok uzak bölgelere kadar taşınmaktadırlar. Özellikle çevrede dayanıklı olanlar

(biyolojik parçalanma hızları yavaş olanlar) ve yağda çözünenler biyoekosistemlerde birikerek (biyolojik kümülasyon ve biyokonsantrasyon) tüm canlılar için zararlı olmaktadır (1).

Pestisitler topraktan yayılımla su kütlelerine sızabilmektedir. Bu doğrudan toprak yüzeyinden akıntılarla veya evlerden, bitkilerden ve tarımsal bölgelerden olabilir. Bazı pestisitler su akımı yoluyla, toprağı enjekte edilmeleriyle, yağmur ve karla yıkanarak yeraltı sularına sızabilir. Pestisitlerin kullanılması bu nedenle mutlaka denetim altında olmalı, su kütlelerinin denetimi de düzenli olarak yapılmalıdır. Pestisit ve su yosunlarının kontrolünden önce yüzeysel su kütleleri, göller dikkatle değerlendirilmelidir. Eğer bu değerlendirme yapılmayacak olursa pestisitler verdikleri yarardan

ziyade zarar meydana getirebilmektedir. Arazi çalışmalarında pestisitlerin sulandırılmalarının ve kaba doldurulmalarının kuyuların yanında yapılması, kuyu çevresini adeta pestisit yoğunlaşma alanı haline getirebilmektedir. Kuyu sularından yararlanılarak pestisitlerle kirlenmiş kapların yıkanması da bu durumu artırabilir (2).

Toprak ve su ortamında zamanla birikmiş olan pestisit artıkları çevre sağlığı açısından genel olarak şu sonuçlara yol açmaktadır (3):

1- Pestisit artıkları ile kirlenmiş toprakta yetiştirilen ürünler pestisit artıklarını kökleriyle topraktan aldıkları için insanlar ve hayvanlar tarafından gıda maddesi ve yem olarak kullanılacak ürünler az da olsa pestisit içerirler.

2- Toprak ve sudan oluşan yaşama ortamındaki makro ve mikrofloranın kısmen veya tamamen yok olmasına sebep olurlar.

3- Toprak verimliliğini artırmada rol oynayan solucanlar, topraktaki ilaç kalıntılarını doğrudan alacakları için önemli zarar görürler.

4- Pestisit artıkları topraktan süzülerek yeraltı sularına, akarsularla baraj ve göllere, buharlaşma ile atmosfere karışabilirler.

Yapılan araştırmalar da pestisitlerin, meyve-sebzelerde, toprakta, yeraltı sularında ve yüzeysel sularda kalıntı sorunlarına neden olduğunu göstermektedir (4).

Halk sağlığının korunması amacıyla Sağlık Bakanlığı'nın İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliği gereği yerleşim yerlerinde içme kullanma suyu kalitesini yıllık su tüketim miktarlarına göre değişen sıklıklarda izlenmektedir. İzleme çalışmaları denetleme izlemesi ve kontrol izlemesi şeklinde yürütülmektedir (4). Sularda pestisit analizi daha önceden belirlenmiş parametrelere göre yapılmaktadır. Su numunesi hangi noktadan alınırsa alınsın hepsinde aynı parametrelerin miktarı belirlenmektedir. Suda yapılacak olan kalıntı pestisit analizlerinde bitkilerde o noktadaki pestisitlerin kullanıldığı göz önünde bulundurulmalıdır. Su numuneleri analiz edilmeden

önce numunelerin hangi noktadan geldiği, hangi bitkilerde kullanıldığı ve bu ürünlerin hastalık ve zararlılardan korumak amacıyla hangi tarım ilaçlarının kullanıldığı hakkında bilgi toplanmalıdır (5).

İzmir Halk Sağlığı Laboratuvarı, Toksikoloji Laboratuvarında su örneklerinde pestisit analizi yapılmaktadır. Laboratuvara gelen yoğun numune akışını karşılayabilmek ve uygulanan yöntemi daha kolay ve etkin bir hale getirebilmek için klorlu pestisitler analizinde örnek hazırlama amacıyla kullanılan yöntemi geliştirme yoluna gidilmiştir. Bu amaçla katı sıvı faz ekstraksiyon örnek hazırlama yöntemi kullanan vakum manifold sistemi geliştirilmiştir.

Katı sıvı faz ekstraksiyon örnek hazırlama yönteminin, özellikle sıvı-sıvı ekstraksiyona kıyasla daha fazla tercih edilmesinin avantajları vardır. Bunlar; solvent tüketimi ve kimyasal atıkların daha az olması, daha az zamanda (sıvı/sıvıya ekstraksiyona kıyasla; 2/3 oranında) numunenin kromatografik analize hazırlanması, otomasyona uygun olması, daha az numune transferi olduğu için verimin daha yüksek olması, çapraz kontaminasyon olmadığı için yöntemin doğruluğunun daha yüksek olması, çözücü/numune ile birebir temas halinde ve cam malzeme kullanımı az olduğu için analizin personel için daha kolay ve güvenli bir yöntem olması şeklinde sıralanabilir.

Bunun yanı sıra, katı sıvı faz ekstraksiyonda birçok seçenek arasından uygun adsorban seçimi önemlidir. Bu yöntemde uygun bir adsorban kullanılarak örneğin biyolojik materyalden yeterli verimle ayrımı sağlanabilmektedir.

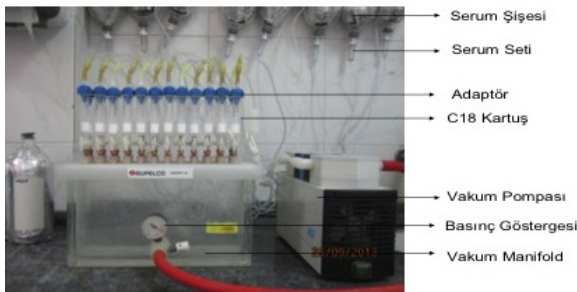
Ayrıca, katı sıvı faz ekstraksiyonda polar, hidrofobik ve/veya iyonik etkileşimli adsorbanlar kullanılabilirken klasik sıvı/sıvı ekstraksiyon yöntemleri sıvı fazdaki partiyon denklemi ile sınırlı kalmaktadır. Tüm duyarlı kromatografik ve spektroskopik yöntemler (HPLC, GC, TLC, UV veya IR gibi) için numune ön-hazırlama işlemi olarak katı faz ekstraksiyonu kullanılabilir. Son yıllarda hassas ve duyarlı modern aletlerin gelişmesiyle, numunenin iyi ve saf hazırlanarak analize uygun hale

getirilmesi kolonların korunması açısından gerekli olmuştur (6).

Bu çalışmada, katı sıvı faz ekstraksiyon örnek hazırlama yönteminin avantajlarının yanında, aynı anda 20 adet örneğin çalışılması sırasında rezervuar sisteminde su dökülmesinden kaynaklanan kayıpların önlenmesi de amaçlanmıştır. Bu amaçla, serum şişeleri ve setleri kullanılarak hem analize alınan 1 L su sisteme sürekli olarak verilmiş hem de kolonların kuruma riski ortadan kaldırılmıştır. Vakum manifoldunun depolama tankı yaklaşık 2 L hacme sahiptir. Bu sıvı toplama hacmi küçüklüğü aynı anda 20 L su toplanması sırasında analizin sürekli durdurulmasına yol açacağından, vakum pompası ile vakum manifold arasına takılan depolama tankı ile sorun giderilmeye çalışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İzmir Halk Sağlığı Laboratuvarında yer alan Toksikoloji Laboratuvarına pestisit kalıntı analizi amacıyla yılda yaklaşık 4.000 adet su numunesi gelmektedir. Toksikoloji Laboratuvarına gönderilen, klorlu pestisit analizi yapılacak su numunelerine öncelikle ön hazırlık işlemi uygulanmıştır. Pestisit etken maddelerinin miktar tayini, sıvı-katı ekstraksiyon yöntemiyle yapılmıştır (7, 8). Kromatografik analizler (Mikro Elektron Yakalama Dedektörlü) gaz kromatografisi kullanılarak yapılmıştır.



Resim 1. Pestisitlerin katı fazda tutulması

Kimyasal Maddeler

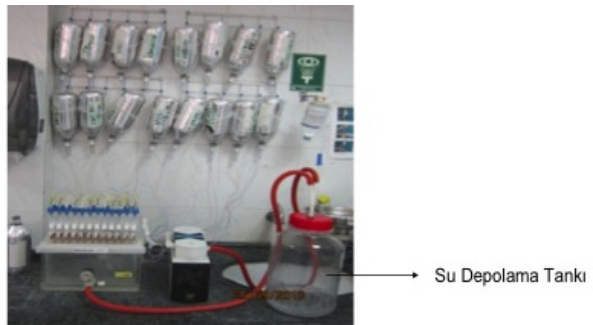
Çalışmamızda; kimyasal madde olarak metanol (Sigma-Aldrich), aseton (Merck), diklorometan (Merck, suprasolv), etil asetat (Merck), C₁₈ ODS kolon (Agilent), 1 g lık, 6 mL'lik ve 6N hidroklorik asit kullanılmıştır.

Ön Hazırlık

Numuneler, 1 L alüminyum folyo ile kaplanmış serum şişelere alınmıştır. C₁₈ kolonların şartlanarak çalışmaya hazır hale getirilmesi için sırasıyla;

5 mL etilasetat (1 dakika içinde geçiş sağlanmalıdır vakum basıncı 2 mmHg olmalıdır), 10 mL metanol (1 dakika içinde geçiş sağlanmalıdır vakumbasıncı 4 mmHg olmalıdır), 10 mL deiyonize su vakum uygulanmadan kolonlardan geçirilmiştir. Çözücülerin ve deiyonize suyun kolondan geçmesi esnasında kolonların kurumamasına dikkat edilmiştir. Deiyonize su kolondan geçtikten sonra numune çalışılincaya kadar 5 mL daha deiyonize su ilave edilerek kolonlar bekletilmiştir. 1 L su kolondan geçirilmeden önce 6 N HCl ile pH 4'e ayarlanmıştır.

Vakum manifold sistemi kullanılarak, serum şişesi ve seti aracılığıyla 1 L numune C₁₈ kolondan 10 mL/dakikalık akış hızıyla (4 mmHg vakum basıncı altında) geçirilerek pestisitlerin katı fazda tutulması sağlanmıştır (Resim 1 ve 2). C₁₈ kolonlar 1 bar basınçta azot gazı altında 10 dakika tutulmuş, katı fazda bulunan suyun uzaklaştırılması ve kuruması sağlanmıştır. Kolondan sırasıyla 5 mL etilasetat, 5 mL diklorometan geçirilip kalıntı 50 mL'lik erlende toplanmıştır.



Resim 2. Pestisitlerin katı fazda tutulması

50 mL'lik erlende bulunan çözücü karışımının 40 °C'ye ayarlanmış evaporatörde ve azot gazı altında kalıntıdan ayrılması sağlanmıştır. Vakum basıncının 600 mbar'ın altına inmemesine dikkat edilmiştir. Kalıntı, 2 mL asetonda 1 dakika ultrasonik su banyosunda çözülerek amber vialle alınmıştır. Amber vialle alınan kalıntı gaz kromatografisi cihazında analiz edilmiştir.

Gaz Kromatografisinde Analiz

Gaz kromatografisi ile yapılan ölçümlerde mikro elektron yakalama dedektörüne sahip Hewlett Packard marka HP6890 Plus model cihaz kullanılmıştır. Çalışma kolonu olarak HP5-MS (30 m uzunlukta, 0,25 mm iç çapında, 0,25 µm film kalınlığında) kapiler kolon kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmış olup akış hızı 56,8 mL/dakikadır. Enjeksiyon bloğu sıcaklığı 260 °C olup enjeksiyon hacmi 1 µL'dir. Enjeksiyonlarda 0,5 dakika boyunca 50 psi basınçta numunenin tamamı kolona verilmiştir. Kolon fırınında sıcaklık programlanması uygulanmıştır. Kolon fırını başlangıç sıcaklığı 70 °C olup 2 dakika bu sıcaklıkta beklemiştir. Daha sonra kolon fırını 25 °C/dakika artış hızı ile 150 °C'ye yükseltilmiş ve bekleme zamanı 0 dakika olarak ayarlanmış, 3 °C/dakika artış hızı ile 200 °C'de bekleme zamanı 0 dakika verilerek 8 °C/dakika artış hızı ile 280 °C'ye ulaşmış, bu sıcaklıktaki bekleme zamanında 20 dakika olarak ayarlanmıştır. Analiz bittikten sonra kolon fırını 290 °C'ye yükseltilerek 10 dakika bu sıcaklıkta beklenmiştir. Dedektör bloğu sıcaklığı 300 °C dir. Dedektör besleme gazı olarak azot kullanılmıştır.

Geri Kazanım Çalışması

Klorlu pestisitlerin geri kazanımında 40 ppb'lik standart karışım kullanılmıştır. Klorlu pestisit standart karışımı olarak beta HCH (beta heksaklorosikloheksan), lindan (gama heksaklorosikloheksan), heptaklor, heptaklorepoksit, alfa endosülfan, beta endosülfan, endrin, dieldrin, op'- DDT (op'diklorodifeniltriklorethan), pp'- DDT (pp' diklorodifeniltriklorethan), alfa HCH (alfa

heksaklorosikloheksan), HCB (heksaklorobenzen), op'- DDD (op'diklorodifenildiklorethan) kullanılmıştır. Son hacimdeki okuma 20 ppb olacak şekilde asetona seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. 1 L suya 1 mL klorlu pestisit standart karışımından ilave edilmiştir. Standart ilave edildikten sonra su numunesi pH'sı 6 N HCl ile pH 4'e ayarlanmıştır. Geri kazanım çalışması amacıyla 10 tekrar yapılarak çalışılmıştır.

Kalibrasyon eğrisi hazırlamada 5, 10, 20, 40 ppb'lik klorlu pestisit standart karışımı kullanılmıştır. Kalibrasyonda kullanılan stok standartlar 100 ppm başlangıç derişiminde 100 mL'lik balon jodelerde, asetonda çözülerek hazırlanmıştır. Ara stok klorlu pestisit standart karışımının derişimi 1 ppm olacak şekilde hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinde kullanılan standartlar, ara stok klorlu pestisit standart karışımından hazırlanmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda, 13 adet klorlu pestisitinin vakum manifold sistemi kullanılarak miktar tespiti yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 1' de verilmiştir.

Tablo 1. Geri kazanım, RSD, LOQ, SS miktarları

Pestisit	Ortalama geri kazanım (%)	RSD (%)	LOQ (µg/L)	SS
Beta hch	94,7	7,2	0,07	1,1
Lindan	67,8	13,9	0,04	1,5
Heptaklor	58,6	13,5	0,03	1,3
Heptaklorepoksit	63,0	14,1	0,03	1,4
Alfa endosülfan	66,1	11,9	0,02	1,3
Beta endosülfan	69,1	10,6	0,02	0,4
Endrin	70,6	9,8	0,04	1,1
Dieldrin	53,9	4,1	0,01	1,2
op'- ddt	54,0	9,2	0,01	1,1
pp'- ddt	95,6	8,7	0,02	0,8
Alfa hch	68,9	19,8	0,02	1,7
Heksaklorobenzen	53,7	17,1	0,01	2,2
op' - ddd	68,7	10,4	0,01	1,5

RSD: Rölatif standart sapma LOQ: Raporlama Limiti SS : Standart Sapma

TARTIŞMA

Analiz öncesi yapılması gereken örnek hazırlama, çoğu zaman zor, pahalı ve uzun süren bir işlemdir. Kromatografik sistemlerle çalışan 152 araştırmacı ve uygulayıcı ile bir anket çalışması yapılmış ve örnek hazırlama yönteminin seçiminde numunenin özelliğinin başlıca etken olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yöntemin kolay uygulanabilir ve ucuz olmasının da önemli olduğu belirlenmiştir (9). Günümüzde en etkili örnek hazırlama yöntemlerinden olan katı-sıvı faz ekstraksiyonu, özellikle ilaç ve diğer farmasotik maddelerin analizinde en fazla kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir (10).

Katı-sıvı faz ekstraksiyonda sıvı örneğin kolondan geçirilmesi, manuel gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybının önüne geçmek amacıyla vakum manifoldları yardımıyla da yapılabilir (11).

Bu yüzden çalışmamızda gaz kromatografisinde analiz öncesi yapılan, ön hazırlık kısmında anlatılan, kolon şartlama ve numune suyun geçişi sırasındaki basınçlara uyularak tekrarlanabilirlik sağlanmıştır. Vakum manifoldundaki rezervuar görevi için C₁₈ kolonlara serum şişeleri ve serum setleri bağlanarak suyun sürekli akışı sağlanmıştır. Vakum manifoldunun dezavantajı olan sıvı toplama hacmi küçüklüğü ise vakum pompası ile vakum manifoldu arasına takılan 10 L kapasiteli depolama tankı yardımıyla çözülmüştür. Evaporasyon işlemlerinde sisteme azot gazı verilerek pestisitlerin geri kazanım oranlarında tekrarlanabilirliğinin yeterliliği sağlanmıştır.

Tablo 1 incelendiğinde, analize alınan klorlu pestisitlerin geri kazanım miktarlarının %53,7 ile %95,6 arasında değiştiği görülmektedir. Geri kazanım miktarlarının % RSD'si en yüksek olanı alfa HCH'dir ve %19,8 olarak bulunmuştur. Doğruluk belirli koşullarda elde edilen test sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Analizler arasındaki korelasyonu göstermesi bakımından önemlidir (12, 13). Avrupa Konseyi Direktifine 98/83/EC sayılı kesinlik değerleri

%25'i geçmemelidir (14). Avrupa Birliği kılavuzlarına göre ise pestisit kalıntı analizlerinde kullanılan çoklu kalıntı analiz metodlarının geçerli olabilmesi için geri kazanım yüzdesinin 70-120 arasında, bağlı standart sapmanın (% RSD) ise %2'den küçük olması gerekmektedir. Ancak kesinliğin iyi olması koşuluyla bazı çoklu pestisit kalıntı analiz metodlarında %70'in altındaki geri kazanımlar da kabul edilmektedir (15). Bu yüzden en yüksek % RSD'ye sahip alfa HCH ve diğer klorlu pestisitlerin sayısal değerleri incelendiğinde, deneye alınan klorlu pestisitlerdeki % RSD'lerin hepsi kabul edilebilir sınırlar içindedir.

Klorlu pestisitlere uygulanan katı-sıvı faz ekstraksiyon yönteminde kullanılan çözücü miktarları oldukça düşüktür. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemlerinde ise çözücü kullanım miktarları yüksektir. Bu yüzden katı-sıvı faz ekstraksiyon yöntemlerinde analiz maliyetleri daha düşük olmaktadır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin, fazla miktarda çözücü kullanımı, yeterli saflığa sahip olmayan ekstraktlar elde edilmesi, hassas kantitatif sonuçlar elde edilememesi gibi istenmeyen durumlara neden olduğu, ayrıca katı-sıvı faz ekstraksiyonunun sıvı-sıvı ekstraksiyona kıyasla daha iyi bir ayırım ve yüksek geri kazanım sağladığı bildirilmiştir (12, 16). Tablo 1 incelendiğinde dört adet klorlu pestisitinin geri kazanım miktarlarının %53,7 ile %58,6 arasında değiştiği gözlenmektedir. % RSD'lerin %4,1 ile %17,1 arasında değişmektedir. Dokuz adet klorlu pestisitinin geri kazanım miktarları ise %63'ün üzerindedir. % RSD'lerine bakıldığında ise %7,2 ile %19,8 arasında değişmektedir. Bu yüzden söz konusu geri kazanım oranları kabul edilebilir sınırlar içindedir.

Geri kazanım çalışmalarında, kolon şartlamalarda ve 1 L suyun kolondan geçme aşamalarında vakum manifoldun basınç göstergesinin ön hazırlık kısmında belirtilen değerlerde olmasına dikkat edilmelidir. Kolon şartlamada ve numune suyun geçiş aşamalarında kolonda kuruma olmamasına özen gösterilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Çözücünün buharlaştırılarak kalıntının zenginleştirilmesi aşamaları azot gazı altında yapılmalıdır. Çözücünün uzaklaştırılmasında kullanılan evaporatördeki sıcaklık 40 °C'yi geçmemelidir (8).

Çalışma sırasında raporlama limiti hesaplamasında, her bir parametre için deneysel olarak hesaplanan standart sapmanın sayısal değerinin 10 katı alınmıştır (17). İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik incelendiğinde; izin verilen sınır değerler aldrin, dieldrin, heptaklor, heptaklorepoksit için 0,03 µg/L, diğer pestisit parametreleri için ise 0,1

µg/L olduğu görülmektedir (18). Çalışmada klorlu pestisitlerde raporlama limiti 0,01 µg/L ile 0,07 µg/L arasındadır. Raporlama limiti değeri beta HCH için 0,07 µg/L bulunmuştur. Yönetmelikte belirtilen 0,1 µg/L değerin altında olduğundan uygun görülmüştür. Dieldrin için bulunan 0,01 µg/L raporlama limiti değeri yönetmelikte belirtilen 0,03 µg/L değerinin altında uygun olduğu belirlenmiştir. Heptaklor ve heptaklorepoksit için bulunan 0,03 µg/L raporlama limiti değeri yönetmelikte belirtilen 0,03 µg/L değeri karşılamıştır.

KAYNAKLAR

1. Vural N. Toksikoloji: 2. baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. No:73, 2005.
2. Çağatay G, Çobanoğlu Z. Pestisitler. Ankara: Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi. No: 52, 1997.
3. Polat M. Düzce Sakarya bölgesinden alınan su ve toprak örneklerinde pestisitlerin gaz kromatografisi ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi teknikleri ile incelenmesi. DSİ Tek Bült, 2006; 984: 29.
4. Oğuz Z. İçme kullanma sularında pestisit kalıntıları. ulusal biyosidal kongresi. Mart, 19-22 Antalya. 2014.
5. Polat M. Sulara pestisit tayini ve önemi. DSİ Tek Bült, 2010; 109: 23-30.
6. Cengiz G, Çeçen Ş, Söylemezoğlu T. GC/MS ile idrarda kokain tayini. Ankara Ecz Fak Derg, 2004; 33(3): 139-49.
7. Munch JW. EPA Method 525.2 Revision 2.0. Determination of organic compounds in drinking water by liquid-solid extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry. 1995.
8. Munch JW, Grimmett PE. EPA method 525.3 Version 1.0. Determination of semivolatile organic chemicals compounds in drinking water by liquid-solid extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry. February, 2012.
9. Majors RE. Trends in sample preparation. LCGC North America, 2002; 20: 1098-113.
10. Hennion MC. Solid-phase extraction method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. J Chromatogr A, 1999; 856: 3-54.
11. Anonymous. EPA Method 3535A Revision 1.0 Solid Phase Extraction (SPE). February, 2007.
12. Synder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Practical. HPLC method development. John Wiley&Sons, 1997; 765.
13. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). Pure Appl Chem, 2002; 74 (5): 835-55.

14. Anonymous. Official Journal of the European Communities Council Directive 98/83/EC. 1998; S.12. 98: 32-54.
15. Anonymous. European Commission DG SANCO. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. No SANCO, 2011.

16. Yavuz O, Aksoy A. Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyon metodu. FÜ Sağlık Bil Derg, 2006; 20: 259-69.
17. Akdağ İ. Metot validasyon eğitim ve belirsizlik notları, 2007.
18. Anonymous. 07.03.2013 tarih ve 28580 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik.

Identification of some *Lecidea*, *Porpidia* and *Lecidella* species (lichen-forming ascomycetes) distributed in Turkey by sequence analysis of rDNA ITS region

Türkiye’de yayılış gösteren bazı *Lecidea*, *Porpidia* ve *Lecidella* türlerinin (liken oluşturan ascomycetes) rDNA ITS bölgesinin dizi analizi yöntemi ile tanımlanması

Esin BAŞARAN¹, Demet CANSARAN-DUMAN², İlker BÜYÜK¹, Sümer ARAS¹

ABSTRACT

Objective: The taxonomy of *Lecidea* is extremely complex because of the enormous morphological variation within and between species. The aim of this study was to analyse the rDNA (ITS) regions of *Lecidea* species and related genus called *Lecidella* and *Porpidia* which are widely spreaded in Anatolia, Turkey.

Methods: The ITS rDNA sequence information of 17 samples from 11 species which were collected from different provinces of Anatolia were generated. Some of the specimens from *Lecidea*, *Lecidella*, *Lecanora* and *Porpidia* genus were also taken from the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). The phylogenetic analysis was performed by the help of four different methods (NJ, ME, MP, UPGMA) and these different methods manifested similar results.

Results: Minimum-Evolution (ME) dendrogram revealed that species of *Lecidea*, *Lecidella*, *Porpidia* and *Ganoderma* sp. genus were distributed into four main branches. *Ganoderma applanatum* (GU256764) which was considered as outgroup formed one of the branches, while the other species were collected on the other branches. Generally the species which belong to the same genus, combined in one branch towards to the origin. In accordance with the results derived from

ÖZET

Amaç: *Lecidea* cinsine ait türlerin taksonomisi tür içi ve türler arasındaki büyük morfolojik farklılıkların olması nedeniyle oldukça karmaşa göstermektedir. Bu çalışma kapsamında, *Lecidea* türleri ve onunla ilişkili cinsler olarak bilinen ve Anadolu’da oldukça yaygın olan *Lecidella* ve *Porpidia* cins türlerine ait örnekler için rDNA (ITS) bölgelerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Anadolu’nun farklı bölgelerinden toplanan 11 türe ait 17 liken örneğine ait rDNA ITS dizi analizi verileri incelenmiştir. Diğer ülkelerde dağılım gösteren *Lecidea*, *Lecidella*, *Lecanora* ve *Porpidia* cinsine ait bazı türlerin sekans analizi bilgileri GenBank’dan (www.ncbi.nlm.nih.gov) alınmıştır. Filogenetik analizler dört farklı metotla (NJ, ME, MP, UPGMA) analiz edilmiştir ve analiz sonuçlarında oluşturulan dört farklı filogenetik ağaçta da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bulgular: Minimum-Evolution (ME) analizine göre oluşturulan filogenetik ağaca göre *Lecidea*, *Lecidella*, *Porpidia* ve *Ganoderma* cinslerine ait türlerin dört ana dala ayrılmış olduğu tespit edilmiştir. Minimum-Evolution (ME) analizinde *Ganoderma applanatum* (GU256764) türü dış-grup olarak kullanılmıştır ve çalışılan tüm türlerden ayrı bir dal oluşturmuştur. Çalışılan *Lecidea* ve onunla ilişkili cinslerin tür ayrımı karşılaştırıldığında genellikle aynı

¹ Ankara University, Faculty of Science, Biotechnology Section, Department of Biology, ANKARA, TURKEY

² Ankara University, Biotechnology Institute, ANKARA, TURKEY



İletişim/Corresponding Author : Sümer ARAS

Ankara University, Faculty of Science, Biotechnology Section, Department of Biology, ANKARA, TURKEY

Tel : +90 312 222 58 16

E-posta/E-mail : aras@science.ankara.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 18.09.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 30.10.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.23540

Başaran E, Cansaran-Duman D, Büyük İ, Aras S. Identification of some *Lecidea*, *Porpidia* and *Lecidella* species (lichen-forming ascomycetes) distributed in Turkey by sequence analysis of rDNA ITS region. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 45-58.

molecular phylogenetic analysis, genus *Lecidea* is found closer *Porpidia* rather than *Lecidella* morphologically. Numerable 4100 nucleotides were obtained from DNA sequences of related region of studied samples. It was indicated that 177 nucleotides of those regions were stable (C), 747 nucleotides were variable (V). It was confirmed that there were transitions in 56 nucleotide pairs, tranversion in 54 nucleotide pairs of compared samples.

Conclusion: In this study, the results of phylogenetic analysis of the genus *Lecidea* and other similar groups were firstly evaluated and the results will not be only a guide but also will provide a resource for next researchers.

Key Words: *Lecidea*, *Lecidella*, *Porpidia*, ITS

cinsine ait türler ana dala karşı bir dal oluşturmuşlardır. Moleküler filogenetik analizler sonucunda elde edilen sonuçlara göre *Lecidea* cinsi *Lecidella* cinsinden ziyade *Porpidia* cinsine daha yakın bulunmuştur. Çalışılan örneklerden ilgili bölgelerinin DNA dizisinden 4100 nükleotit elde edilmiştir. Bu nükleotitlerin 177 tanesi korunmuş (C), 747 nükleotit farklılaşmış (V) olarak belirlenmiştir. 56 nükleotit çifti transitions, 54 nükleotit çiftide tranversion olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışma kapsamında *Lecidea* ve onunla ilişkili cinslerin filogenetik analizi literatürde ilk defa değerlendirilmiştir ve elde edilen sonuçların ileride yapılacak fungus türlerinin moleküler filogenetik yöntemlerle tanımlanması çalışmalarına kaynak sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Lecidea*, *Lecidella*, *Porpidia*, ITS

INTRODUCTION

The lichen genus forming *Lecidea* Ach. (*Lecideaceae*, *Ascomycota*) is one of the most heterogeneous of Zahlbruckner's artificial system and a large number of genera have been separated from it, especially during the last 30 years (1). The taxonomy of *Lecidea* is extremely complex because of the enormous morphological variation within and between species. Some problems are associated with the discrepancies of morphological data. Most systematic studies on *Lecidea* have been concerned with saxicolous species groups, but a number of recent studies deal with the non-saxicolous species groups as well (1 - 3).

During the 150 years following Erik Acharius initial description of *Lecidea* in 1803, this genus became the "garbage bin" for crustose lichen taxa with generally green algal photobionts, photobiont-free apothecial margins and hyaline and single-celled ascospores. At its height, the genus had grown to include approximately 1600 species (2, 3).

Only in the second half of the last century efforts were started, most significantly by Hertel (1, 4) to revise the genus based on morphological, chemical, ecological, and biogeographical data. As currently circumscribed *Lecidea* (*Lecideaceae*) includes approximately 100 species whose within genus revision is currently under way (1). The species of this genus grow on rock with thalli that are thick to thin, continuous or composed of dispersed areoles. The members are often endolithic which appear white to ashy gray, orange or becoming orange because of iron compounds in the rock substrate. The genus *Lecidea* belongs to *Lecideaceae* includes photobiont green (*Trebouxia*). They have characteristic apothecia lecideine which is disks black or very dark brown, lightly or heavily coated with white pruina in some taxa. Their paraphyses are branched and net-like, not conspicuously expanded at the tips. Their epihymenium pigment is brown, olive or green. They have eight per spores per asci with a distinctive tube

or cylinder in the tip. Their ascospores are one-celled which have colorless and large. Most of the species of this genus grow on siliceous or rarely calcareous rocks. A large percentage of crustose lichens on rock with large black apothecia (more than 0.75 mm in diameter) belong to this important genus. Other crustose lichens that are superficially similar with a hand lens include species of *Lecidea*, *Rhizocarpon*, *Sarcogyne* and *Buellia* (5).

To light on the clarification of the taxonomic status of *Lecidea* and related genera such as *Porpidia* and *Lecidella*, the sequence diversity in the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA was studied. *Porpidia* belongs to the largest group of the Lecanoromycetes. *Porpidia*, as well as the family *Porpidiaceae*, include exclusively crustose taxa that form colourful thalli on siliceous to slightly calcareous rock surfaces worldwide in association with their unicellular green algal photobionts of the genus *Trebouxia* (Chlorophyta) (6). Members of *Porpidia* are inhabitants of exposed to shaded, but always humid localities in temperate to arctic zones. The lichen genus *Porpidia* provides excellent opportunities for evolutionary, reproductive, and ecological studies of crustose epilithic lichen symbioses (3).

In its unclear taxonomic history *Porpidia* is closely entwined with the crustose genus *Lecidea*. One of the largest genera split from *Lecidea* is the genus *Porpidia*. Several revisions of the genus *Porpidia* based on traditionally employed morphological, chemical, ecological, and biogeographical characters exist (7-12). They are the most studied of the recent segregates of *Lecidea* (2, 8-11) but in spite of this, although it is usually easy to identify a lichen as a *Porpidia*, it is often very difficult, or impossible, to assign it to a particular species. Species concepts

are still unclear within the genus with many of the characters used in separating taxa (e.g. chemistry, width of excipular hyphae) being revealed only after detailed microscopic/biochemical investigation. According to Buschbom and Mueller (3), it is probable that many of these problems are unresolvable by traditional taxonomic methods and that molecular techniques will be required to elucidate critical species boundaries.

The other related genus with *Lecidea*; the genus *Lecidella* was established by Körber (13). Zahlbruckner (14) placed it in *Lecidea* sect. *Eu Lecidea*. Hertel (4), restricted *Lecidella* to the *Lecidella elaeochroma* group which had been precisely characterized by Fries (15) and classified it as a subgenus of *Lecidea*. Hertel and Leuckert (16) revealed the special status of the taxon *Lecidella* by chemosystematic investigations and established it as a separate genus. In this respect the presence of derivatives of norlichexanthone in the taxon was recognized as a crucial character. The *Lecidella thalli* are gray but some with imperceptible thalli. Their apothecia are lecideine type which are pitch black, often shiny and with black margins level with the disk or prominent. The species of *Lecidella* grow on rocks (especially those containing calcium), bark, wood or soil (5). As to the infrageneric classification of the genus *Lecidella* for a long time it was based mainly on thallus colour and spot tests, which are both of limited value, and on morphological characters. As a result, many species were doubtful and their delimitations indistinct. By use of additional chemical and morphological characters it has been possible to overcome these obstacles (17 - 20). Important contributions to the chemistry of the genus were made by Huneck and Santesson (21) and Elix and Crook (22).

In general, it is systematically difficult to determine crustose lichens and less informative for resolving phylogenetic problems of lichen genera. Development of molecular techniques has been assisted to determine genetic similarities in lichen species. Recent molecular studies have been mainly used to reveal phylogenetic relationships between the specimens. Some scientists have been widely used for reconstructing phylogenetic relationships from the overall genome similarity (23, 24). The spacer regions like the internal transcribed spacers (ITS) and external transcribed spacers (ETS) are widely utilized in phylogenetics studies. The fact, that these regions are present in many copies in the genome is an advantage for laboratory practice and might be useful tools for phylogenetic analysis. The internal transcribed spacer (ITS) is intercalated in the 18S-5.8S-28S region separating the elements of the rDNA locus (25). One of the most preferred techniques to determine genetic relationship of lichens at lower taxonomic levels involves sequence diversity study of the ITS region of nuclear ribosomal DNA (26). The ITS region plays a role in ribosomal maturation and processing of small and large-subunit rDNAs (27). The evolutionary origin of the ITS is considered to be an intron-like structure flanked by highly conserved region from which universal primers can be obtained (28, 29). The small size of the ITS region makes this region easy to amplify, even from herbarium material that is dry. The other advantage in sequencing the ITS region is that it is non-coding and so includes a relatively high level of variability (27). Since its first application by Porter and Collins (30) in it has become widely used for phylogeny reconstruction.

It clearly indicates that the species concept in *Lecidea* needs revision and that molecular data

are helpful in interpreting subtle morphological differences that have been previously regarded as intraspecific variability. It was investigated that ITS regions of *Lecidea*, *Lecidella*, and *Porpidia* lichen species for variability using PCR and automated sequencing. The identity of lichens from some *Lecidea*, *Lecidella* and *Porpidia* species has been determined by ITS rDNA sequence comparisons in order to estimate the diversity, to detect patterns of specificity. Specific PCR primers have been used to determine the ITS rDNA sequences from DNA extractions of dried lichens. There are 17 specimens from *Lecidea*, *Lecidella*, *Lecidoma* and *Porpidia* in Turkey as herbarium sample and in very small amounts. Other *Lecidea*, *Lecidella* and *Porpidia* lichen species recorded for Turkey were not available because most of the species were collected by foreign researchers in 1800s. The indicated locations of mentioned samples are not consistent with current settlement regions. Direct comparisons and phylogenetic analyses allowed the assignment of some *Lecidea*, *Lecidella* and *Porpidia* ITS rDNA phylogeny.

In this study, molecular techniques were applied on 17 samples of genus *Lecidea*, *Lecidella*, *Lecidoma* and *Porpidia* lichen which were collected from Anatolia, Turkey. 26 lichen samples related to *Lecidea*, *Lecidella*, *Lecanora* and *Porpidia* specimens were obtained from GenBank. Also *Ganoderma applanatum* (GU256764) was used to test reliability of analysis as a out-group. This is the first study with molecular markers and ITS sequence analysis on *Lecidea* and their related genera which are *Lecidella* and *Porpidia* in Anatolia, Turkey and focused on revealing the genetic distances and also defining genotypes of the specimens of the species used in the study.

MATERIAL AND METHODS

Lichen materials

A total of 17 samples were used in the present study including *Lecidea* (4), *Lecidella* (3), *Porpidia* (3) and *Lecidoma* (1) species. Lichen samples were collected from different parts of Anatolia, Turkey and Table 1 was shown in localities. The samples were dried at room temperature and

foreign matters were removed prior to grinding. The lichen samples are stored in the Herbarium of Erciyes University (Erciyes University, Department of Botany, Kayseri, Turkey). Some of the lichen materials were provided from previously collected and stored material of Erciyes University Herbarium.

Table 1. Collection area of *Lecidea*, *Lecidella*, *Porpidia* and *Lecidoma* species

Accession number	Name of sample	Location
HQ605926	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Ankara, Beynam Forest, N 36°53'920", E 32°55'005", 1450 m, 06.01.2009
HQ605929	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Bilecik, North of Çaltı village, N 40°01'36", E 30°14'17", 573 m, 23.07.2007
HQ605930	<i>Lecidea fuscoatra</i>	Konya, Gevne village, N 36°53'127", E 32°19'124", 2100 m, 06.07.2007
HQ605928	<i>Lecidea fuscoatra</i> var. <i>grisella</i>	Trabzon, Of, Uzungöl province, N 40°37'091", E 40°36'885", 1240 m, 30.10.2008
HQ605931	<i>Lecidea fuscoatra</i> var. <i>grisella</i>	Trabzon, Maçka, surround of the Sumela Monastery, 1230 m, N 40°41'16", E 39°39'37", 29.10.2008
KF570277	<i>Lecidea syncarpa</i>	Trabzon, Maçka, surround of the Sumela Monastery, 1230 m, N 40°41'16", E 39°39'37", 29.10.2008
KF570280	<i>Lecidea plana</i>	Trabzon, Maçka, surround of the Sumela Monastery, 1230 m, N 40°41'16", E 39°39'37", 29.10.2008
HQ605936	<i>Lecidella elaeochroma</i>	Trabzon, Of, Uzungöl, N 40°37'091", E 40°36'885", 1240 m, 31.10.2008
HQ605938	<i>Lecidella elaeochroma</i>	Kayseri, Bakırdağ, Çataloluk village, N38°11'326", E 35°50'605", 1400 m, 15.06.2007
HQ605932	<i>Lecidella patavina</i>	Sivas, Gürün, Gökpınar Village, N 38°39'111", E 37°18'374", 1562 m, 12.06.2007
HQ605934	<i>Lecidella patavina</i>	Niğde, Çamardı, Aladağlar National Park, Emlil village, N 37°45'886", E 35°06'454", 1840 m, 19.06.2007
HQ605935	<i>Lecidella stigmatea</i>	Rize, Çamlıhemşin, around of Zilkale, N 40°58'389", E 40°57'505", 691 m, 30.10.2008
HQ605937	<i>Lecidella stigmatea</i>	Kayseri, Yahyalı Aladağlar National Park, Tekekalesi Dirsek village, N 37°05'0279", E 35°01'1'946", 3320m, 19.06.2007
HQ605941	<i>Porpidia crustulata</i>	Trabzon, Of, Uzungöl-Soğanlı road, N 40°36'117", E 40°16'682", 2210 m, 31.10.2008
HQ605940	<i>Porpidia macrocarpa</i>	Rize, Çamlıhemşin, Ayder plateau and Kavran plateau, N 40°55'601", E 41°07'603", 1700 m, 01.11.2008
HQ605939	<i>Porpidia musiva</i>	Trabzon, Of, Uzungöl-Soğanlı road, N 40°36'117", E 40°16'682", 2210 m, 29.10.2008
KF570278	<i>Lecidoma demissum</i>	Trabzon, Maçka, surround of the Sumela Monastery, 1230 m, N 40°41'16", E 39°39'37", 29.10.2008

DNA extraction, ITS amplification and sequencing

Total DNA was extracted from thallus or apothecia by using DNA isolation protocol of herbarium material on lichen species (31). This protocol gives a high quality DNA, free of polysaccharides and other metabolites which might interfere with restriction endonucleases. In particular: lichen material (0.1g) was ground to a fine powder in liquid nitrogen. Prewarmed extraction buffer [50 mM Tris-HCL (pH 8), 50 mM EDTA, 0.8 M LiCl, 1% CTAB, 2% PVPP (addition of PVPP is optional)] in the amount of 1 ml was added to the samples and ground once more in the buffer. After the samples were taken to the 1.5 mL eppendorf tubes, 0.2% β -mercaptoethanol was added. The solution was incubated in 65 °C water bath for 15 min. Following these incubation periods, samples were cooled to room temperature, 0.5 mL chloroform:isoamyl alcohol (24:1[v/v]) was added and mixed well (no vortex). Then, samples were centrifuged at 17.000 g (14.000 rpm) for 2 min, and the supernatant was transferred to a fresh tube (~0.8 mL). Equal volume of isopropanol was added to the supernatant and mixed gently by inversion several times. Incubation of the samples for at least 15 min on ice increased the efficiency of DNA yield. The samples were then centrifuged for 2 min at 17.000 g (14.000 rpm). Supernatant was discarded and 1 mL 70% ethanol was added. The samples were then centrifuged for 1 min at 17.000 g (14.000 rpm). The pellet was once more washed with 70% ethanol optionally and air-dried until all ethanol was removed. The obtained nucleic acids as a pellet were dissolved in an appropriate amount of TE buffer (10 mM Tris-HCL [pH 8], 1 mM EDTA) (30 - 60 μ L). The nucleic acids dissolved in TE buffer, were treated with 1 μ L of ribonuclease A (10 mg/mL) and stored at -20 °C until use. Concentration and purity

of extracted DNA were measured at OD 260 and by measuring 260 nm/280 nm absorbance ratio by nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA), respectively. The integrity of the extracted DNA was also evaluated by electrophoresis.

ITS region (ITS1F-5.8-ITS4) was amplified by PCR using the primers ITS 1F was designed specifically for fungal sequences (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (32) for the 3' end of 18S rDNA and ITS4 was described as a universal primer (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), (29) for the 5' end of 28S rDNA. PCR amplifications for sequence analysis were performed in a 50 μ L volume containing 30 ng of genomic DNA, 5 μ L of 10 x reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 μ L dNTPs (10 μ M), 0.2 μ M of each of the primers, and 1 U Taq polymerase (Fermentas, Canada). The thermal cycling for PCR comprised incubation at 94 °C for 3 min, and 35 cycles, each with 94 °C for 30 sn, 52-54 °C for 1 min, and extension of 1 min 30 s at 72 °C for 8 min. Two separate PCR reactions were carried to amplify rDNA (ITS) regions of DNA. In order to prevent non-specific bands appeared in some reactions the annealing temperature was increased to 54 °C in some cases. The amplified PCR products were purified using Beckman Coulter Genomel Lab DTCS Quick Start Kit according to manufacturer's instruction. PCR products and DNA markers (100 bp, Fermentas, Canada) were analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gel (AppliChem, Canada), containing 0,5 μ L/mL ethidium bromide, for 2 h at 100 V.

After PCR amplification of the entire ITS region (ITS1-5.8S-ITS2), all species analyzed displayed a single band of PCR products of about 600 bp. The amplified fragments with the primers ITS1F and ITS4

comprising 3' end of small subunit gene, ITS 1F, the 5.8 S gene, ITS 4 and the 5' terminus of the large subunit gene, were sequenced. Sequence reactions were purified using the Beckman Coulter Agencourt Clean SEQ kit. The PCR products were sequenced by the cycle sequencing method using dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia, USA) according to the manufacturer's protocol. The purified and dried PCR-products were sent to Ankara University Biotechnology Institute for sequencing using the PCR primers. DNA sequence analysis was carried with Beckman coulter CEQ 8000 Genetic Analysis System in Biotechnology Institute.

Data Analysis

Chromatograms were manually checked using Chromas 2.01 (Chromas version 2.01; www.technelysium.com.au.chromas.html). The alignment of sequences (including out-group taxon) was done using CLUSTAL X2 (33). Two separate sequences which were obtained from one sample with forward (ITS1F) and reverse (ITS 4) primers derived from the ITS region were matched by the help of Clustal X2 programme. For comparison, lecideoid species from other parts of the world was sequenced and included in the data matrix together with one sequence downloaded from GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov) as shown in Table 2. Alignment of the sequences was performed visually, as gaps were few and easily interpreted. Insertion/deletion gaps were treated as missing data.

All data were analysed by Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 4 and a bootstrapped dendrogram was generated (34). To test for potential conflict, parsimony bootstrap analyses were performed on each individual dataset, and 75% bootstrap consensus trees were examined for

conflict. Maximum Composite Likelihood analyses were performed using the program MEGA 4 (34). Bootstrapping was performed based on 1000 replicates with random sequence additions. Homoplasmy levels were assessed by calculating consistency index (CI), retention index (RI), and rescaled consistency (RC) index from each parsimony search.

Table 2. Localities and their GenBank accession numbers

Species	GenBank No	Origin
<i>Lecanora rupicola</i>	AY541259	Austria
<i>Lecanora rupicola</i>	AY541265	Austria
<i>Lecanora bicincta</i>	AY541242	Austria
<i>Lecanora bicincta</i>	AY541243	Austria
<i>Lecanora albella</i>	AY541241	Austria
<i>Lecanora farinacea</i>	AY541261	Austria
<i>Lecanora farinacea</i>	AY541262	Austria
<i>Lecanora carpinea</i>	AY541246	Austria
<i>Lecanora carpinea</i>	AY541247	Austria
<i>Lecidella elaeochroma</i>	AY541275	Austria
<i>Lecidella elaeochroma</i>	EU266082	Korea
<i>Lecidella stigmatea</i>	JN873901	Austria
<i>Lecidella stigmatea</i>	JN873902	Austria
<i>Lecidella patavina</i>	JN873893	Austria
<i>Lecidella patavina</i>	JN873894	Austria
<i>Lecidella carpathica</i>	DQ534471	Korea
<i>Lecidella carpathica</i>	AY541274	Austria
<i>Lecidea atrobrunnea</i>	HQ650657	Germany
<i>Lecidea atrobrunnea</i>	GU074455	Austria
<i>Lecidea atrobrunnea</i>	GU074457	Austria
<i>Lecidea fuscoatra</i>	EU263922	Austria
<i>Lecidea fuscoatra</i>	HQ650662	Germany
<i>Lecidea plana</i>	EU259903	Austria
<i>Lecidea plana</i>	EU259904	Austria
<i>Porpidia macrocarpa</i>	EU263923	Austria
<i>Porpidia speirea</i>	HQ650631	USA
<i>Ganoderma applanatum</i>	GU256764	USA

RESULTS

The lichen genus *Lecidea* was struck together with the substrate and it was so hard to collect genus during field works. Therefore only 0.001-0.08 gr lichen samples were obtained from substrate. According to DNA extraction results, the concentrations of DNAs were approximately in the range of 34.09 - 933.5 ng/ μ L and 260 nm / 280 nm ratios. Purity of DNA was between 0.59-1.72.

In this study, rDNA (ITS) regions of four species from genus *Lecidea*, three species from genus *Lecidella*, three species from genus *Porpidia* and one species *Lecidoma* were amplified by using ITS1F forward and ITS4 reverse primers with the help of PCR and sequenced by genetic analyzer to reveal genetic similarities and variations among the specimens. A sequence matrix of 4100 nucleotide positions were analysed and had 747 variable positions, of which 336 were parsimony-informative sites were detected (34). The number of base substitutions

Table 3. Estimates of evolutionary divergence over sequence pairs between groups

A	B	C	D	E	OG
1. A					
2. B	0.024				
3. C	0.130	0.095			
4. D	0.053	0.023	0.100		
5. E	0.043	0.061	0.076	0.076	
6. OG	0.241	0.187	0.204	0.198	0.179

A: *Lecidea* C: *Lecidoma* E: *Porpidia*
 B: *Lecidella* D: *Lecanora* OG: Out Group

per site from averaging over all sequence pairs between groups was shown Table 3. All results were based on the pairwise analysis of 44 sequences (27 samples obtained from GenBank+17 samples obtained from Turkey). Analyses were conducted using the Minimum Evolution (ME) method in MEGA 4. According to the analysis genus *Porpidia* was the closest to genus *Lecidea* with 0.043 distance index. Genus *Lecidoma* was the second with 0.053 distance index. *Ganoderma applanatum* was very distant to all studied samples with 0.179-0.241 genetic distance index (Table 3). When transitional changes were compared transversional ones, bias towards transversional changes were observed, with the transition pair value of 56 versus transversional value of 54 (Table 4). Dendograms were obtained according to different phylogenetic methods such as Neighbour-Joining (NJ), Minimum Evolution (ME), Maksimum Parsimony, UPGMA using the software MEGA 4. Bootstrapping was performed based on 1.000 replicates with random sequence additions. To test for potential conflict, parsimony bootstrap analyses were performed on each individual dataset, and 75% bootstrap consensus trees were examined for conflict. Homoplasy levels were assessed by calculating consistency index (CI), retention index (RI), and rescaled consistency (RC) index from each parsimony search. The trees yielded similar topology showing only slight rearrangements within the groups. Since the topologies of the MP; ML, NJ and UPGMA analyses did not show any strongly supported conflicts, only Minimum-Evolution (ME) dendogram was shown in Figure 1.

Table 4. Numbers and base pairs of compared samples

Related region	ii	si	sv	R=si/sv	TT	TC	TA	TG	CC	CA	CG	AA
ITS region	382	56	54	1.03	84	37	11	11	110	14	19	79
	AG	GG	TOTAL									
	19	109	491.79									

ii = Identical Pairs, si = Transitional Pairs, sv = Transversional Pairs, R = si/sv

It was observed that the species were divided into two branches and both of them showed binary branches according to dendrogram obtained from Minimum Evolution (ME) analysis. *G. applanatum* (GU256764) species constructed one of the branches while the other species clustered on the other branch (Figure 1). A result of the Minimum Evolution (ME) analysis without out-group (*G. applanatum*) four

major clades were formed. Generally the species which were belong to the same genus, combined in one branch towards to the origin. According to dendrogram, species from genus *Lecidea* were close to species from *Porpidia* genus phylogenetically, while the species from *Lecidella* genus located on a separate branch from the species in *Lecidea* and *Porpidia* genus (Figure 1). *Lecidea fuscoatra*

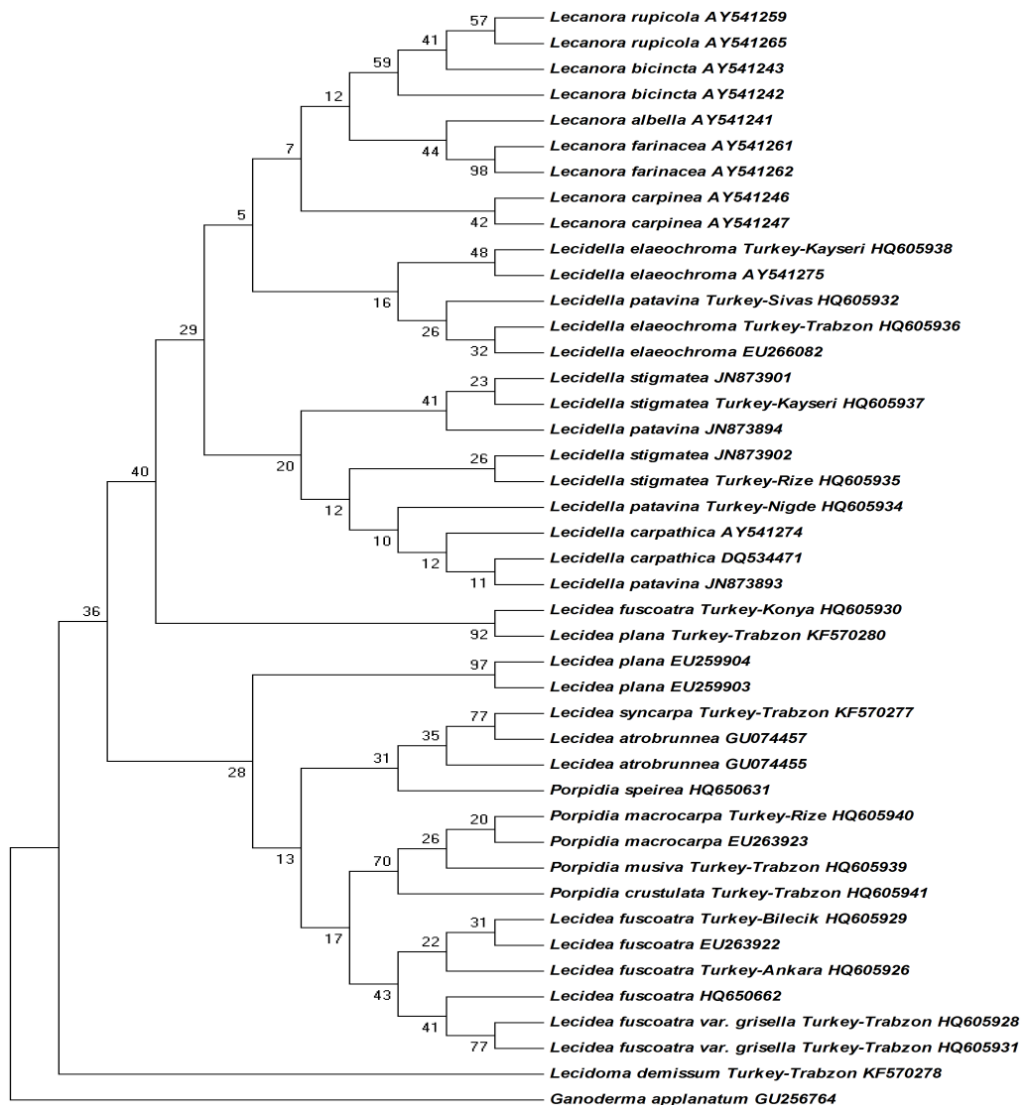


Figure 1. Minimum Evolution analysis inferred from ITS region sequences which is shown phylogenetic relations of 17 samples from *Lecidea*, *Lecidella*, *Lecidoma* and *Porpidia* genus. Numbers at the nodes are bootstrap frequencies above 40%.

which was collected from two different provinces of Konya was located on a separate branch from Ankara, Bilecik and Trabzon *L. fuscoatra* samples. Thus, it showed genetic difference from the other samples (Figure 1). *Porpidia musiva* species showed phylogenetic proximity to *Porpidia* species while *P. macrocarpa* showed phylogenetic proximity to *P. crustulata* species. Two of *Lecidella patavina* and *Lecidella stigmatea* samples which were collected from different localities were located on a separate branches. These two species showed proximate branches (Figure 1). Trabzon and Korea (EU266082) *Lecidella elaeochroma* samples showed boot strap value (32%) and they formed a group. Also Bakırdağ-Kayseri and Austria (AY541275) samples of the same species showed boot strap value (48%) and formed another group (Figure 1).

The results of this phylogenetic analysis indicates that four distinct lineages of *Lecidea* sp. and related genus occur in Anatolia, Turkey. Four dendrograms were obtained according to different phylogenetic methods. The trees yielded similar topology showing only slight rearrangements within the groups. We demonstrated only Minimum-Evolution dendrogram because analysis with Maximum Parsimony (MP) and Minimum-Evolution revealed trees with similar topology with slight differences among the groups and within groups.

DISCUSSION

The diversity of lichens, especially crustose species, is still poorly known (35). To overcome difficulties with the morphology based species delimitations in these groups, we evaluated molecular data (nuclear ITS and rDNA sequences) to test species boundaries within the genus *Lecidea* (35). Molecular data are largely absent for Turkey lichens, with only a few exceptions (36, 37). To overcome difficulties of assessing species diversity in Turkey lecideoid lichens, we employed molecular

data (nuclear ITS ribosomal DNA sequences) to test species boundaries. Based on our phylogenetic estimate we re evaluated morphological characters to identify characters that can be used to identify these distinct lineages. Here we have focused on samples belonging to the genus *Lecidea*, *Lecidella* and *Porpidia*.

Ruprecht et al. (35), sampling was done along a north-south transect at five different areas in the Ross Sea region. Phylogenetic analyses also include specimens from other regions in Antarctica and non-Antarctic areas. According to their results, maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian analyses agreed in placing the samples from continental Antarctica into four major groups. Based on this phylogenetic estimate, they restudied the micromorphology and secondary chemistry of these four clades to evaluate the use of these characters as phylogenetic discriminators. These clades are identified as the following species *Lecidea cancriformis*, *L. andersonii* as well as the new species *L. polypycnidophora* Ruprecht & Turk sp. nov. and another previously unnamed clade of uncertain status, referred to as *Lecidea* spp. (35). Ruprecht et al. demonstrate that the diversity of *Lecidea* spp. in continental Antarctica is higher than previously thought (35). Geographical data evaluation also shows a decreasing diversity of *Lecidea* species the more continental and drier the habitats are. It clearly indicates that the species concept in *Lecidea* needs revision and that molecular data are helpful in interpreting subtle morphological differences that have been previously regarded as intraspecific variability (35).

This is especially true for crustose lichens that are often reduced to minute patches surrounding ascomata under the harsh climatic conditions typical of this ecosystem. The number of available collections is limited, which restricts the ability to assess variability within species. Because of the

poor understanding of morphological and chemical variation, their taxonomy is currently in urgent need of revision. Lecideoid lichens often act as pioneers on rock and pebbles (38). Saxicolous lecideoid lichens in Turkey include species of the genera *Carbonea*, *Lecanora*, *Lecidea*, and *Lecidella*. Despite the ecological importance of these lichens in polar habitats, the taxonomy is only poorly known and the circumscription of taxa differs between authors.

According to Buschbom and Mueller (3) the lichen-forming genus *Porpidia* (*Porpidiaceae*, Ascomycota) provided excellent opportunities for evolutionary, reproductive, and ecological studies of crustose epilithic lichen symbioses. Separate and combined analyses of nuclear ribosomal RNA large subunit and nuclear β -tubulin gene fragments were performed using maximum parsimony, maximum likelihood, and Bayesian approaches in their study. Branch support was estimated using non-parametric bootstrapping and posterior probabilities, while monophyly of a priori defined groups was tested using posterior probabilities. The results revealed a highly supported “*Porpidia sensu lato*,” however, *Porpidia* itself was not monophyletic. Several smaller genera of the *Porpidiaceae* and probably the large genus *Lecidea* (*Lecideaceae*) were nested within the group (3). The present study was also indicated that the species of the genus *Porpidia* are nested within *Lecidea* as shown in previous study.

A large percentage of crustose lichens on rock with large black apothecia (more than 0.75 mm in diameter) belong to *Porpidia* genus. Other crustose lichens that are superficially similar with a hand lens include species of *Lecidea*, *Rhizocarpon*, *Sarcogyne* and *Buellia*. *P. crustulata* together with the very similar *P. macrocarpa*, make up the bulk of the nonpruinose species of *Porpidia* (5). In our study, *P. crustulata* and *P. macrocarpa* composed a close branch on the tree that is supported with a 96% bootstrap value. In *P. macrocarpa*, the apothecia

tend to be a larger (up to 3.5 mm in diameter-por crus 0.13-1.5 mm in diameter); the spores are larger (13-23 x 7-10 μm other 10-17 x 5-9 μm) the hymenium is higher (80-120 μm other 60-90 μm), and cells of the exciple are smaller (mostly 3-6 μm in diameter other 5-8 μm). The gelatinous halo around the spores helps distinguish species with 2-celled spores from similar species of *Buellia* or *Catillaria*. *Porpidia* has 1-celled spores and a different ascus type. *Lecidea* species have much smaller, 1-celled spores, and their paraphyses are mostly unbranched (5). According to our study result of phlogenetic analyses and morphological characters of species in Anatolia, Turkey were similar results.

The *Porpidia* genus is one of the most studied of the segregates of *Lecidea* (2, 3, 7, 9-11). The reasons for this are largely because of the difficulty in recognizing species-level characters within the genus. Most species of *Porpidia* have a grey thallus and black sessile apothecia and, as macroscopic characters (e.g. thickness of thallus, size of apothecia) appear to be extremely variable within a single species, specimens are usually impossible to identify beyond genus in the field (5). It was aim of the study molecular studies of the *Lecidea* genus and related genus have greatly enhanced our understanding of the infrageneric relationships, thus permitting a re-assessment of morphological characters that should result in a clearer understanding of species concepts within the genus.

The analyses of Buschbom and Mueller indicated that the genus *Porpidia* could be divided into three infra-generic groups, with a high probability that the *Lecideaceae* s. str. (i.e. *Lecidea* and *Cecidonia*) was nested within them (3). This suggested that either the *Porpidiaceae* should be included within the *Lecideaceae* (and *Porpidia* within *Lecidea*), or that *Porpidia* should be divided into at least three, and possibly four, separate genera. According to our results, species of *Porpidia* genus in Anatolia, Turkey

remained relatively close to *Lecidea* group samples. However, Buschbom and Mueller (3) studied only a limited number of the relevant taxa, and because of the lack of consistent supporting morphological/chemical differences, they preferred to await the results of further analyses of all the available character systems (molecular, morphological, and chemical) before making any taxonomic innovations. *P. crustulata* is a common species in upland and montane habitats. It is an early colonizer of bare rock surfaces and is frequent around areas of prolonged snow-lie. It is distinguished from *P. macrocarpa* in the field by its smaller apothecia and microscopically by its smaller ascospores, lower thecium and thicker excipular hyphae (5).

Lecidella may be hard to distinguish from other black disk lichens such as *Lecidea*, *Porpidia* or *Buellia*. They are, however, fairly easy to recognize under the microscope by the combination of their easily separating paraphyses, greenish tissues, and broad spores (5). In the current study *Porpidia* was the closest to genus *Lecidea*. *Lecidella carpathica* differs mainly in its dark yellowish brown hypothecium and darker exciple; it contains atranorin and diploicin (an orcinol depsidone). *Lecidella carpathica* which were obtain from GenBank located on a separate branch from the species in *Lecidea*, *Lecidella* and *Porpidia* genus. Because of these reasons could be explained synerjistic effect of the seconder metabolite. *Lecidella patavina* (syn. *L. spitsbergensis*) has the same chemistry as *L. stigmata*, but its hymenium is filled with oil drops, its exciple contains crytals, and the thallus tends to be thicker. *Lecidella*

elaeochroma located on a separate branch from the other *Lecidella* species because of this result *Lecidella elaeochroma* which differs only in its C positive orange thallus (arthothelin).

Dissimilarity index and dendrogram data which are conducted as a result of this research reveals the genomic similarities and differences of studied samples. By determining molecular phylogeny of the samples showing the variation in different habitats and populations, certain taxonomic values have revealed. The distant taxa relations have been defined by ITS region amplification and sequencing. Wide range of information is provided on Anatolia, Turkey of *Lecidea* and *Lecidella*, *Porpidia* samples. A molecular study involving the *Lecidea*, *Lecidella* and *Porpidia* species that are present in Anatolia, Turkey have not been carried out so far. Furthermore these genus are quite less molecular studies in the world literature. Thus, current study is the first report on *Lecidella*, *Porpidia* genus in the world.

Lichens are major sources of biodiversity in terms of wide variety of species in Anatolia. If the study extends by using more species and localities, ITS variations among the species involving *Lecidea*, *Lecidella* and *Porpidia* will help to enlighten evolutionary differentiation of the lichens. Those type of studies will make contribution to reveal and protect the rich gene potential of Turkey. It is truly important that those type of studies will be very beneficial to find solutions to the taxonomic problems of certain samples and to reveal their position in lichen systematic on molecular dimension.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Ankara University, Management of Scientific Research Projects (no. 2006-0705116). We gratefully acknowledge for M. Gökhan Halıcı's assistance with the collection and identification some lichen species.

REFERENCES

1. Hertel H. Schlüssel für die Arten der Flechtenfamilie *Lecideaceae* in Europa. *Biblioth Lichenol*, 1995; 58: 137-80.
2. Hertel H. Ein vorläufiger Bestimmungsschlüssel für die kryptothallinen, schwarzfrüchtigen, saxicolen Arten der Sammelgattung *Lecidea* (Lichenes) in der Holarktis. *Decheniana*, 1975; 127: 37-78.
3. Buschbom J, Mueller G. Resolving evolutionary relationships in the lichen-forming genus *Porpidia* and related allies (Porpidiaceae, Ascomycota). *Mol Phylo Evol*, 2004; 32: 66-82.
4. Hertel H. Revision einiger calciphiler Formkreise der Flechtengattung *Lecidea*. *Nova Hedwig Beih*, 1967; 24: 1-174.
5. Brodo IM, Sharnoff SD, Sharnoff S. *Lichens of North America*, Yale University Press. London, 2001; 390-633.
6. Ahmadjian V. *The lichen symbiosis*. New York, Wiley, 1993; 135-40.
7. Gowan SP. The lichen genus *Porpidia* (Porpidiaceae) in North America. *Bryologist*, 1989; 92: 25-59.
8. Gowan SP. A character analysis of the secondary products of the Porpidiaceae (lichenized Ascomycetes). *System Bot*, 1989; 14: 77-90.
9. Gowan SP, Ahti T. Status of the lichen genus *Porpidia* in eastern Fennoscandia. *Annal Bot Fenn*, 1993; 92: 25-59.
10. Knoph JG. Vorarbeiten zu einer monographie der euthallinen arten der flechtengattung porpidia (Porpidiaceae, Lecanorales) Europas, mit besonderer Berücksichtigung des Alpengebietes. Staatsexamensarbeit, Universität München, 1984.
11. Schwab AJ. Rostfarbene Arten der Sammelgattung *Lecidea* (Lecanorales): Revision der Arten Mittel- und Nordeuropas. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München.*, 1986; 2: 221-476.
12. Fryday AM. Ecology and taxonomy of montane lichen vegetation in the British Isles. Ph. D. Thesis, University of Sheffield, England, 1997.
13. Körber G. *Systema Lichenum Germaniae (I-XXXIV)*. Die Flechten Deutschlands mikroskopisch geprüft, kritisch gesichtet, charakteristisch beschrieben und systematisch geordnet, Breslau, 1855.
14. Zahlbruckner A. *Catalogus Lichenum Universalis*. Vol. 3, Leipzig, 1925.
15. Fries TM. *Lichenographia Scandinavica*. Pars I u. II, Uppsala, 1874.
16. Hertel H, Leuckert C. Über Flechtenstoffe und Systematik einiger Arten der Gattungen *Lecidea*, *Placopsis* und *Trapelia* mit C+ rot reagierendem Thallus. *Willdenowia*, 1969; 5: 369-83.
17. Knoph JG. Untersuchungen an gesteinsbewohnenden xanthonhaltigen Sippen der Flechtengattung *Lecidella* (Lecanoraceae, Lecanorales) unter besonderer Berücksichtigung von außereuropäischen Proben exklusive. *Am Bibliog Lichen*, 1990; 36: 1-183.
18. Leuckert C, Knoph JG, Ziegler HG, Hertel H. Chemotaxonomische studien in der Gattung *Lecidella* (Lecanoraceae, Lecanorales) I. *Lecidella carpathica* und *Lecidella viridans*-Untersuchungen an mittel- und südeuropäischen Proben. *Herzogia*, 1990; 8: 265-72.
19. Leuckert C, Knoph JG, Hertel H. Chemotaxonomische Studien in der Gattung *Lecidella* (Lecanoraceae, Lecanorales) II. Europäische Arten der *Lecidella asema*-Gruppe. *Herzogia*, 1992; 9: 1-17.
20. Leuckert C, Knoph JG. European taxa of saxicolous *Lecidella* containing chloroxanthon: identification of patterns using thin layer chromatography. *Lichennologist*, 1992; 24: 383-97.
21. Huneck S, Santesson J. Mitteilung über Flechteninhaltsstoffe. Die Inhaltsstoffe von *Lecidella carpathica* (Koerb.) Szat. Und die Struktur des Thuringions, eines neuen Xanthon. *Zeitsc für Naturfor*, 1969; 24b: 756-60.
22. Elix JA, Crook CE. The joint occurrence of chloroxanthon in lichens, and a further thirteen new lichen xanthon. *Bryologist*, 1992; 95: 52-64.

23. Song KM, Osborn TC, Williams PH. Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), I. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor App Genet*, 1988; 75: 784-94.
24. Miller JC, Tanksley SD. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor App Genet*, 1990; 80(4): 437-48.
25. Wheeler WC, Honeycutt RL. Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. *Mol Biol Evol*, 1988; 5: 90-6.
26. Bridge PD, Arora DK, Reddy CA, Elander RP. Applications of PCR in Mycology. In: *PCR Applications in Studies of Lichen-Forming Fungi* (Crespo A, Cubero OF and Grube M, eds. USA: Cab International, 1998; 231-69.
27. Dizkırıncı A, Kaya Z, Cabi E, Doğan M. Phylogenetic relationships of *Elymus L.* and related genera (Poaceae) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Turk J Bot*, 2010; 34: 467-78.
28. Torres RA, Gunal M, Humleben V. GC balance in the International Transcribed Spacers ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal RNA genes. *J Mol Evol*, 1990; 30: 170-81.
29. White TJ, Bruns T, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to Methods and Applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. San Diego: Academic press, 1990; 315-22.
30. Porter CH, Collins FH. Species-diagnostic difference in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg*, 1991; 45: 271-9.
31. Aras S, Cansaran D. Isolation of DNA for sequence analysis from herbarium material of some lichen species. *Turk J Bot*, 2006; 30: 449-53.
32. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*, 1993; 2: 113-8.
33. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformat*, 2007; 23: 2947-48.
34. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2007; 24: 1596-99.
35. Ruprecht U, Lumbsch T, Brunauer G, Allan-Green TG, Türk R. Diversity of *Lecidea* (*Lecideaceae*, *Ascomycota*) species revealed by molecular data and morphological characters. *Antar Sci*, 2010; 22(6): 727-41.
36. Aras S, Cansaran D, Türk AÖ, Kandemir I, Candan M. Resolving genetic relationships in manna group of lichens from genus *Aspicilia*. *Afr J Biotech*, 2007; 6(9): 1154-60.
37. Cansaran D, Aras S, Kandemir I, Halıcı MG. Phylogenetic relations of *Rhizoplaca* Zopf. From Anatolia Inferred from ITS sequence data. *Zeit Naturfor*, 2006; 61c: 405-12.
38. Hertel H. Progress and problems in taxonomy of Antarctic saxicolous lecideoid lichens. *Bibliot Lichenol*, 1987; 25: 219-42.

Pantoea agglomerans'ın neden olduğu kateter ilişkili bir sepsis olgusu

A catheter related sepsis case caused by *Pantoea agglomerans*

Fadime YILMAZ¹, Sercan SAVCI², Elvin PAZAR-YILDIRIM¹, Nevriye GÖNÜLLÜ¹, Işıl BAVUNOĞLU²,
Fatma KÖKSAL-ÇAKIRLAR¹, Yavuz UYAR¹, Hrisi Bahar TOKMAN¹, Murat GÜNAYDIN¹, Nuri KİRAZ¹

ÖZET

Pantoea türleri, bitkilerde ve toprakta bulunan, *Enterobacteriaceae* ailesinden, fakültatif aerob Gram-negatif çomaklardır. *Pantoea agglomerans* immün sistemi normal olan kişilerde lokalize, immünsuprese hastalarda ve yeni doğanlarda sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Fırsatçı patojen olan bu bakterilerin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonlar; septik artrit, pnömoni, sepsis, peritonit, üriner sistem, cerrahi alan ve kateterle ilişkili enfeksiyonlardır. Bu bakteri, 4°C'de iyi üreyebilme özelliğine sahip olduğu için kontamine intravenöz solüsyonlar ve depolanmış kan ürünleriyle bulaşabilmektedir. *Pantoea* spp. pamuk silgiçlerde, intra-arterial gereçlerde de bulunabilmektedir. Bu çalışmada, *P. agglomerans*'a bağlı kateter ilişkili bir sepsis olgusu sunulmaktadır. Kasım 2013'te mide kanseri tanısı konulan, son kemoterapisini Mart 2014'te alan 54 yaşında erkek hasta; kemoterapi sonrası bulantı kusma, beslenememe şikayetleriyle hastanemizin dahiliye servisinde yatırıldı ve gastrointestinal pasajı olmaması nedeniyle total parenteral nutrisyon (TPN) ile takip edildi. Genel durumu stabilleşince Nisan 2014'te taburcu edildi. Evde iki hafta TPN ile beslenmesi sürdürülen hasta Mayıs 2014'te üşüme, titreme ve 39,9 °C ateş şikayetleriyle İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'nin acil servisine başvurdu. Kateter ilişkili sepsis ön tanısıyla piperasilin-tazobaktam başlanarak dahiliye servisine yatırıldı. CVP kateterinden alınan kan kültüründe Gram

ABSTRACT

Pantoea species, members of the *Enterobacteriaceae* family are facultative anaerobic Gram-negative bacilli that can be isolated from plants and soil. *Pantoea agglomerans* can lead to localized infections in healthy people with normal immune systems and to systemic infections in newborns and immunocompromised patients. Nosocomial infections caused by these opportunistic-pathogenbacteria are; septi arthritis, pneumonia, sepsis, peritonitis, urinary system infections, surgical infections, and catheter-associated infections. This bacteria, since it has a good ability to grow at 4°C, can be transmitted by contaminated intravenous solutions and stored blood products. *Pantoea* spp. can be found in cotton swabs and the intra-arterial devices. In this study, a catheter related sepsis caused by *P. agglomerans* was presented. 54-year-old male patient with a diagnosis of gastric cancer at November 2013 and receiving the last chemotherapy at March 2014; was hospitalized in the internal medicine service at our İstanbul University, Hospital of the Cerrahpaşa Tıp Faculty and was followed-up by total parenteral nutrition (TPN) due to the lack of gastrointestinal passage. After stabilization of his general conditions he was discharged in April 2014. Patient whose feeding continued for two weeks at home with TPN, applied to our hospital emergency department at May 2014 with the fever of 39.9°C and chills. He was admitted to hospital in the internal medicine service initiating piperacillin-tazobactam with preliminary diagnosis of catheter-associated sepsis. Because of the Gram-negative bacilli reproduction from blood cultures

¹ İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, İSTANBUL

² İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları ABD, İSTANBUL



İletişim / Corresponding Author : Yavuz UYAR

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, İSTANBUL

Tel : +90 212 414 30 00 - 23099

E-posta / E-mail : yavuz.uyar@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 25.11.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 20.01.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.90267

Yılmaz F, Savcı S, Pazar-Yıldırım E, Gönüllü N, Bavunoğlu I, Köksal-Çakırlar F, Uyar Y, Tokman HB, Günaydın M, Kiraz N. *Pantoea agglomerans*'ın neden olduğu kateter ilişkili bir sepsis olgusu. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 59-62.

negatif çomak üremesi üzerine kateteri çıkarıldı ve TPN ile beslenmesini sağlamak için yeni kateter takıldı. Hastanın kan ve kateter kültüründen *P. agglomerans* izole edildi. Bakterinin tanımlanması konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ve Phoenix otomatize tanımlama sistemi ile yapıldı. Antibiyotik duyarlılığı (Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü-CLSI) kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Mikroorganizma piperasilin-tazobaktam'a duyarlı saptandığı için hastanın tedavisi değiştirilmedi. Tedavi sonrasında hastanın genel durumu iyileşince 16. gününde antibiyoterapi kesilerek taburcu edildi. Bu olgu sunumunda, immunsuprese hastalarda, nadir görülen *P. agglomerans*'a bağlı kateter ilişkili sepsis gelişme riskine ve antibiyoterapisine dikkat çekilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: immunsuprese, kateter ilişkili sepsis, *Pantoea agglomerans*, piperasilin-tazobaktam

taken from the CVP catheter, the catheter was removed and a new catheter was inserted to provide nutrition for patient with TPN. *P. agglomerans* was isolated from the patient's blood and catheter culture. The identification of bacteria was done by conventional microbiological techniques and Phoenix automated identification system. Antibiotic susceptibility evaluated by using Kirby-Bauer disk diffusion test according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria. The microorganism was sensitive to piperacillin-tazobactam, so, patient's therapy was not changed. After treatment, when the general condition of the patient healed, he was discharged by ending antibiotics on the sixteenth day. This case report, is intended to call attention to the risk of the growth of catheter-associated sepsis and antibioterapi are related to *P. agglomerans* which is rarely seen on immunocompromised patients.

Key Words: immunosuppressed, catheter related sepsis, *Pantoea agglomerans*, piperacillin-tazobactam

GİRİŞ

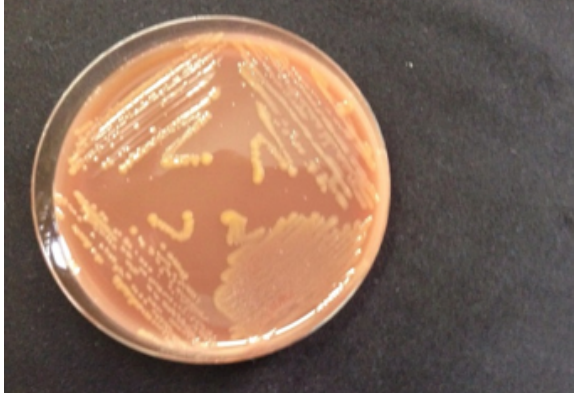
Pantoea türleri, bitkilerde ve toprakta yaygın olarak bulunan, *Enterobacteriaceae* ailesinden, fakültatif aerob Gram-negatif çomaklardır. En sık izole edilen tür *P. agglomerans*'tır. Fırsatçı patojen olan bu bakteriler, hastanede yatan hastalarda sıklıkla cilt, solunum, üriner ve gastrointestinal sistem yollarında kolonize olur ve bu bölgeler hastalıklar için giriş yolu görevi görür. Bu mikroorganizmanın neden olduğu en önemli nozokomiyal enfeksiyonlar; septik artrit, pnömoni, sepsis, peritonit, üriner sistem enfeksiyonu, cerrahi alan enfeksiyonu ve kateterle ilişkili enfeksiyonlardır (1). Bu olgu sunumunda, *P. agglomerans*'a bağlı kateter ilişkili bir sepsis olgusu sunulmaktadır. Çalışmamızda, immunsuprese hastalarda, nadir görülen *P. agglomerans*'a bağlı kateter ilişkili sepsis gelişme riskine ve antibiyoterapisine dikkat çekilmesi amaçlanmaktadır.

OLGU

Kasım 2013'te taşlı yüzük hücreli mide kanseri tanısı konulan ve son kemoterapisini Mart 2014'te

alan 54 yaşında erkek hasta; kemoterapi sonrası bulantı kusma, beslenememe şikayetleriyle İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'nin dahiliye servisinde yatırıldı. Gastrointestinal pasajı olmaması nedeniyle total parenteral nutrisyon (TPN) ile takip edildi, genel durumu stabilleşen hasta tedavisi düzenlenerek taburcu edildi. Evde iki hafta TPN ile beslenmesi sürdürülen hasta Mayıs 2014'te üşüme, titreme ve 39,9°C ateş şikayetleriyle hastanemizin acil servisine başvurdu. Kateter ilişkili sepsis ön tanısıyla piperasilin-tazobaktam başlanarak dahiliye servisine yatırıldı. C-reaktif protein (CRP) değeri 122 mg/L (N: 0-5 mg/L) olan hastanın piperasilin-tazobaktam tedavisine devam edildi. Laboratuvar testlerinde; lökosit sayısı 4.200/mm³, nötrofil sayısı 3.000/mm³, hemoglobin değeri 8,2 g/dL, platelet 133.8000/mm³, üre 55 mg/dL, kreatinin 0,75 mg/dL, AST:42U/L, ALT: 6 U/Lolarak saptandı. Diğer biyokimyasal değerleri normaldi. CVP kateterinden alınan kan kültüründe Gram-negatif çomak üremesi üzerine kateteri çıkarıldı

ve kateter ucu kültürü gönderildi. Hastanın TPN ile beslenmesini sağlamak için yeni bir kateter takıldı. Hastanın gelişinde alınan kan kültüründen ve kateter ucu kültüründen *P. agglomerans* izole edildi (Resim



Resim 1. *P. agglomerans* kolonilerinin çukolatamsı agardaki görüntüsü



Resim 2. *P. Agglomerans* kolonilerinin MacConkey agardaki görüntüsü



Resim 3. *P. Agglomerans* kolonilerinin kanlı agardaki görüntüsü

1, 2, 3). Bakterinin tanımlanması konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ve Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks MD) otomatize tanımlama sistemi ile yapıldı. Antibiyotik duyarlılık testleri Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü (CLSI) kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak Mueller-Hinton katı besiyerinde yapıldı (2). Bakteri amoksisilin-klavulanat, sefuroksim, piperasilin-tazobaktam, sefotaksim, sefepim, seftazidim, imipenem, meropenem, siprofloksasin, netilmisin, gentamisin, amikasin duyarlı olarak saptandı. Bakteri piperasilin-tazobaktama duyarlı saptandığı için hastanın tedavisi değiştirilmedi. Tedavi sonrasında hastanın genel durumu iyileşti, ateşi düştü ve CRP değerleri geriledi. Hasta yatışının 16. gününde antibiyoterapisi kesilerek taburcu edildi.

TARTIŞMA

Bitki patojeni olarak bilinen *Pantoea* türleri, pamuk silgiçlerde, intraarterial gereçlerde, bitkisel materyallerde de bulunabilmektedir. Pamuk ürünleri hastanelerde sık kullanılan malzemelerdir ve birçok yolla kontamine olabilmektedir. Bu bakteri, 4 °C'de iyi üreyebilme özelliğine sahip olduğu için kontamine intravenöz solüsyonlar ve depolanmış kan ürünleriyle bulaşabilmektedir. Ayrıca intravenöz ilaç bağımlılarında görülen 'pamuk ateşi' ile ilişkilidir. *P. agglomerans*, immün sistemi normal olan kişilerde lokalize, immünsuprese hastalarda ve yeni doğanlarda sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Fırsatçı patojen olan bu bakterilerin neden olduğu en önemli nozokomiyal enfeksiyonlar; septik artrit, pnömoni, sepsis, peritonit, üriner sistem enfeksiyonu, cerrahi alan enfeksiyonu ve kateterle ilişkili enfeksiyonlardır (3-6).

Kalp ve akciğer nakli yapılan bir hastada, transplantasyonu takiben *P. agglomerans*'a bağlı nozokomiyal pnömoni gelişimi Shubov ve arkadaşları tarafından bildirildi (1). Hastanede bakterinin kontamine sıvılarla bulaşacağına dair bir kanıt

olmadığı için, hastaya inhalasyon yoluyla bulaşmış olabileceği bildirildi. Liberto ve ark. (3), beşi onkoloji bölümünde, biri yoğun bakım ünitesinde yatan toplam altı hastada *P. agglomerans*'a bağlı sepsis olgusu bildirdi. Bakterinin hastalara bulaş yolunun intraarterial gereçler, hastanede kullanılan pamuk ürünleri ya da hastalara hediye olarak gelen bitki ve çiçekler olabileceği bildirildi (3). Ülkemizden Kahveci ve ark. (5), 89 yaşındaki bir peritoneal diyaliz hastasında *P. agglomerans*'a bağlı peritonit ve sonrasında septik şok gelişimini bildirdi. Gelişen tablo ile kontamine kan ürünleri, intravenöz sıvılar, total parenteral beslenme ve anestezi ajanlarının bağlantılı olduğunu; ayrıca gastrointestinal sistemden oral kontaminasyon veya bakteriyel translokasyonun da *Pantoea* enfeksiyonları için sorumlu olabileceği bildirildi. Aly ve ark. (4), yenidoğan ünitesinde yatan preterm yenidoğanlarda *P. agglomerans*'a bağlı kan dolaşımı enfeksiyonlarını rapor ettiler. Gastrointestinal kolonizasyonun bu mikroorganizma için muhtemel bir rezervuar olabileceği bildirildi. Ayrıca hastane çalışanlarının elleriyle taşınabileceği bildirildi. Olgumuzda; kemoterapi nedeniyle immunsüprese bir hastada sepsis bildirilmekte ve

bulaş yolu TPN, kateter veya kullanılan pamuk ürünleri olabileceği düşünülmektedir. Bulaş yolu hastane çalışanlarının elleri olabilir; ancak gelişen enfeksiyonun inkubasyon süresini bilmediğimiz için hastanın evde TPN aldığı dönemde de bulaş olabilir. Yine ülkemizden Kurşun ve ark. (6), 55 yaşında, kronik böbrek yetmezliği olan erkek hastada; *P. agglomerans*'a bağlı gelişen ventilatörle ilişkili bir pnömoni olgusu bildirdi. Olgumuzda da mide kanseri tanısı olan immunsüprese bir hastadır.

Bu olgu sunumunda, acil serviste kateter ilişkili sepsis öntanısı konulan, 54 yaşında immunsüprese erkek hastanın, kan ve kateter kültüründen *P. agglomerans* izole edildi. Mikroorganizma piperasilin-tazobaktam duyarlılığı saptandı ve tedaviye başarılı klinik yanıt alındı. İzole edilen *P. agglomerans* diğer çalışmalarda gibi antibiyotiklere duyarlılığı belirlendi. Ancak son yıllarda *Enterobacteriaceae* ailesindeki direnç insidansındaki artış nedeniyle bu bakteride de çeşitli direnç mekanizmaları gelişebilir ve tedavisi zor, mortalitesi yüksek bir enfeksiyon etkeni olabilir. *P. agglomerans*'a bağlı enfeksiyonlar nadir görülse de özellikle immunsüprese hastalarda etken olabileceği akılda tutulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Shubov A, Jagannathan P, Chin-Hong PV. *Pantoea agglomerans* pneumonia in a heart-lung transplant recipient: case report and a review of an emerging pathogen in immunocompromised hosts. *Transpl Infect Dis*, 2011; 13 (5): 536-9.
2. Anonymous. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. USA: Wayne, PA, 2014.
3. Liberto MC, Matera G, Puccio R, LoRusso T, Colosimo E, Focà E. Six cases of sepsis caused by *Pantoea agglomerans* in a teaching hospital. *New Microbiol*, 2009; 32(1): 119-23.
4. Aly NY, Salmeen HN, Lila RA, Nagaraja PA. *Pantoea agglomerans* bloodstream infection in preterm neonates. *Med Princ Pract*, 2008; 17(6): 500-3.
5. Kahveci A, Ascioglu E, Tigen E, Ari E, Arikan H, Odabaşı Z, et al. Unusual causes of peritonitis in a peritoneal dialysis patient: *Alcaligenes faecalis* and *Pantoea agglomerans*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2011; 10(12): 1-3.
6. Kurşun O, Unal N, Cesur S, Altın N, Canbakan B, Argun C, et al. *Pantoea agglomerans*'a bağlı ventilatörle ilişkili pnömoni gelişen bir olgu. *Mikrobiyol Bul*, 2012; 46 (2): 295-8.

Molecular techniques for clinical diagnostic bacteriology

Klinik bakteriyoloji tanısında moleküler teknikler

Nevriye GÖNÜLLÜ¹

ABSTRACT

Molecular methods have contributed tremendously to the understanding of the pathogenesis and epidemiology of infectious diseases. The polymerase chain reaction (PCR) is the most widely used target nucleic acid amplification method. By this method, a single copy of a nucleic acid is multiplied to more than 10⁷ times within a very short period. New technologies such as real-time PCR, sequencing and mass spectrophotometry have been described and have many applications in a clinical microbiology laboratory. The greatest impact of real-time assays was in the field of virology where they have been used to detect rapidly a range of viruses in human specimens and to monitor quantitatively viral loads and response to antiviral therapy. In bacteriology they are used for rapid detection of bacterial pathogens and/or antibiotic resistance genes can help to ensure the appropriate use of antibiotics, reduce the duration of hospital stay and minimize the potential for resistant strains of bacteria to emerge. Commercial kits employing PCR technology for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* have been developed. Nucleic acid amplification tests can be used directly to identify *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens. Some clinical laboratories have developed their in-house assays based on PCR assays to detect *M. tuberculosis* in clinical specimens. Some studies have compared the kits and "in-house" methods and have found similar results. In addition to in-house developed assays, there are commercial amplification tests some of them that are widely used. This chapter describes the basic principles and applications of recently DNA-based molecular techniques for the clinical bacteriology.

Key Words: Bacteriology, molecular biology, PCR

ÖZET

Moleküler yöntemler enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin ve epidemiyolojisinin anlaşılmasında çok önemli katkıda bulunmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), en yaygın kullanılan hedef nükleik asit amplifikasyon yöntemidir. Bu yöntem ile tek bir nükleik asidin kopyası çok kısa bir süre içinde 10⁷ kereden fazla çoğalır. Gerçek zamanlı PZR, sekanslama tekniği ve kütle spektrofotometresi gibi yeni teknolojiler klinik mikrobiyoloji laboratuvarında birçok uygulama alanı kazanmıştır. Gerçek zamanlı tekniklerin en büyük etkisi viroloji alanında olmuştur ve bu tekniklerin klinik örneklerde çeşitli virüslerin tespiti, kantitatif viral yükleri ve antiviral tedaviye yanıtı izlemek için kullanılmıştır. Bakteriyoloji alanında bakteriyel patojenler ve/veya antibiyotik direnç genlerinin hızlı tanımlanması, antibiyotiklerin uygun kullanımını sağlar, hastanede kalış süresini kısaltır ve dirençli suşların gelişme potansiyelini azaltır. *Neisseria gonorrhoeae* ve *Chlamydia trachomatis* tespiti için PZR teknolojisi kullanan ticari kitler geliştirilmiştir. Nükleik asit amplifikasyon testleri klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin doğrudan tespitinde kullanılabilir. Bazı klinik laboratuvarlar, klinik örneklerden *M. tuberculosis*'i tespit etmek için PZR deneylerine dayalı kendi in-house deneylerini geliştirmiştir. Bazı çalışmalar hazır kitleri ve "in-house" yöntemleri karşılaştırmıştır ve benzer sonuçlar bulmuştur. In-house geliştirilen yöntemlere ek olarak bazı ticari amplifikasyon kitleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bölümde güncel DNA yöntemine dayalı moleküler tekniklerin temel ilkelerini ve klinik bakteriyoloji için uygulamaları açıklanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyoloji, moleküler biyoloji, PZR

¹ İstanbul University, Cerrahpasa Medical Faculty, Department of Medical Microbiology, İSTANBUL, TURKEY



İletişim / Corresponding Author : Nevriye GÖNÜLLÜ

İstanbul University, Cerrahpasa Medical Faculty, Department of Medical Microbiology, İSTANBUL, TURKEY

Tel : +90 212 414 30 00

E-posta / E-mail : ngonullu@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 03.01.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 26.01.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.32704

Gönüllü N. Molecular techniques for clinical diagnostic bacteriology. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 63-72.

INTRODUCTION

Since 1983 many molecular methods have been developed for the detection and genotyping of bacteria. These methods have contributed tremendously to the understanding of the pathogenesis and epidemiology of infectious diseases (1). The molecular methods for diagnostic microbiology are diverse and they can be classified into one of these categories: hybridization, amplification, and sequencing and enzymatic digestion of nucleic acids (2).

Molecular techniques

Nucleic acid hybridization methods

Hybridization assays using DNA probes were developed in the early 1960s. DNA probes have been used successfully to identify a wide variety of pathogens from simple viruses to pathogenic bacteria and parasites. Direct diagnosis by nucleic acid probe hybridization is simple, rapid, and relatively free of the contamination and inhibition problems associated with target amplification methods. The sensitivity of probe hybridization methods is limited by the relatively large number of copies (~10⁴) of the target sequence required to generate a positive signal (1, 3).

Specific gene probes have also been developed for the recognize of specific antibiotic resistance genes, so that antimicrobial susceptibility of an infecting organism can be determined directly without primary isolation and growth. Commercial kits incorporating DNA probes are now available to detect a range of bacteria and viruses (4).

Nucleic acid amplification technology

The polymerase chain reaction (PCR) is the most widely used target nucleic acid amplification method. By this method, a single copy of a nucleic acid is multiplied to more than 10⁷ within a very short period. A thermostable DNA polymerase and two specific oligonucleotide primers are used to produce

multiple copies of specific nucleic acid regions during 25 to 50 repetitive cycles (4, 5). The method has received particular attention for detecting the presence of low numbers of bacteria or virus particles in clinical and environmental specimens. Commercial kits employing PCR technology for detection of *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* have been developed. Although PCR is the most widely used method, other amplification techniques for DNA and RNA molecules are available (ligase chain reaction, transcription-mediated amplification, strand displacement amplification). After the amplification reaction has occurred, the simplest method to identify the product by size is the electrophoresis and migration on an agarose gel (4-6).

Real-time amplification

Most conventional PCR-based tests require multiple manipulations and the PCR products are detected in a separate gel electrophoresis system. Compared with conventional PCR, real-time PCR is faster and contamination risk is reduced. It detects amplified target by fluorescently labeled probes as the hybrids are formed (i.e., detection of amplicon in real time). The signal produced is related to the amount of amplicon present at the end of each cycle and increases as the amount of specific amplicon increases (4, 5, 7). Commercially available robotic nucleic acid extraction systems, combined with rapid thermal cyclers and instrumentation (e.g. LightCycler, TaqMan©) capable of detecting and differentiating multiple amplicons, make real-time PCR an attractive and viable proposition for the routine diagnostic laboratory. Real-time assays have been extremely useful for studying microbial agents of infectious disease. The greatest impact to date has been in the field of virology where, real-time assays have been used to detect rapidly a range of viruses in human specimens and to monitor quantitatively viral loads and response to antiviral therapy. Benefits

to the patient can also be seen in bacteriology, where rapid detection of bacterial pathogens and/or antibiotic resistance genes can help to ensure the appropriate use of antibiotics, reduce the duration of hospital stay and minimize the potential for resistant strains of bacteria to emerge. Recent developments in real-time PCR have suggested a future in which rapid identification, quantification and typing of a range of microbial targets in single multiplex reactions will become commonplace (8, 9).

Molecular typing of microorganisms

Molecular typing of microorganisms are useful in the investigation of epidemiological relationships during infectious outbreaks, in determining routes and sources of infections and epidemiological surveillance of infectious diseases. Molecular fingerprinting methods are being used increasingly to distinguish clinical isolates and for assessing the relatedness of individual bacterial isolates in epidemiological studies (4, 10).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is now recognized as the gold standard molecular technique used to examine the molecular relatedness of bacteria. The principle of PFGE is to use a specialized electrophoresis apparatus to separate chromosomal fragments produced by enzymatic digestion of bacterial DNA (11).

Mass Spectrometry

Mass spectrometry is an analytical technique with high specificity used for determining the elemental composition of samples, quantifying the mass of particles and molecules, and elucidating the chemical structure of molecules. For example, MALDI-TOF MS, are being increasingly valued and utilized as tools in clinical microbiology laboratories (12).

Bacterial infections

C. trachomatis and *N. gonorrhoeae*

C. trachomatis and *N. gonorrhoeae* infections are among the most frequently sexually transmitted infections in the world. These infections (associated with syphilis and lymphogranuloma venereum) are

constantly increasing since the 2000s (13). A study in the United States showed that about 4.1% of the young population aged 18-26 were infected with *C. trachomatis* and 0.43% with *N. gonorrhoeae* (14). In France, the prevalence is higher with a range between 10% and 18% and the most affected population are young people aged between 15-30 (15, 16). Both infections have an important clinical polymorphism and can affect the uterus, the urethra, rectum, oropharynx and the conjunctiva. These infections are often asymptomatic (50% of cases for *C. trachomatis*). They can be in the form of urethritis or cervicitis. In women, these infections can reach the genital area and cause pelvic inflammatory disease, endometritis or salpingitis and lead to infertility or ectopic pregnancy. In man, these two bacteria cause urethritis which can progress to chronic epididymitis that can cause infertility. In both sexes, gonorrhoeae can progress to arthritis, meningitis or endocarditis (17). Reiter syndrome (urethritis, conjunctivitis, polyarthritis and mucocutaneous lesions) can be initiated by genital infections with *C. trachomatis* (18). In addition, some strains of *C. trachomatis* (serovars L1, L2, L2a, L2b and L3) are responsible for a rare disease, lymphogranuloma venereum. Its prevalence increases significantly in recent years and causes genital ulcerative lesions, lymphadenitis, proctitis, rectal fistulas and draining sinuses progressing to chronicity. Perinatal infections are also possible for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*. Approximately one fourth to half of infants born to women infected with *C. trachomatis* develop conjunctivitis and about 10% to 20% of infants develop pneumonia. *N. gonorrhoeae* can produce a severe conjunctivitis (ophthalmia neonatorum) or sepsis. All these elements show the importance of early detection of these infections (15).

C. trachomatis and molecular biology

C. trachomatis is an obligate intracellular bacteria organism which culture is difficult (19). Previously considered the gold standard (restricted to a few specialized laboratories), this technique is time consuming (results in three-seven days) and

expensive. Culture is highly specific (100%) but is relatively insensitive (40-85%). The sensitivity of culture is compromised if inadequate specimens are used and if viability of bacteria has been lost during transport of the specimen (18). Antigen detection methods are commercially available: direct fluorescent antibody (DFA) with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The sensitivity of each test has been reported to vary enormously and neither is found as sensitive as culture or nucleic acid-based tests. Antibody detection with serology is of limited value in the diagnosis of urogenital infections in adults because it cannot differentiate between current and past infection. Serology can be used to diagnose lenfogramuloma venereum (5, 18).

Nucleic Acid-Based tests are nucleic acid hybridization tests that measure the presence of species-specific sequence of 16S ribosomal RNA (rRNA). These tests are rapid and relatively inexpensive; however they are more reliable in patients who are symptomatic and shedding large numbers of bacteria than those who are asymptomatic and most likely shedding fewer bacteria (18).

Nucleic acid amplification tests (NAATs) are polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction, standard displacement amplification and transcription-mediated amplification. Most comparative studies indicate that these tests are more sensitive than culture and nonnucleic acid amplification assays (5, 20, 21). First-voided urine specimens from men and women are acceptable specimens. Care must be taken to monitor for the presence of inhibitors. Despite this inconvenient, nucleic acid amplification tests are currently the most preferred tests for the laboratory diagnosis of genital *C. trachomatis* infection (18). Table 1 summarizes the various molecular tests used in the diagnosis of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* infections.

***N. gonorrhoeae* and molecular biology**

N. gonorrhoeae is an intracellular organism which unlike *C. trachomatis* can be easily cultured.

The specificity (100%) and sensitivity of this technique (85%) are excellent. The result is obtained in one to three days. In addition, susceptibility test can be performed (25). For some authors, in areas where the *N. gonorrhoeae* prevalence is low, the culture is preferred over testing gene amplification (22). Other authors did not observe differences in sensitivity and specificity kits depending on the prevalence (23).

The molecular biology tests (*C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*)

Molecular biology tests using probe hybridization are also used for direct detection of *N. gonorrhoeae*. The PACE 2 DNA probe assay (Gen-Probe, San Diego, CA) is a nonisotopic chemiluminescent DNA probe system for direct detection of gonococcal ribosomal RNA in genital and conjunctival specimens. The sensitivities of this test have ranged from 85.5% to 100% for femal endocervical specimens and 91.5 to 100% for male urethral specimens (24). However, tests using amplification techniques are preferred and used routinely (17)(Table 1).

Table 1. Principals commercial kits for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections

Kit	Company
Detection after amplification:	
(Cobas) AmpliCor CT/NG (PCR)	Roche
(Cobas) TaqMan CT (real-timePCR)	Roche
AMPLIFIED (only CT) (NASBA)	BioMérieux
APTIMA COMBO 2 (TMA et HPA) (CT or NG)	Gen-Probe
BD ProbeTec CT/NG (SDA)	Becton-Dickinson
Hybrid Capture CT/GC	Digene
RealArt artus (real-time PCR)	Qiagen
Direct detection in clinical specimens:	
Pace 2 (only for CT or NG) (HPA)	Gen-Probe
Detection from culture:	
Accuprobe NG (HPA)	
Isolated or combined detection (CT and NG)	Digene
CT ID, GC ID, CT/GC Hybrid Capture 2	

The amplification tests are achievable in urine, urethral, endocervical or vaginal. According to the biological origin of the sample, specificity and sensitivity of the tests vary (25). For example, for *C. trachomatis*, the Amplicor™ kit (Roche) has a sensitivity ranging from 45 to 80% in women, of 92% in men in the urine and 98 % in the urethral level. For *N. gonorrhoeae*, the Amplicor kit has a sensitivity of 84-100 % for endocervical, 100% for the urethra, 67% for urine in women and 95% for the urine in man. Some authors reported that the search for *C. trachomatis* (and not *N. gonorrhoeae*) in urine has the same sensitivity and specificity in men as than in women with that of urethral or cervicovaginal samples (23). In addition, these kits whatever technical amplification used are equivalent in terms of the sensitivity specificity (23, 25). However, gene amplification tests may not differentiate a living from a dead organism. Therefore, there is not recommended to do this research if the individual has followed a specific treatment (antibiotics particular) in the previous three weeks. In addition, in areas with low prevalence, in the case of a positive amplification test results, some authors recommend to perform a second confirmatory test (to eliminate false positives) on the same sample or to prelevate a new sample for the culture (26, 27).

Tuberculosis

Detection of *M. tuberculosis*

The World Health Organization (WHO) estimates that the global tuberculosis epidemic results in about 9 million new cases and in 2 million deaths annually. Approximately one third of the world population is infected with *M. tuberculosis*. Regions with the highest incidence of disease are particularly countries with limited medical resources. In the other hand it still remains a major problem in industrialized countries. In these countries, socioeconomic factors such as immigration, the homeless, drug and alcohol abuse and people infected with the human immunodeficiency virus (HIV) are recognized as the most important reasons of the resurgence of

tuberculosis. Because it is difficult to eradicate disease in these patients, spread of this infection to other populations poses an important public health problem (18). The early diagnosis and adequate treatment of infectious patients with pulmonary tuberculosis are very important to reduce transmission of *M. tuberculosis* and to achieve the disease elimination (28).

It has been estimated that when using standard concentrating techniques, approximately 10 000 acid-fast bacilli per milliliter of sputum are required to be detected by routine microscopy (staining with auramine or Ziehl-Nielsen) (29, 30). This test cannot identify the particular mycobacterial species. On the other hand, a positive acid-fast stain reaction corresponds to higher activity (18).

Culture is considered the reference (gold standard) method to confirm the diagnosis. Unfortunately, it generally took 4 to 8 weeks for *M. tuberculosis* and other important slow-growing bacteria to grow on the Löwenstein-Jensen media. However, this time has been shortened through the use of specially formulated broth cultures the rapid growth of most mycobacteria. Thus the average time to grow mycobacteria in these automated detection systems (e.g., BacT / ALERT™ or system BACTEC™ systems) has been decreased to approximately 12 to 14 days. In addition, sputum or bronchoalveolar lavage requires prior decontamination with N-acetyl-L-cysteine and sodium, which can cause a significant decrease in the number of bacteria. Other methods such as to gas chromatography-mass spectrometry or ELISA did not improve the detection (31).

Thereafter, the need of new rapid and accurate diagnostic methods has emerged. For this reason, techniques have been developed to detect specific mycobacterial nucleic acid sequences present in clinical specimens in order to achieve higher sensitivity and specificity compared to traditional methods of microscopic examination and culture (18, 28).

Nucleic acid amplification tests (e.g., polymerase chain reaction-PCR) can be used directly on clinical specimens (sputum). These tests amplify target

nucleic acid regions in viable or nonviable bacilli, which uniquely identify *M. tuberculosis* complex. Some clinical laboratories have developed their in-house assays based on PCR assays to detect *M. tuberculosis* in clinical specimens and commercial kits. Some studies have compared the kits and “in-house” methods and have found similar results (32). In addition to in-house developed assays, there are commercial amplification tests some of them that are widely used: AmpliCor MTB test (Roche diagnostics System) and the Amplified Mycobacterial Tuberculosis Direct test (Gen Probe, Inc San Diego). Table 2 summarize some test kits and Table 3 summarize the sensitivity and the specificity of these amplification tests used in the diagnosis of *M. tuberculosis* from respiratory samples compared to the culture (17, 33). These tests are highly sensitive and specific with acid-fast smear-positive specimen but they are relatively insensitive in smear-negative specimens. The nucleic acids amplification test results must always be confirmed by sputum culture for pulmonary tuberculosis infection. It is also worth to mention that nucleic acid amplification tests have low specificity and sensitivity for extrapulmonary tuberculosis. Because of these limitations current literature evidence suggest that nucleic acid amplification tests cannot replace sputum microscopy and culture in tuberculosis diagnosis and that nucleic acid amplification tests cannot be used in the evaluation of treatment effectiveness in patients receiving therapy (28, 30).

Some of the potential problems of the nucleic-acid-based amplification assays are inhibition of amplification by inhibitors that are present in specimens and reporting of false-negative results may be a problem with PCR. For this reason, the use of an internal amplification and the monitoring of the false-negative rate is required (e.g., inhibitors of polymerase in 4% in the respiratory specimens and 18% of extrapulmonary samples). In addition, false positives (not related to contamination) can be reported as a result of nonviable mycobacteria DNA remained after treatment tuberculosis (32, 33).

Table 2. Principals commercial kits for the detection of *M. tuberculosis* infections

Kit	Company
Detection after amplification Cobas Aplicor <i>M. avium</i> (PCR) Cobas AmpliCor <i>M. intracellulare</i> (PCR) AMPLIFIED (complexe MT) (TMA and HPA)	Roche BioMérieux
Detection after amplification: Genotype Mycobacteria Direct (NASBA and reverse dot-blot) (<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. tuberculosis</i> complex) RealArt artus (<i>M. tuberculosis</i> complex)	Hain Lifescience Qjagen
Direct detection in clinical specimens: Genotype® MTB Direct v3.0 (reverse dot-blot) (<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. tuberculosis</i> complex)	Biocentric
Detection from culture: AccuProbe (HPA) Many mycobacteria (<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. kansasii</i>) AccuProbe (complexe MT) (HPA)	Gen-Probe
Inno-LiPA Mycobacteria (Reverse dot-blot) (<i>M. tuberculosis</i> complex, <i>M. kansasii</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. genovense</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. marinum</i> and <i>M. ulcerans</i> , <i>M. celatum</i> , MAIS, <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. chelonae</i> complex, <i>M. fortuitum</i> complex, and <i>M. smegmatis</i>)	Innogenetics
Genotype® Mycobacterium MTBC (Reverse dot-blot) Complex Mycobacterium tuberculosis	Biocentric
Genotype® Mycobacterium CM/AS (Reverse dot-blot) Identification of 26 Mycobacteria (<i>M. avium</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. interjectum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. marinum</i> / <i>M. ulcerans</i> , Complexe <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. goodii</i> , <i>M. celatum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. genovense</i> , <i>M. lentiflavum</i> , <i>M. heckeshornense</i> , <i>M. szulgai</i> / <i>M. intermedium</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. asiaticum</i> , <i>M. shimoidei</i>)	
Genotype® MTBDR (Reverse dot-blot) Resistance detection for isoniazide and rifampicin of Mycobacterium tuberculosis	Hain Lifescience

Identification of mycobacteria in culture

The genus *Mycobacteria* consist of diverser acid-fast bacilli. The conventional methods for the identification of these organisms are well established bu they are also time consuming and labor intensive. On the other hand, the results of these conventional tests can be sometimes inconclusive. The introduction of species-specific molecular probes have revolutionized the identification of mycobacteria as the most useful means of identifying commonly isolated mycobacteria (e.g., *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*). Because many organisms are present in the culture at the time of initial detection, it is not necessary to amplify the target genomic sequence. The commercially prepared probe identification systems currently used are rapid (test time 2 hours), sensitive and specific (5, 18).

Moleculer biology and detection of antimicrobial resistance

Mutations leading to rifampicin resistance, a marker for multidrug-resistant strains have been detected using molecular methods. Many different genotypic assays are currently available for drug susceptibility testing. Most are based on PCR amplification of a specific region of a gene followed by analysis for specific mutations associated with drug resistance. DNA probe assays have also been used to detect rifampin resistance (5, 34, 35). One of these assays, the INNO-Lipa Rif.TB (Innogenetics NV, Chem, Belgium) is a commercially available reverse hybridization-based probe assay for rapid detection of rifampin mutations leading to rifampicin resistance in *M. tuberculosis*. The assay has a sensitivity of 80%

Table 3. Sensibility and specifty of amplification tests used in the diagnosis of *M. tuberculosis* isolated from respiratory samples compared to the culture

	Sensibility %		Specificity %
	M+	M-	
AMTDB (GenProbe)	90-100	63.6-100	92.1-100
Amplicor (Roche)	87.5-100	50-71.7	91.3-100
BD Probe Tec	90-100	40.3-100	96-99.8
RealTime PCR	99.5	52	98.3
Lamp test	97.7	48.8	99

to 100% for detecting rifampin resistance (36). The second line-probe assay is the Genotype MTBDRplus assay (Hain Lifescience, GmbH, Nehren, Germany) (34, 37). The Genotype MTBDRplus assay shows a diagnostic sensitivity of approximately 98% with a specificity of approximately 99% for detecting rifampin resistance. For detecting isoniazid resistance the diagnostic sensitivity is approximately 84% with about the same specificity (approximately 100%) (38).

Epidemiological surveys

Molecular techniques permit strains analysis of *M. tuberculosis* isolates for purposes of epidemiologic studies. The most used technique is the RFLP-PCR of the insertion sequence IS6110. The IS6110, was specifically identified as the target of a DNA probe to be used in fingerprint analysis (30, 39). Strain-typing methods have also been used in the detection of drug-resistant strains of *M. tuberculosis*. There have been developed methods to detect mutations in the *M. tuberculosis* RNA polymerase (*rpoB*) to detect mutations associated with rifampin resistance (30, 40).

Other bacteria

Although many amplification techniques exist, the most widely used target nucleic acid amplification method is the polymerase chain reaction (PCR). Table 4 summarize some test kits used in molecular diagnosis of other bacteria than *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and *M. tuberculosis* (17); Table 5 resumes some bacteria detected by real Time PCR.

The advantage of PCR compared to usual bacterial culture was clearly demonstrated in the following situations:

- Detection and identification of bacteria difficult to grow in culture that are extremely difficult to grow (*Bartonella* spp., *Coxiella burnetii*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia* spp., *Francisella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Tropheryma whippelii*)
- More rapid detection and identification of bacteria containing mycolic acids that grow slowly (e.g., mycobacteria); more rapid detection of opportunistic bacteria (*Legionella* spp.).

- Ability to detect bacteria previously detected by serology (e.g., group A beta-hemolytic streptococci or toxin of *Escherichia coli* O157:H7). Quantification of infectious agent burden was proposed for some bacteria to appreciate their role in pathogenesis of diseases (e.g., *Streptococcus pneumoniae*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (41).
- Detection of bacteria in cerebrospinal fluids in the clinical suspicion of meningitis (*Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*).
- Ability to show nonviable microorganisms that cannot be detected in culture because of other reasons (e.g., a previous antibiotic therapy).

Table 4. Principals commercial kits for the detection of other bacteria

Kit	Company
Bacterial identification: Sequencing of bacterial regions Microseq PyroMark	Lifescience Biotage
Detection from culture Accuprobe (HPA) (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> group A and B, <i>Enterococcus</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>) PNA FISH <i>Staphylococcus aureus</i> (FISH) PNA FISH <i>Enterococcus faecalis</i> (FISH)	Gen-Probe AdvanDX
Gamme Genotype® EHEC: Detection and identification of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC) Enterococcus: Genetic identification of enterococci and resistance to vancomycin Blood Culture: Identification of Gram + and Gram- bacteria from blood cultures Staphylococci: Identification of staphylococci, <i>mecA</i> gene and PVL gene MicroIDent: Detection and genetic identification of anaerobic periodontal bacteria	Biocentric
Direct detection in clinical specimens: GASDirect (HPA): <i>Streptococcus</i> group A BD Affirm VPIII Microbial Identification Test: Direct identification of bacteria that cause vaginites (<i>Candida</i> sp., <i>Gardnerella vaginalis</i> and <i>Trichomonas vaginalis</i>) (DNA hybridization probe)	Gen-Probe Becton-Dickinson
Test IDI-Strep B (<i>Streptococcus</i> B-Direct Hybridation) Test IDI-MRSA (Detection of methicillin resistance of <i>Staphylococcus aureus</i> -Direct hybridization) SepCheck (FISH in whole blood) (<i>Staphylococcus aureus</i> , Coagulase negative <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus faecium</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Enterobacterium</i> spp) TOCScan (Quantification of bacteria-Real-time PCR SYBR-Green) Genotype® MRSA Direct (reverse dot-blot): methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> direct detection	GeneOhm Science RiboTechnologies/ Microscreen Biocentric
Bacterial detection: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> and coagulase negative staphylococci	Roche
Detection of resistance to therapy: Detection of methicillin resistance of <i>Staphylococcus</i> spp. (<i>MecA</i>) Detection of vancomycine resistance (<i>vanA/vanB</i>) of <i>Enterococcus</i> sp.	
Gamme RealArt artus (Real-time PCR): <i>Borrelia</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i> spp.	Qiagen
Gamme LightCycler (Real-time PCR): <i>Candida albicans</i> detection Detection in whole blood (Real-time PCR): <i>Aspergillus</i> Tracer: <i>Aspergillus</i> spp. detection Multiplex assays	Roche Affigene Seegene IDOHA BIOTECH

- PCR can be used to detect antimicrobial resistance mechanisms (e.g., *mecA* gene which encodes resistance among methicillin-resistant *S. aureus* strains, *van* genes which encode vancomycin resistance among vancomycin-resistant enterococci). Phenotypic methods for resistance detection are still the methods of choice for most resistance mechanisms determinants because of their simplicity. However, the complexity of emerging resistance mechanisms challenges the ability and utility of these classic methods (5, 7). Unfortunately, there are some limitations in the use of molecular methods for the detection of resistance mechanisms. Despite these important advantages, disadvantages still exist, notably inhibitors (e.g., sputum, urine, feces).

As medical research of infectious diseases evolves, it is hoped that these techniques may also be routinely used to investigate host immunogenetic factors and host susceptibility for particular types of infections. Better understanding of pathogen genomics will lead to the discovery of new diagnostic methods and therapies in the future.

Table 5. Bacteria which can be detected by Real-time PCR

Bacteria	
Group A and B <i>Streptococcus</i> spp.	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Bartonella pertussis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Ehrlichia chaffensis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Tropheryma whippelii</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Clostridium difficile</i>

REFERENCES

1. Phaller MA, Caliendo AM, Versalovic J. Molecular biology. In: Isenberg HD, Garcia LS, eds. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: ASM Press, 2007.
2. Lamoril J, Bogard M, Ameziene N, Deybach JC, Bouizegarène P. Molecular biology in clinical microbiology in 2007-Part 1. *Immuno-Anal Biol Spec*, 2007; 22 (1): 5-18.
3. Nolte FS, Caliendo AM. Molecular microbiology. *Manuel of Clinical Microbiology*, Washington DC: ASM Press, No: 10, 2011; 27-59.
4. Greenwood D, Slack R, Peutherer J, Barer M. *Medical Microbiology*. 17th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2007.
5. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. Philadelphia: Mosby Inc, 2007.
6. Chen SC, Kontoyiannis DP. New molecular and surrogate biomarker-based tests in the diagnosis of bacterial and fungal infection in febrile neutropenic patients. *Curr Opin Infect Dis*, 2010; 23 (6): 567-77.
7. Cai HY, Archambault M, Gyles CL, Prescott JF. Molecular genetics methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. *Anim Health Res Rev*, 2003; 4 (2): 73-93.
8. Drancourt M. Molecular identification of bacteria. *Med Mal Infect*, 1998; 28 (4): 380-2.
9. Marcadé G. Rapid diagnostic tests for bacterial infections. *Immuno-Anal Biol Spec*, 2013; 28 (4): 167-73.
10. Sibley CD, Peirano G, Church DL. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect Genet Evol*, 2012; 12 (3): 505-21.
11. Biron M, Berche P, Ferroni A. Contribution of the laboratory to the epidemiologic study of bacterial infections. *Pathol Biol*, 2001; 49 (2): 128-37.
12. Meng QH. Mass Spectrometry applications in clinical diagnostics. *J Clin Exp Immunol Pathol*, 2013. S6: e001. doi:10.4172/2161-0681.S6-e001.
13. Herida M, Michel A, Goulet V, Janier M, Sednaoui P, Dupin N, et al. Epidemiology of sexually transmitted infections in France. *Med Mal Infect*, 2005; 3 (5): 281-9.
14. Miller WC, Ford CA, Morris M, Handcock MS, Schmitz JL, Hobbs MM, et al. Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in United States. *JAMA*, 2004; 291 (18): 2229-36.
15. Anaes - Haute Autorité de Santé. Évaluation du dépistage des infections urogénitales basses à *Chlamydia trachomatis* en France. Rapport 2003. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/Chlamydia_tome2_synth.pdf. Erişim: 02.01.2015

16. Anaes - Haute Autorité de Santé. Place des techniques de biologie moléculaire dans l'identification des infections urogénitales basses à Chlamydia trachomatis. Rapport; 2003. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/Chlamydia_tome1_synth.pdf. Erişim: 02.01.2015
17. Lamoril J, Bogard M, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P. Molecular biology in clinical microbiology in 2007-Part 2. *Immuno-Anal Biologie Spec*, 2007; 22 (2): 73-94.
18. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller, MA. *Medical Microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2013.
19. Hamdad F, Orfila J, Boulanger JC, Eb F. Chlamydia trachomatis urogenital infections in women. Best diagnostic approaches. *Gynecol Obstet Fertil*, 2004; 32(12): 1064-74.
20. Gaydos CA, Roblin PM, Hammerschlag MR, Hyman CL, Eiden JJ, Schachter J, et al. Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture, and serology for detection of Chlamydia pneumoniae in symptomatic and asymptomatic patients. *J Clin Microbiol*, 1994; 32 (4): 903-5.
21. Johnson RE, Green TA, Schachter J, Jones RB, Hook EW III, Black CM, et al. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for Chlamydia trachomatis infections in asymptomatic men. *J Clin Microbiol*, 2000; 38 (12): 4382-6.
22. Diemert D, Libman MD, Lebel P. Confirmation by 16S rRNA PCR of the cobas amplicor CT/NG test for diagnosis of Neisseria gonorrhoeae infection in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol*, 2002; 40 (11): 4056-9.
23. Cook RL, Hutchinson SL, Ostergaard L, Braithwaite RS, Ness RB. Systematic review: noninvasive testing for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *Ann Intern Med*, 2005; 142 (11): 914-25.
24. Mushahwar IK, McGrath LC, Drnec J, Overby LR. Radioimmunoassay for detection of hepatitis B e antigen and its antibody. Results of clinical evaluation. *Am J Clin Pathol*, 1981; 76 (5): 692-7.
25. Olshen E, Shrier LA. Diagnostic tests for chlamydial and gonorrheal infections. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2005; 16 (3): 192-8.
26. Anonymous. CDC (Center for Disease Control). Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections-2002. morbidity and mortality weekly report 2002; 51. <http://www.cdc.gov/std/labguidelines>. Erişim: 02.01.2015.
27. Koeck JL, Chakour M, Teyssou R. Apport de la biologie moléculaire au diagnostic bactériologique. *Rev Franc Lab*, 2001; 2001 (335): 37-41.
28. Tsara V, Serasli E, Christaki P. Problems in diagnosis and treatment of tuberculosis infection. *Hippokratia*, 2009; 13 (1): 20-2.
29. Heifets L. Gen-Probe test should not be considered final in Mycobacterium tuberculosis identification. *J Clin Microbiol*, 1989; 27 (1): 229.
30. Winn WJR, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
31. Nahid P, Pai M, Hopewell PC. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2006; 3 (1): 103-10.
32. Cheng VC, Yam WC, Hung IF, Woo PC, Lau SK, Tang BS, et al. Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Pathol*, 2004; 57 (3): 281-5.
33. Truffot-Pernot C, Veziris N. Bacteriological tests for tuberculosis: standards and perspectives. *Rev Mal Res*, 2011; 28 (8): 1034-47.
34. Brossier F, Veziris N, Aubry A, Jarlier V, Sougakoff W. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *J Clin Microbiol*, 2010; 48 (5): 1683-9.
35. Vernet G, Jay C, Rodrigue M, Troesch A. Species differentiation and antibiotic susceptibility testing with DNA microarrays. *J Appl Microbiol*, 2004; 96 (1): 59-68.
36. Hillemann D, Rüş-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 2009; 47 (6): 1767-72.
37. Walters SB, Hana BA. Testing of susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampin by mycobacterium growth indicator tube method. *J Clin Microbiol*, 1996; 34 (6): 1565-7.
38. Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F. Evaluation of Mycobacteria growth indicator tube (MGIT) for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1999; 3 (4): 344-8.
39. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2005; 24 (11): 711-20.
40. Whelen AC, Felmler TA, Hunt JM, Williams DL, Roberts GD, Stockman L, et al. Direct genotypic detection of Mycobacterium tuberculosis rifampin resistance in clinical specimens by using single-tube heminested PCR. *J Clin Microbiol*, 1995; 33 (3): 556-61.
41. Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2002; 40 (7): 2392-7.

Kuşlarda ve insanlarda *Chlamydomphila psittaci* enfeksiyonu

Chlamydomphila psittaci infection of birds and humans

Bülent BAŞ¹,

Gökçen DİNÇ²

ÖZET

Psittakoz, evcil ve yabani kuşlarda görülen ve *Chlamydomphila psittaci*'nin neden olduğu sistemik, morbiditesi yüksek bir enfeksiyon olup, zoonotik özellik göstermektedir. *C. psittaci*'nin dünya genelinde başta papağan ve muhabbet kuşu olmak üzere 470'in üzerinde kuş türünde hastalığa yol açtığı bilinmektedir. İnsanların gerek yabani gerekse evcil kuşlarla uzun yıllar yakın ilişki içerisinde olduğu bir gerçektir ve bu durum insanlarda enfeksiyonun görülmesine zemin hazırlamaktadır. *C. psittaci*; Gram negatif, obligat, bifazik üreme siklusuna sahip ve intraselüler bir bakteridir. Etken, kuşlar arasında solunum veya fekal-oral yolla bulaşmaktadır. Enfekte kuşlarda klinik olarak iştahsızlık, göz ve burun akıntısı, konjunktivit, rinit, nefes almada zorluk, zayıflama, tüylerde kabarmalar ve ishal gözlenebilir. Enfeksiyonun insanlara bulaşması inhalasyon veya doğrudan temas yoluyla olmakta, kuş ısırması veya insandan insana bulaşma nadir görülmektedir. *C. psittaci*, insanlarda çoğunlukla pnömoni ile seyreden sistemik özellikte bir enfeksiyona yol açar. Tanıda enzime bağlı immün sorbent analiz (ELISA), komplement fiksasyon testi (KFT), mikroimmün fluoressan testi (MIF) gibi serolojik yöntemlerin yanı sıra son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Hem enfekte kuşların, hem de insanların tedavisinde tetrasiklinler veya makrolidler tercih edilmektedir. Hastalığın önüne geçebilmek için özellikle kuşlarda kullanılabilecek ticari bir aşı mevcut olmadığından biyogüvenlik kurallarının düzgün şekilde uygulanması gerek ekonomik yönden gerekse insan

ABSTRACT

Psittacosis is a systemic infection with high morbidity caused by *Chlamydomphila psittaci* in domestic and wild birds. It shows zoonotic characteristic. *C. psittaci* leads an infection in over of 470 bird species worldwide has been known. This is a fact that people have a close relationship both with wild and pet birds and this has paved the way for infection in humans of. *C. psittaci* Gram negative, obligate and intracellular bacterium with biphasic growth cycle. It is transmitted by respiratory and fecal-oral route between birds. Clinically, anorexia, eye and nasal discharge, conjunctivitis, rhinitis, difficulty breathing, weight loss, ruffled feathers and diarrhea may also seen in infected birds. Transmission of infection to humans occurs through inhalation or direct contact and transmission through bird bites or human-to-human is rare. *C. psittaci* usually leads to the systemic infection associated with pneumonia in humans. In recent years, PCR based molecular methods are used as well as serological methods such as ELISA, CFT, MIF in diagnosis. Both of infected birds and humans, tetracyclines and macrolides are preferred for treatment of infection. In order to prevent the disease, due to there isn't any commercial vaccine for especially using in birds, applying biosafety rules is very important in terms of human health and economical aspects. Especially, veterinarians, bird breeders and dealers, poultry farmers and slaughterhouse workers are at high risk for *C. psittaci* infection. Due to the transmission to humans

¹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA

² Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, KAYSERİ



İletişim / Corresponding Author : Bülent BAŞ

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA

Tel : +90 312 317 03 15-4333

E-posta / E-mail : fbulentbas27@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 12.03.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 17.07.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.13281

Baş B, Dinç G. Kuşlarda ve insanlarda *Chlamydomphila psittaci* enfeksiyonu. Turk Hij Den Biol Derg, 2015; 72(1): 73-8.

sağlığı yönünden oldukça önemlidir. Özellikle veteriner hekimler, kuş yetiştiricileri ve satıcıları, kümes hayvanları yetiştiricileri ve kesimhanede çalışanları *C. psittaci* enfeksiyonu açısından yüksek risk altındadır. Psittakoz enfeksiyonunun insanlara bulaşması ve potansiyel biyolojik silah olarak kabul edilmesi nedeni ile halk sağlığı yönünden önemli olduğu düşünülmektedir. Hastalık ile ilgili farkındalığın düşük olması ve hastalığın değişken bir klinik tablo göstermesi dolayısıyla tanıda gözden kaçırılabilirlik olması nedeniyle bu derlemede insan ve kuşlar için enfeksiyon ile ilgili detaylı bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Chlamydomphila psittaci*, insan, kuş, psittakoz

of psittacosis infection and accepting it as a potential biological weapon, it is thought to be important for public health. In this review, it is aimed to give detailed information about infection in human and birds, because it can be missed at the diagnosis, hence there is low awareness about disease and it has got variable clinical symptoms.

Key Words: *Chlamydomphila psittaci*, human, bird, psittacosis

GİRİŞ

Chlamydomphila psittaci evcil ve yabani kuşlarda sistemik, bulaşıcı ve zoonotik bir enfeksiyona yol açmaktadır (1 - 3). Psittacine kuşlarda (muhabbet kuşu ve papağan) ve insanlarda görülen hastalığa "Psittakoz", psittacine grubu kuşlar dışında başta kanaryalar olmak üzere diğer kuşlarda görülen hastalığa ise "Ornithoz" adı verilmektedir. Son yıllarda etkenin adına göre yapılan adlandırma hastalığa "Klamidiyoz" adı verilirken, papağanlardaki hastalığa aynı zamanda "Parrot fever = Papağan ateşi" adı da verilmektedir (4 - 7). Enfeksiyon, insanlarda ilk kez 1879 yılında İsviçre'de görülmüş, 1894 yılında ise enfeksiyonun papağanlardan insanlara bulaştığı kesinlik kazanmıştır. Enfeksiyonda morbidite %50-80, mortalite ise %10-30 arasında değişmektedir. Etkenin, biyolojik silah olarak kabul edilmesi dolayısı ile oldukça önem arz etmektedir (8 - 11). Biyolojik silah olarak kullanılan bakteriler arasında ikincil öneme sahip bakterilerdendir (11).

Ülkemizde kuşlarda bu hastalıkla ilgili çok fazla çalışmaya rastlanılmamıştır. Sareyyüpoğlu ve ark. (12), kafes kuşlarının dışkıları ile yaptıkları moleküler bir çalışmada 47 hayvandan 43'ünde (%91,5) etkenin DNA'sını saptamıştır. Çelebi ve Ak (13), 96 hayvanın dışkı incelemesinde 33'ünde (%34,4) *C. psittaci* DNA'sı belirlediklerini bildirmişlerdir. Karakuzulu (14), su kuşlarında yaptığı serolojik çalışmada 140 hayvandan

91'inde (%65) enfeksiyonun varlığını saptamıştır. Ülmemiz dışında yapılan çalışmalara bakılacak olursa; Hermann ve ark. (15), kloakal svaplarla yaptıkları moleküler bir çalışmada, 431 kuştan %10'unda pozitiflik tespit etmişlerdir. Heddema ve ark. (16), 331 fekal örnekten 26'sında (%7,9) etkenin DNA'sını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Vanrompay ve ark. (17), 308 kuştan 59'unda (%19,2) moleküler olarak etken DNA'sını saptamışlardır. Lima ve ark. (18), yaptıkları bir çalışmada 238 güvercinden 40'ında (%17) etkenin varlığını belirlemişlerdir. Dickx ve ark. (3), 32 güvercin yetiştiricisinin dördünde (%12,5) *C. psittaci* bulaşık olduğunu saptamışlardır. Lagae ve ark. (19), inceledikleri 19 tavuk çiftliğinde çalışan 31 kişiden 29'unun (%93,5) kültür sonuçlarının *C. psittaci* yönünden pozitif bulunduğunu belirtmişlerdir. Kalmar ve ark. (20), yabani kuş bakım evinde yaptıkları bir çalışmada; 42 kuştan 11'inde (%26), aynı yerde çalışan 10 kişinin de üçünde (%30) *C. psittaci* varlığını bildirmişlerdir.

Etiyoloji

Zaman içerisinde *Rickettsia psittaci*, *Ehrlichia psittaci*, *Rickettsia formis psittaci* ve *Chlamidozoon psittaci* gibi isimlerle tanımlanmış olan bu

mikroorganizma kesin sınıflandırmanın yapılmasından sonra *Chlamydophila psittaci* olarak adlandırılmıştır. Gram negatif, kapsülsüz, sporsuz, hareketsiz olan bu mikroorganizmalar obligat intraselüler özellikte bakterilerdir. Etken “Levinthal-Cole-Lillie” inklüzyon cisimciklerine sahiptir ve bu cisimcikler Giemsa veya Macchiavello yöntemleri ile boyanarak tanıda önem arz ederler. *C. psittaci*, laboratuvarlarda kullanılan genel besiyerlerinde üremezler. Etkenin üremesi için canlı hücrelerin bazı moleküllerine ihtiyaç duymaları, üreme aşamasının bakterilerden biraz farklı olması gibi sebepler, izolasyonlarını zorlaştırmakta ve üremeleri için canlı sistemlere ihtiyaç duyulmalarına neden olmaktadır. Etken ancak hücre kültürlerinde, embriyolu tavuk yumurtalarında ve deney hayvanlarında üretilmektedir (4, 17, 21-23).

Epidemioloji

Kuşlarda: *C. psittaci* kanaryalar, muhabbet kuşları ve papağanların dışında tavuk, güvercin, hindi, yaban ördeği gibi birçok kanatlıda, memeli hayvanlarda ve insanlarda da enfeksiyonlara yol açmaktadır (7, 11). Hastalığın 470’den fazla kuş türünü etkilediği bildirilmektedir (3, 24).

Etken, kuşlarda sindirim ve solunum yoluyla bulaşarak enfeksiyona sebep olur. Bu açıdan fekal-oral bulaşma, havada bulunan mikroplu damlacıklar ve kontamine kurumuş fekal tozlar önemlidir. Kuşlar, iyi olmayan bakım koşulları, yetersiz beslenme, stres faktörleri ve immün sisteme olumsuz etki eden nedenler predispozisyon yaratmaktadır. Sağlıklı kuşların bulunduğu yere, herhangi bir sağlık kontrolünden geçirilmeden, karantina süresine dikkat edilmeden getirilen diğer kuşlar, hastalığın yayılmasında önemlidir. Hasta hayvanların sekret ve ekskretlerinde, kontamine tüylerinde etkene fazlaca rastlanır. Tıksırma ile havaya karışan etken soluk alma ile diğer hayvanların akciğerlerine kadar ulaşabilir. Bu tarz bulaşma özellikle fazla sayıda kuşun olduğu yerlerde önemlidir. Etken sokucu sineklerle ve böceklerle de taşınabilmektedir. Ayrıca, vertikal bulaşma muhabbet kuşu, tavuk, ördek, kaz gibi hayvanlarda gözlenmiş, fakat bu tarz bulaşma oranının düşük olduğu bildirilmiştir (3, 4, 10, 23, 25).

İnsanlarda: Hastalık insanlara enfekte kanatlı salgılarının, dışkı tozlarının solunması ile ya da doğrudan temas sonucu bulaşmaktadır. Özellikle evde beslenen kuşların kontamine gaitaları kafesin tabanındaki kağıt üzerinde toplanmaktadır ve mikropla bulaşık kuru gaita tozlarının inhalasyonu sonucu insanlarda enfeksiyon şekillenmektedir. Bu nedenle özellikle kafes kuşu yetiştiricileri gibi çok sayıda hayvanla uğraşanların maske kullanmaları ve gaita ile kontamine kağıdı değiştirirken dikkatli olmaları gerekmektedir. İnsandan insana bulaşma da aerosol yolla olup nadir gözlenmekte ve bu tür şekillenen bulaşlar daha ağır seyirli bir enfeksiyona yol açmaktadır. (4, 21, 22, 26-28).

Semptomlar

Kuşlarda: Enfeksiyon kuşlara (yaş, ırk, duyarlılık vs.), etkene (miktar, virulens), çevresel koşullara (stres, kalabalık, bakım-besleme, hijyen vs.) göre değişmek üzere asemptomatikten kroniğe kadar değişik derecelerde seyretmektedir (4, 29).

Hastalığın inkübasyon süresi konakçının duyarlılığına, mikroorganizmanın giriş yoluna, virülansına, miktarına, hayvanın yaşına ve çevresel koşullara göre 5-60 gün arasında değişmektedir. Klinik belirtiler, oluşan enfeksiyonun şiddetine göre değişiklik göstermektedir (23, 30).

Kanarya gibi “nonpsittacine” grubu kuşlarda durgunluk, hareketsizlik, tüylerin kabarması, göz ve burundan akıntı gelmesi, konjunktivitis, iştahsızlık, zayıflama gibi genel bulgular dışında soluk almada zorluk ve hırıltılı soluma, öksürük, tıksırık, ses tonunda değişimler, ötmeye isteksizlik, yeşilimsi bir ishal ve dışkıda urat kristallerinin bulunması gibi özel bulgular da meydana gelebilir (5, 12, 31-34). Mortalite ise hastalığın şiddetine göre değişiklik göstermektedir (31). Nekropsi bulgularına bakıldığında, üst solunum yollarının etkilendiği görülür. Burun, larinks, soluk borusu ve bronşların mukozaları hiperemik ve üzerlerinde fazla miktarda mukoid madde birikimine rastlanır. Akciğerlerde de hastalığın şiddetine göre tek ya da çift taraflı pnömoni lezyonlarına rastlanabilir (4, 23).

Muhabet kuşu ve papağan gibi psittacine grubu kuşlarda asemptomatikten kroniğe kadar değişen semptomlar gözlenir. Mortalite oranı genellikle düşük düzeyde kalmaktadır. Enfekte kuşların büyük çoğunluğu klinik belirtiler göstermeden etkeni asemptomatik olarak taşıyabilir ve etrafı kontamine edebilirler (2, 4). Bu tarz subklinik olgularda etkilenen kuşlar yoğun stres altında kalırsa hastalanarak etkeni daha çok dışarı saçarlara (4).

Aktif olgularda tüylerde kabarma, konjunktivitis, rinitis, nefes zorluğu, zayıflama, ishal, poliüri, tüylerde matlaşma gözlenebilir. Bu bulguların hepsini tek bir kuşta görmek mümkün değildir. Nadiren sinirsel semptomlara bağlı olarak boyunda bükülmeler ve bacaklarda paraliz gelişebilir. Nekropside karaciğer ve dalakta büyüme, akciğerde ödem, pnömoni, miyokarditis gözlenebilir (4).

İnsanlarda: *C. psittaci* insanlarda respiratuvar enfeksiyona yol açar ve klinik semptomlar oldukça değişkendir. Enfeksiyon insanlarda hafif gribal semptomlar veya ağır seyirli atipik pnömoni semptomları ile kendini gösterir. Enfeksiyonun inkübasyon periyodu 7-21 gün arasındadır. Hastalarda halsizlik, ateş, üşüme-titrete nöbetleri, baş ağrısı, boğaz ağrısı, öksürük, iştahsızlık ve miyalji şekillenir. Çoğunlukla bronko-pnömoni gözlenebilir. Enfeksiyon, hafif olgularda 10-14 gün, ağır olgularda ise 3-7 hafta kadar sürer. Hastalığın nadiren perikardit ve miyokardit veya tromboembolik komplikasyonlar ile de seyredebileceği bildirilmiştir. Enfeksiyon, primer atipik pnömoni, bruselloz, tifo, influenza, tüberküloz gibi hastalıklarla karıştırılabilir. (1, 9, 21, 28).

Teşhis

Kuşlarda: Nekropside karaciğer ve dalakta büyüme, perikarditis, sinusitis, hava keselerinde yangı, enteritis, pnömoni ve peritonitis şekillendiği bildirilmiştir (28).

Klinik ve nekropsi bulgularına bakılarak kesin teşhis yapılamamaktadır. Bu nedenle laboratuvar muayenelerine gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla, hasta hayvanlardan alınan kan, burun

ve sinüs akıntıları, larinks ve trakeal svaplar laboratuvara gönderilir. Sekretlerden ve svaplardan yapılan preparatlar Stamp veya Giemsa boyama yöntemine göre boyanabilir. Stamp boyama sonrasında pembe renkte çok küçük boyutlarda etkenler görülmelidir. Giemsa boyama sonrasında ise etkenler hücre içinde veya dışında mavi renkte görülmelidir (4, 23). Alınan bu materyallerden hazırlanan inokulumların, farelere intranasal yolla, genç kobaylara intraperitoneal yolla enjekte edilmesi ve/veya 6-7 günlük embriyolu tavuk yumurtasına ekim yapılmasıyla etken izolasyonuna yapılabilir. Her ne kadar etken izolasyonu geçerli bir yöntem olsa da çoğu zaman başarılı sonuç alınamayabilir. Sonuçların negatif çıkması da hiçbir zaman kuşlarda psittakoz olmadığı anlamına gelmemektedir (4).

Serolojik olarak serumlarda etkene karşı bulunan spesifik antikorlar, duyarlı serolojik testlerle (ELISA vb.) ortaya konabileceği gibi, dokularda etkene ait spesifik antijenlerin saptanmasında ELISA'nın yanı sıra indirekt immun floresans antikor testi (İİFAT) de kullanılabilir. Hayvanlar küçük olmasına rağmen yeterli miktarda serum alınabilirse, KFT, agar jel immun difüzyon testi (AGİD) ve lateks aglutinasyon testi (LAT) de yapılabilir. Ayrıca, son dönemlerde sıklıkla moleküler yöntemler teşhiste etkili bir şekilde kullanılmaktadır (4, 10, 36)

İnsanlarda: *C. psittaci* yüksek virulansa sahip bir mikroorganizma olduğu ve laboratuvar kazaları sırasında kolay bulaş olabileceği için özel ekipmalı biyogüvenlik 3 düzeyinde laboratuvarlara ihtiyaç duyulmaktadır. Hastalığın akut dönemi ve antibiyotik kullanımından önce etken izolasyonu, tanı için önemlidir. Tanı amacıyla balgam, plevral sıvı veya pıhtılaşmış kan örnekleri kullanılabilir. Etken izolasyonu için önceleri embriyolu tavuk yumurtasına ekim yöntemi kullanılırken son yıllarda Buffalo Green Monkey, McCoy, Hela, Vero ve L-929 hücre hatlarından yararlanılmaktadır. Hastalığın tanısında insanlar için de kuşlarda olduğu gibi serolojik yöntemler de (ELISA, KFT, mikro-immunofluoresans) kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda moleküler teknikler özellikle multiple nested PCR temelli ompA saptama testi rutin olarak

tercih edilmeye başlamıştır. Ayrıca kantitatif Real Time PCR, sekans analizi ve microarray de ayrıntılı genotipik incelemelerde kullanılmaktadır (28, 36, 37).

Sağaltım

Kuşlarda: Hasta hayvanlar, ayrı bir kafese alınarak bakım ve beslemelerine dikkat edilmelidir. Yemlere vitamin ve mineral takviyesi yapılarak immun sistemi kuvvetlendirmek faydalı olabilir. Hayvan bakıcıları, hasta hayvanların yanına koruyucu kıyafetlerini (tulum, başlık, maske ve eldiven) giyerek girmelidirler. Hasta kuşlara geniş spektrumlu antibiyotikler, yemlerine katılmak suretiyle verilebilir. Tedavi genellikle uzun sürmekte ve antibiyotik seçimi ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir (4, 23).

İnsanlarda: Tedavide doksisisiklin veya tetrasiklin hidroklorid gibi tetrasiklinler başta olmak üzere azitromisin ve eritromisin gibi makrolidler de kullanılabilir. Ancak antibiyotiklerin özellikle tetrasiklinlerin kanatlı endüstrisinde sıklıkla kullanılması nedeniyle *C. psittaci* suşlarında direnç gelişimi de bildirilmiştir (28, 38).

Koruma ve Kontrol

Kuşlarda: Biyogüvenlik önlemlerinin eksiksiz alınması bulaşmanın önüne geçilmesi açısından önemlidir. Özellikle dezenfeksiyon ve hijyen ön plana çıkmaktadır. Yeni alınan kuşlar sürüye katılmadan önce 20-25 gün karantina altına alınarak spesifik testlere tabi tutulmalıdır. Kloakal svaplar kullanılarak etken izolasyonu yapılabileceği gibi moleküler yöntemlerle de hastalık varlığına bakılabilir. Kafesler periyodik aralıklarla temizlenmelidir. Kuşların bulunduğu ortamın havalandırılmasına dikkat edilmelidir (4, 23, 39).

İnsanlarda: Kuşların enfeksiyondan korunması ve belirli aralıklarla test programlarının yapılması insanlardaki en önemli korunma yollarından birisidir. Hayvanlarla temas sonrasında ellerin yıkanması, kalabalık yetiştiricilik yapılan yerlerde maske ve koruyucu kıyafetlerin kullanımı, iyi hijyen şartlarının yerine getirilmesi, havalandırmanın iyi yapılması, kafeslerin düzenli olarak dezenfektanlarla temizlenmesi korunmada önemlidir. (28, 39).

KAYNAKLAR

1. Kılıç A, Doğanç L. Chlamydia cinsi bakteriler. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2003; 33: 365-76.
2. Özbey G, Kalender H, Muz A. Avian klamidiyozis. FÜ Sağ Bil Derg, 2008; 22 (1): 41-8.
3. Dickx V, Beeckmen DSA, Dossche L, Tavernier P, Vanrompay D. *Chlamydomphila psittaci* in homing and feral pigeons and zoonotic transmission. J Med Microbiol, 2010; 59: 1348-53.
4. Arda M. Kafes kuşu hastalıkları. 1. Baskı. Ankara: Ayban matbaacılık ve yayıncılık. 2008.
5. Zweifel D, Hoop R, Sachse K, Pospischil A, Borel N. Prevalance of *Chlamydomphila psittaci* in wild birds-potential risk for domestic poultry, pet birds, and public health? Eur J Wildl Res, 2009; 55: 575-81.
6. Zhou J, Qiu C, Lin G, Cao X, Zheng F, Gong X, et al. Isolation of *Chlamydomphila psittaci* from laying hens in China. Vet Res, 2010; 3 (3): 43-5.
7. Madani SA, Peighambari SM, Barin A. Isolation of Chlamydomphila psittaci from pet birds in Iran. Int JVR, 2011; 5 (2): 95-8.
8. Özbal Y. Klamidyalar. In: Ustaçelebi Ş. ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti., 1999: 705-14.
9. Anğ Ö, Tümbay E, Anğ Küçükler M. Zoonozlar hayvandan insana bulaşabilen enfeksiyon hastalıkları, 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2011.
10. West A. A brief review of *Chlamydomphila psittaci* in birds and humans. J Exot Pet Med, 2011; 20(1): 18-20.
11. Kılıç S. Biyolojik silah olarak bakteriler "kategori A akanlar" Türk Hij Den Biyol Derg. 2006; 63(1,2,3): 21-46.
12. Sareyyopoglu B, Cantekin Z, Bas B. *Chlamydomphila psittaci* DNA detection in the faeces of cage birds. Zoonozes Public Hlth, 2007; 54(6-7): 237-42.
13. Çelebi BS, Ak S. A comparative study of detecting *Chlamydomphila psittaci* in pet birds using isolation in embryonated egg and polymerase chain reaction. Avian Dis, 2006; 50: 489-93.

14. Karakuzulu H. Türkiye'de önemli hayvanat bahçelerinde bulunan su kuşları ve bakıcılarında *Chlamydia psittaci* prevalansının belirlenmesi. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2003.
15. Herrmann B, Persson H, Jensen JK, Loensen HD, Klint M, Olsen B. *Chlamydia psittaci* in fulmars, the Faroe Islands. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12 (2): 330-32.
16. Heddema ER, Sluis S, Buys JA, Vandenbroucke-Grauls CME, Wijnen JH, Visser CE. Prevalence of *Chlamydia psittaci* in fecal dropping from feral pigeons in Amsterdam, The Netherlands. *Appl Environ Microb*, 2006; 72 (6): 4423-5.
17. Vanrompay D, Harkinezhad T, Walle M, Beeckman D, Droogenbroeck C, Verminnen K, et al. *Chlamydia psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg Infect Dis*, 2007; 13 (7): 1108-10.
18. Lima VY, Langoni H, Silva AV, Pezerico SB, Costra APB, Silva RC, et al. *Chlamydia psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from Sao Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*, 2011; 175: 9-14.
19. Lagae S, Kalmar I, Laroucau K, Vorimore F, Vanrompay D. Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. *J Med Microbiol*, 2013; DOI: 10.1099/jmm.0.064675-0.
20. Kalmar ID, Diczek V, Dosche L, Vanrompay D. Zoonotic infection with *Chlamydia psittaci* at an avian refuge centre. *Vet J*, 2014; 199: 300-2.
21. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji, özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları, 10.Baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 2000: 601-3.
22. Harkinezhad T, Verminnen K, Buyzere MD, Rietzschel E, Bekaert S, Vanrompay D. Prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds. *J Med Microbiol*, 2009; 58: 1207-12.
23. Anonymous. World Organisation for Animal Health (OIE). Manual of diagnosis tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.3.1. Avian Chlamydiosis. 2012. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.01_AVIAN_CHLAMYD.pdf Erişim tarihi: 03.02.2014.
24. Kaleta EF, Taday EM. Avian host range of *Chlamydia* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol*, 2003; 32 (5): 435-61.
25. Vanrompay D, Ducatella R, Haesebrouck F. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol*, 1995; 45 (2-3): 93-119.
26. Huminer D, Pitlik S, Kitayin D, Weissman Y, Samra Z. Prevalence of *Chlamydia psittaci* infection among persons who work with birds. *Isr J Med Sci*, 1992; 28 (10): 739-41.
27. Saito T, Ohnishi J, Mori Y, Linuma Y, Ichihaya S, Kohi F. Infection by *Chlamydia avium* in an elderly couple working in a pet shop. *J Clin Microbiol*, 2005; 43 (6): 3011-3.
28. Beeckman DS, Vanrompay DC. Zoonotic *Chlamydia psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect*, 2009; 15 (1): 11-17.
29. Greco G, Corrente M, Martella V. Detection of *Chlamydia psittaci* in asymptomatic animals. *J Clin Microbiol*, 2005; 43 (10): 5410-11.
30. Arda M. Hindi hastalıkları. BESD-BİR Beyaz Et Sanayicileri ve Damızlıkçıları Birliği Derneği İktisadi İşletmesi. Ankara, 2006; 145-8.
31. Mohan R. Epidemiologic and laboratory observations of *Chlamydia psittaci* infection in pet birds. *J Am Vet Med Assoc*, 1984; 184 (11): 1372-74.
32. Elder J, Brown C. Review of techniques for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection in psittacine birds. *J Vet Diagn Invest*, 1999; 11: 539-41.
33. Ramon PM, Oronan RB, Toledo SU. Detection of *Chlamydia psittaci* antibodies from captive birds at the Ninoy Aquino Parks and Wildlife Nature Center, Quezon city, Philippines. *Ann Agric Environ. Med*, 2007; 14: 191-93.
34. Gartrell BD, French NP, Howe L, Nelson NJ, Houston M, Burrows EA, et al. First detection of a *Chlamydia psittaci* from a wild native passerine bird in New Zealand. *New Zeal Vet J*, 2013; 61: 174-76.
35. Andersen AA, Grimes JE, Wyrick PB. Chlamydiosis (Psittacosis, Ornithosis). In: Calnek BW, Barnes JJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, eds. *Diseases of Poultry*, 10th ed. Ames, IA Iowa State University Press. 1997; 33-349.
36. Geens T, Dewitte A, Boon N, Vanrompay D. Development of a *Chlamydia psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. *Vet Res*, 2005; 36 : 787-97.
37. Sachse K, Laroucau K, Hotzel H, Schubert E, Ehrlich R, Slickers P. Genotyping of *Chlamydia psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of ompA genes. *BMC Microbiol*, 2008; 8: 63.
38. Senn L, Hammerschlag MR, Greub G. Therapeutic approaches to *Chlamydia* infections. *Expert Opin Pharmacol*, 2005; 6 (13): 2281-90.
39. Smith KA, Bradley KK, Stobierski MG, Tengelsen LA. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (Psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). <http://www.cste2.org/webpdfs/PComp2006.pdf> Erişim Tarihi: 05.02.2014.

Laktik asit bakterilerinde çoğunluğu algılama mekanizması

Quorum sensing mechanism in lactic acid bacteria

Hatice YILMAZ-YILDIRAN¹, Aynur Gül KARAHAN², Gülden BAŞYİĞİT-KILIÇ³

ÖZET

Uzun yıllar mikroorganizmaların sadece çoğalan, besin arayan kendi başlarına yaşayan hücreler oldukları düşünülmüştür. Ancak 50 yıl önce mikrobiyologlar tarafından bakterilerin birbirleri ve çevreleri ile iletişim kurduklarının anlaşılması ile mikroorganizmaların dünyasına bakış açısı değişmiştir. İletişimde kullanılan dil, sinyal moleküllerinden oluşmakta ve sinyal moleküllerine genel olarak "otoindükleyici" adı verilmektedir. Bakteriler üretilen sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, bu sayede ortamdaki diğer mikroorganizmaların miktarını algılayabilmekte ve türe özgü davranışlar sergileyebilmektedirler. Yapılan çalışmalar; farklı mikroorganizmaların farklı çoğunluğu algılama (ÇA) moleküllerini kullandıklarını, hatta bazı mikroorganizmaların bir kaç çeşit sinyal molekülünü birden kullandığını ortaya koymuştur. LuxI/LuxR sistemi, oligopeptid sistemi ve hibrit sistem olmak üzere üç çeşit çoğunluğu algılama mekanizması tanımlanmıştır. Bu mekanizmalarda kullanılan sinyal molekülü ve bu molekülün algılanması birbirinden farklıdır. Çoğunluğu algılama ile ilgili ilk çalışmalar deniz suyunda yaşayan *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi* bakterileri üzerinde yapılmış ve sonraki aşamada patojen bakteriler üzerine yoğunlaşmıştır. Spor oluşturma, konjugasyon, biyoluminesans, biyofilm oluşturma, antibiyotik üretimi ve bakteriyosin üretimi gibi türe özgü pek çok davranış ÇA mekanizması ile kontrol edilmektedir. ÇA mekanizmasının anlaşılması, patojen mikroorganizmalarla etkili şekilde

ABSTRACT

For a long time, microorganisms were considered as just multiplying, finding nutrients and living by themselves organisms. But that belief changed 50 years ago along with the discovery of bacteria communication with each other and environment by microbiologists. The language used in the communication consists of signal molecules and these molecules are generally called "auto inducer". Bacteria are capable of measuring density of these molecules and by this way they are able to detect amount of the other organisms and can have specific behaviors. Studies prove that different types of bacteria use different quorum sensing molecules, and some species use several kinds of signal molecules together. There are three described quorum sensing mechanisms; LuxI/LuxR, oligopeptide and hybrid system. Among these systems, type of signal molecules and their perceptions are different from each other. The first quorum sensing studies are accomplished on *Vibrio fischeri* and *Vibrio harveyi* and then focused on pathogen microorganisms. Many specific behaviors such as spore forming, conjugation, bioluminescence, biofilm forming, antibiotic production and bacteriocin production are controlled by quorum sensing mechanisms. Understanding of QS mechanism is very important in the terms of effective struggling with pathogen microorganisms and understanding behavior of lactic acid bacteria. Because of lactic

¹ Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, İl Müdürlüğü, BURDUR

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İSPARTA

³ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, BURDUR



İletişim / Corresponding Author : Hatice YILMAZ-YILDIRAN

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, İl Müdürlüğü, BURDUR

Tel : +90 248 233 10 45

E-posta / E-mail : hayilmaz79@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 02.06.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 07.01.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.04695

Yılmaz-Yıldiran H, Karahan AG, Başyigit-Kılıç G. Laktik asit bakterilerinde çoğunluğu algılama mekanizması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 79-90.

mücadele edilmesinde ve laktik asit bakterilerinin davranışlarının anlaşılmasında son derece önemlidir. Ancak laktik asit bakterilerinin ÇA mekanizmasının çok farklı sinyal moleküllerinin kullanılması ve algılamanın olaylar dizisi şeklinde gerçekleşmesi nedeniyle anlaşılması zordur. Bu derlemede, sağlık üzerine olumlu katkı sağlayan probiyotik özellikteki laktik asit bakterilerinin konakçısı ile uyumu, sindirim sistemindeki patojenlerin gelişimini ve koloni oluşturmasını engellemesi, bakteriyosin üretimi, asit koşullara ve safra tuzlarına dayanımı, epitel hücrelere tutunma gibi pek çok özelliğinin ÇA ile bağlantısı değerlendirilmiştir. Laktik asit bakterileri tarafından kullanılan ÇA mekanizmasının anlaşılması ile yeni dönem probiyotikler olarak tanımlanan metabiyotiklerin tasarlanmasında yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, çoğunluğu algılama, sinyal molekülü

acid bacteria use different type of signal molecules and detection occurs as a consequence it is hard to understand their QS mechanism. In this review, connection between QS mechanism and some characteristics of lactic acid bacteria are evaluated such as concordance with its host, inhibition of pathogen development and colonization in gastrointestinal system, bacteriocin production, acid and bile resistance, adhesion to epithelium cells. Understanding QS mechanism of lactic acid bacteria will be useful to design metabiotics which is defined as novel probiotics.

Key Words: Lactic acid bacteria, Quorum sensing, Signal molecule

GİRİŞ

Mikroorganizmalar, günlük yaşantımızın hemen her alanında varlıklarını hissettirmektedirler. Mikroorganizmaların bulunmadığı bir yer düşünmek neredeyse imkânsızdır. İnsan hayatında mikroorganizmalarla sürekli iletişim ve etkileşim söz konusudur. Bu ilişki ve etkileşim sonucunda karşılıklı fayda ve zarar ortaya çıkmakta ve insanoğlu bu iletişimi kendi yararına yönelik kullanmak için çaba sarf etmektedir. Ancak bunu başarabilmenin en iyi yolu; mikroorganizmaları çok iyi tanımak, davranışlarını ve dillerini iyi anlamaktır (1).

Çoğunluğu Algılama (ÇA); çoğunluk (quorum) ve hissetme, algılama (sensing) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşturulmakta ve ilk çalışmalar 1960'li yıllara kadar dayanmaktadır. Bu alanda ilk çalışmalar deniz suyunda yaşayan *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi* bakterileri üzerinde yapılmıştır (2). Deniz suyunun mililitresinde 100'den daha az sayıda bulunan bu iki bakterinin normal şartlarda ışına yapmadığı, ancak bazı deniz balıklarının ışık

organellerinde 10^{10} - 10^{11} seviyesine ulaştıklarında ışımaya neden olduklarının tespit edilmesi ile ÇA mekanizması anlaşılmuştur. Buradaki sinyal molekülünün S-adenozil metiyonin türevi bir açıl-homoserin lakton olduğu açıklanmış ve bu sinyal molekülünün sentezinden sorumlu genler tanımlanmıştır. Bu sistem, bundan sonraki ÇA çalışmaları için model olarak kullanılmış ve çalışmalar bu doğrultuda ilerlemiştir (3). Bu derlemede, sağlık üzerine olumlu katkı sağlayan probiyotik özellikteki laktik asit bakterilerinin konakçısı ile uyumu, sindirim sistemindeki patojenlerin gelişimini ve koloni oluşturmasını engellemesi, bakteriyosin üretimi, asit koşullara ve safra tuzlarına dayanımı, epitel hücrelere tutunma gibi pek çok özelliğinin ÇA ile bağlantısı değerlendirilmiştir. Laktik asit bakterileri tarafından kullanılan ÇA mekanizmasının anlaşılması ile yeni dönem probiyotikler olarak tanımlanan metabiyotiklerin tasarlanmasında yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

1. ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA MEKANİZMASI

Yapılan çalışmalar farklı mikroorganizmaların farklı ÇA mekanizmaları ve moleküllerini kullandıklarını, bazı durumlarda bir kaç çeşit sinyal molekülünün aynı anda kullandığını ortaya koymuştur. Farklı türde olmalarına rağmen aynı sinyal molekülünü kullanan mikroorganizmaların varlığı da ispatlanmıştır (4).

Mikroorganizmaların iletişim kurmak için ürettiği sinyal moleküllerine genel olarak “otoindükleyici-OI” adı verilmektedir. Bu moleküller besi ortamına salınır, diğer hücreler tarafından algılanır ve bu moleküllere yanıt verilir. ÇA mekanizması türe özgü farklılıklar göstermektedir. Bu mekanizmayı kullanan mikroorganizmalarda, örneğin bakterilerde, ortamda yeterince besin maddesi bulunmazsa, hücre sayısı belirli bir eşik değere ulaşmadığından, bu mekanizma aktif hale geçmez ve türe özgü davranışlar sergilenmez (5).

ÇA'nın ilk aşamasında, her türün kendine özgü genleri kullanarak, ekspanansiyel fazın sonlarına doğru artan miktarda sinyal molekülü ürettiği görülmektedir. Sinyal moleküllerinin ortama salınmasının ise hücre zarı yapısındaki özel bir sistem aracılığıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir (6). İkinci aşamada, sinyal moleküllerinin değişime uğratılması ve besi ortamına salınması protein yapısındaki özel moleküller aracılığı ile olmaktadır. Üçüncü ve son aşamada, sinyal moleküllerinin algılanması iki şekilde gerçekleşmektedir. Birinci aşama, sinyal molekülünün hücre içine alınması, ikincisi ise molekülün hücre içine alınmadan, hücre zarındaki alıcı bölgeler ile algılanmasıdır (7).

Bu mekanizma içinde kullanılan sinyal molekülleri genel olarak üç grupta toplanmaktadır. Bunlar; açıl-homoserin lakton (AHL veya HSL) türevleri, oligopeptitler ve furanosil borat diester türevleridir (8).

AHL molekülleri Gram negatif bakteriler, oligopeptit grubu sinyal molekülleri ise Gram pozitif bakteriler tarafından kullanılmaktadır.

Furan türevleri ise bazı Gram negatif veya Gram pozitif bakterilerde ikincil sinyal molekülü olarak görev alır (2).

Bu mekanizma içerisinde yer alan sinyal moleküllerinin çeşidi ve bu moleküllerin algılanma şekline göre üç çeşit ÇA mekanizması vardır. Bunlar:

1. LuxI/LuxR Sistemi (Gram negatif bakterilerde)
2. Oligopeptit Sistemi (Gram pozitif bakterilerde)
3. Hibrit Sistem (Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde) (9).

1.1. LuxI/LuxR Sistemi

Gram negatif bakterilerde bulunan bu sistemde, LuxI ve LuxR olarak adlandırılan düzenleyici iki protein rol alır. Üreme ortamına AHL'nin sentezinden sorumlu otoindükleyici sentaz olan LuxI tipi enzimler tarafından sentezlenerek salgılanan bu moleküller, ortamda birikmeye başlar ve belli bir eşik değere ulaşmadan hücrelerde bir uyarılma gerçekleşmez. Sinyal moleküllerinin hücre zarında tanınarak, sitoplazmaya alınması ile molekül algılanmış olur. Sitoplazma içindeki sinyal molekülleri, LuxR tipi transkripsiyonel düzenleyiciler tarafından algılanır (10). AHL sinyal moleküllerinin transkripsiyon faktörlerine (TF) bağlanarak aktifleşmesini sağlar. TF ise ilgili operonların promotörlerine bağlanarak gen ekspresyonunu düzenler. Böylece her tür kendine özgü davranışı sergiler. Gram negatif bakterilerin kullandığı sinyal molekülü ilk kez *V. fischeri*'de keşfedilen N-açıl-homoserin lakton (AHL) türevleridir. Çoğunluğu algılama mekanizmalarına yönelik çalışmalar en fazla Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Salmonella* türleri üzerinde yoğunlaşmıştır (8).

1.2. Oligopeptit Sistemi

Bu sistemde otoindükleyici peptitler (OIP) olarak bilinen oligopeptitler salgılanır. Bunlar 5-17 aminoasitten oluşmaktadır. Oligopeptit sisteminde sinyal moleküllerinin algılanma mekanizması ise iki bileşenli algılama sisteminden oluşur. Bu sistemi

oluşturan proteinlerden biri hücre zarına yerleşmiş olan bir histidin kinazdır. Diğeri ise histidin kinazın aktif olmasına bağlı olarak çalışan bir TF'dir (11). Salgılanan sinyal molekülü miktarı eşik değere ulaştığı zaman, hücre yüzeyindeki alıcı bölgeler ile sinyal molekülü etkileşimi sonucunda histidin kinaz proteinleri aktifleşir. Bu şekilde aktifleşen yüzey proteinleri sistemin ikincil bileşeni olan TF proteini fosforlayarak aktifleştirir. Böylece ÇA mekanizmasına bağlı davranışların gerçekleşmesi sağlanır. Gram pozitif bakterilerde, Gram negatif bakterilerde olduğu gibi AHL aracılığıyla oluşan ÇA sistemi bulunmamaktadır. Gram pozitif bakterilerin oligopeptit sistemini kullandıkları bildirilmiştir (12). *Bacillus* türleri, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus* türü bakteriler bu sistemi kullanan ve üzerinde en çok çalışma yapılan bakterilerdir (13).

1.3. Hibrit Sistem

Hibrit sistem bazı özellikleri açısından LuxI/LuxR sistemine, bazı özellikleriyle de oligopeptit sistemine benzerlik göstermektedir. Hibrit sistemde, iki çeşit sinyal molekülü kullanılır. Birincisi Gram negatif bakterilerde görülen AHL türevleridir. İkinci sinyal molekülü ise furan türevlerinden oluşur. Sinyal molekülleri diğer sistemlerde olduğu gibi belli eşik değere ulaştığı zaman hücreler tarafından algılanır. Algılama sisteminde her iki sinyal molekülü oligopeptit sistemine benzer şekilde, hücre zarında yer alan iki bileşenli sistemler tarafından algılanır. Bu sistem, sinyal moleküllerinin hücre içine alınmayıp hücre zarından algılanması yönüyle oligopeptit sistemine benzemektedir (14).

Hibrit sistemde, LuxLM proteini tarafından üretilen OI-1 sinyal molekülü LuxN proteini tarafından alınır. OI-2 sinyal molekülü ise luxS geninde kodlanan LuxS proteininin LuxP'ye bağlanması ile oluşan LuxQ proteini tarafından alınır. Her iki sistemde de membrana bağlı histidin kinazlar olan LuxN ve LuxQ, sinyal molekülü hücre içine alınırken sinyal molekülüne çok basamaklı bir izyolu

ile fosfat gruplarını ekler. Bu yolla iletilen sinyal molekülü düşük hücre yoğunluğunda LuxO proteini ile birleşir ve luxCDABE genlerinin transkripsiyonunu engeller. Yüksek hücre yoğunluğunda ise LuxN ve LuxQ, LuxO üzerindeki fosfat gruplarını alır. Böylece alıcı proteinin sentezi gerçekleşmeyeceğinden transkripsiyon aktivatörü olan LuxR, luxCDABE gen ekspresyonunu uyarır. Böylece türe özgü davranışlar gerçekleşir (3, 11).

Bakterilerde türler arası iletişimi sağlayan molekül OI-2 olup, birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakteri tarafından üretilmektedir. OI-2'nin varlığı ilk kez *V. harveyi*'de, daha sonra *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella flexneri* ve *Salmonella typhimurium* gibi birçok bakteri kültürünün üst kısımlarında gösterilmiştir (15).

2. ÇA MEKANİZMASINI KULLANAN CANLILAR VE BU MEKANİZMA İLE KONTROL EDİLEN DAVRANIŞLAR

ÇA mekanizması başlangıçta sadece bakteriler tarafından kullanılan bir mekanizma olarak düşünülse de aynı türe ait bakteriler arasında farklı bakteri türleri arasında ve prokaryot canlı ile ökaryot konakçısı arasında da görülmektedir (16, 17).

ÇA mekanizması ile kontrol edilen pek çok fenotipik özellik, hücre konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili olduğundan mekanizmanın ve mikroorganizmalar tarafından sergilenen davranışların anlaşılabilmesi için üreme eğrilerinden yararlanılmaktadır (18). Hücreler üreme ortamına uyum sağladıktan sonra bölünmeye başlar ve sayıları artmaya devam eder. Bölünme hızı başlangıçta yavaşken, eksponansiyel faza doğru gidildikçe artar. Ancak bu aşamada da hücre yoğunluğu ve ortama salınan sinyal molekülü yoğunluğu azdır. Bu nedenle ÇA genleri henüz aktif değildir. Hücre sayısındaki artışla doğru orantılı olarak ÇA sinyal molekülü ve bu mekanizmanın kontrolü altında sentezlenen moleküller de giderek artar. Durağan fazın

başlangıcında, hem sinyal molekülleri hem de bu moleküller sayesinde sentezlenen diğer moleküller en yüksek konsantrasyona ulaşır. Bu aşamadan sonra ÇA mekanizması ile kontrol edilen türe özgü fenotipik davranışlar sergilenmeye başlar (9).

ÇA mekanizması her tür için farklı olduğu gibi her tür için kullanım amacı da farklıdır. Bu farklılığın nedeni, her türün sahip olduğu genetik bilginin farklı olmasıdır. Bu mekanizma ile spor oluşturma, konjugasyon, biyoluminesans (19), hücre bölünmesi, lag fazından çıkma, biyofilm oluşturma (14, 20-22), hücre dışı enzimlerin salgılanması, virülans faktörlerinin oluşumu (23), antibiyotik üretimi, kommensal-patojen formlar arasında dönüşüm (24), bakteriyosin üretimi (25-27) gibi birçok türe özgü davranış kontrol edilmektedir. Yapılan çalışmalarda; *E. coli* O157:H7'nin virülans özelliklerinin ortaya çıkmasında (28), dişlerde plak oluşumunda (29) ÇA mekanizmasının kullanıldığı belirtilmiştir.

Gıda endüstrisi ve sağlık açısından çok önemli olan biyofilm oluşumu da ÇA mekanizması ile kontrol edilmektedir (13). Biyofilm oluşumu ile ilgili yapılan genetik incelemeler sonucunda, hücre dışı sinyallerin ve ÇA mekanizmasının biyofilm oluşumunda etkili olduğu ortaya konmuştur. *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmaya ile ilgili bir çalışmada; mikrobiyal yük arttıkça biyofilm oluşumunun da arttığı tespit edilirken (17, 30), *S. aureus*'un ÇA mekanizması bloke edildiğinde, biyofilm oluşumunda artış gözlemlendiği bildirilmiştir. *S. aureus*'un daha az sayıda iken biyofilm oluşumunu arttırdığı, yüksek sayıya ulaştığında biyofilm oluşturmaktan vazgeçerek konakçı hücreye saldırdığı düşünülmektedir (31, 32).

Aynen farklı insan topluluklarının farklı diller kullanması gibi farklı mikroorganizmalar da farklı ÇA molekülleri kullandıklarından anlaşamazlar. Hatta bazı mikroorganizmalar birkaç çeşit sinyal molekülünü birden kullanmaktadır. Farklı türde olmalarına rağmen aynı sinyal molekülünü kullanan mikroorganizmaların varlığı da ispatlanmıştır.

Bu tarz çapraz iletişim, çeşitli mikroorganizma gruplarının bir arada bulunduğu sistemlerde (biyofilm gibi) yaygındır (3). Özellikle aynı ekolojik niş içerisinde yer alan türler tarafından, ÇA moleküllerinin ortak olarak kullanıldığı bildirilmiştir (4).

3. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE (LAB) ÇA MEKANİZMASI

Probiyotik özellik gösteren mikroorganizmalar arasında önemli bir yere sahip olan laktik asit bakterileri (LAB) Gram pozitifdir. LAB pek çok fermente gıdada, insan ve hayvanların bağırsak sistemlerinde bulunmaktadır. LAB arasında geniş ve çeşitli bir grup olan *Lactobacillus* cinsi bakteriler sağlık üzerinde olumlu etkilere sahiptir (26). Laktik asit bakterilerinin hangi mekanizmaları kullanarak sağlık üzerine olumlu etki gösterdiği pek çok araştırmaya konu olmuştur. İnhibe edici maddeler üretmek, toksin reseptörlerinin yıkımı, besin maddeleri için rekabet, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve sindirim sistemi boyunca patojenlerin tutunma bölgelerini bloke etmek, probiyotiklerin etki mekanizmaları olarak gösterilmektedir (33).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda; sadece insanlar ve sahip oldukları mikroflora arasındaki karmaşık ilişkinin genel hatları belirlenbilmiştir. Bunun yanı sıra genetik araştırmalar yapıldıkça, konakçı-mikroflora etkileşiminin daha karmaşık olduğu belirlenmektedir. Laktik asit bakterileri hakkında yapılan genomik çalışmalarla bazı sorulara cevap bulunurken, elde edilen bulgular yeni soruların da ortaya çıkmasına neden olmaktadır (34).

Probiyotik özellikteki LAB'ın kullandığı ÇA mekanizması farklılık göstermektedir. Aynı amaçla kullanılsa bile farklı mekanizmalar devreye girmekte ve mekanizma tek bir molekül ile yürütülmemekte, olaylar bileşimi şeklinde gerçekleşmektedir. Bu nedenle de karmaşık ve anlaşılması zor bir alan olarak kabul edilmektedir (17). LAB genellikle oligopeptit yapıdaki sinyal molekülleri ile iletişim kurmaktadır. Öncelikle aktif olmayan formdaki

öncül moleküller sentezlenmekte, daha sonra bu öncül moleküller translasyon modifikasyonu ile (proteolitik yıkım ve/veya glikozilasyon gibi) aktif alıcılara dönüşmektedir. Aktifleşen sinyal molekülleri bakteriler ve/veya hücre yüzeylerinde özel alıcı bölgeler vasıtasıyla tanınmaktadır. Bakteri ve konakçısı arasındaki çapraz iletişim de genellikle aynı yolla gerçekleşmektedir (35).

LAB'da çevreyi algılama ve çevreye uyum, bakteriyosin üretimi, patojenlerin inhibisyonu ve gıda sistemlerindeki ÇA mekanizması üzerine yapılan çalışmalar bulunmaktadır.

3.1. Çevreyi Algılama ve Uyum Özelliği

LAB uygun şekilde koloni oluşturmak ve değişen çevre koşullarına etkin olarak uyum sağlayıp, canlılığını sürdürebilmek için çevreye özgü sinyalleri algılama sistemlerine ihtiyaç duymaktadır. Bu bakterilerde yaygın olarak kullanılan TCS (two-component regulatory system) adı verilen iki bileşenli düzenleyici bir sistem mevcuttur. Bu sistem içindeki bileşenlerden biri membrana bağlı olan histidin protein kinaz (HPK), diğeri ise sitoplazmik cevapları düzenleyici olarak adlandırılan RR (cytoplasmic response regulator)'dir. Bu bileşenlerden HPK, sinyali alır ve RR'ye iletir, RR ise belirli gen ekspresyonlarının oluşmasını sağlar. Sistem fosfat grubunun yer değiştirmesi yoluyla sinyal iletimini gerçekleştirir. Her iki sistem bileşeni de bir operon yapısı içindedir. LAB'daki bu sistem ile çevredeki ozmotik basınç değişimleri, besin elementlerinin miktarları (C, N, P) ve sıcaklık algılanarak gerekli cevap oluşturulur (36).

LAB tarafından ÇA mekanizmasında kullanılan iki bileşenli düzenleyici sistem, *L. acidophilus* için tanımlanmıştır. Bu sistemin, bakterinin safra tuzlarına tolerans ve asit direnci özellikleri üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu iki özellik de sindirim sistemindeki canlılığın devamı ve probiyotik işlevlerin belirlenmesi açısından son derece önemlidir (37, 38).

LAB'ın yüzeye tutunma ve diğer mikroorganizmalar ile rekabet etme özelliğinin de ÇA mekanizması ile kontrol edildiği belirlenmiştir. *L. plantarum* WCFS1 ile gerçekleştirilen in silico bir çalışma sonucunda, bu mikroorganizmanın oldukça yüksek sayılabilecek peptit temelli ÇA-TCS'lerine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum, bu türün çevrede daha yaygın olarak bulunmasının ve uyum yeteneğinin diğer türlere göre daha iyi olmasının sebebi olarak bildirilmiştir (39, 36).

Çeşitli çevresel etkenler karşısında canlılığını sürdürme, asit koşullara dayanım ve biyofilm oluşumunun laktik asit bakterilerinde bulunan luxS geni ile kontrol edildiği bildirilmektedir. *L. rhamnosus* GG, *L. salivarius* UCC118, *L. acidophilus* NCFM ve *L. johnsonii* NCC5334 gibi dört farklı suşun düşük asitliğe karşı verdiği cevapların araştırıldığı bir çalışmada; luxS geninin asidik strese karşı cevap vermede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Asidik stres karşısında laktobasiller tarafından salgılanan OI-2 sinyal moleküllerinin aktivitesinin arttığı saptanmıştır (38).

3.2. Bakteriyosin Üretimi

LAB'da ÇA mekanizması ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir bölümü, bazı laktobasil türleri tarafından üretilen ve bakteriyosin olarak adlandırılan antimikrobiyal peptit üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu bakteriyosinler genellikle aynı ekolojik niş içerisinde yer alan bakteriler üzerinde aktif etki gösterirler. Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin çoğu küçük, ısıya dayanıklı ve yüksek izoelektrik noktaya sahip proteinlerdir. Çoğu suşta bakteriyosin üretimi bakteri yoğunluğuna bağlı bir şekilde salgılanan bir feromon peptiti ile kontrol edilir (26).

Bakteriyosin üretiminde ÇA mekanizmasının etkili olmasına ilaveten, bazı bakteriyosin moleküllerinin sinyal molekülü olarak görev yaptığı da bilinmektedir. Gram pozitif bakterilerde bakteriyosinlerin de içinde yer aldığı peptitler sinyal molekülü

olarak rol oynamaktadır. Bu nedenle en azından bazı bakteriyosinler; yüksek konsantrasyonlarda inhibitör etken, düşük konsantrasyonlarda ise sinyal molekülü olarak iki görevi birlikte üstlenmektedir. Böylece probiyotik suşlar tarafından üretilen bakteriyosinler; ÇA mekanizması içerisinde yer alan sinyal molekülü veya otoindükleyici peptitler olarak bağırsak florası üzerine etkili olurlar. Otoindükleyici peptitler genellikle sinyal rolü dışında bir işleve sahip değilken, bazı peptitler aynı zamanda antimikrobiyal olarak da görev alırlar. Buna en iyi örnek nisindir. Nisin hem antimikrobiyal etkiye sahip bir molekül, hem de hücre yoğunluğuna bağlı olarak kendi biyosentezinde rol alan sinyal molekülüdür (27). Bu özellik, *L. salivarius* UCC118 tarafından üretilen salivarisin Abp118 ve *L. plantarum* C11 tarafından üretilen plantarisin A için de geçerlidir (40).

LAB'da tespit edilen ve ÇA mekanizması ile kontrolü sağlanan ekspresyon sistemlerinden biri, nisinin sinyal molekülü olarak görev yaptığı nisin-kontrollü ekspresyon sistemidir (41). *Lactococcus lactis*'in nisin üretimi (42) iki bileşenli düzenleyici bir sistem ile kontrol edilir. Bu sistemdeki bileşenler NisK ve NisR'dir (43-45). İspanya'ya özgü kırmızı şaraplardan izole edilen *L. plantarum* J51'de bakteriyosin üretimine ait genetik bilgiyi içeren pln lokusları tanımlanmış (46) ve bakteriyosin üretme özelliğinin ÇA ile kontrol edildiği tespit edilmiştir (47).

LuxS geni ile kontrol edilen ÇA mekanizmasının araştırıldığı bir diğer çalışmada; Çin'de geleneksel olarak doğal fermantasyon yolu ile üretilen kremadan izole edilen, *L. plantarum* KLDS1.0391 tarafından sentezlenen plantarisin MG'nin, *L. helveticus* KLDS1.9207, *Enterococcus faecium* KLDS4.0352, *L. reuteri* KLDS1.0737 ve *E. faecalis* KLDS4.0313 suşlarına etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar; plantarisin MG üretiminin *L. plantarum* KLDS1.0391 hücre konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını göstermiştir. Hücre konsantrasyonundaki artışın yanı

sıra diğer dört suşun bakteriyosin üretimini teşvik ettiği de belirlenmiştir. *L. plantarum* KLDS1.0391'in ÇA sisteminin luxS temelli bir mekanizma olduğu bildirilmiştir (48).

LAB ile yapılan bir diğer çalışmada; şarap üretimi sırasında starter kültür olarak kullanılan *L. reuteri* DSMZ 20016'nın gliserol fermantasyonu yolu ile oluşturduğu 3-hidroksipropiyonaldehit (3-HPA) üretiminin ÇA mekanizması ile kontrol edildiği ortaya konmuştur. 3-HPA'nın, 1988 yılında reuterin ismi ile patenti alınmış ve gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaya başlanmıştır. Çalışma sonundaki veriler 3-HPA'nın üretiminin bu molekülün kendi konsantrasyonu ile bağlantılı olarak ÇA mekanizması ile kontrol edildiğini göstermiştir (49).

3.3. Patojenlerin Engellenmesinde ÇA Sistemi

Laktik asit bakterilerinin patojen mikroorganizmaları inhibe ederek sağlık üzerine olumlu etki gösterdiği pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmalardan birinde tavuk körbağırsağından izole edilip tanımlanan 36 adet *Lactobacillus* suşundan 25 adedinin *E. coli* ve *S. typhimurium* üzerinde değişik oranlarda inhibe edici etki gösterdiği tespit edilmiştir (50).

Probiyotik özellik gösteren mikroorganizmaların aynı zamanda patojenlerin sinyal moleküllerinin oluşmasını engelleyen düşük molekül ağırlıklı biyoaktif bileşenleri ürettikleri de bildirilmiştir. Bu biyoaktif bileşenler arasında kısa zincirli yağ asitleri, bakteriyosin benzeri bileşikler, organik asitler, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve sinyal molekülleri sayılabilir. Bu moleküllerin patojenler tarafından oluşturulan toksinleri, zararlı metabolitleri ve sinyal moleküllerini etkisiz hale getirerek ya da üretimlerini baskılayarak patojenlerin aktivitelerini engellediği bildirilmiştir (35).

Patojenlerin rekabetle engellenmesi açısından da ÇA sistemi önem taşımaktadır. *L. acidophilus* ve *L. monocytogenes* birlikte geliştirdiklerinde,

L. acidophilus'un mukozaya tutunma özelliğinin olumlu yönde geliştiği belirlenmiştir. Konu ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmakla birlikte, *L. monocytogenes* tarafından salgılanan bir molekülün *luxS* genini aktive ederek sindirim sistemindeki rekabette *L. acidophilus* lehine bir durum oluşturduğu gösterilmiştir. Benzer bir ilişkinin *L. reuteri* ve *E. coli* O157:H7 arasında da olduğu bildirilmiştir (51).

LAB'ın enteropatojenlerin bağırsaklarda tutunma ve koloni oluşturma özelliğine etkileri *in vitro* bir çalışma ile incelenmiştir. Araştırma sonucunda; *L. acidophilus* LA-5 tarafından üretilen protein benzeri moleküllerin enterohemorajik *E. coli* O157:H7'nin engellenmesinde, aynı zamanda patojen mikroorganizmanın bağırsaklarda koloni oluşturmada ve ÇA mekanizmasında etkili olan enteropatojenik gen transkripsiyonunu azalttığı gösterilmiştir (52).

Patojenlerin engellenmesine dış yüzeyine yapışmak suretiyle sakkarozdan çözünmeyen glukoz ve asit oluşturarak dış plaklarının oluşmasında etkili olan *Streptococcus mutans* ile probiyotik özellik gösteren *Lactococcus lactis* arasındaki ilişki de örnek verilebilir. *L. lactis*'in besin azlığında yarışmalı olarak *S. mutans*'ı engellediği ve bunun yanı sıra *S. mutans* tarafından salgılanan hücre dışı sinyal moleküllerinin *L. lactis*'in nisin üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Yapılan pek çok çalışmada, tükürükte bulunan *S. mutans* sayısının probiyotikler tarafından antimikrobiyal özellikteki proteinler yolu ile azaltıldığı gösterilmiştir (29).

Son yıllarda, su ürünlerinde antibiyotik kullanmadan bakteriyel enfeksiyonların kontrol altına alınmasında probiyotiklerden yararlanılması ile ilgili çalışmalar giderek artmakta ve ilgi çekmektedir. Enfeksiyona neden olan bakterilerin iletişimlerini sağlamak amacıyla sentezledikleri AHL türü ÇA moleküllerini etkisiz hale getirme özelliğindeki inhibitörlerin probiyotik suşlar tarafından sentezlendiği, özellikle *Bacillus* cinsleri

tarafından sentezlenen ÇA-inhibitörleri tarafından balık patojenlerinin ürettiği AHL miktarında belirgin şekilde azalma olduğu gösterilmiştir (53-55).

Laktobasil cinsinden farklı probiyotik suşların *P. aeruginosa* üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda; birkaç farklı ÇA mekanizması belirlenmiştir. Bu mekanizmalardan biri, probiyotik özellik taşıyan suşlar tarafından *P. aeruginosa*'nın ÇA gen ekspresyonlarını engelleyen bazı moleküllerin üretilmesidir. Özellikle *L. paracasei* spp. *paracasei* CMGB 18 ile yapılan çalışmada, bu suşun patojen *P. aeruginosa*'nın gelişimini, yüzeye tutunmasını ve ÇA mekanizmasında rol alan moleküllerin üretimini gerçekleştirecek gen ekspresyonlarını engellediği gösterilmiştir. Ayrıca probiyotikler tarafından üretilen asetik asit ve laktik asit gibi organik asitlerin özellikle ilaçlara karşı direnç genlerinin oluşmasını engellediği yani ÇA inhibitörleri olarak rol oynadıkları ortaya konmuştur (56).

Bu konudaki çalışmalar genellikle, fırsatçı patojen olan ve hastane enfeksiyonlarının gelişmesinde rol alan *P. aeruginosa* üzerine yoğunlaşmıştır (30, 17). Ancak LAB'a yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Fermente gıdalarda yaygın olarak tespit edilen aynı zamanda aroma üzerinde olumlu katkı sağlayan *Enterococcus faecalis*, bazı durumlarda virülans özellik göstererek septisemiye ya da bakteriyemiye neden olabilmektedir. Bu mikroorganizmadaki virülans etkenlerin ekspresyonları ÇA mekanizması ile kontrol edilmektedir. Ancak LAB'da virülans özelliklerin ortaya çıkması çok rastlanan bir özellik değildir (57).

3.4. Gıda Sistemlerindeki Laktik Asit Bakterilerinde ÇA Mekanizması

Fermantasyon yolu ile üretilen gıdalarda, mikroorganizmaların birbirleri ile kurdukları iletişimin anlaşılması, fermantasyonun tasarlanmasına ve sistemin başarılı şekilde

çalışmasına katkı sağlayacaktır. Gıda sistemlerinde birlikte gelişen mikroorganizmalar tarafından üretilen aroma maddeleri, yağ asitleri gibi teknolojik açıdan oldukça önemli olan metabolitlerin üretiminin de ÇA mekanizmaları temeline dayandığı bildirilmiştir (58).

L. helveticus, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. sanfranciscensis*, *E. faecalis*'in de aralarında bulunduğu bakterilerle yapılan bir çalışmada; (5H)-furanonun sinyal molekülü olarak rol oynadığı ve gıda fermantasyonlarında patojenlerle antagonistik ilişkinin anlaşılmasında önemli olduğu bildirilmiştir. Aslında 5H-furanon uçucu ve suda/ yağda çözünebilir aromatik bir bileşiktir. Piyasada sotolon (çemen kokusuna benzer bir kokuya sahip) gibi kimyasal olarak üretilmiş ticari analogları da bulunmaktadır. Patojenlerin gelişimlerinin kontrol altına alınmasında, biyofilm oluşturmalarının engellenmesinde ve laktobasiller tarafından oluşturulan fermente gıdalarda başlatıcı kültür ile gıdada doğal olarak bulunan LAB arasındaki ilişkilerin düzenlenmesinde bu sinyal molekülünün etkin olduğu bildirilmiştir (59).

Saccharomyces cerevisiae LBS ve *L. sanfranciscensis* LSCE1'in birlikte geliştirildikleri ekşi hamurda yapılan çalışma sonucunda; bazı stres faktörleri karşısında salgılanan metabolitlerin ve sinyal moleküllerinin mikroorganizmaların birbirleri ile kurdukları iletişimde etkili olduğu ortaya konmuştur. Ekşi hamur örneğinde özellikle aroma oluşumunda ÇA mekanizmasının oldukça etkili olduğu ve bu konuda yapılacak ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir. Teknolojik açıdan önemli bazı metabolitlerin üretiminde hücre yoğunluğuna bağlı olarak harekete geçen ÇA sisteminin etkili olduğu düşünülmektedir (58).

Benzer şekilde *L. plantarum*'un ÇA mekanizmasının araştırılması için yapılan diğer bir çalışmada, *L. sanfranciscensis* DPPMA174 ve *L. rossiae* gibi ekşi hamurdan izole edilen laktobasiller birlikte geliştirildiklerinde, aralarında ÇA mekanizması içinde yer alanlar da dahil, bazı gen ve protein ekspresyonlarının etkilendiği tespit edilmiştir. *L. plantarum* DC400 suşunun tek başına ve *L. sanfranciscensis* DPPMA174 ya da *L. rossiae* A7 suşları ile birlikte geliştirildiğinde yaklaşık olarak sırasıyla 2,5 ve 3,5 kat daha fazla luxS gen ekspresyonunun olduğu bildirilmiştir (60).

SONUÇ

Mikroorganizmaların birbirleri ve konakçısı ile kurdukları iletişimin anlaşılması ile genetik, metabolik ve fizyolojik pek çok aktivite hem anlaşılır, hem de yeni amaçlar için kullanılabilir hale gelecektir. Ancak, özellikle LAB tarafından kullanılan ÇA mekanizması üzerinde yapılacak daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Probiyotik özellik taşıyan mikroorganizmaların birbirleri ve konakçıları ile kurdukları iletişimin anlaşılması ve kullanılması ile bağırsak florası ve insan sağlığı ilişkisi önemli ölçüde aydınlanacaktır.

Gıda bozulmalarının ve mikrobiyal kaynaklı gıda zehirlenmelerinin önüne geçilmesi açısından da mikroorganizmaların ÇA mekanizmalarının anlaşılması son derece önemlidir. Raf ömrünün uzatılmasıyla üretim masrafları ve gıda kayıpları azaltılmış olacaktır. Bu noktada hem patojenlerle mücadele, hem gıda koruyucularının doğal yollarla üretimi, hem de yeni nesil probiyotiklerin tasarımında ÇA sistemlerinden yararlanmanın doğru bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gobbetti M, De Angelis M, Di Cagno R, Minervini F, Limitone A. Cell-cell communication in food related bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2007; 120, 34-45.
2. Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, 1999; 2, 582-87.
3. Saraçlı MA. "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Derg*, 2006; 48, 244-50.
4. Smid EJ, Lacroix C. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Curr Opin Biotechnol*, 2013; 24: 148-54.
5. Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2004; 28: 261-89.
6. Schauder S, Bassler BL. The languages of bacteria. *Genes Dev*, 2001; 15: 1468-80.
7. Eriş R. Gül (*Rosa damascena* mill.) yağı, absöütü ve gül suyunun *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, CV026 ve CVIR 07 suşlarının çevreyi algılama sistemleri (quorum sensing) üzerine etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
8. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001; 55: 165-99.
9. Avcı MK. Quorum sensing odaklı yenilikler ve biyoteknolojik uygulamalar. MBG 617 Bbiyoteknolojide yeni gelişmeler, www.quorumsensing.net, 2009.
10. LaSarre B, Federle MJ. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013; 77 (1): 73.
11. Kleerebezem M, Quadri LEN, Kuipers OP, de Vos WM. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 1997; 24 (5): 895-904.
12. Xavier KB, Bassler BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol*, 2003; 6: 191-97.
13. Abee T, Kovacs AT, Kuipers OP, van der Veen S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2011; 22: 172-79.
14. Jaraman A, Wood TK. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng*, 2008; 10: 145-67.
15. Winzer K, Hardie KR, Burgess N. LuxS: its role in central metabolism and the *in vitro* synthesis of 4-hydroxy- 5-methyl-3(2H)-furanone. *J Gen Microbiol*, 2002; 148: 909-22.
16. Shiner EK, Rumbaugh KP, Williams SC. Interkingdom signalling: the language of acylhomoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev*, 2005; 29: 935-47.
17. Di Cagno R, De Angelis M, Calasa M, Gobbetti M. Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing. *J Proteomics*, 2011; 74: 19-34.
18. Baskın H. İnsan florası ve "quorum sensing". *Klimik 13. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Mart, 23-27, Antalya-Türkiye. 2007.
19. Hayes SH, Low DA. Signals of growth regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2009; 12: 667-73.
20. Simoes M, Simoes L.C, Vieira M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Lebenson Wiss Technol*, 2010; 43: 573-83.
21. Lazar V. Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe*, 2011; 17: 280-285.
22. Oppenheimer-Shaanan Y, Steinberg N, Kolodkin-Gal I. Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms. *Trends Microbiol*, 2013; 21(11): 591-601.
23. Sifri CD. Quorum sensing: Bacteria talk sense. *Clin Infect Dis*, 2008; 47: 1070-6.
24. Mc.Gowan SJ, Barnard AM, Boşgelmez G, Sebahia M, Simpson NJ, Thomson NR, et al. Carbepenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol Microbiol*, 2005; 2: 526-45.
25. Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*, 2004; 25: 1405-14.
26. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008; 72: 728-64.

27. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Appl Environ Microbiol*, 2012; 78(1): 1-6.
28. Carey CM, Kostrzynska M, Thompson S. Escherichia coli O157:H7 stress and virulence gene expression on Romaine lettuce using comparative real-time PCR. *J Microbiol Methods*, 2009; 77: 235-42.
29. Tong Z, Zhou L, Li J, Kuang R, Lin Y, Ni L. An *in vitro* investigation of Lactococcus lactis antagonizing cariogenic bacterium Streptococcus mutans. *Arch Oral Biol*, 2012; 57: 376-82.
30. Karatuna O, Yağcı A. Pseudomonas aeruginosa'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*, 2008; 38(1): 42-51.
31. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect*, 2003; 46: 207-14.
32. Karaman M, Yılmaz O, Bayrakal V, Bahar İH. Gentamisin ve imipenem etkisinde Pseudomonas aeruginosa quorum sensing yanıtları ve biyofilm üretimi: In-vivo modelleme. *ANKEM*, 2010; 24(2): 76-81.
33. Çakır İ, Karahan AG, Çakmakçı ML. Probiyotikler ve etki mekanizmaları. *Gıda Müh Derg*, 2002; 6 (12): 15-9.
34. Schroeter J, Klaenhammer T. Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2009; 292: 1-6.
35. Shenderov BA. Probiotic (symbiotic) bacterial languages. *Anaerobe*, 2011; 1: 490-5.
36. O'Flaherty S, Klaenhammer TR. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. *Int Dairy J*, 2010; 20: 262-8.
37. Pfeiler EA, Azcarate-Peril MA, Klaenhammer TR. Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in Lactobacillus acidophilus. *J Bacteriol*, 2007; 189: 4624-34.
38. Moslehi-Jenabian S, Gori K, Jespersen L. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of Lactobacillus spp.. *Int J Food Microbiol*, 2009; 135: 295-302.
39. Sturme MHJ, Francke C, Siezen RJ, de Vos WM, Kleerebezem M. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on Lactobacillus plantarum WCF51. *Microbiology*, 2007; 153: 3939-47.
40. Messaoudi S, Manai M, Kergourlay G, Prévost H, Connil N, Chobert JM, et al. Lactobacillus salivarius: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol*, 2013; 36: 296-304.
41. Douillard FP, Mahony J, Campanacci V, Cambillau C, van Sinderen D. Construction of two Lactococcus lactis expression vectors combining the gateway and the nisin controlled expression systems. *Plasmid*, 2011; 66: 129-135.
42. Alkhatib Z, Abts A, Mavaro A, Schmitt L, Smits HJS. Lantibiotics: How do producers become self-protected? *J Biotechnol*, 2012; 159: 145-54.
43. Kuipers OP, de Ruyter PGGA, Kleerebezem M, de Vos WM. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J Biotechnol*, 1998; 64: 15-21.
44. Kim JH, Mills DA. Improvement of a nisin-inducible expression vector for use in lactic acid bacteria. *Plasmid*, 2007; 58: 275-83.
45. Zhou XX, Li WF, Ma GX, Pan YJ. The nisin-controlled gene expression system: Construction, application and improvements. *Biotechnol Adv*, 2006; 24: 285- 95.
46. Navarro L, Rojo-Bezarez B, Sáenz Y, Díez L, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, et al. Comparative study of the pln locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing. *L. plantarum* J51 strain. *Int J Food Microbiol*, 2008; 128: 390-4.
47. Diep DB, Straume D, Kjos M, Torres C, Nes I. An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from Lactobacillus plantarum. *Peptides*, 2009; 30: 1562-74.
48. Man LL, Meng XC, Zhao RH. Induction of plantaricin MG under co-culture with certain lactic acid bacterial strains and identification of LuxS mediated quorum sensing system in Lactobacillus plantarum KLDS1.0391. *Food Control*, 2012; 23: 462-9.
49. Bauer R, du Toit M, Kossmann J. Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by Lactobacillus reuteri DSMZ 20016 and its accumulation by wine lactobacilli. *Int J Food Microbiol*, 2010; 137: 28-31.
50. Karahan AG, Çakmakçı ML. Determination of some properties of Lactobacillus strains isolated from cecum. *J Agri Sci*, 1998; 4: 59-64.

51. Moslehi-Jenabian S, Vogensen FK, Jespersen L. The quorum sensing luxS gene is induced in *Lactobacillus acidophilus* NCFM in response to *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*, 2011; 149: 269-73.
52. Tabasco R, de Palencia PF, Fontecha Peláez C, Requena T. Competition mechanisms of lactic acid bacteria and bifidobacteria: fermentative metabolism and colonization. *LWT - Food Sci Technol*, 2014; 55: 680-4.
53. Chu W, Lu F, Zhu W, Kang C. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. *J Appl Microbiol*, 2010; 110: 202-8.
54. Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol Adv*, 2013; 31: 224-45.
55. Tuan TN, Duc PM, Hatai K. Overview of the use of probiotics in aquaculture. *Int J Res Fish Aquac*, 2013; 3(3): 89-97.
56. Cotar AI. Quorum sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs in the fight against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol*, 2013; 2(4): 1-2.
57. Lenz CA, Hew Ferstl CM, Vogel RF. Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. *Food Microbiol*, 2010; 27: 317-26.
58. Guerzoni ME, Vernocchi M, Ndagijimana M, Gianotti A, Lanciotti R. Generation of aroma compounds in sourdough: effects of stress exposure and lactobacilli-yeasts interactions. *Food Microbiol*, 2007; 24: 139-48.
59. Vannini L, Ndagijimana M, Saracino P, Vernocchi P, Corsetti A, Vallicelli M, et al. New signaling molecules in some Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2007; 120: 25-33.
60. Di Cagno R, De Angelis M, Coda R, Minervini F, Gobbetti M. Molecular adaptation of sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400 under co-cultivation with other lactobacilli. *Res Microbiol*, 2009; 160: 358-66.

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE



TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU / PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

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,

Yayınlanması 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.

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU / PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 Refik Saydam Yerleşkesi 06100 Sıhhiye-ANKARA-TURKEY

Tel/Phone : +90 312 565 55 79

Faks/Fax : +90 312 565 54 55

e-posta/e-mail : turkhijyen@thsk.gov.tr

