

**BİR DEVLET HASTANESİ DİYALİZ
ÜNİTESİ SU SİSTEMİNİN
MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ VE
İZOLATLARIN ANTİBAKTERİYEL
DİRENÇLİLİKLERİNİN TESPİTİ**

Fadime GÖKTAŞ
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek lisans Programı
Dr.Öğr.Üyesi Aytaç KOCABAŞ
Mayıs-2018

T.C
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİR DEVLET HASTANESİ DİYALİZ ÜNİTESİ SU SİSTEMİNİN
MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ VE İZOLATLARIN ANTİBAKTERİYEL
DİRENÇLİLİKLERİNİN TESPİTİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Fadime GÖKTAŞ

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı : Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Dr.Öğr.Üyesi Aytaç KOCABAŞ

KARAMAN-2018

TEZ ONAYI

Fadime GÖKTAŞ tarafından hazırlanan “**Bir Devlet Hastanesi Diyaliz Ünitesi Su Sisteminin Mikrobiyolojik Analizi ve İzolatların Antibakteriyel Dirençliliklerinin Tespiti**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:
Dr.Öğr.Üyesi Aytaç KOCABAŞ

Eş Danışman:
Dr. Arda BÜYÜKSUNGUR

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. ERKAN YURTCU
(Başkent Üniversitesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Doç. Dr. Gökhan SADI
(Karamanoğlu Mehmetbey Üniv.,
Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)

Dr.Öğr.Üyesi Aytaç KOCABAŞ
(Karamanoğlu Mehmetbey Üniv.,
Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)

İmza:

Tez Savunma Tarihi: 10/05/2018

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Doç. Dr. Kamil ARI

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Fadime GÖKTAŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİR DEVLET HASTANESİ DİYALİZ ÜNİTESİ SU SİSTEMİNİN MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ VE İZOLATLARIN ANTİBAKTERİYEL DİRENÇLİLİKLERİNİN TESPİTİ

Fadime GÖKTAŞ

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr. Üyesi Aytaç KOCABAŞ
Eş Danışman: Dr. Arda BÜYÜKSUNGUR

Mayıs, 2018, 129 sayfa

Hemodiyaliz, akut böbrek hasarı veya son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda en yaygın kullanılan renal replasman tedavi yöntemidir. Hemodiyaliz işlemi sırasında kullanılan diyalizat solüsyonunun hazırlanmasında şehir suyundan yararlanılır. Hemodiyaliz hastalarının diyalizat hazırlanan sudaki zararlı maddelere maruz kalmamaları için, suyun belirli oranlarda arıtılması gereklidir. Su arıtma sisteminde üretilen saf suda maksimum mikrobiyal kontaminasyon <100 KOB/mL, bakteriyel endotoksin düzeyi ise <0,25 IU/mL olmalıdır. Bu çalışmada bir devlet hastanesi hemodiyaliz ünitesi su arıtma sisteminde dezenfeksiyon öncesinde ve sonrasında 3 noktadan (şehir şebeke suyu, karbon filtre sonrası ve revers osmoz sonrası çıkış suyu) su örnekleri alınmıştır. Sularda bulunan mikroorganizmaların izolasyonunda membran filtrasyon yöntemi kullanılmıştır. İzolatların tanımlanmasında biyokimyasal testler, APİ 20NE test kiti ve moleküler tanı yöntemi (16S rRNA PZR ve 16S rRNA gen bölgesi DNA dizi analizi) kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. Sonuç olarak diyaliz üniteleri su sistemlerinde mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için kullanılan filtreler düzenli olarak değiştirilmelidir. Özellikle karbon filtreler bakteri üremesi açısından elverişli ortam olduğu için 18-24 ayda bir ya da sistemde kloramin görüldüğünde aktif karbonun değişmesi gerekmektedir. Ayrıca su sisteminin dezenfeksiyonu periyodik olarak yapılmalı, revers osmoz çıkış suyunun kimyasal ve endotoksin kontrolü 6 ayda bir, bakteriyolojik kontroller 3 ayda bir yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Diyaliz suyu, mikrobiyal kontaminasyon, su arıtma sistemi

ABSTRACT

Ms Thesis

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF THE DIALYSIS UNIT WATER DISTRIBUTION SYSTEM OF A STATE HOSPITAL AND DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL RESISTANCE OF THE ISOLATES

Fadime GÖKTAŞ

**Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Aytaç KOCABAŞ
Co-Supervisor: Dr. Arda BÜYÜKSUNGUR**

May, 2018, 129 pages

Hemodialysis is the most common method of renal replacement therapy for patients with either acute kidney injury or end stage kidney failure. City water is used to prepare the dialysate solution used during the hemodialysis process. In order for hemodialysis patients not to be exposed to the harmful substances in the prepared dialysate, it is necessary to treat the water at certain rates. The maximum microbial contamination in pure water produced in the water treatment system should be <100 KOB/mL and the bacterial endotoxin level should be <0.25 IU/mL. In this study, water samples were taken from three points before and after disinfection in a state hospital hemodialysis unit water treatment system (municipal water, carbon filter and outlet water after reverse osmosis). Membrane filtration method has been used for the isolation of microorganisms found in the waters. Biochemical tests, rapid diagnostic test kit and molecular diagnostic method (16S rRNA PZR and 16S rRNA gene region DNA sequence analysis) were used to identify isolates. In addition, the antibiotic susceptibilities of the obtained isolates were examined. As a result, filters used to prevent microbial contamination in dialysis units water systems should be changed regularly. Particularly, since carbon filters are a favorable environment for bacterial growth, active carbon must be changed every 18-24 months or. chloramine is detected in the system. In addition, disinfection of water system should be done periodically. Chemical and endotoxin control of reverse osmosis effluent should be done every 6 months; bacteriological controls should be done every 3 months.

Keywords: Dialysis water, microbial contamination, water treatment system

ÖNSÖZ

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda engin fikirleriyle gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam sayın Dr. Aytaç KOCABAŞ'a, laboratuvarında birlikte çalıştığım Muazzez Ceren POLAT'a ve bugünlere gelmemde büyük fedakarlıkları ve emekleri olan annem, babam ve kardeşlerim'e ve bana her zaman destek olan sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

10-YL-17 nolu proje ile çalışmamı maddi olarak destekleyen Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Fadime GÖKTAŞ

Mayıs, 2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Böbreğin Yapısı ve Görevleri.....	4
2.2. Böbrek Yetmezliği ve Tedavisi.....	6
2.2.1. Akut Böbrek Yetmezliği (ABY).....	6
2.2.2. Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY).....	7
2.2.3. Renal Replasman Tedavileri (RRT).....	9
2.3. Hemodiyaliz Tedavisi.....	11
2.3.1. Hemodiyaliz İşlemi.....	13
2.3.2. Hemodiyalizin Fizyolojik Prensipleri.....	17
2.3.3. Hemodiyaliz Hastalarında Sık Görülen Komplikasyonlar.....	18
2.4. Hemodiyaliz Ünitesi Su Sistemi.....	20
2.4.1. Hemodiyaliz Ünitelerinde Su Sistemi İle İlişkin Sorunlar.....	21
2.4.2. Diyaliz Solüsyonlarının Kalite Gereksinimleri.....	24
2.4.3. Hemodiyaliz Ünitesi Su Arıtma Sistemi.....	26
2.5. Suların Mikrobiyolojik Kirlenmesi ve Mikrobiyolojik Kalite Standartları.....	39
2.6. Su Dağıtım Sistemlerinde Mikrobiyal Biyofilm Tabakası.....	40
2.7. Suyun Mikrobiyolojik Analizi.....	42
2.7.1. Çoklu Tüp Yöntemi (En Muhtemel Sayı).....	42
2.7.2. Membran Filtrasyon Yöntemi.....	43
2.8. Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları.....	44
2.8.1. Antibiyotiklerin Etki Derecelerine Göre Sınıflandırılmaları.....	45
2.8.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları.....	45

2.9. Mikroorganizmaların Tanılanmasında Moleküler Yöntemler.....	48
2.9.1. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	51
2.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ana İşlem Basamakları.....	53
2.9.3. PZR'nin Temel Bileşenleri.....	55
2.9.4. Elektroforez Çalışmaları.....	56
3. MATERYAL VE METOD.....	59
3.1. Materyal.....	59
3.2. Metot.....	59
3.2.1. Su Numunelerinin Alınması ve Taşınması.....	60
3.2.2. Membran Filtrasyon Yöntemi ve Kullanılan Besiyerleri	61
3.2.3. Gram Boyama.....	64
3.2.4. Katalaz Testi.....	65
3.2.5. Oksidaz Testi	65
3.2.6. Api 20NE Hızlı Tanı Kitinin Kullanımı.....	65
3.2.7. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları	66
3.2.8. İzolatların Moleküler Olarak Tanımlanması	67
3.2.9. Bakterilerin Stoklanması	70
4. BULGULAR.....	71
4.1. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Tanılamaları.....	71
4.2. Hızlı Test Kitleri ile yapılan Tanımlama Sonuçları.....	75
4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	76
4.4. İzolatların Moleküler Tanımlanmaları.....	78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	87
KAYNAKLAR.....	92
EKLER.....	102
EK 1.....	102
EK 2.....	107
EK 3.....	111
EK 4.....	114
EK 5.....	127
EK 6.....	128
ÖZGEÇMİŞ.....	130

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Böbrekler ve nefronun yapısı	5
Şekil 2.2. Türkiye’de RRT gerektiren SDBY insidansı ve prevalansı	11
Şekil 2.3. Hemodiyaliz uygulaması	12
Şekil 2.4. Hemodiyaliz tedavisi bileşenleri	14
Şekil 2.5. Hemodiyaliz mebranı (diyalizer).....	15
Şekil 2.6. Difüzyon ve konveksiyonun şematik gösterimi	17
Şekil 2.7. Diyalizattaki bakteri kontaminasyonu ve enflamatuar tepkiler.....	23
Şekil 2.8. Hemodiyaliz ünitesi su sistemi.....	26
Şekil 2.9. Otomatik su yumuşatma filtresi	30
Şekil 2.10. UV ışınları hücre ölüm eğrisi ve UV-C ışınlarının DNA üzerine etkisi	35
Şekil 2.11. Gram negatif bakteri hücre duvarı ve lipopolisakkarit yapısı	36
Şekil 2.12. Biyofilm oluşumu.....	41
Şekil 2.13. Bazı antibiyotikler ve bakteri hücresinde hedef aldıkları bölgeler	46
Şekil 2.14. Prokaryot hücrelerde ribozamların alt üniteleri.....	49
Şekil 2.15. 16s rRNA yapısı ve V4 gen bölgesi	50
Şekil 2.16. PZR ürünlerinin aritmetik olarak kopyalanması	52
Şekil 2.17. PZR siklusunun basamakları	53
Şekil 2.18. Temel bir elektroforez seti	58
Şekil 3.1. Su numunelerini alma noktaları	60
Şekil 3.2. Gram boyama	64
Şekil 3.3. Su numunelerinin alınması.....	61
Şekil 3.4. Membran filtrasyon yöntemi ile su analizi.....	62
Şekil 3.5. 25 bp DNA ladder’a ait cetvel.....	69
Şekil 4.1. İzolatlara ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	78
Şekil 4.2. İzolat 41, 42 ve 43'e ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi blast sonucu	80
Şekil 4.3. İzolat 45'e ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi blast sonucu.....	80
Şekil 4.4. İzolat 4, 68 ve 71'e ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi blast sonucu	81
Şekil 4.5. İzolat 5, 6, 67 ve 77'ye ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi blast sonucu ..	81
Şekil 4.6. İzolat 8, 21, 23, 26, 38 ve 39'a ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi blast sonucu.....	82

Şekil 4.7. İzolat 20 ve 37'ye ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi blast sonucu	83
Şekil 4.8. İzolat 3, 11, 62, 63 ve 65'e ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi blast sonucu	83
Şekil 4.9. İzolat 9 ve 15'e ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisi blast sonucu	84



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. K/DOQI kılavuzuna göre kronik böbrek hastalığının evreleri.....	9
Çizelge 2.2. Hastaların RRT tipine göre dağılımı	11
Çizelge 2.3. Hemodiyaliz hastalarının ölüm nedenlerine göre dağılımı	19
Çizelge 2.4. Avrupa farmakopesine göre saf suya ait değerler	25
Çizelge 2.5. İnsani tüketim amaçlı sular hakkında yönetmelik” esaslarına göre içme ve içme-kullanma sularında aranan mikrobiyolojik parametreler.....	40
Çizelge 2.6. DNA molekülünün büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonları	58
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri, konsantrasyonları ve CLSI standartlarına göre duyarlılık kategorileri	67
Çizelge 3.2. PZR karışım protokolü	68
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler ve PZR protokolleri	68
Çizelge 4.1. Su numunelerini alma tarihleri ve su sisteminin dezenfeksiyon tarihleri ..	71
Çizelge 4.2. ŞŞS çıkış noktasından alınan su örneklerinde üreme sonuçları	73
Çizelge 4.3. KF çıkış noktasından alınan su örneklerinde üreme sonuçları.....	73
Çizelge 4.4. RO çıkış noktasından alınan su örneklerinde üreme sonuçları	74
Çizelge 4.5. İzolatları API 20NE test sonuçları.....	75
Çizelge 4.6. İzolatların antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları.....	76
Çizelge 4.7. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
ABY	Akut Böbrek Yetmezliği
AVF	Arteriyo-Venöz Fistül
KOB	Koloni Oluşturan Birim
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfatlar
EMB	Eozin Metilen Blue
GFH	Glomerüler Filtrasyon Hızı
HD	Hemodiyaliz
IU	International Unit/Uluslar Arası Birim
KBY	Kronik Böbrek Yetmezliği
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KUF	Ultrafiltrasyon Katsayısı
LAL	Limulus Amoebocyte Lysate
LPS	Lipopolisakkarit
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MİK	Minimum İnhibitor Konsantrasyon
NKF-KDOQI	National Kidney Foundation-Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
PCA	Plate Count Agar
PD	Periton Diyalizi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal RNA
RRT	Renal Replasman Tedavisi
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDBY	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
SS Agar	Salmonella-Shigella Agar

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
mL	Mililitre
dk	Dakika
sn	Saniye
L	Litre
%	Yüzde
m²	Metre Kare
mmHg	Milimetre Civa
mg	Miligram
ppm	mg çözünen / kg veya litre çözelti
IU	International Unit
µg	Mikrogram
g	Gram
nm	Nanometre
°C	Santigrad Derece
EU	Endotoksin ünitesi
µm	Mikrometre
mM	Milimolar
mcg	Mikrogram

1. GİRİŞ

Kronik böbrek yetmezliği glomerüler filtrasyon değerinde azalmanın sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bozulma hali olarak tanımlanabilir. Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY) tanısı konulan hastalarda glomerüler filtrasyon hızı 15 mL/dk'nın altına düşmeye başladığında son dönem böbrek yetmezliği tablosu oluşur (Vural, 2002). Son dönem böbrek yetmezliği gelişen hastaların yaşamını sürdürebilmesi için Renal Replasman Tedavisi (RRT) olarak adlandırılan hemodiyaliz, periton diyalizi veya böbrek transplantasyonu tedavilerinden bir tanesinin uygulanması gerekir. Son dönem böbrek yetmezliğinin ideal tedavisi, böbreğin tüm fonksiyonlarının düzeldiği böbrek naklidir. Ancak, böbrek nakillerinde yaşanan zorluklar nedeniyle, hastaların büyük bir kısmı diyaliz ile yaşamını sürdürmek zorundadır. Dünyada RRT alan 2 milyonu aşkın hastanın %25'den azı böbrek nakillidir. Periton diyalizi tedavisinde ise hasta merkezli bir tedavi olması, hekimlerin PD ile uğraşmak istememeleri, Nefroloji uzmanlarının PD hakkındaki uygulama eksikliği gibi nedenler daha az tercih edilmektedir. Ülkeler arasında bazı farklılıklar olmakla beraber, tüm dünyada en çok tercih edilen RRT tedavi yöntemi yaklaşık %90'lık oran ile hemodiyalizdir (TC Sağlık Bakanlığı, 2014).

Hemodiyaliz, yarı geçirgen bir membran aracılığı ile hastanın kanı ve uygun diyaliz solüsyonu arasında sıvı ve solütlerin (elektrolit ve atık maddeler) değişimini temel alan bir tedavi şeklidir. Bu yöntem ile vücut sıvılarındaki istenmeyen maddeler yarı geçirgen zar aracılığı ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Akdemir ve Birol, 2005). Hemodiyaliz tedavisi hastanelerin diyaliz ünitesinde hastanın klinik durumuna göre haftada 2-3 kez uygulanmaktadır. Her seans yaklaşık 4-5 saat sürmektedir.

Hemodiyaliz hastalarında ölüm nedenlerine baktığımız zaman kardiyovasküler hastalıklardan sonra enfeksiyonlar %14'lük oranla ikinci sırada yer almaktadır. Enfeksiyonların yol açtığı mortalitenin ise en önemli sebebi sepsistir. Sepsis diyaliz hastalarında mortalitenin yaklaşık %11'inden sorumludur. Hemodiyaliz hastalarında ekzojen yolla bakteriyel patojenlerin bulaşması ile ilişkili birçok salgın tanımlanmıştır. Bu salgınların çoğu kontamine diyaliz sıvıları veya ekipmanlar, birden fazla kullanılmaya şansı olan (reuse) diyalizerlerde yetersiz dezenfeksiyon ya da diyalizde kullanılan saf suların istenen standartlarda arıtılmamasından kaynaklanmaktadır.

Hemodiyaliz tedavisi alan hastalar normal popülasyonla karşılaştırıldığında yaşamları süresince daha fazla miktarlarda su ile karşılaşmaktadırlar. Böbrek yetmezliği olan hastaların kanları diyaliz sırasında haftada yaklaşık 360-400 litre su ile işlem görürken, sağlıklı bir insan vücuduna haftada yalnızca 14-15 litre su alınmaktadır. Buna göre diyaliz hastaları yıllık olarak 18,000 -36,000 litre arasında suya maruz kalmaktadır (Başarı ve Uyanık, 2012). İçme suyunda izin verilen kimyasal maddelerin birçoğu, diyaliz hastaları için potansiyel olarak tehlikelidir (Ward, 2007). Hemodiyaliz işlemi esnasında hasta kanı yarı geçirgen bir membranla bağlantı halindedir. Bu nedenle diyaliz sıvısının bileşenleri ve içeriği diyalize bağlı gelişebilecek komplikasyonlarda önemli bir rol oynamaktadır. Suda bulunan endotoksin, ekzotoksin ve bakteri kaynaklı DNA parçaları gibi düşük ağırlıklı maddeler diyaliz yoluyla doğrudan hastaların kan dolaşımına geçebilmektedir (Montanari, 2009). Diyaliz işlemi sırasında kullanılan diyalizat solüsyonunun hazırlanmasında şehir suyundan yararlanılır. Hemodiyaliz hastalarının diyalizat hazırlanan sudaki zararlı maddelere maruz kalmamaları için, suyun belirli oranlarda arıtılması gereklidir (Sezen, 2014).

Hemodiyaliz ünitelerinde bulunan su sisteminde ön arıtma sisteminde sırasıyla kaba partikül filtresi, yumuşatıcı, karbon filtre ve mikrofiltreler bulunmaktadır. Ön arıtma sisteminden sonra ise su revers ozmoz membranlarından geçerek içereside bulunan; sodyum, potasyum, bikarbonatlar, alüminyum, çinko, bakır, florür, bakteri, virüs ve pirojenlerden %99,8 oranında temizlenmektedir.

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan yönetmeliğe göre hemodiyaliz tedavisinde kullanılan sularla ilgili olarak; hemodiyaliz çözeltilerinin seyreltilmesinde kullanılan saf suyun kimyasal ve bakteriyolojik kontrolünde Avrupa Birliği farmakopesinde bildirilen sınır değerler göz önüne alınmaktadır. Buna göre su sisteminde üretilen saf sularda maksimum mikrobiyal kontaminasyon < 100 KOB/mL, bakteriyel endotoksin düzeyi ise < 0,25 IU/mL olmalıdır. Bakteri ve endotoksin filtrasyon sistemi bulunan merkezlerde saf su deposu her ay, maksimum 3 ayda bir dezenfekte edilmelidir. Ancak bu süreler üretici firma önerilerine göre değişebilmektedir (Sağlık Bakanlığı, Su Arıtma Sistemi Yönergesi, 28.10.2011).

Hemodiyalizde kullanılan suyun, bakteriyel kontaminasyonunu etkileyebilecek birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; su arıtma yönteminin özelliği, diyalizat dağıtım sistemi, diyaliz makinesinin tipi ve uygulanan dezenfeksiyon yöntemine göre değişmektedir. Gram negatif bakteriler (*Acinetobacter spp*, *Pseudomonas spp*, *Serratia spp*, vb.) hemodiyaliz için kullanılan kaynaklarda bulunur. Bu mikroorganizmalar hemodiyaliz ekipmanlarıyla ilgili sulu çevrelerde yaşayıp çoğalarak endotoksemi yoluyla hastalarda pirojenik reaksiyonlara ve bakteremiye neden olabilir (Parlar, 2008).

Birçok çalışma hemodiyaliz sularını taşıma borularında biyofilm oluştuğunu ve biyofilmin biyositlere yüksek direnç gösterdiğini bildirmiştir. Bu bakteriel biyofilm hemodiyalize giren hastalarda kronik inflamasyona sebep olan toksinlerin kana tekrarlayan difüzyonuna neden olabilir. Literatürde biyofilm oluşturabilen birçok bakteri (*Pseudomonas spp.*, *Burkholderia spp.* ve *Mycobacteria*) tanımlanmıştır. Diğer birçok bakteri türüne kıyasla, mikobakteriler, klor gibi kimyasal dezenfektanlara oldukça dayanıklıdır (Montanari, 2009). Bununla birlikte, Arvanitidou ve arkadaşları (1998), hemodiyaliz ünitesi ile ilişkili suyun ana kirletici maddeleri olarak Gram negatif bakterileri işaret etmektedir.

Hemodiyaliz hastaları, diyaliz tedavisi alma sürecinde birçok antibiyotiğe dirençli suşların bulaşması açısından risk altındadırlar. Bu hastaların sık hastaneye yatmaları, özellikle uzun süreli antibiyotik kullanımı ve cerrahi girişimler bunun nedeni olmaktadır. Hemodiyaliz hastalarında sık vankomisin kullanılması nedeniyle diyaliz hastaları vankomisine dirençli enterokok (VRE) yönünden artmış risk altındadır ve VRE epidemileri gözlenmektedir. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), metisilin dirençli *koagülaz negatif stafilokoklar* (KNS), hatta vankomisin dirençli stafilokoklar ve çok ilaca dirençli gram negatif basiller de diğer önemli dirençli bakterilerdir (Parlar, 2008).

Araştırmamızın amacı; diyaliz ünitesi su sisteminin mikrobiyolojik etkinliğinin belirlenmesi ve hastaların kullandıkları antibiyotikler ile izolatların bu antibiyotiklere dirençliliklerinin belirlenmesidir. Bu çalışmanın önemi; ülkemizde hemodiyaliz ünitelerinde suların mikrobiyolojik incelenmesi, su sistemini en sık kontamine eden etkenlerin izolasyonu ve antibiyotik dirençliliklerinin incelenmesi konusunda bakteriyolojik ve moleküler tekniklerin kullanıldığı ilk çalışmalardan biri olmasıdır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Böbreğin Yapısı ve Görevleri

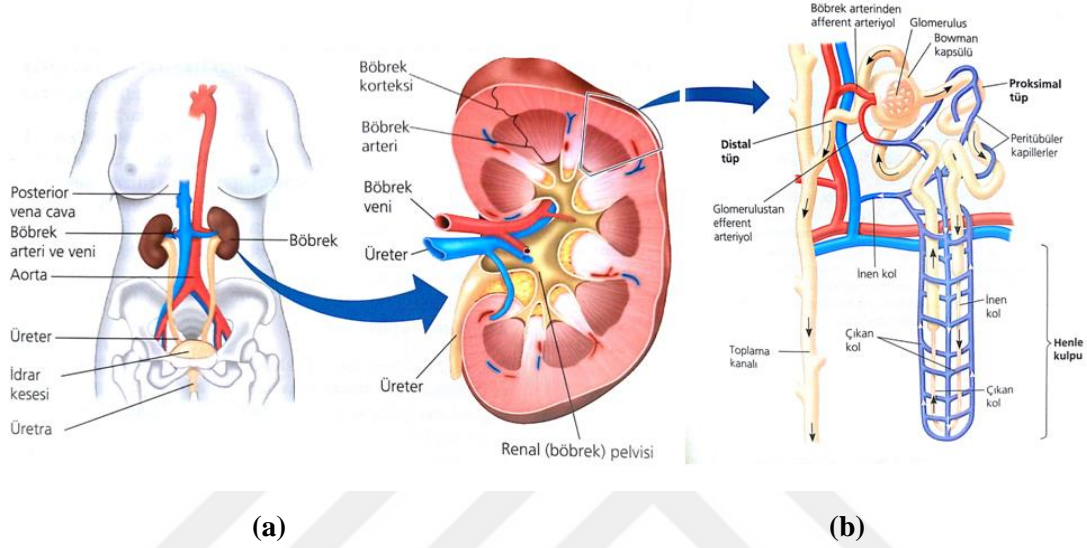
Böbrekler, 11. torasik vertebra ile 3. lumbal vertebra arasında retroperitoneal bölgeye yerleşmiş bir çift organdır (Şekil 2.1 a). Yetişkin bir bireyde her bir böbrek yaklaşık 12 cm uzunluğunda ve erkeklerde 150 g, kadınlarda 135 g ağırlığındadır (Lote, 1994).

Böbrekler, insan vücudunun en önemli ve hayati organlarından. Vücudumuza dışarıdan aldığımız veya vücudumuzda metabolizma sonucu oluşan atıkların temizlenmesinden böbreklerimiz sorumludur. Vücut sıvılarının hacim ve bileşenleri ile elektrolitlerin düzenlenmesi gibi birçok önemli görevleri bulunmaktadır. Böbreklerimiz, kanın osmotik basıncını sabit tutmak için uygun miktarda elektrolit atılmasını sağlayarak sıvı-elektrolit dengesini düzenler. Ayrıca metabolizma sonucu meydana gelen atık maddelerin (üre, kreatinin, ürik asit, bilirubin vb.) idrar yoluyla vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar. Aynı zamanda vücut için gerekli olan maddelerin geri emilimini sağlayarak da (glukoz, aminoasit gibi) madde kaybını önler (Dönmez, 2012; Özyurt, 200). Böbreklerin diğer görevleri;

- Arteriyel basıncın düzenlenmesi
- Asit baz dengesinin düzenlenmesi
- Eritrosit yapımının düzenlenmesi (eritropoetin hormonu salgılayarak)
- 1,25-dihidroksi vitamin D3 yapımının düzenlenmesi
- Bazı hormonların salgılanması, metabolize edilmesi ve atılması
- Glikoneogenez (uzun süreli açlık esnasında aminoasitlerden glukoz sentezler) (Kaysı, 2007)

Böbrek fonksiyonları, böbreğin en küçük birimi olan nefronlara dayanmaktadır. Her bir böbrek yaklaşık olarak bir milyon nefrona sahiptir. Nefronlar, glomerül ve uzun tübüllerden oluşur (Şekil 2.1 b). Glomerül, epitel hücreleri ile örtülü ve dışından da Bowman kapsülü ile çevrelenmiş zengin kapiller damar yumağıdır. Tübüller ise filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü kanallardır (Guyton ve Hall, 2007).

Her bir nefron kendi başına idrar oluşturabilme yeteneğindedir. Böbreğin fonksiyonları bütün nefronların fonksiyonlarının toplamıdır. Her iki böbrekte ne kadar sağlam nefron varsa, böbrek fonksiyonları o kadar iyidir. Ancak nefronların kendilerini yenileme yetenekleri yoktur. Böbrek hasarı, hastalık ve yaşlanma olayları ile nefron sayısında azalma görülür (Kösem, 2017).



Şekil 2.1. Böbrekler ve nefronun yapısı (Campbell, 2013)
(a): Böbreklerin anatomik pozisyonu ve böbreğin yapısı
(b): Nefronun yapısı

Sağlıklı bir insanda, her iki böbrekten toplam olarak; 120 mL/dk kan süzülür. Buna glomerüler filtrasyon hızı (GFH) denir. Glomerüllerden tübüllere doğru süzülen bu süzüntüye ultrafiltrat denir. Bu ultrafiltratın büyük bir kısmı böbrek tübuluslarından geri emilir. Vücut için önemi kalmayan kısmı ise idrar yolu ile dışarıya atılır. Ultrafiltrat yalnız su değildir, içinde elektrolitler ve metabolik artıklar da bulunur. Kan ile ultrafiltrat arasındaki en büyük fark; kanda protein ve elektrolitler bulunurken, ultrafiltrat içinde bulunmamasıdır. Bir günde oluşan ultrafiltrat miktarı 120 L olmasına karşın, günlük idrar miktarı ortalama 1200-1500 mL arasındadır. Metabolik atık maddelerin vücuttan atılabilmesi için günlük idrar miktarının en az 400 mL olması gerekir. Buna zorunlu idrar denilir (Akpolat, 1999). İnsanda ortalama plazma hacmi yaklaşık 3 litredir. Glomerüler filtrasyon hızının yüksek olması; vücut sıvılarının hergün defalarca filtre olmasına ve böbrekler tarafından işleme tabi tutulmasına olanak sağlar (Kösem, 2017).

Hastalık ve sağlık durumlarında böbrek fonksiyonlarının en iyi göstergesi olarak GFH kabul edilmiştir. Böbrek fonksiyonları GFH'na, nefronun toksik maddeleri atma kapasitesine ve suyun tübüllerde geri emilme kapasitesine bağlıdır. Glomerüler filtrasyon hızının klinik göstergesi olarak sıklıkla kreatinin klirens testi kullanılmaktadır (Sezen, 2013).

2.2. Böbrek Yetmezliği ve Tedavisi

Böbrek yetmezliği, böbreklerin vücudun metabolik artıklarını atamadığı, sıvı-elektrolit dengesini düzenleme yeteneğini kaybettiği durumlarda gelişir. Bu durumda vücudumuzda idrar ile atılması gereken maddeler birikir ve sonuşta endokrin, metabolik fonksiyonlar bozulduğu gibi, sıvı-elektrolit ve asit-baz dengesinde bozulur. Böbrek yetmezliği sistemik bir hastalıktır ve genellikle çeşitli böbrek hastalıklarının sonunda geldiği son noktadır (Akdemir ve Birol, 2011). Böbrek yetmezliğinde böbreğin temel fonksiyonlarında bozulmalar olur ve değişik adaptif sistemler devreye girer (Bilge, 2010). Böbrek yetmezliği çok kısa süre içinde gelişen ‘‘Akut Böbrek Yetmezliği’’ ve tedaviye rağmen hastalığın ilerlediği, böbrek fonksiyonlarının geri dönüşsüz olarak bozulduğu ‘‘Kronik Böbrek Yetmezliği’’ olarak iki gruba ayrılır.

2.2.1. Akut Böbrek Yetmezliği (ABY)

Böbrek fonksiyonlarının akut kaybı olarak tanımlanan akut böbrek yetmezliği; glomerüler filtrasyon hızında saatler, günler içinde hızlı düşme ile karakterize bir durumdur. Çeşitli nedenlere bağlı olarak böbrek hasarı nedeni ile idrar miktarının azalması, üre, kreatinin gibi toksik maddelerin vücuttan atılamaması, sıvı-elektrolit dengesinin korunamaması ve asit-baz bozukluğu gibi belirtilerle birçok organ ve sistemi etkileyen bir hastalıktır (Akdemir ve Birol, 2011). Akut Böbrek Yetmezliği (ABY) renal fonksiyonda hızlı bir azalmayla karakterize ve yüksek mortalite oranına sahip önemli bir klinik sendromdur (Horoz, 2004). Glomerüler filtrasyon hızındaki düşüşün aylar hatta yıllar içerisinde geliştiği kronik böbrek yetmezliğinin aksine, akut böbrek yetmezliğindeki GFH düşüşü daha hızlıdır ve günler ile haftalar içerisinde gelişir.

Akut Böbrek Yetmezliği, nadiren toplumsal kökenli bir hastalık olup, hastanede yatan hastaların %3-7'sinde ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların %25-30'unda akut böbrek yetmezliği gelişmektedir. İleri yaş, erkek cinsiyet, eşlik eden diğer hastalıklar, sepsis, geçirilmiş büyük cerrahi, kardiyojenik şok, nefrotoksik ilaçlara ve maddelere maruz kalma, çoklu organ işlev bozukluğu akut böbrek yetmezliği gelişimi için risk faktörleridir (Taş ve ark., 2011). Genellikle hastalığa ait semptomlar çoğu zaman görülmez iken hastanede yatan hastaların kan değerlerinde üre ve kreatinin düzeylerinde yeni ortaya çıkan bir artış durumunda tanı konulur.

Akut Böbrek Yetmezliği, sıklıkla geri dönüşümlü bir böbrek hastalığı olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte eşlik eden hastalıklara bağlı olarak komplikasyon gelişme riski yüksektir (Clarkson ve ark., 2008). Akut Böbrek Yetmezliği gelişen hastaların mortalite oranı altta yatan klinik duruma göre %88'e kadar çıkabilir. 2007 yılı Türk Nefroloji Derneği kayıtlarına göre akut böbrek yetmezliğinde en sık mortalite nedenleri kardiyovasküler hastalıklar, enfeksiyon, solunum yetmezliği ve serebrovasküler olaylardır (Taş ve ark., 2011). ABY'nin etiyolojik nedenleri, böbrek hasarlanmasının kaynağına göre; prerenal, renal ve postrenal sorunlara bağlı olarak gelişir.

Akut Böbrek Yetmezliği tedavisinde ilk yapılması gereken altta yatan neden biran önce düzeltmektir. Prerenal ABY uygun sıvı desteği, postrenal ABY ise obstrüksiyonun giderilmesi ile düzeltilir. Renal ABY'de ise, konservatif tedaviler ve diyaliz tedavisi uygulanmaktadır. Akut Böbrek Yetmezliğinde mortalite oranı, son yıllarda yoğun bakım üniteleri ve renal replasman tedavisindeki gelişmelere rağmen yüksek kalmaya (%20-40) devam etmektedir (Ympa, 2005).

2.2.2. Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY)

Kronik böbrek yetmezliği (KBY) genel anlamda çeşitli hastalıklara bağlı olarak gelişen hastanın böbrek fonksiyonlarında kronik, ilerleyici ve geri dönüşümü olmayan bir bozulma hali olarak tanımlanabilir. Klinik açıdan baktığımızda; glomerüler filtrasyon hızında giderek azalma sonucunda böbreğin sıvı-solüt dengesini düzenleme, metabolik-endokrin fonksiyonlarının biyokimyasal, kronik ve ilerleyici biçimde bozulduğu ve üremik sendrom ile sonuçlanan, geriye dönüşümü olmayan bir durumdur (Tanrıverdi ve

ark., 2010). Böbreklerde üç aydan daha uzun süren, geri dönüşümsüz ve ilerleyici işlev bozukluğu, KBY olarak değerlendirilir. Nefron sayısında ve işleyişinde uygunsuz bir şekilde azalmanın görüldüğü, birçok etiyojinin rol aldığı patofizyolojik bir durumdur. Bu özellikler dışındaki klinik ve laboratuvar verileri, hastalarda farklılıklar gösterebilir. Kronik böbrek yetmezliği, hastaların hem mortalite ve morbidite oranını arttıran hem de hastaneye yatış oranlarını yükselten, fiziksel fonksiyon, bağımsız yaşam, iş hayatı ve yaşam kalitesi üzerinede önemli bir etkisi olan kompleks kronik bir hastalıktır (Taş ve ark., 2017).

Kronik böbrek yetmezliği, sıklığı giderek artan, prognozu kötü, tedavi maliyetinin yüksek olması nedeniyle ülkemizde ve dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Kronik böbrek yetmezliği birçok nedene bağlı olarak gelişebilir. Etiyolojisinde genellikle diyabet, hipertansiyon ve glomerüler hastalıklar yer almaktadır (Nadir ve ark., 2002; Serdengeçti ve ark., 2010).

Kronik böbrek yetmezliğinin tanımı genel bir tanım olup, hastalığın derecesini bize tam olarak anlatamaz (Kösem, 2017). Glomerüler filtrasyon hızı, böbrek yetmezliğinin derecesini hesaplamada en yaygın ve objektif ölçüm yöntemidir. National Kidney Foundation-Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI) tarafından hazırlanan 2002 yılı Kronik Böbrek Hastalığı Değerlendirme ve Sınıflama Kılavuzuna göre KBY;

1. Glomerüler Filtrasyon Hızında (GFH) azalma olsun veya olmasın, böbrekte 3 ay veya daha uzun süre devam eden yapısal veya fonksiyonel anormallikler olması,
2. Böbrek hasarı olsun ya da olmasın GFH'nin 3 ay veya daha uzun süredir 60 mL/dk/1,73 m²'den daha düşük olması olarak tanımlanmıştır.

Kronik böbrek yetmezliğinin tanımı ve evrelerine ilişkin kılavuz 2002 yılında National Kidney Foundation (NKF-K/DOQI) tarafından yayınlamıştır. 2012 yılında da Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO) Uzlaşma Konferansında KBY'nin tanımı ve evreleri yeniden düzenlenmiştir. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) kılavuzlarında açıklandığı şekliyle KBY'nin GFH'na göre belirlenen evreleri Çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. K/DOQI kılavuzuna göre kronik böbrek hastalığının evreleri (National Kidney Foundation, 2002)

Evre	Tanım	GFH (mL/dk/1,73 m ²)
1	Normal veya artmış GFH ile birlikte böbrek hasarı	≥90
2	Hafif GFH azalması ile birlikte böbrek hasarı	60 – 89
3	Orta derecede böbrek yetmezliği	30 – 59
4	Şiddetli böbrek yetmezliği	15 – 29
5	Son Dönem Böbrek Yetmezliği (SDBY)	<15

Kronik böbrek yetmezliğinde, erken evrede hastalarda genellikle belirti görülmezken ileri evrelerde hastalıkla ilişkili belirtiler görülmeye başlar. Klinik belirti ve bulgular, böbrek yetmezliğinin patolojisi ve glomerüler filtrasyon hızı ile yakından ilişkilidir. Glomerüler filtrasyon hızı, 35-50 mL/dk'nın altına inmedikçe hastalar KBY ile ilişkili belirtiler görülmez. GFH, 20-25 mL/dk olunca hastada üremik semptomlar ortaya çıkmaya başlar. GFH değeri 15 mL/dk'nın altına inince de son dönem böbrek yetmezliğinden (SDBY) bahsedilir (Göküstün, 2014). Tedavisinde ise böbrek yetmezliğinin derecesine göre; tanıya dayalı özgül tedavi, eşlik eden hastalık durumlarının değerlendirilmesi ve kontrol altına alınması (ör: Diabetes Mellitus ve hipertansiyon) gerekir. Böbrek işlev kaybını önlemeye yönelik; kan basıncı kontrolü, sigaranın bırakılması, egzersiz, lipit kontrolü ve nefrotoksik ajanlardan kaçınılması gibi sağlıklı yaşam stiline geliştirilmesi önerilmektedir (Topbaş, 2015). Böbrek fonksiyonlarının geriye dönüşümsüz kaybı ile karakterize olan son dönem böbrek yetmezliği tanısı alan hastalarda ise hayatı tehdit eden, üremiden korumak için renal replasman tedavileri olan periton diyalizi (PD), hemodiyaliz (HD) ve renal transplantasyon seçenekleri değerlendirilmelidir.

2.2.3. Renal Replasman Tedavileri (RRT)

Böbrek fonksiyonlarını yerine koyma tedavisi olan Renal Replasman Tedavileri, ilk kez 1960 yılında diyaliz uygulamaları ile ortaya çıkan bir kavramdır. Günümüzde RRT; böbrek fonksiyonları bozulmuş, glomerüler filtrasyon hız değeri 15 mL/dk'nın altınan inen ve SDBY tanısı alan hastalarda yaşamın sürdürülmesi için kullanılan tedavi yöntemleri olarak anlaşılmaktadır. Bu aşamada bulunan bir hastaya uygun bir renal replasman tedavisi başlanmaz ise, üremi tablosu ortaya çıkar.

Renal Replasman Tedavileri içinde yer alan tedavi yöntemleri başlıca 4 ana başlıkta toplanabilir; beslenme ve tıbbi tedavi (konservatif tedavi), periton diyalizi (PD), hemodiyaliz (HD) ve transplantasyon (organ nakli) (Mir, 1994). Son dönem böbrek yetmezliği bulunan hastalar zaman içerisinde bu tedavilerin hepsinde yararlanmak zorunda kalabilirler. Hastalarda doğru tedavi zamanını belirlemek en önemli konudur. KBY'nin erken evrelerinde hastalar RRT konusunda bilgilendirilmeli ve RRT'ye geçişin oldukça "yumuşak" olması sağlanmalıdır. Eğer hastanın yakınması yok ise, RRT'ye başlamak için acele edilmemelidir. Ancak üremenin komplikasyonlarının gelişimini önleyecek kadar da erken dönemde başlatılmalıdır. Hastalar ve yakınları, RRT hakkında, tedavinin başlayacağı süre, tedavi seçeneğine göre uygun hazırlıkların yapılması gibi konularda eğitim programlarına alınmalıdır (Tombak, 2008).

Hastalarda KBY teşhisinden hemen sonra tedavi planı başlatılmaktadır. Son dönem böbrek yetmezliği aşamasına henüz gelmemiş KBY hastalarına öncelikle koruyucu tedavi seçenekleri uygulanmaktadır. Böylece hastalığın SDBY'ne ilerlemesini yavaşlatarak ortaya çıkan üremik komplikasyonlar önlenmektedir (Akdemir ve Birol, 2011). Bu dönemde komplikasyonlar belirlenip ilaç ve diyet tedavisine başlanmaktadır. Ancak böbrekler tümüyle işlevini yapamaz duruma geldiğinde hemodiyaliz, periton diyalizi ve organ nakli (transplantasyon) tedavilerinden biri uygulanmaktadır (Tombak, 2008). Tedavinin asıl hedefi, hastaların yaşam süresini uzatmak olmakla birlikte, aynı zamanda yaşam kalitesinin en iyi düzeyde tutulması da amaçlanmaktadır. (Ersoy, 2005). Son dönem böbrek yetmezliğinin ideal tedavisi, böbreğin tüm fonksiyonlarının düzeldiği böbrek transplantasyonudur. Ancak, transplantasyon olanağındaki kısıtlılıklar nedeniyle, hastaların büyük kısmı diyaliz ile yaşamını sürdürmek zorundadır. Renal Replasman Tedavi seçeneklerinin tercihi ülkeden ülkeye büyük farklılıklar göstermektedir. Dünyada RRT altındaki 2 milyonu aşkın hastanın %25'den azı böbrek nakillidir. Ülkeler arasında bazı farklılıklar olmakla beraber, tüm dünyada hemodiyaliz tedavisi daha yaygındır (Süleymanlar ve ark., 2013).

Ülkemizde, Türk Nefroloji Derneği'nin verilerine göre, 2016 yılı sonu itibariyle kronik HD/PD programında veya fonksiyonel greftle izlenmekte olan tüm hastaların (çocuk hastalar dahil) sayısının 74.475 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2.2). En sık uygulanan RRT tipi hemodiyaliz (%76,12) olup, bunu transplantasyon (%19,17) takip etmektedir. Periton diyalizi (%4,71) ise üçüncü yer almaktadır (Süleymanlar ve ark., 2017).

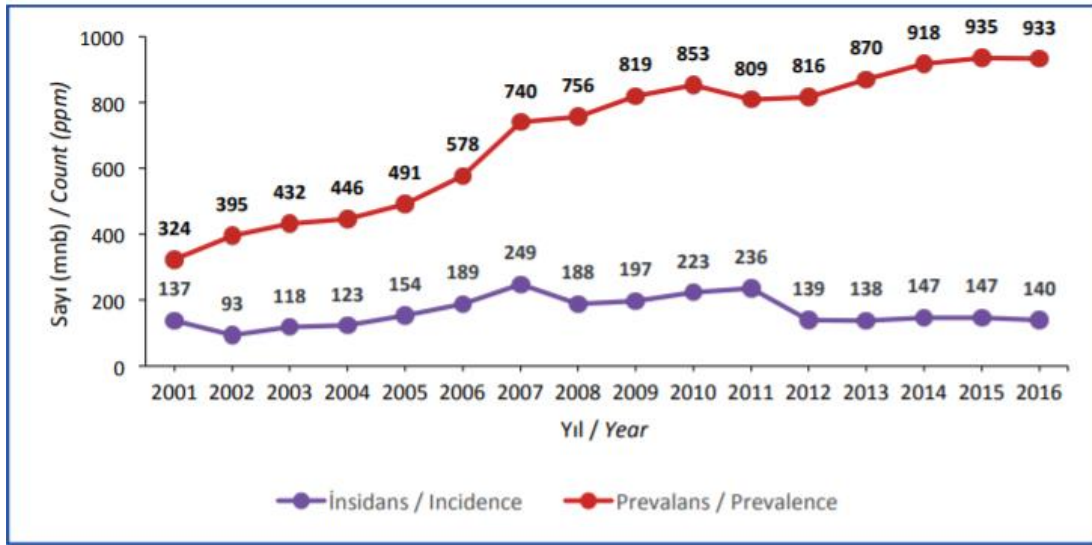
Türkiye’de 2016 yılında RRT gerektiren son dönem böbrek hastalığı nokta prevalansı milyon nüfus başına 933 olarak saptanmıştır (bu sayıya çocuk hastalar dahildir).

Çizelge 2.2. 2016 yılı sonu itibarıyla RRT tipine göre dağılım (Süleymanlar ve ark., 2017)

Renal replasman tedavi tipi	Hasta sayısı	Oran (%)
Hemodiyaliz	56.687	76.12
Periton diyalizi	3.508	4.71
Transplantasyon *	14.280	19.17
Toplam	74.475	100.00
Genel prevalans	933.1 mnb **	

* : Yaklaşık sayı ** : Milyon nüfus başına

2016 yılında Türkiye’de RRT insidansı, çocuk hastalar dahil milyon nüfus başına 140 olarak hesaplanmıştır. Prevalansın yıllar içinde kararlı bir artış trendi içinde olduğu görülmüş olsa da, son yıllardaki veriler bir plato oluşumunun başladığını düşündürmektedir (Şekil 2.2).

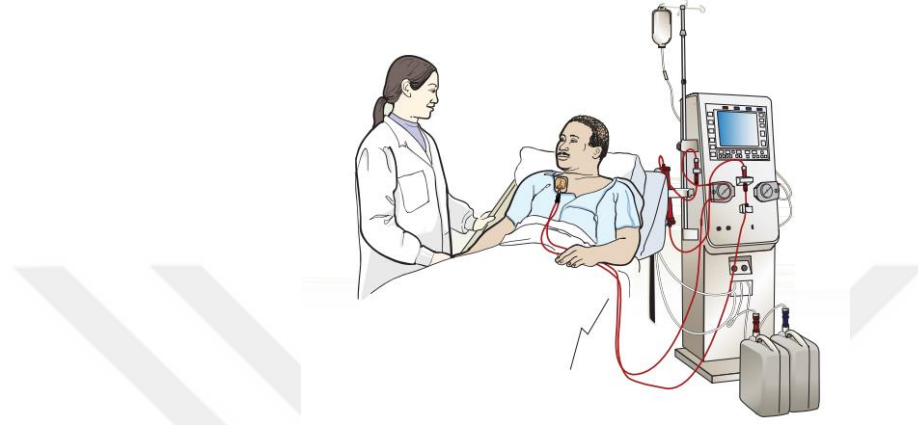


Şekil 2.2. Türkiye’de RRT gerektiren SDBY insidansı ve prevalansı (Süleymanlar ve ark., 2017)

2.3. Hemodiyaliz Tedavisi

Hemodiyaliz (HD), dünyada ve ülkemizde, son dönem böbrek yetmezliği gelişen hastalarda en yaygın renal replasman tedavi yöntemlerinden biridir (Şekil 2.3). İnsanda ilk HD uygulaması 1946 yılından Willem Johan Kolff tarafından akut böbrek yetmezliği tedavisinde uygulanmış ve başarılı olmuştur. 1960’lı yıllardan itibaren SDBY olan hastaların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Fesci, 1996). Hemodiyaliz işleminin

gerçekleştirilmesi için hastalarda 200-600 mL/dk hızında yeterli kan akımı sağlanmalı bunun için de kalıcı veya geçici damar erişim yolu gerekmektedir. 1960 yılında Brescia'nın internal arterio-venöz fistülü geliştirmesi ile diyaliz tedavisinde kanama, pıhtılaşma ve enfeksiyon sorunları en aza indirilmiş ve bu alanda çalışmalar giderek ilerlemiştir (Akpolat ve Utaş, 2001).



Şekil 2.3. Hemodiyaliz uygulaması (Anonim, 2016)

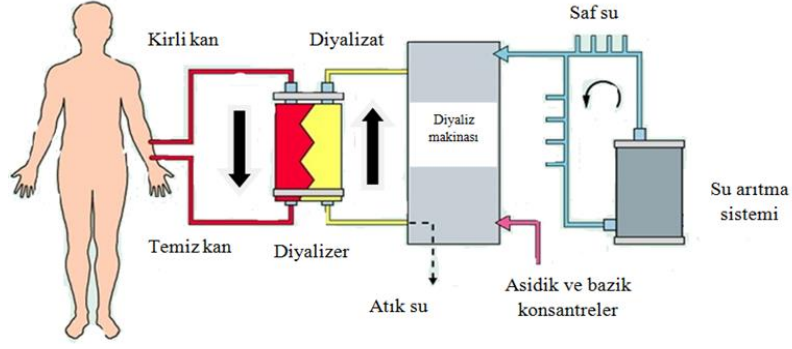
Ülkemizde ilk hemodiyaliz uygulaması 1963 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün, ülkemize 3 hemodiyaliz makinesini hibe etmesi ile başlamıştır. Bu makineler o dönem Gülhane Askeri Tıp Akademisi'ne, Hacettepe Tıp Fakültesi'ne ve Ankara Üniversitesi Hastanesi'ne verilmiştir. Bu tarihlerde genellikle üniversitelerdeki dâhiliye kliniklerinde hemodiyaliz uygulamaları yapıyordu. Ülkemizde sürekli hemodiyaliz programına ise 1974 yılında geçilmiştir. 1990 yıllarından sonra diyaliz tedavisi alan hasta sayısının ve diyaliz ünitelerinin sayısının giderek artmıştır. İlk hemodiyaliz merkezleri hakkında yönetmelik 1993 yılında yayınlanmıştır. Hemodiyaliz tedavisi, gelişen teknoloji ile beraber 2000'li yıllara büyük mesafeler alarak girmiştir. Artan merkez sayıları ile birlikte diyaliz uygulamaları da çeşitlenmiştir. Gece uzun süreli diyaliz uygulamaları 2004 yılında yapılmaya başlamıştır, fakat günümüze kadar devam ettirilememiştir (Kösem, 2017). Ülkemizde ev hemodiyalizi uygulanmasına 2006 yılında başlanmıştır. 2016 yılı verilerine göre ülkemizde 364 hastaya ev hemodiyalizi tedavisi uygulanmaktadır (Süleymanlar ve ark., 2017). Ülkemizde diyaliz uygulamaları ile ilgili konularda şuan geçerli ve yürürlükte olan yasal düzenlemelere baktığımızda yıllar içerisinde ihtiyaçlar doğrultusunda Sağlık Bakanlığı tarafından günün ihtiyaçlarına göre mevcut yönetmeliklere ek maddeler eklenmiş ya da tamamen yenilenmiştir.

Bu güne kadar sırasıyla 1993, 1998, 2005 ve 2010 yıllarında diyaliz merkezleri hakkındaki yönetmelikler yeniden düzenlenerek yayınlanmıştır. Mevcut yönetmelik 2010 yılından sonra tekrar revize edilmiştir ve “Diyaliz Merkezleri Hakkında Yönetmelik'te Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik” 14.02.2012 tarih ve 28204 sayılı Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe girmiştir (Sezen, 2017). Ayrıca Sağlık Bakanlığı tarafından hemodiyaliz merkezlerinde diyaliz işleminde gerekli olan hemodiyaliz çözeltisinin dilüsyonunda kullanılan saf suyun üretimi için su sisteminin kurulması, bakımı, takibi ve kontrolünü amaçlayan ve daha kaliteli hemodiyaliz tedavisinin sunulmasına yönelik oluşturulan “Su Arıtma Sistemi Yönergesi” 28.10.2011 tarih ve 44047 sayılı makam onayı ile güncellenerek yürürlüğe girmiştir.

2.3.1. Hemodiyaliz İşlemi

Bir hastaya hemodiyaliz tedavisi kararı verildiğinde, hastanın klinik durumu, eşlik eden hastalıkları, rezidüel renal fonksiyonları ve kreatin klirensine göre haftada iki veya üç kez 4 saat boyunca diyaliz merkezinde diyaliz tedavisi uygulanır (Sezen, 2014). Bu tedaviye merkezde standart hemodiyaliz tedavisi denilmektedir.

Hemodiyaliz işlemi bazı sistem ve ekipmanları kullanarak temel fizik kurallarının pratik ve organize bir şekilde uygulanmasıdır. Şehir şebekesinden diyaliz ünitesine gelen su, önce su sisteminde bir dizi işlemde geçtikten sonra saf su olarak, diyaliz solüsyonu hazırlamak üzere hemodiyaliz cihazlarına kapalı bir boru sistemi ile iletilir. Hemodiyaliz cihazı bir yandan su sisteminden gelen saf su ile hasta için uygun diyaliz solüsyonunu hazırlarken, bir yandan da hastadan arter iğnesi veya kateterden alınan kanı, arter setleri ile diyaliz membranı (diyalizer) ulaştırılır (Şekil 2.4). Hazırlanan diyaliz solüsyonu (diyalizat) ile diyalizerde ters yönde karşılaştırılan bu kanın, içinde bulunan küçük molekül ağırlıklı toksinler uzaklaştırılırken difüzyon ve ultrafiltrasyon olayları ile sıvı ve elektrolit dengesi de sağlanır. Sonuç olarak diyalizerden ven seti aracılığı ile çıkan temiz kan, hastaya ven iğnesi veya kateter üzerinden verilir (Kösem, 2017)



Şekil 2.4. Hemodiyaliz tedavisi bileşenleri (Değiştirilmiş, Anonim, 2015)

Hemodiyaliz uygulamasında iki devre söz konusudur. Bunlar kan ve diyalizat devreleridir. Kan devresi hasta, uygun damar yolu, diyaliz seti (arter ve ven setleri), diyaliz membranı ve hemodiyaliz cihazından oluşur. Buna ekstrakorporeal devre de denilmektedir. Dalizat devresi hemodiyaliz cihazı içinde işlenmiş su ile karışan konsantre diyalizattan oluşur. Hastanın kanı diyalizerde bulunan yarı geçirgen zardan geçirilirken, zarın diğer tarafından da uygun bir diyaliz solüsyonu ters yönde hareket ederek sıvı elektrolit değerleri normale getirilmeye çalışılır (Sezen, 2014). Yarı geçirgen membranın porları su ve küçük moleküllerin geçişine izin verirken, proteinler ve kan hücreleri gibi daha büyük yapıların geçişine izin vermez (Daugirdas, 2003).

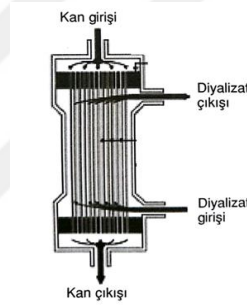
Hemodiyaliz işlemi için gerekli olan ekipman ve sistemler şunlardır; hemodiyaliz cihazı, arter-ven setleri ve iğneleri, diyalizat, diyalizer (diyaliz membranı) ve su arıtma sistemi.

Hemodiyaliz cihazları, diyalizerdeki kan ve diyalizat akımlarını kontrol ederek, hastanın güvenli bir şekilde diyaliz tedavisi almasını sağlar. Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte diyaliz cihazları, diyaliz tedavisi sırasında olası komplikasyonları önleyen, haber veren gösterge ve alarm sistemleri sayesinde mümkün olan en üst düzeyde işlem güvenliğini sağlamaktadır. Modern hemodiyaliz makineleri genel olarak kan hattı, diyalizat hattı ve kontrol panellerinden oluşur (Kösem, 2017).

Hemodiyaliz tedavisinde hasta kanı vücut dışı kapalı bir devrede (ekstrakorporeal devre) geçirilerek diyalizere ulaştırılır. Hemodiyaliz cihazına yeterli hızda kan akımını (300-400 mL/dk) sağlamak için uygun bir damar erişim yolu sağlanır. Hastanın damar erişim yolu olarak kullanılan arteriovenöz fistül (AVF) ya da arteriovenöz greft ile bağlantı sağlayan; arter-ven iğneleridir. Kateterli hastalarda ise arter ve ven

lümenleridir. Arter iğnesi veya arter lümeni ile hastadan kan uygun bir hızda çekilir. Çekilen kan arter seti ile diyalizere götürülür. Ven seti de, ven iğnesine veya ven lümenine takılarak diyalizerden gelen kan hastaya aynı hızda geri verilir (Tuğlular, 2016).

Diyalizör (diyaliz membranı), hemodiyaliz işleminin gerçekleştiği yarı geçirgen membrandır. Diyalizerin içinde bulunan borucuklardan kan geçerken, borucukların dışından da ters yönde diyalizat geçer ve hemodiyaliz işlemi gerçekleşir (Kösem, 2017). Diyalizör dört girişli bir kutu veya tüpe benzetilebilir. İki giriş kan bölmesi, diğer ikisi ise diyalizat bölmesi ile bağlantılıdır. Yarı geçirgen membran iki ortamı birbirinden ayırır. Diyalizerde kan ile diyalizat kesinlikle birbirine karışmaz (Akpolat, 2010). Diyaliz membranları bir poliüretan silindir ve içinde yer alan hollow fiber (içi boş kılcal fiberler) halindeki liflerin toplamıdır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Hemodiyaliz mebranı (diyalizer) (Tuğlular, 2016)

Diyaliz membranları membran tipine, kan hacmi, yüzey alanına, ultrafiltrasyon katsayısına, klirens kapasitesine, yeniden kullanım özelliğinin olup olmasına ve sterilizasyon tekniğine göre sınıflandırılabilirler. Hollow fiber diyaliz membranları günümüzde en çok kullanılan membranlardır. Poliüretan bir silindir içerisine, insan kapiller damarlarında olduğu gibi, binlerce dikey lif yerleştirilmiştir. Hemodiyalizde kullanılan membranlar, yapılarında içerdikleri maddelere göre selüloz, modifiye selüloz, sentetik selüloz veya tamamen sentetik yapıda olabilir. Diyaliz membranının (diyalizer) lifleri içinden hastanın kanı, kapillerin dış çeperinden ise diyalizat hemodiyaliz cihazı tarafından ters yönlerde geçirilir (Daugirdas, 1994). İdeal bir membran (diyalizer) şu özelliklerde olmalıdır:

- Hem düşük molekül, hem de orta-yüksek molekül ağırlıklı üremik toksinleri yüksek düzeyde temizleyebilmeli

- Yeterli ultrafiltrasyon sağlamalı
- Protein ve aminoasitler için düşük düzeyde kayıp olmalı
- Biyolojik uyumlu olup, sitokin salınımını ve trombojeniteyi çok az, ideali hiç aktive etmemeli
- Doluş kan hacmi düşük olmalı
- Düşük maliyetli olmalı
- Tekrar kullanımda bu özellikleri korumalıdır (Packet, 2005).

Hemodiyaliz membranları por boyutlarına göre “düşük geçirgenlikli veya düşük akımlı membranlar” ve “yüksek geçirgenlikli veya yüksek akımlı membranlar” olarak kategorize edilir. Beta-2-mikroglobülin gibi bazı büyük moleküller düşük geçirgenlikli hemodiyaliz membranları ile yeterli oranda vücuttan uzaklaştırılmamaktadır. Son zamanlarda, “yüksek geçirgenlikli” membran kullanımı yönünde bir eğilim söz konusudur. Ancak “yüksek geçirgenlikli” membranlar kullanılırken sıvı uzaklaştırma hızını uygun şekilde kontrol edebilmek ve diyaliz solüsyonunda olabilecek kirli materyallerin membran aracılığı ile hastaya geçişini önleyebilmek için yeni hemodiyaliz makineleri ve yüksek kalitede diyaliz solüsyonlarının kullanılması gerekmektedir. Yüksek akımlı membranların porları bakterilerin geçişi için çok küçüktür, fakat pirojenik bakteriyel ürünlerin geçişine izin verebilirler (Cheung ve ark., 2006).

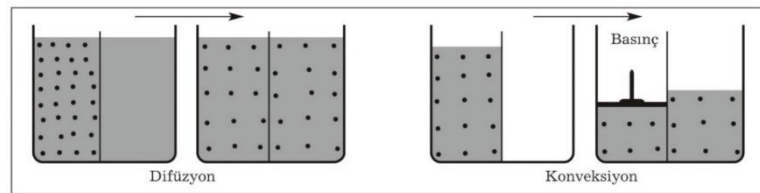
Birçok araştırmada bakteriyel ürünlerin hem düşük akımlı hem de yüksek akımlı membranlardan geçip mononükleer hücreleri uyararak, bu hücrelere tnf- α , IL-6 ve IL-1 gibi sitokinleri salgılatığı gösterilmiştir (Eyileten ve ark., 2010). Bu mikrobiyolojik kontaminantlar febril reaksiyona yol açmazlar, ancak vücutta sitokin üretimini uyararak diyaliz hastalarında sıklıkla görülen kronik enflamasyonun patogenezinde rol alırlar.

Diyalizat, şehir şebeke suyu revers ozmoz yöntemiyle arıtıldıktan sonra, hemodiyaliz cihazlarında son kontrolleri yapılarak, konsantre asit ve baz solüsyonlarının belirli oranlarda homojen olarak karıştırılması ile elde edilen solüsyondur. Hemodiyaliz tedavisinin odak noktasını diyalizer ve diyalizat oluşturur. Haftada 3 kez 4 saat diyalize giren bir hasta, bir haftalık süre içerisinde yaklaşık 360-400 litre diyalizat ile karşılaşır. Bu nedenle diyalizat; hemodiyaliz hastalarının erken ve geç dönem prognozunu etkileyen en temel faktörlerden birisidir (Kösem, 2017). Su sisteminin amacı ise; hemodiyaliz işleminde kullanılacak olan diyalizati hazırlamak için, diyaliz amaçlı saf

suyu hazırlamaktır. Şebekeden ya da kuyudan gelen su belirli işlemlerden geçerek diyalizat amaçlı saf su haline getirilir. Hemodiyaliz merkezlerinde ya da dört hemodiyaliz cihazından fazla cihaz olan yerlerde klasik su sistemi kullanılır. Eğer evde hemodiyaliz ya da yoğun bakımda hemodiyaliz yapılacak ise taşınabilir su sistemleri kullanılır. Her iki su sisteminde de suya renk, koku, tat veren maddeler süzülürken, suyun sertliği, içerdiği biyokimyasal ve mikrobiyolojik yükler istenilen standartlara uygun hale getirilir (Sezen, 2014).

2.3.2. Hemodiyalizin Fizyolojik Prensipleri

Hemodiyaliz tedavisinde hasta kanı ve diyaliz sıvısı, diyalizerde bulunan yarı geçirgen zar ile karşı karşıya gelmektedir. Diyalizerde bulunan porlar su, sodyum, potasyum, üre gibi küçük moleküllü maddelerin bir taraftan diğer tarafa geçmesine engel olmazken daha büyük moleküllü protein gibi maddeler, kan hücreleri, çapları porlardan daha büyük olduğundan diyalizata geçemezler. Porlardan geçebilen küçük moleküller ise membranın iki tarafındaki konsantrasyonları eşitlenene kadar yüksek konsantrasyonlu olarak buldukları taraftan diğer tarafa doğru yer değiştireceklerdir. Ayrıca diyaliz sıvısında bulunmayan üre, kreatinin, fosfor ve daha birçok üremik toksin membrandan diyaliz sıvısına geçer, bu sıvının uzaklaştırılması ile de vücuttan atılmış olurlar. Hemodiyaliz sırasında hastanın kanından uzaklaşmasını istemediğimiz iyonize kalsiyum, sodyum, potasyum, magnezyum gibi maddelerin kan konsantrasyonlarının az etkilenmesi için yapılması gereken şey ise bu maddeleri diyaliz sıvısı içinde kan konsantrasyonlarına eşit miktarlarda bulunduraktır (Davison, 1996). Membranın porlarından geçebilen solütler ve sıvı, iki farklı mekanizma ile taşınırlar; difüzyon ve ultrafiltrasyon (konveksiyon) (Şekil 2.6). Difüzyon, konsantrasyon farkına bağlı olarak solütlerin yer değiştirmesi, ultrafiltrasyon (konveksiyon) ise hidrostatik basınç ile birlikte suyun ve suyu takiben solütlerin membranın diğer tarafına hareketidir (Akpolat, 2002).



Şekil 2.6. Difüzyon ve konveksiyonun şematik gösterimi (Karakoç, 2007)

Difüzyon membranın iki yanındaki konsantrasyon farkı nedeniyle solütün konsantrasyonu yüksek olan taraftan düşük olan tarafa hareketidir. Diyaliz sırasında diyaliz membranı içerisinde kan 300-500 mL/dk ve diyalizat 500-800 mL/dk hızla zıt yönlü olarak hareket eder. Zıt yönlü akım konsantrasyon farkının maksimumda tutulmasını ve diyaliz etkinliğinin artırılmasını sağlar. Difüzyon hızını ve yönünü etkileyen başlıca üç faktör vardır:

- Konsantrasyon gradienti; iki taraf arasındaki konsantrasyon farkı arttıkça madde alışverişi hızlanacaktır.
- Solütlerin molekül ağırlığı ve hızı; porlardan geçen maddelerin molekülleri ne kadar büyük ise membrandan geçen madde miktarı ve geçiş hızı o kadar azalır.
- Membran direnci; diyalizer membranının kalınlığının artması, por çaplarının küçülmesi veya por sayısının azalması membranların madde alışverişine karşı direncini artırır.

Ultrafiltrasyon ise suyun ve suyu takiben solütlerin membranın diğer tarafına geçişidir (Akpolat, 2001). Bir membrandan su geçişi iki nedenle olur. Bunlar hidrostatik basınç ve osmotik basınçtır. Hidrostatik basınç yolu ile ultrafiltrasyonun artırılabilmesi özelliği hemodiyalizde kullanılan her cins membran için aynı değildir (Sezen, 2014). Bazı membranlar por ve kalınlık özellikleri nedeni ile suyu daha fazla geçirirler (Daugirdas, 1994).

2.3.3. Hemodiyaliz Hastalarında Sık Görülen Komplikasyonlar

Renal replasman tedavilerinin gündeme gelmesi ve teknolojik ilerlemelerin katkısıyla KBY hastalarında yaşam süreleri uzamaya başlamış ve özellikle de RRT alan hastaların yaşam kalitelerinin değerlendirilmesine ve artırılmasına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır (Özçürümez, 2003). Birçok araştırma SDBY hastalarında yaşam kalitesinin, muhtemelen hastalığın getirdiği kısıtlılıklar ve diyaliz tedavisinin gerekleri gibi etkenlerden dolayı, genel popülasyona göre daha düşük olduğuna işaret etmektedir (Balaban ve ark., 2017). Hemodiyaliz tedavisi alan hastalarda yaşam kalitesini etkileyecek bazı komplikasyonlar vardır. Bu komplikasyonlar hem diyaliz tedavisine hem de hastada gelişen üremik komplikasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Parlar, 2008). Hemodiyaliz tedavisi ile birlikte aşağıdaki komplikasyonlar gelişebilir;

- Metabolik komplikasyonlar: Karbonhidrat-yağ metabolizması bozuklukları, protein enerji malnütrisyonu
- Enfeksiyöz komplikasyonlar: Bakteriyel, tüberküloz, hepatit
- Kardiyovasküler komplikasyonlar: Hipertansiyon, arterioskleroz, aritmi, hipoksi, vasküler yol infeksiyonları ve tromboz, hava embolisi
- Üremik komplikasyonlar: Periferik nöropati, metabolik kemik hastalığı, metastatik kalsifikasyon, anemi, kaşıntı, uykusuzluk ve kronik yorgunluk, üremik ensefalopati, renal osteodistrofi, alüminyum intoksikasyonu
- Non-üremik komplikasyonlar: Hepatit, serozit (perikardit, hemodiyaliz asiti), büyüme ve gelişmede gerilik, malnütriyon, edinsel kistik hastalık (Utaş, 2005; Akpolat, 2007).

Hemodiyaliz hastalarındaki en sık rastlanan ölüm nedeni kardiyovasküler hastalıklardır. Bu durum renal ve kardiyovasküler patolojiler arasındaki ilişkinin bir sonucu olarak kabul edilebilir. Bunu enfeksiyonlar, serebrovasküler hastalıklar ve kanserler izlemektedir. Ülkemizde de benzer şekilde diyaliz hastalarının ölüm sebeplerinde ilk sırada kardiyovasküler hastalıklar yer almaktadır. Çizelge 2.3'de 2016 yılına ait ülkemizde hemodiyaliz hastalarının ölüm nedenleri verilmiştir.

Çizelge 2.3. 2016 yılında ölen prevalan HD hastalarının ölüm nedenlerine göre dağılımı (Süleymanlar ve ark., 2017)

Ölüm nedenleri	Oran (%)	Hasta sayısı
Kardiyovasküler hastalıklar	51,44	482
Serebrovasküler hastalıklar	12,06	113
Malignite	10,14	95
Enfeksiyon	9,93	93
Akciğer yetmezliği	3,84	36
Gastrointestinal kanama	1,60	15
Karaciğer yetmezliği	0,85	8
Diyalize girmeyi reddetme	0,43	4
Diğer	9,71	91
Toplam	100,00	937

Hemodiyaliz hastalarında bakteriyemi sıklığı normal popülasyona göre oldukça yüksektir. Hastalarda varolan diyabet, malnütrisyon ve üremi enfeksiyon gelişmesini kolaylaştırıcı faktörlerdir (Çaydam ve ark., 2016). Ayrıca son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda immün sistemdeki önemli bozukluklar enfeksiyonlara yatkınlığı arttırmaktadır. Kronik hemodiyaliz hastalarında enfeksiyon riskinin yüksek olmasının nedenleri; hemodiyalizin vasküler girişim gerektirmesi, çok sayıda hastanın aynı ortamda diyaliz tedavisi alması sonucu doğrudan ve dolaylı yollarla (kontamine aletler, ekipmanlar, çevresel yüzeyler, personelin elleri aracılığı ile geçiş gibi) mikroorganizmaların bulaşması ve hastaların bağışıklık sistemlerinin baskılanmasıdır (Vanholder, 2000).

Hemodiyaliz hastalarındaki enfeksiyöz komplikasyonlar: kan yoluyla bulaşan viral enfeksiyonlar: HBV, HCV, HDV ve HIV enfeksiyonları, bakteriyel enfeksiyonlar: vasküler girişim bölgesi enfeksiyonları, diyalizat ve diyalizer kontaminasyonu ile ilişkili enfeksiyonlar olarak sınıflandırılabilir (Martin, 1997). Enfeksiyonların yol açtığı mortalitenin en önemli sebebi sepsistir. Hemodiyaliz hastalarında bakteriyeminin en sık nedeni damar girişimleridir. Bakteriyel etkenler ekzojen veya endojen yollarla enfeksiyona yol açar. Hemodiyaliz hastalarında ekzojen yolla bakteriyel patojenlerin bulaşması ile ilişkili birçok salgın tanımlanmıştır. Bu salgınların çoğu kontamine diyaliz sıvıları veya ekipmanlar, tekrar kullanılabilen (reusable) diyalizerlerde yetersiz dezenfeksiyon ya da diyalizde kullanılan suların yeterince arıtılmamasından kaynaklanır (Parlar, 2008).

2.4. Hemodiyaliz Ünitesi Su Sistemi

Diyaliz işlemi sırasında kullanılan diyalizat solüsyonunun hazırlanmasında şehir suyundan yararlanılır. Hemodiyaliz hastalarının diyalizat hazırlanan sudaki zararlı maddelere maruz kalmamaları için, suyun belirli oranlarda arıtılması gerekmektedir. Hemodiyaliz tedavisi sırasında kullanılan arıtılmış suyun, dolayısıyla diyaliz solüsyonunun kimyasal ve mikrobiyolojik saflığı çok önemlidir (Sezen, 2014).

Arıtılmış suyun kimyasal ve mikrobiyolojik kontaminant düzeylerindeki yükseklik hastalarda kronik enflamatuvar yanıtı uyarmakta ve diyaliz yeterliliğini olumsuz yönde etkilemektedir (Yıldız, 2011). Yerel su kaynağının sürekli olarak istenen standartta suyu

temin edeceğine güvenilemediğinden, hemodiyaliz merkezinde su sisteminin bulunması gerekir. Hemodiyaliz su sistemi, diyaliz hastalarına zararlı olduğu bilinen suyun içeriğindeki çeşitli maddeleri istenen miktarın altına düşürerek diyaliz sırasında uygun kalitede suyun sağlanması işlemini yapan ünedir (Gökdoğan, 2015).

Böbrek fonksiyonları normal sınırlarda olan bir insanda; suda bulunan kirleticiler böbreklerimiz tarafından temizlenmekte ve atık maddeler vücudumuzdan atılmaktadır. Günde 2 litre su tüketen bir insan bir haftada toplam 14 litre su tüketir. Hemodiyaliz hastalarının kanı ise her diyaliz seansında yaklaşık 120 litre su ile işlem görmektedir. Haftada 3 kez 4 saat hemodiyalize giren bir hastada hemodiyaliz işleminde 360 litre su kullanılır. Bu hesaplamalara göre diyaliz hastaları yıllık olarak 18,000-36,000 litre arasında suya maruz kalmaktadır (Heidarieh, 2016). Sudaki zararlı maddeler membranlardan doğrudan hastanın kanına geçebilir.

2.4.1. Hemodiyaliz Ünitelerinde Su Sistemi İle İlişkin Sorunlar

Diyaliz hastalarının zarar görmesini engellemek için diyaliz solüsyonunun kimyasal ve mikrobiyolojik saflığı çok önemlidir. Diyaliz solüsyonu, saf su (ürün su) ve konsantreden hazırlanır; konsantre, reçetelendirilen içerikte bir diyaliz solüsyonu hazırlayabilmek için gerekli olan elektrolitleri içerir. Konsantrelerin çoğu ticari kaynaklardan elde edilir ve saflıkları yönergelerin gözetimi altındadır (Daugirdas, 2010).

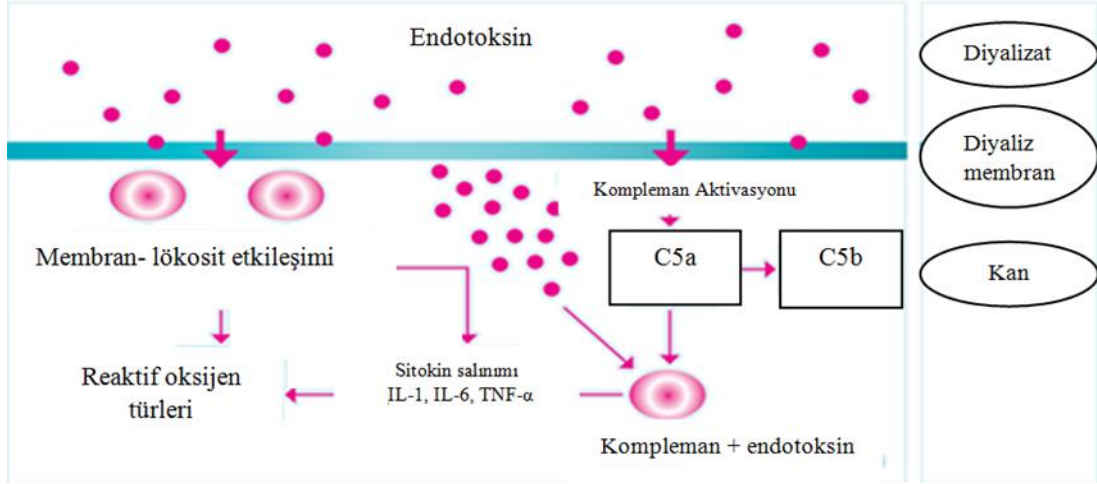
Diyaliz solüsyonu hazırlamak veya diyaliz ünitesinde tozdan konsantre oluşturmak için kullanılan suyun saflık düzeyi diyaliz ünitesinin sorumluluğundadır. Halk sağlığı açısından şehir şebeke suyuna ilave edilen bazı maddeler, kullanılan konsantrasyonlarda sağlıklı bireyler için tehlike oluşturmaz; ancak bu maddelerin diyaliz için kullanılan suda kalmasına izin verilecek olursa bunlar böbrek yetersizliği olan hastalara zarar verebilir. Bu nedenle tüm şehir şebeke sularının diyaliz hastaları için zararlı maddeler içerdiği kabul edilmelidir ve tüm diyaliz ünitelerinin diyaliz solüsyonunu hazırlamadan önce şehir suyunu saflaştıracak bir sisteme gereksinimleri vardır. Şehir şebeke suyunda bulunabilecek başlıca zararlı maddeler, canlılar ve neden oldukları sorunlar;

- Alüminyum: Şehir suyu arıtılmasında yabancı maddeleri çöktürücü olarak alüminyum hidroksit kullanılır. Vücutta aşırı alüminyum birikimi, diyaliz ensefalopatisi

denilen beyin ve sinir dokusu harabiyetine yol açabildiği gibi, kemik dokusunda birikerek de kemik sorunlarına neden olmaktadır.

- Kalsiyum ve Magnezyum: “Sert Su Sendromu” denilen diyaliz sonrası bulantı, kusma, kas güçsüzlüğü, ciltte kızarıklık, hipertansiyon ve hipotansiyon problemlerine yol açabilir. Şehir sularında izin verilen miktar; Kalsiyum: 100 mg/L, Magnezyum: 30 mg/L.
- Kloraminler: Kloramin, şehir sularında bakterisit amacı ile kullanılır. Kloramine maruziyet durumunda hemolitik anemi, methemoglobinemi gibi kan problemlerine sebep olur.
- Flor: Aşırı flora bikrimi osteomalazi, osteoporoz ve diğer kemik sorunlarına yol açar.
- Nitrat: Siyanoz, methemoglobinemi, hipotansiyon, bulantı yapabilir. Şehir suyunda izin verilen maksimum miktar; 50 mg/L NHO_3 .
- Çinko: Su borularında suya karışabilir. Bulantı, kusma ve anemi nedeni olabilir.
- Asellus Aquaticus: Su sistemlerinde yaşayan, sularda organik kirlenmeye neden olan, suya pis bir koku veren bir eklem bacaklıdır. Bu böceğin su sisteminde varlığı hastalarda pirojenik reaksiyonlara neden olur (Ersoy, 2010).

Hemodiyaliz tedavisinde kullanılan malzemelerin biyolojik uyumu yüksek olmalıdır. Hemodiyaliz esnasında kanın yabancı yüzeyle teması bir kısım reaksiyonları başlatır. Bunlar arasında; kompleman aktivasyonu, koagülasyon ve kinin sisteminin aktivasyonu ve kan hücrelerinin aktivasyonu sayılabilir (Sezen, 2014). Hemodiyalizde biyolojik uyumsuzluk; kullanılan membranın yapısı, kan setlerinin ve diyalizerin sterilizasyon yöntemi, diyalizat (suyun kalitesi ve bakteriyel kontaminasyon) ile ilişkilidir. Kan elemanlarına bağlı gelişebilecek komplikasyonlar Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Diyalizattaki bakteri kontaminasyonu ve enflamatuvar tepkiler (Fresenius Medical Care, 2011).

Mast hücrelerinde; Histamin salınımı damar geçirgenliğinin artırır ve akut membran reaksiyonlarına neden olur. Bazofilden; Lökotrien salınımı düz kasların kasılmasına bağlı pulmoner fonksiyon bozukluğu, periferik ödem ve hipoksemi ortaya çıkar. Nötrofillerden; Lökotrien salınımı $\beta 2$ mikroglobulin açığa çıkmasına, proteazlar doku hasarına sebep olur. Trombositlerden; Tromboksan salınımı ve prostoglandinler trombositopeni ve pıhtılaşmaya neden olur. Monosit ve makrofajlardan; İnterlökin salınımı hipotansiyon, hızlı ateroskleroz, kemik ve eklem hastalığı, kas kaybı, hipoalbünemi oluşturabilir. Kompleman aktivasyonu: klinik olarak anaflaksi, pulmoner fonksiyon bozukluğu, hemodinamik değişiklikler, lökopeni ortaya çıkabilir (Sezen, 2014; Fresenius Medical Care, 2011).

Saf su ile hazırlanan diyalizat çözeltisi ve bikarbonat konsantrisi mikrobiyolojik olarak kontamine olabilir. Diyalizat içindeki endotoksinler ve diğer bakteri kökenli sitokin uyarıcı maddeler, hemodiyaliz sırasındaki sitokin salınımının önemli nedenlerindedir. Diyalizattaki bakteriyel kontaminasyon kaynaklı küçük moleküler ağırlıklı pirojenlerin, hem düşük akımlı hem de yüksek akımlı diyalizörlerden geriye kaçabildiklerine (back-filtrasyon) gösteren birçok çalışma vardır (Schiff, 2002). Bu endo-ekzotoksinler kompleman aktivasyonuna neden olmadan bile dolaşan mononükleer hücrelerin sitokin üretimini artırabilirler (Lonnemann, 2000). *Pseudomonas aeruginosa* gibi diyalizatta sıklıkla bulunan bakterilerden köken alan sitokin uyarma etkisine sahip maddelerin %20-50'si, endotoksin ve lipit A içeren endotoksin parçacıklarından farklı olduğundan, bakteri ürünlerinin tümüne birden "sitokin uyaran maddeler" adı verilmektedir. Genelde

polisülfon ve poliamid kökenli membranlar, emilim özelliklerinden dolayı sitokin uyaran maddelere karşı etkin bir engel teşkil ederler. Buna karşın selüloz kökenli membranlar daha zayıf bir bariyer oluşturur. Günümüzde diyalizat mikrobiyolojik kalitesinin, kronik enflamatuvar durumda düzelme dışında hedef hemoglobin değerlerine ulaşmak için gerekli eritropoetin dozu, beslenmeye ilişkin göstergeler ve karpal tünel sendromu ve diyaliz amiloidozu gibi uzun dönem komplikasyonlar üzerine olan olumlu etkileri vardır (Eyileten ve ark., 2010).

2.4.2. Diyaliz Solüsyonlarının Kalite Gereksinimleri

Diyaliz sularının kabul edilebilir mikrobiyolojik ve kimyasal limitlerine yönelik standartlar 1960'lı yıllarda oluşturulmuştur. Sonraki yıllarda ülke, bölge ve uluslararası alanlarda diyaliz sularının mikrobiyolojik ve kimyasal parametrelerinin alt ve üst limitlerini belirlemeye yönelik çeşitli standartlar yayınlanmıştır (Ward, 2009). Günümüzde diyaliz solüsyonlarının kalite gereksinimlerine yönelik standartlar Tıbbi Cihazları Geliştirme Derneği (the Association for the Advancement of Medical Instrumentation [AAMI]) ve Avrupa Farmakopesi tarafından hazırlanmıştır. Ülkeler kendileri için uygun gördükleri standartlardan bir tanesini kabul edip diyaliz suları için belirlenen önerilere uymaktadırlar. AAMI, diyaliz solüsyonu için kullanılacak suyun saflığı ile ilgili minimum standartları belirlemiştir; ayrıca oluşturulan nihai diyaliz solüsyonunun saflığı hakkında da önerilerde bulunmuştur. Avrupa Farmakopesi mikrobiyolojik kirleticiler açısından daha sıkı öneriler getirmiştir.

Bu standartlar ve önerilerde, hemodiyaliz hastaları için toksik olduğu bilinen kimyasalların, genel popülasyon için kimyasalların ve bakterilerle onların endotoksinlerinin maksimum düzeyleri bildirilmektedir (Daugirdas, 2010). Yeni AAMI önerileri, diyaliz solüsyonu hazırlamak için kullanılacak ürün suyun bakteri sayısının < 200 KOB/mL ve endotoksin miktarının < 2,0 EU/mL olması gerektiği şeklindedir. Avrupa farmakopesi tarafından önerilen ürün su değerleri ise, sırasıyla < 100 KOB/mL ve 0,25 EU/mL'dir. Diyaliz solüsyonundaki bakteri ve endotoksin düzeyleri bu limitlerin altında olduğunda pirojenik reaksiyon oluşmaz (Daugirdas, 2010). Son zamanlarda, endotoksin ve endotoksin parçalarının diyaliz solüsyonundaki düşük düzeylerinin, pirojenik reaksiyonlara yol açmamasına rağmen diyaliz hastalarının uzun

dönem morbiditesine neden olabilen kronik enflamatuvar bir cevaba katkıda bulunabildiği ortaya çıkmıştır (Eyileten ve ark., 2010). Gözlemsel çalışmalarda, çok saf diyaliz solüsyonu kullanımının plazma C-reaktif protein ve IL-6 düzeylerini azalttığı, aneminin eritropoietin tedavisine yanıtını düzelttiği, plazma albumin değeri, tahmin edilen kuru vücut ağırlığı, orta kol kas çevresi ve üre azotu ortaya çıkış hızı parametrelerinde saptanan artışlarla kanıtlandığı gibi daha iyi bir beslenme durumunu uyardığı, plazma β 2-mikroglobulin düzeylerini düşürdüğü, rezidüel renal fonksiyon kaybını yavaşlattığı ve kardiyovasküler morbiditeyi düşürdüğü gösterilmiştir (Daugirdas, 2010; Eyileten ve ark., 2010).

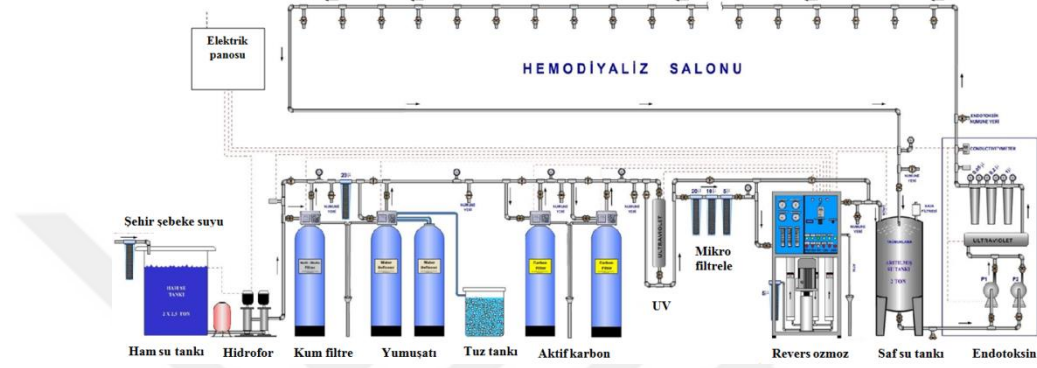
Ülkemizde su arıtma sisteminin kontrolünde, hemodiyaliz çözeltilerinin seyreltilmesinde kullanılan suyun kimyasal ve bakteriyolojik kontrolünde Çizelge 2.4’de verilen Avrupa Birliği farmakopesinde bildirilen sınırlar göz önüne alınmaktadır (TC Sağlık Bakanlığı, 2011).

Çizelge 2.4. Avrupa Farmakopesine göre saf suyun maksimum kontaminasyon düzeyleri (TC Sağlık Bakanlığı, 2011)

Parametre	Yöntem	Maksimum Düzey
Asitlik – Alkalilik	Kimyasal	Teste uygunluk
Okside olabilen maddeler	Kimyasal	Teste uygunluk
Toplam mevcut klor	Kimyasal	0,1 ppm
Klorür	Kimyasal	50 ppm
Florür	Potansiyometrik	0,2 ppm
Nitrat	Kimyasal	2 ppm
Sülfat	Kimyasal	50 ppm
Alüminyum	Flöresan spektrofotometri – Atomik absorpsiyon	10 μ g/L
Amonyum	Kimyasal	0,2 ppm
Kalsiyum	Atomik absorpsiyon spektrometri	2 ppm
Magnezyum	Atomik absorpsiyon spektrometri	2 ppm
Civa	Atomik absorpsiyon spektrometri - ICP-MS	0,001 ppm
Potasyum	Alev fotometri	2 ppm
Sodyum	Alev fotometri	50 ppm
Çinko	Atomik absorpsiyon spektrometri	0,1 ppm
Ağır metaller (kurşun)	Atomik absorpsiyon spektrometri – Kimyasal yöntem	0.1 ppm
Mikrobiyal kontaminasyon	Plak dökme	100 KOB/mL
Bakteriyel endotoksin	LAL	0,25 EU/mL (Ultra saf diyaliz suyu için 0,03)

2.4.3. Hemodiyaliz Ünitesi Su Arıtma Sistemi

Hiçbir yerel su kaynağı istenen standartda suyu temin edemeyeceği için tüm hemodiyaliz merkezlerinde su sisteminin bulunması zorunludur. Diyaliz için kullanılacak suyun saflaştırılması için kullanılan sistemler üç kısımdan oluşmaktadır: ön arıtma, asıl saflaştırma ve kullanım noktalarına dağıtım (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Hemodiyaliz ünitesi su sistemi (Sezen, 2014)

Su Sistemi Odası

Diyaliz ünitelerinde su arıtımı için tasarlanmış ve sadece bu amaç ile kullanılan su sistemi odası bulunmalıdır. Su sistemi odası; kullanılan su sisteminin kapasitesine uygun büyüklükte olmalı, en az bir adet yer gideri ve havalandırması olmalıdır. Eğer su sisteminde dış mekâna açılan pencereler var ise camlar kaplanmalıdır (Sezen, 2014). Su sistemi odası medikal cihaz çalışma ortamları, ürünlerin üreticisi tarafından belirlenmiş asgari çalışma koşullarına uygun olarak belirtilen nem, sıcaklık vb. parametrelerin limitleri altında olacak şekilde tasarlanmalıdır. Yumuşatma için ihtiyaç duyulan tuz paketleri yere temas etmemelidir (TC Sağlık Bakanlığı, 2011).

Hemodiyaliz ünitesi su sistemini oluşturan elemanlar:

1. Kaba partikül filtresi
2. Ham su tankı
3. Hidrofor (dengeleme tankı)
4. Ön arıtma sistemi
 - Kum filtre
 - Yumuşatıcı

- Aktif karbon filtresi
 - Mikropartikül tutucu
5. Revers Ozmoz (RO) sistemi
 6. Sterilizasyon amaçlı ultraviyole
 7. Endotoksin filtresi

Kaba Partikül Filtresi (Çelik Filtre-Ön Filtre)

Ham su deposundan önce yerleştirilen 70-100 mikrometre çapında filtrelerdir. Şebeke suyunda bulunan kaba partikülleri tutmaya yarar. Filtre, polyester ve polietilen bir makara üzerine iplik ve pamuk olarak sarılmış çok küçük gözeneklerden oluşur. Sabit bir değiştirme zamanı yoktur. Şebeke suyunun kalitesine göre dolma (kirlenme) zamanı değişir. Filtre kirlendikçe renk değiştirir. Renk değişikliği arttıkça filtre değiştirilir. Geri yıkamalı modelleri de mevcuttur (Sezen, 2014).

Ham Su Tankı

Su arıtma sisteminin ilk ünitesi olan ham su deposu sisteme verilecek olan şebeke suyunu depolamaya yarar. Ham su deposu polyester, polietilen, paslanmaz çelik malzemeden üretilmelidir. Drenaj hattı olmalı ve tabanında olmalıdır. Ham su tankının kapağı kapalı olmalı, hidrofobik hava filtresi ile havalandırılmalıdır. Direkt gün ışığı almamalıdır (Tuğlular, 2015).

Diyaliz merkezinin makine sayısı, şebeke suyunun sürekliliğine bağlı olarak depo kapasitesi değişmekle birlikte, diyaliz merkezinin bir günlük su ihtiyacını karşılayabilmelidir. Örneğin 20 adet diyaliz cihazı olan ve üç saat çalışan bir merkeze 10 tonluk ham su deposu idealdir. Ayrıca diyaliz merkezinin bulunduğu bölgedeki su kesintileri de dikkate alınarak ham su tankının hacmi belirlenmelidir (Sezen, 2014). Ham su tankı ne kadar büyüse, tank duvarları üzerindeki ıslak yüzeyde o kadar geniş olur. Islak yüzeyin genişliği suda bulunan bakterilerin üreme riskini ve tank yüzeyindeki ıslak alanlarda biofilm oluşum riskini artırır. Bu sebeple ham su tankının kontrol ve temizliğinin titizlikle yapılması şarttır. Depo temizliği altı ayda bir hipoklorit ile yıkanarak yapılır. Hipoklorit kalmayacak şekilde durulanır. Temizlik sonunda klor testi yapılmalıdır (Tuğlular, 2016).

Hidrofor (Dengeleme Tankı)

Su sisteminde değişken olan su basıncını sabit hale getirmek ve sabit bir su akışı sağlayarak önündeki hatlarda biofilm tabakası oluşumunu önlemek için kullanılır. Standart su sisteminde ön arıtmadan önce hidrofor kullanılabilir. Amaç sisteme giren suyun basıncını sabitleyerek revers ozmozun verimli çalışmasını sağlamaktır. Online RO su sisteminde ise ön arıtmadan önceki pompanın önünde veya RO sonrası pompanın önünde hidrofor bulunur. Amaç saf su hattındaki basınç ve akım hızını (2 mL/sn) sabitleyerek biofilm tabakasını engellemektir (Akpolat, 2010).

Pompalar

Pompalar, ürün su hattındaki su akış hızını (1 mL/sn) sürdürmek için, RO cihazının giriş suyu basıncını korumak için ve diğer su sistemi ekipmanlarına yeterli derecede yüksek basınç sağlamak için kullanılırlar. Normalde standart su arıtma sistemi için ön arıtımda pompa gereklidir. Ham su tankından sonra, ön arıtma sisteminden önce bulunur. Ürün (saf su) hattında kullanılmak zorunda değildir. Saf su hattında istenilen akış hızı, RO tarafından ana hattın çapının uygun büyüklükte seçilmesiyle sürdürülebilir (Tarhan, 2009).

Ön Arıtma Sistemi

Ön arıtma bölümü genellikle sıcak ve soğuk suyu belirli bir ısıya kadar karıştırmak üzere bir valf, bir çeşit ön filtrasyon, yumuşatıcı ve aktif karbonla adsorpsiyon paçalarını içerir. Tüm bunlar, suyu, asıl saflaştırma işleminin optimum düzeyde gerçekleşmesi için hazırlamak üzere dizayn edilmiştir. Bazen karbon adsorpsiyon yataklarının ve RO membranının fonksiyonunu engelleyebilen aşırı alkaliliği düzeltebilmek için pH'nın düzeltilmesi gerekir (Daugirdas, 2010).

Kum Filtre

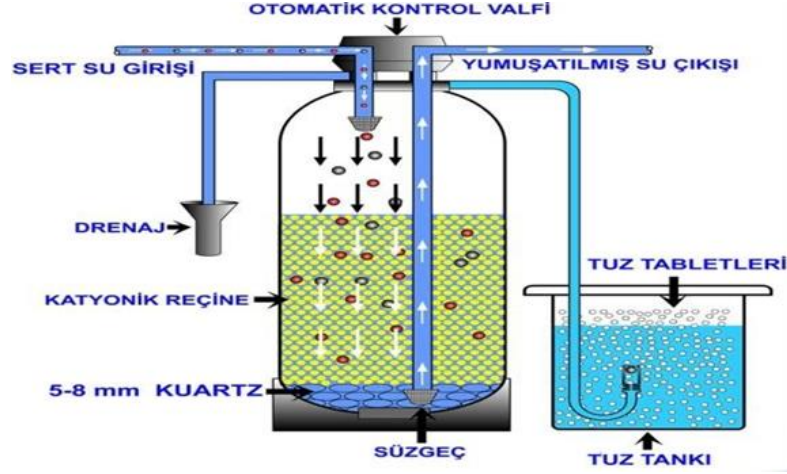
Kendinden sonra gelen ekipmanların performansını etkilememek için, partikül büyüklüğü 50-500µ olan partiküllerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Genelde görünümü bulanık ve dibinde çökelti bırakan sular, tortulu olarak değerlendirilir. Tortu, suyun kullanım amacı ne olursa olsun, tolere edilmesi pek mümkün olmayan bir parametredir

(Tarhan, 2009). Tortu ile renk parametrelerini birbiriyle karıştırmamak gerekir. Renk, genelde sularda çözünmüş organik madde veya ağır metallerin varlığının göstergesidir. Tortunun çeşitli şekillerde giderilmesi mümkündür. Kum ve antrasit filtrelerde filtrasyon sadece, süzme etkisiyle değil adsorpsiyon etkisi ile de gerçekleşir (Sezen, 2014).

Otomatik Su Yumuşatma Filtresi

Suyun sertliği, evsel, ticari ve endüstriyel kullanımlarda en çok karşılaşılan problemdir. Suda çözünmüş olarak bulunan kalsiyum ve magnezyum iyonları suya sertlik verir. Otomatik su yumuşatma filtresi, sistemin en hassas noktasıdır. Suyu sertlik veren ve erimiş halde bulunan Ca^{+2} ve Mg^{+2} bileşiklerinin tutulmasını sağlar. İşlem suya sertlik veren maddelerin sodyum (Na^{+}) iyonu ile yer değiştirilmesi esasına dayanır. Suyu yumuşatmak için iyon değiştirici reçineler kullanılır. Sert su, reçine içinden geçerken suya sertlik veren iyonlar (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) reçineye bağlı olan Na^{+} ile yer değiştirir, reçineye Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağlanır. Bu iyon değişim işlemi reçine tamamen Ca^{+2} ve Mg^{+2} ile doyana kadar devam eder. Doymuş olan reçine rejenere edilmezse sert su kaçakları başlar (Tuğlular, 2016; Tarhan, 2009).

Rejenerasyon işlemi, için tuz kullanılır. Kullanılan tuz tabletleri rafine edilmiş, %99 NaCl içerir. Yumuşatıcı filtresinin hemen yanında konumlandırılan tuz tankından sağlanır (Şekil 2.9). Rejenerasyon amacıyla kullanılan tuz, sofralık yemek tuzu özelliğindeki tabletler halindedir. Kaya tuzu saf değildir. Saf olmadığı içinde sistemde tıkanıklıklara ve tortu oluşumuna sebep olur. Tuz tankındaki seviye azaldıkça tuz eklenir. Harcanan tuz miktarı şebeke suyunun barındırdığı Ca^{+2} ve Mg^{+2} miktarıyla alakalıdır (Sezen, 2014).



Şekil 2.9. Otomatik Su Yumuşatma Filtresi (Anonim, 2015)

Yumuşatma filtresinden sonra alınan su numunesinde sertlik olmamalıdır. Sertlik sıfır olmalıdır. Sertlik varsa tekrar rejenerasyona alınmalıdır. Sert su membranlarda tıkanmalara ve kapasite düşüşüne neden olur. Bu nedenle sistemde ikili olarak tasarlanmıştır. Biri sisteme su gönderilirken diğeri kendini yıkar. Revers Ozmoz cihazına asla sert su gitmemesi için çiftli çalışması gerekmektedir (Akpolat, 2010).

Otomatik Aktif Karbon Filtresi

Aktif karbon kömürümsü ancak çok geniş yüzey alanına ($1000-1500 \text{ m}^2/\text{g}$) sahip bir malzemedir. Organik kirliliğin olduğu sularda ve klor giderme amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Tuğlular, 2016). Revers ozmozla uzaklaştırılmayan ve RO membranlarına zarar verebilen klor ve kloraminleri temizlemek için aktif karbonla adsorpsiyon yöntemi kullanılır. Kloraminler hemolitik anemiye neden olabilir. Karbonla adsorpsiyon, suda bulunan diğer küçük organik bileşikleride uzaklaştırır (Daugirdas, 2010).

Hemodiyalizde kloramin entoksikasyonunu önlemek için çift ve seri bağlı aktif karbon tankları kullanılmaktadır. Aktif karbon tankları RO cihazından önce kurulmalıdır. Aktif karbon filtrelerinin görevi; suya renk, koku, tat veren bütün düşük molekül ağırlıklı çözülmüş organik maddeleri, aynı zamanda serbest kloru ve hemodiyaliz tedavisi için önemli olan kloramini adsorplamaktır. Hemodiyaliz merkezlerinde kloramin entoksikasyonunu önlemek için çift ve seri bağlı aktif karbon filtresinin kullanılması önerilmektedir (Sezen, 2014). Filtre periyodik olarak üzerinde bulunan otomatik kontrol

valfi vasıtasıyla yıkama işlemini gerçekleştirmektedir. Tankın dış gövdesi lifli polyester olup, içi polietilen kaplıdır. Karbon tankları tanecikli aktif kömür ile doldurulur. Aktif kömür farklı organik maddelerden oluşabilir. Genellikle bu amaç için hindistan cevizi kabuğu 1500°C’de kömürleştirilir. Daha sonra karbondaki külü uzaklaştırmak için asitle yıkanır. Asitle yıkama işlemi aktif karbona mikro gözenekli bir yapı kazandırır. Sağlanan gözenekli yapı aktif karbona yüksek absorblama kapasitesi sağlar. Taneciklerin yüzey alanının büyük olması hızlı adsorplama işlemini kolaylaştırılır (Tarhan, 2009). Aktif karbona rejenerasyon (yenilenme) işlemi yapılmadığı durumda en geç 18-24 ay arasında ya da sistemde kloramin görüldüğünde aktif karbonun değişmesi gerekmektedir. Organik kirliliğin olduğu sularda ve kloru uzaklaştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Sezen, 2014). Aktif karbon filtreler, bakterilerin üremesi için uygun bir ortamdır. Çünkü aktif karbon organik maddeyi tutar ve eğer suda bakteri varsa, bakteri bu organik maddeyi besin olarak kullanarak üreyebilir. Bu gibi durumlarda sisteme bakteri kaçacağı mümkün olur. Bu sebeple aktif karbonun öncesinde ve sonrasında suyun dezenfekte edilmesi gerekmektedir (Daugirdas, 2010).

Mikropartikül Tutucu Filtre (Kartuş Filtreler)

Ön Arıtım sisteminde, su içerisinde farklı büyüklüklerde askıda katı maddeler bulunmaktadır. Bu askıdaki maddelerin RO sisteminin ve ön arıtım sisteminin verimli çalışmasını engellememesi için sudan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla kartuş filtreler kullanılır. Kartuş Filtrelerin farklı uzunluklarda ve farklı filtrasyon hassasiyetine sahip tipleri bulunmaktadır (Tuğlular, 2016). Kartuş filtre seçiminde planlanan su arıtma sisteminin debisine göre filtre ebatları seçilir. Revers osmoz cihazından önce, ön arıtımda duvara gruplar halinde monte edilen filtrelerdir. 20µ, 10µ ve 5µ büyüklüğündeki partikülleri tutmaya yarayan bu filtreler sıkıştırılmış polietilen, kâğıt, dokuma tel, kumaş vb. malzemeden üretilmiş olabilirler. Bakteri üremesini engellemek için mikron filtrelerin dış yüzeyi saydam olmalıdır. Mikron filtreler giriş ve çıkış basıncı arasında 1 bar fark olduğunda veya kirlendiklerinde mutlaka değiştirilmeleri gerekmektedir (Sezen, 2014).

Revers Ozmoz (Ters Ozmoz) Cihazı

Revers ozmoz, bir membran teknolojisi olup, ozmotik basınç kullanılarak, mineralce zengin olan suyun, yarı geçirgen bir membranın diğer tarafına mineralleri azaltılmış olarak geçirilmesi işlemidir (Yaşa, 2009). Konsantrasyonu fazla olan sıvı tarafından bir basınç uygulanarak, sağlanacak ters akışla, yoğunluğu fazla olan sıvı içerisinde bulunan mineraller, tuzlar ve organik maddeler, membranın bir tarafında bırakılarak diğer tarafa, yoğunluğu daha az, tuzlar ve minerallerden arındırılmış bir sıvı olarak geçirilir (Tarhan, 2009). Reverse ozmoz sistemlerinde yüksek basınç pompaları kullanılır. Yüksek basıncın etkisi ile su, üzerinde 5 angstrom boyutunda gözenekler bulunan membranlardan geçirilerek saflaştırılır. Atık hattından çıkan yoğun su ise drenaja verilir. Sistem %50-70 verim ile çalışır. Membranların giriş ve çıkışında bulunan manometreler vasıtasıyla membranda kirlenme olup olmadığı anlaşılır. Membrandan yalnız su molekülleri geçebilmekte, diğer yüksek ve düşük molekül ağırlıklı bileşikler, tuzlar, glikoz ve aminoasitler geçememektedir (Sezen, 2014). Periyodik olarak yapılan kontrollerde membran giriş ve çıkış basıncı, ürün su ve atık su debisi, giriş suyu sertliği, iletkenliği, sıcaklığı, ürün su sıcaklık ve iletkenliği kontrol edilir. Membranlara giren suda sertlik olmamalı, aksi takdirde membranlarda tıkanmalar olacaktır. Giriş suyunun iletkenliği ne kadar düşükse elde edilen suyun iletkenliği de daha düşük olur. Giriş suyu sıcaklığına bağlı olarak membranların kapasitesi değişmektedir (Tuğlular, 2016). Kapasite genellikle 25°C giriş suyu sıcaklığına göre verilmekte, ancak kış aylarında sıcaklığı düşmesinden dolayı kapasitede düşmesinden dolayı kapasite de düşüş görülmektedir.

Revers ozmoz membranları vasıtasıyla: Suyun içerisinde bulunan tüm çözünmüş mineral tuzları (Na, K, HCO₃) %98 oranında, Tüm ağır metal tuzları (Al, Zn, Cu) %99 oranında, virüsleri, bakterileri, pirojenleri temizler (Akpolat, 2001). Tek RO geçişli sistemde su standartlarını karşılanarak saf su üretilir. Çift RO geçişli sistemlerde en yüksek su standardına ulaşılarak ultra saf su üretilir. Rutin online hemodiyafiltrasyon uygulanan diyaliz merkezlerinde çift RO su sistemleri bulunur (Sezen, 2014).

Ultraviyole Sterilizatörü

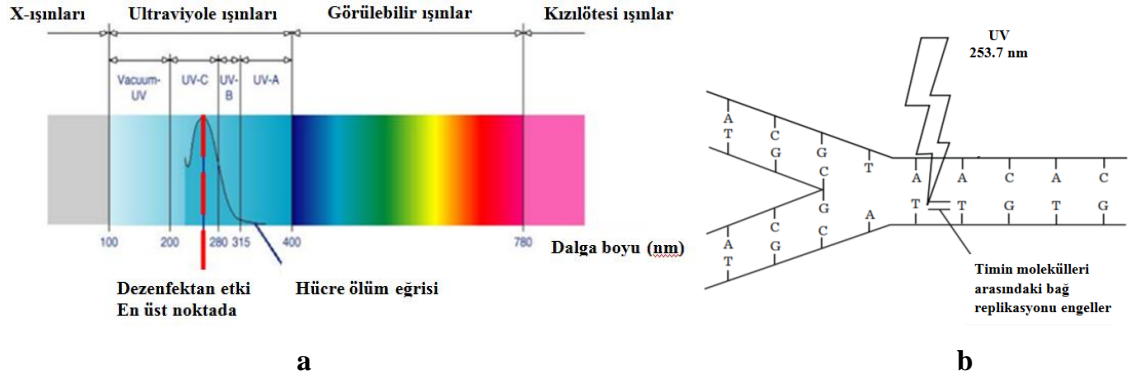
Güneş elektromanyetik spektrum diye bilinen bir dizi enerji yayar. Elektromanyetik enerji dağılımı birçok farklı radyasyon tipini içerir: Gamma, X-ışın, ultraviyole (morötesi), görünür bölge, kızılötesi ve radyo. Ultraviyole (UV) radyasyon, güneşten gelen ışık enerjisinin bir şeklidir. Enerjinin değişik şekilleri, dalga boylarına göre sınıflandırılır. En kısa dalga boylu radyasyon en fazla enerjik olandır (Boğaziçi, 2000). Bu ışınlar görünür ışıktan kısa, X ışınından uzun dalga boyuna sahiptirler. Dalga boyları görünür ışıktan daha küçük olduğu ve gözlerimizdeki mercekle UV ışınları süzdüğü için normalde insan gözü ile bu ışınları göremiyoruz. Ultraviyole ışınların dalga boyları 10 nm ile 380 nm arasında değişmektedir (Mutlu ve ark., 2003). UV ışınları, uzak-UV (extreme-UV, 10-200 nm) ve yakın-UV (near-UV, 200-380) olmak üzere iki ana bölgeye ayrılmaktadır. Yakın-UV insan sağlığına ve çevreye etkileri göz önüne alınarak UV-A (uzun-UV, siyah ışık; 315-400 nm), UV-B (orta-UV, 280-315 nm) ve UV-C (kısa-UV, germisidal-UV; 200-280 nm) olarak üç bölümde incelenmektedir (Öztürk, 2007).

UV-A Işını; Dalga boyu 315-400 nm arasındadır. UV ışınları içinde dalga boyu en fazla ve enerjisi en az olan ışınlardır. Güneş kaynaklı UV-A ışınları atmosfer tarafından tutulmamakta, camdan geçebilmektedir. Derinin daha alt kısımlarına kadar etki yaparak cildin koyulaşmasına neden olur. Ayrıca erken yaşlanmaya ve deride kırışıklıklara, deri kanserinin ilerlemesine de yol açmaktadır. Endüstride genellikle ışıklandırma sistemlerinde kullanılmaktadır (Vural,1999).

UV-B Işını; Dalga boyu 280-315 nm arasında olan ve hem enerji hem de dalga boyu açısından UV bandının ortasında yer alan ışınlardır. UV-A'dan yaklaşık 1000 kez daha güçlüdür. Bu ışınların vücutta D₃ vitamininin sentezlenmesinde önemli rolü vardır. Biyolojik olarak zararlı olan UV-B radyasyonu stratosferik ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak yer yüzeyine ulaşmaktadır (Perinçek, 2007). UV ışınlarının büyük bir kısmı da bulutlar tarafından absorbe edilmektedir. Atmosferik kirlilik, UV ışınlarına maruz kalmayı yerel ve küresel olarak etkileyebilmektedir. Uzun süreli maruz kaldığında tüm canlıları etkilemektedir. Bağışıklık sistemini zayıflatması, geçici körlük, korneanın zedelenmesi, ileri yaşlarda katarakt ve deri kanserine sebep olur. Endüstride ışıklandırma sistemlerinde ve solaryum lambalarında kullanılmaktadır (Tevini, 1994).

UV-C Işını; Dalga boyu 200-280 nm arasında UV'nin C bandında, dalga boyu en kısa, enerjisi en yüksek olan ışıklardır. Deri veya göz ile teması sonucunda kansere yol açmaktadır. Hücrelerde ciddi tahribat yaparak canlılığın ölümü ile sonuçlanabilen etkilere sahiptir. Koruyucu önlemler alınmadan hiçbir şekilde UV-C radyasyonuna maruz kalınmamalıdır. Güneş kaynaklı UV-C ışınları ozon tabakası tarafından filtre edilir ya da atmosferdeki gazlar tarafından tutulmaktadır. Bu nedenle UV-C ışını mikrobiyolojik çalışmalarda, akvaryumlarda, ameliyathanelerde sterilizasyon amaçlı kullanılmaktadır (Perinçek, 2007). Şekil 2.10 a'daki hücre ölüm eğrisinde görüldüğü gibi, 240 ila 280 nm aralığındaki UV-C ışınları mikroorganizmaların DNA'sı üzerinde en fazla tahribata yol açan UV ışınlarıdır. Eğrinin pik noktasında yaklaşık 253 - 256 nm dalga boylu ışınlar için etki en üst düzeye ulaşır.

UV-C ışınları mikroorganizmaların hücre zarı ve DNA da bulunan timin bazları tarafından absorbe edilmektedir. Bu enerji transferi sonucunda DNA zinciri birçok noktasından tahrip olmaktadır (Öztürk, 2009). UV radyasyon enerjisi hücresel DNA tarafından absorbe edilerek, yan yana bulunan timin bazları arasında kimyasal kovalent bağlar oluşturarak, timin dimerleri meydana getirmektedir (Şekil 2.10 b). Oluşan bu timin dimerleri hücresel UV hasarının başlıca mekanizmasını oluşturmaktadır. Bu hasar DNA'nın doğal sarmal yapısını bozarak DNA iplikçiklerinde katlanmalara neden olmaktadır. Bu durum hücre bölünme öncesi kromozom replikasyonunu güçleştirmektedir. Bu duruma rağmen kromozom replikasyonu gerçekleşen hücreler üreyemeyen mutant hücrelere dönüşmektedir. Timin dimerlerinin yaşamsal fonksiyonu olan genlerde meydana gelmesi ölümcül olmaktadır. UV ışınlarının dozunun artması durumunda timin dimerleri yanı sıra, sitozin dimerlerinin de oluşumu gözlenmektedir. DNA yapısı bozulan canlılığın başta üreme olmak üzere tüm hücre faaliyetleri durmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (Kanat, 2009).



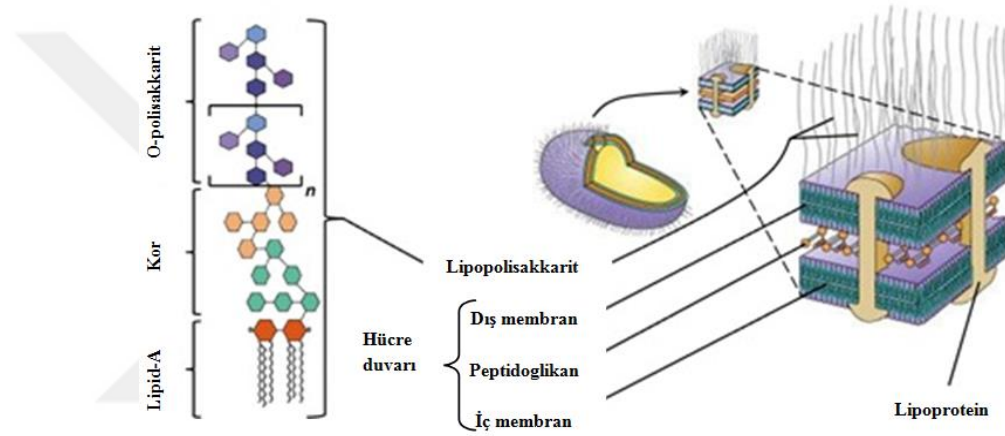
Şekil 2.10. Ultraviyole ışınları hücre ölüm eğrisi ve UV-C ışınlarının DNA üzerine etkisi
(a): UV Işınları Dezenfektan Etkisi (Kanat, 2009)
(b): Ultraviyole radyasyonla germisidal inaktivasyon (Özkütük, 2007)

Ultraviyole ışınları yeterli dozda tüm bakteri, mantar, küf sporları, virüsleri %99,9 öldürebilen çok kısa dalga boyuna sahip ışınlardır. Mikroorganizmalar bu ışığa maruz kaldıklarında hücre zarından içeriye nüfuz eden bu enerji, hücrenin DNA yapısını bozarak, bakteri faaliyetlerini durdurur ve çoğalmasını önler (Öztürk, 2009). UV ışınları günümüzde su arıtma tesislerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. UV ışınının geçebildiği ince quartz tüpler içinden veya merkezdeki UV lambanın etrafından geçen filtre edilmiş suyun sterilizasyonunu sağlar. Bu amaçla kullanılan UV lambalar “civa buharlı” tiptedir. Dayanıklı kuvarstan üretilen cam tüp şeklindeki UV lambanın içinde özel inert bir gaz ve katı formda civa mevcuttur. Öncelikle inert gaz ısıtılır, civanın buharlaşması ve iyonlaşarak tüp içine dağılması sağlanır. Ardından elektrotlar elektron yaymaya başlar. İki elektrot arasındaki potansiyel farkı (volt) ile elektronlar tüp içinde bir elektrottan diğerine ve akış yönü sürekli değiştirilerek yüksek hız ve yoğunlukta hareket etmeye başlar. Elektronlar civa iyonları ile çarpışarak enerji seviyelerini yükseltir. Civa iyonları aldıkları enerjiyi 254 nm dalgaboylu UV-C ışınları yayarak deşarj ederler. Böylece suya herhangi bir kimyasal madde eklenmeden ve tadı değişmeden işlem den geçirilebilmektedir (Sezen, 2014; Tuğlular, 2016).

Endotoksin Filtresi

Endotoksinler gram negatif bakterilerin dış membranında yer alan alan, bakteri şeklinin organizasyonu ve stabilitesinden sorumlu, lipopolisakkarit (LPS) olarak bilinen moleküllerdir (Joiner ve ark., 2002). Lipopolisakkarit, gram negatif bakteri için yaşamsal önemi olan integral bir hücre duvarı bileşenidir. Günümüzde yapısı ve katıldığı biyolojik mekanizmalar çok iyi tanımlanmış olan LPS, gram negatif bakteri

öldüğü veya bölündüğü sırada açığa çıkmaktadır (Marsh, 1996). Endotoksinlerin yapısı esas olarak üç immünokimyasal bölümden oluşmaktadır. Bunlar biyolojik olarak etkin bir lipid A, O-polisakkarit yan zincir ve R-kor oligosakkaritdir. O-polisakkarit yan zincir genellikle tekrarlayan oligosakkarit ünite polimerlerinden meydana gelir. Bu yapının diğer bir özelliği de, endotoksine serotip denilen bakteriyel köken ve karakteristik özellikleri vermesidir (Bone, 1996). Aynı zamanda O-polisakkarit yan zincir bakteriyel virulans etkenidir. O-polisakkarit yan zincir birimine göre daha az yapısal farklılık gösteren iç ve dış kor olarak iki alt birimden meydana gelir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Gram negatif bakteri hücre duvarı ve lipopolisakkarit yapısı (Bogaerts, 2014)

Endotoksinlerin molekül ağırlığı yaklaşık 10 kDa - 1.000 kDa arasındadır (Bui, 202). Yüksek sıcaklıklara dayanıklıdırlar. Interleukin-1 ve diğer mediyatörlerin salınmasıyla konakta pirojenik reaksiyonlar gelişir (Bates ve ark., 1998). İntravenöz olarak uygulanan biyolojik ve farmasötik ürünlerde, uygulama sırasında organizmanın alabileceği maksimum endotoksin seviyesi tüm farmakopilerde 5 endotoksin ünitesi EU/kg/saat olarak belirlenmiştir. Buradaki EU terimi, bir endotoksinin biyolojik aktivitesini göstermektedir (Berthold ve Walter, 1994).

Endotoksinlerin oluşturduğu doku hasarı, şok ve ölüm gibi fizyopatolojik etkiler oldukça farklıdır (Ogikubo ve ark., 2004). Endotoksinler hücre ve organlar üzerine doğrudan etki etmezler, bunun yerine monosit ve makrofajlar başta olmak üzere immün sistemin aktive edilmesiyle etki gösterirler. Aktive edilen immün sistem hücrelerinden özellikle tümör nekroz faktör, birçok interleükinler, prostoglandinler, koloni sitümüle

edici faktörler, trombosit aktivite edici faktörler ve serbest radikaller gibi mediyatörlerin salınmasına neden olur (Magalhães ve ark., 2007). Bu mediyatörler güçlü biyolojik aktiviteye sahiptir ve endotoksinlerin oluşturduğu yan etkilerden sorumludur. Organ ve hücrelerin yapı ve fonksiyonlarında meydana getirdiği değişiklikler arasında metabolik fonksiyonlarda değişiklikler, vücut ısısında artma, pıhtılaşma aktivitesinde bozulma, hemodinamiklerin değişimi ve şok sayılabilir.

Bakteriyel proliferasyonu baskılamak için şehir suyuna ilave edilen maddeler diyaliz ünitesinin su arıtma sistemi tarafından uzaklaştırıldığı için, hem diyaliz solüsyonunu hazırlamak için kullanılan su, hem de nihai diyaliz solüsyonu bakteriler ve onların endotoksinleri ile mikrobiyolojik kontaminasyona açıktır. Endotoksinler, endotoksin parçaları ve bazıları 1,250 dalton kadar küçük olabilen kısa bakteri DNA fragmanları gibi diğer bakteriyel ürünler diyalizer membranlardan geçebilir ve pirojenik reaksiyonları ve diğer istenmeyen etkileri oluşturmak üzere kana girebilir. UV sterilizasyonundan sonra bol miktarda endotoksin ortaya çıkar. Bu nedenle UV lambasından sonra birde endotoksin filtresinin olması gerekir (Daugirdas, 2010).

Arıtılmış Su Deposu

Revers ozmoz cihazından elde edilen saf suyun depolanmasında kullanılır. Arıtılmış su deposu polyetilen veya paslanmaz çelik malzemeden yapılmalıdır. Saf su korozif olduğundan saf su deposundan sonra suyun temas ettiği tüm boru ve bağlantılar paslanmaz çelik veya plastik olmalıdır. Depo, su kesintisi veya arıza durumunda diyaliz seansını tamamlayacak kapasitede su içermelidir veya deposuz (online) sistem de kullanılabilir (Sezen, 2014). Deponun kapağı kapalı tutulmalı ve hava girişini sağlamak için 0,2µ büyüklüğünde hava filtresi bulunmalıdır. Direk gün ışığı almamalı ve kolay yıkanabilmesi için konik tabanlı olmalıdır. Bakteri ve endotoksin filtrasyon sistemi bulunan merkezlerde saf su deposu her ay, maksimum üç ayda bir dezenfekte edilmelidir. Gıda maddeleri tüzüğüne göre polietilen yapıdaki tanklar veya 316 L kalite paslanmaz çelikten imal edilmiş su depoları kullanılmalıdır. (TC Sağlık Bakanlığı, 2012). Avrupa farmakopesi, saf su tanklarının kullanımından kaçınılmasını ve RO ünitesinin ürettiği saf suyun on-line olarak yani bekletilmeden doğrudan diyaliz hattına verilmesini tavsiye etmektedir.

Suyun Makinelere Dağıtımını Sağlayan Boru Sistemi (Dağıtım Sistemi)

Diyaliz solüsyonu hazırlamak amacıyla saflaştırılmış olan su, kirletici içermeyen diyaliz solüsyonu oluşturmak üzere diyaliz makinelerine dağıtılmalıdır. Kimyasal kirleticilerden saflaştırılmış su ve diyaliz solüsyonu ile temas eden tüm komponentler için plastikler gibi inert materyaller kullanılarak kaçınılır. Mikrobiyolojik kontaminasyondan ise uygun bir şekilde tasarlanıp yapılandırılmış boru sistemleri (düzenli dezenfeksiyonla birlikte) kullanılarak kaçınılır. Su dağıtım sistemleri çok sayıda dallanmaları ve ölü uçları olmayan bir “lup” şeklinde şekillendirilir. Eğer dağıtım sistemi bir depolama tankı içerirse (ideal olarak, depolama tankı kullanımından kaçınılımalıdır), tank gerekli olan minimum boyutta olup, sıkıca kapanan bir kapağı bulunur ve kolay dezenfekte edilecek bir şekilde dizayn edilmiştir (Daugirdas, 2010).

Su depolama ve dağıtım sistemleri sistemin bakteriyel kolonizasyonunu önlemek ve oluştuktan sonra temizlenmesi çok güç olan biyofilm oluşumunu en aza indirmek için düzenli bir şekilde dezenfekte edilir. Kimyasal germisidler kullanıldığında da dezenfeksiyon genellikle en az ayda bir kez yapılır. Günümüzde sıcak suyla dezenfekte edilebilen dağıtım sistemleri vardır. Bu sistemler daha sık dezenfeksiyona uygundur, çünkü rezidüel germisid içermeyen sistemin durulanmasına gerek yoktur. Dezenfeksiyon yeterliliğini göstermek için su ve diyaliz solüsyonu kültürleri ve endotoksin testleri yapılır (Daugirdas, 2010).

Su Arıtma Sisteminin Bakımı ve Kontrolü

Su sisteminde yer alan filtrelerin periyodik bakımları üreticinin tavsiye ettiği aralıklarla yapılmalıdır. Mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi ve sistem performansının olumsuz etkilememesi amacıyla ön arıtmada kullanılan karbon, reçine ve multimedia filtreler, yapılan günlük testlerin sonuçlarına göre ihtiyaç duyulduğunda ve üretici tavsiyeleri dikkate alınarak değiştirilmeli ve değişimler kayıt altına alınmalıdır. Su ünitelerinin bakım onarımlarından sonra mutlaka dezenfeksiyon yapılmalıdır (TC Sağlık Bakanlığı, 2011). Su arıtma sisteminde günlük yapılan testler;

- Saf su iletkenliği
- Su sertliği (yumuşatıcı kontrolü)

- Klor miktarı
- Asitlik-alkalilik (ham su, saf su) (TC Sağlık Bakanlığı, 2011).

Ülkemizde hemodiyaliz çözeltilerinin seyreltilmesinde kullanılan suyun kimyasal ve bakteriyolojik kontrolünde Avrupa Birliği Farmakopesinde belirlenen sınırlar esas alınmaktadır. Üretilen saf suyun kimyasal ve endotoksin kontrolü 6 ay, bakteriyolojik kontrolleri 3 ay aralarla yapılmaktadır.

Saf suyu diyaliz cihazlarına taşıyan borular poly vinyl chloride (PVC) olmalıdır. Saf su dağıtım hatlarında sürekli devir daim etmeli ve kullanılmayan saf su, arıtılmış su tankına veya RO ünitesine geri dönmelidir (TC Sağlık Bakanlığı, 2011). Diyaliz sistemlerinin dezenfeksiyonunda amaç diyaliz sıvısının dolaştığı yerlerde mikroorganizmaların üremesini önlemektir. Filtreler içine geçen bakterilerin uzaklaştırılması güçtür. Bu kritik bölgelerde mikrobiyal çoğalmanın mutlaka önlenmesi gerekir. Hemodiyaliz cihazlarının dezenfeksiyonu ısı ile ve kimyasallar yöntemleri ile yapılır. Cihazların dezenfeksiyon programlarına göre sitrik asit, hipoklorik asit (çamaşır suyu) ve formaldehit kullanımı tercih edilebilir. Isı ile dezenfeksiyon için 80°C üzerindeki sıvı tüm sistemden geçirilir.

Su arıtma sistemine uygun dezenfektanları periyodik olarak katarak veya bazı durumlarda bakteriyolojik filtreler kullanarak sudaki bakteriyel sayı 100 KOB/mL'nin altında tutulmalıdır. Alınan örneklerde 200 KOB/mL den fazla koloni üreme saptanması halinde tekrar örnek alınmalı ve dezenfeksiyon işlemi sonrası bakteriyolojik işlem tekrarlanmalıdır. En az üç ayda bir dezenfekte edilmelidir (Gökdoğan, 2015).

2.5. Suların Mikrobiyolojik Kirlenmesi ve Mikrobiyolojik Kalite Standartları

Gelişmiş ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de halkın içme ve kullanma suyu gereksinimi yerel yönetimlerce karşılanmaktadır. Sularda insan sağlığını tehdit eden hiçbir unsur içermemesi için yasal düzenlemeler uygulamaya koyulmuştur. Günlük hayatımızda kullandığımız musluk suyunun hastaneler de dâhil tüm bina su sistemlerinde sağlık açısından güvenli ve içilebilir nitelikte olmalıdır. Suyun arıtılması ve dezenfeksiyonu oldukça karmaşık ve teknik bir süreçtir. Sular doğasına ve kaynağına göre bazı aşamalardan geçirilerek arıtılmaktadır. Ancak mikroorganizmaların sudan tümü ile uzaklaştırılması pratik olarak mümkün olmadığı için indikatör mikroorganizmaların

sudan uzaklaştırılması esas alınmıştır (Akbaş, 1998). Sağlık Bakanlığının İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik esaslarına göre içme ve içme-kullanma sularında aranan mikrobiyolojik parametreler Çizelge 2.5’te verilmiştir.

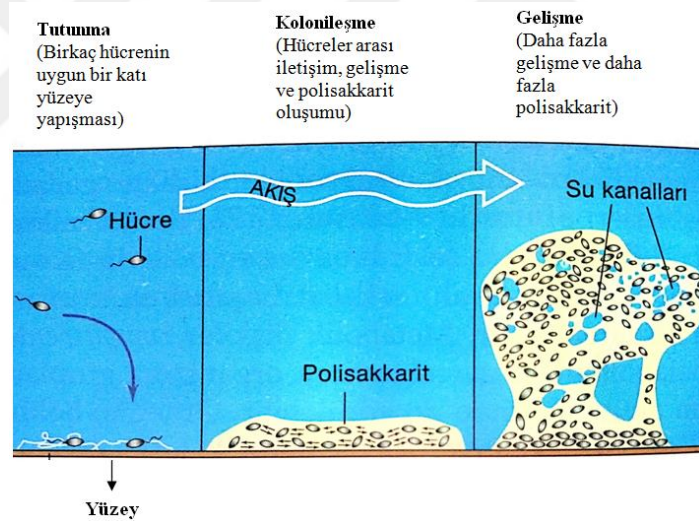
Çizelge 2.5. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik” Esaslarına Göre İçme ve İçme-Kullanma Sularında Aranan Mikrobiyolojik Parametreler (Sağlık Bakanlığı, 2013)

Parametre	Parametrik değer sayı/100mL
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Enterokok</i>	0
Koliform bakteri	0

2.6. Su Dağıtım Sistemlerinde Mikrobiyal Biyofilm Tabakası

Mikroorganizmalar çoğu zaman bir yüzeye tutunmuş bakteriyel hücre yığınları ve hücreler tarafından salınmış yapışkan polisakkarit ile çevrelenmiş yapılar olan biyofilmlerle kaplanmış yüzeylerde gelişirler (Madigan ve Martinko, 2012). Biyofilm; mikroorganizmaların, bir yüzeye, bir ara yüzeye veya birbirine bağlanabilen kendi ürettikleri hücre dışı polimerik yapıda oluşturduğu jele benzeyen bir matrise gömülü olarak yaşadıkları topluluktur (Ünal ve Tayfur, 2017). Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen polisakkarit yapıda bir kafestir. Bu kafese EPS (extracellular polymeric substances, exopolysaccharides) (Türetgen, 2006). Biyofilm tabakasının yapısını yüzey, mikroorganizma ve EPS oluşturmaktadır. Biyofilm yapısının %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturur. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir (Ünal ve Tayfur, 2017). Ancak bu yapısal yüzde payları mikroorganizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (Allison, 2003). Mikroorganizmalar, besin varlığı açısından zayıf bir ortamda bulduklarında, yaşamak ve çoğalmak için daha uygun bir ortam oluşturmak amacıyla, yüzeye tutunmak ve biyofilm oluşturmak eğilimine girmektedirler. Tanımlanmış olan bakterilerin %99’u biyofilm tabakası içinde yaşayabilmektedir (Türetgen, 2006). Biyofilm oluşumunun ilk aşaması; bakterilerin uygun bir yüzeye tutunmalarıdır. Doğal suşlar, çevresel koşullarda hayatta kalabilmeleri ve kendilerini koruyabilmeleri için biyofilm oluştururlar. Biyofilm oluşturacak olan bakteriler yüzeye tutunmadan önce yüzey boyunca hareket ederler. Yüzeyle etkileşimden sonrası aynı türe dahil bakteriler bir araya gelip tek tabakalı hücre hatları

oluşturarak mikrokoloniler meydana getirirler. Biyofilmler, aynı türden bakterilerin bir araya gelmeleriyle oluşabileceği gibi, farklı türden bakterilerin bir araya gelmesi ile de oluşabilirler (Costerton, 1999). Bakterilerin geri dönüşümlü bir biçimde bağlanmalarının ardından bakteriyel hücreler çoğalır ve EPS üretirler (Kumar ve Anand 1998). Biyofilmler, elastiki davranış sergileyen yüksek derecede esnek yapılardır (Stoodley ve ark., 2002). Biyofilmler sıklıkla mantar benzeri yapılar sergilerler. Bu yapının baş kısmında hücresel yoğunluk sap kısmına oranla daha fazladır (Costerton, 1999). Olgun biyofilmlerin üç boyutlu yapılarında bakteriyel kümeler arasında su dolu kanallar bulunmaktadır, bu su dolu kanallar metabolik süreçlerde üretilen toksik maddelerin atılmasında ve besinsel öğelerin alınmasında görev yapar. Biyofilmlerin ilerleyen safhalarında biyofilmden kopmalar görülebilir. Biyofilm hücre topluluğundan köken alan yavru hücreler, hayatta kalabilmek ve yeniden kolonize olabilmek için biyofilmden ayrılabilirler (Aparna ve Yadav, 2008).



Şekil 2.12. Biyofilm oluşumu (Madigan ve Martinko, 2012)

Su dağıtım şebekelerinde bulunan borularda gelişen biyofilm suların güvenliğini tehlikeye atmaktadır. Suyun boru içindeki akış hızının azalması ya da durmasıyla biyofilm oluşu daha hızlı gerçekleşir. Su arıtma sistemlerinde yer alan borularda suyun uygun debide gelmemesi ve yeterli akış hızının sağlanamaması gibi durumlarda bakteri ve endotoksin birikimleri oluşmaya başlar (Türetgen, 2006). Biyofilm tabakası bakterilerin yüzeye tutunması ile başlar ve zamanla boruların iç kısımlarını kaplar. Bakteriler, besin varlığı açısından zayıf bir ortamda olan şebeke sularında yaşamak ve çoğalmak için her zaman daha avantajlı bir ortam ararlar. (Costerton ve ark., 2005).

Biyofilm tabakasının oluşumu sıcaklık, su akış hızı, suyun kimyasal ve mikrobiyolojik parametreleri, dezenfektan maddeler ya da kalıntılara bağlı olduğu gibi depo ve boru malzemelerinin tipine de bağlıdır. Biyofilm içinde yer alan bakteriler başta klor olmak üzere dezenfektanlardan, pH dalgalanmalarından, kuraklıktan, besinsizlikten, toksinlerden ve virüslerden korunurlar. Özellikle rutin temizliği ve dezenfeksiyonu ihmal edilen su tankları ve depolarda biyofilm tabakası bakterilerin yerleşmesi için ideal bir ortam haline gelir (Türetgen, 2006).

Su sistemlerinde meydana gelen biyofilm tabakasındaki bakteriler, birçok dezenfektan maddeye direnç gösterebilirler. Biyofilm tabakasının oluşumunu önlemek için tek bir strateji vardır, o da biyofilm oluşmadan önce düzenli olarak dezenfeksiyon işlemlerini yapmaktır. Çünkü şebeke suyuna, kaynağında ne kadar temiz olursa olsun, taşındığı boru ve depolarda mikroorganizmalar karışacaktır. Uygulanan dezenfeksiyon sürecinin de takibinin yapılması şarttır (Türetgen, 2004).

2.7. Suyun Mikrobiyolojik Analizi

Su için çok farklı mikrobiyolojik analiz teknikleri uygulanır. Su mikrobiyolojisinde analizlerin büyük çoğunluğu mikroorganizma arama ya da sayma şeklindedir. Bunları, tanımlamaya yönelik testler izler. En çok uygulanan yöntemler ise mikroorganizmaların tanımlanmasına yönelik olan çoklu tüp yöntemi ve membran filtrasyon teknikleridir.

2.7.1. Çoklu Tüp Yöntemi (En Muhtemel Sayı)

Özellikle *Escherichia coli*'nin tanımlanmasından sonra sularda koliform grubu bakterilerin sayımında bu yöntem daha çok tercih edilmektedir. Çoklu tüp yönteminde hazırlanan örneğin dilüsyonları içerisinde ardışık beş dilüsyondan üçer adet Lauril Sülfat Triptoz Broth (LST) besiyerine birer mL ekimler yapılarak inkübe (37°C'de 24 saat) edilir. İnkübasyon sonrası üreme ve gaz oluşturma açısından tüpler değerlendirilir. Gaz oluşan tüpler daha sonra koliformlar için özel bir besiyerine (Brilliant Green Bile Broth (BGBB)) tekrar ekilir. Tekrar gaz oluşturlarsa suda koliform grup bakteri var demektir. Ancak bunun fekal koliform olduğunu doğrulamak için 44°C'de tekrar inkübe edilir. 44°C'de gaz oluşturlarsa fekal koliform varlığına karar verilir. Bakteri sayımında suyun kantitatif ekimine göre hazırlanan tablolardan yararlanılır (Topçu,

1996). Çoklu tüp yöntemi kullanılarak içme suları, içme suyu kalitesinin dışındaki sular, tuzlu veya acı sular, çamurlu sular ve hatta sedimentlerdeki *E. coli* miktrı tespit edilebilmektedir.

2.7.2. Membran Filtrasyon Yöntemi

Çoklu tüp yönteminin kısıtlılıkları ve yanlış negatif sonuç verebilme olasılığının nedeniyle 1950'li yıllarda sudaki mikroorganizmaların izolasyonunda "Membran Filtrasyon Yöntemi" olarak adlandırılan yeni bir analiz yöntemini geliştirilmiştir (Hasde ve ark., 2002). Membran filtrasyon yöntemi; genel olarak içme sularında ve diğer sıvı örneklerde mikrobiyolojik yükün belirlenmesi için kullanılır. Yüksek hacimli örneklerle çalışmaya ve sayım yapmaya elverişli olmasının yanı sıra klasik analizlere göre daha hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir (Kamanlıcan, 2011). Suyun mikrobiyolojik analizlerinde geliştirilen yöntemlerden birisi olan membran filtrasyon tekniğinde, 1-2 mL yerine çok daha büyük hacimlerde numune analizi yapılabilmektedir. Böylece numunenin çok az sayıda mikroorganizma içermesi halinde bile, bunun belirlenmesi mümkün olur. Bu teknik analizi yapılacak örneklerin içerdiği mikroorganizmadan daha küçük por genişliğine sahip membran filtre üzerinden örneğin vakumla filtre edilmesi, filtrasyon işlemi tamamlandıktan sonra filtre üzerinde tutulmuş olan mikroorganizmaların türüne özgü besi yeri üzerinde ve uygun ısı derecesinde inkübe edilmesi ile inkübasyon sonunda oluşan kolonilerin sayılması esasına dayanır. Membran filtrasyonun yönteminin genel olarak uygulanışı aşağıdaki gibidir:

- Öncelikle işlem esnasında su örneği ile temas edecek bütün malzemeler steril edilir. Sterilizasyon işlemi, ekipmanın özelliğine göre otoklav ile yapılabildiği gibi alkol kullanarak kimyasal sterilizasyonda yapılabilir. Ancak alkol ile sterilizasyon işleminde dezenfektanın kolaylıkla sistemden uzaklaştırılması gerekmektedir. Çünkü sistemde kalan dezenfektan, analizi yapılacak mikroorganizma için yanlış sonuçlar verebilir. Bunun için alkol uzaklaştırıldıktan sonra kalan kısmının yakılarak giderilmesine ek olarak, analiz öncesinde 50 mL kadar steril arıtılmış suyun filtre edilmesi, sistemde kalabilen dezenfektanın tamamen uzaklaştırılmasında etkili bir uygulamadır.
- Aseptik koşullara dikkat ederek membran filtrenin yerleştirileceği taban steril su ile ıslatılır ve filtre buraya yerleştirilir. Koruyucu plastik kılıf kendiliğinden kalkar, bu kısım filtreden ayrılır. Sonra süzme haznesi yerine yerleştirilerek sabitlenir.

- Beklenen ya da hedef sayıya uygun miktarda su hazneye aktarılır, pompa çalıştırılır ve su örneği membran filtreden geçirilerek süzülür.
- Süzme işlemi tamamlandıktan sonra haznenin kenarlarında kalmış olması muhtemel mikroorganizmaların da alınması için 10-20 mL kadar steril su ilave edilerek süzülür.
- Aseptik koşullara uyularak filtre, mikroorganizmaların tutulmuş olduğu yüzeyi üstte kalacak şekilde petri kutusundaki besiyerine yerleştirilir. Petri kutuları, tabanları alta gelecek şekilde inkübasyona bırakılır.
- Besiyeri olarak ped üzerine emdirilmiş hazır besiyeri kullanılıyor ise üretici firmanın talimatı doğrultusunda steril su ilave edilerek besiyeri aktive edilir.
- Mikroorganizma sayımı için membran filtreden süzülen su miktarı esas alınarak sonuçlar KOB/mL ya da KOB/g olarak verilir (Halkman, 2005).

2.8. Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları

Antimikrobiyal ilaçlar, mikroorganizmaların üremesini engelleyen veya onları öldüren kimyasal maddelerdir. İnsanlarda bakteriler, mantar, virüsler ve parazitler gibi değişik mikroorganizmaların hastalık etkeni olabilmesi nedeni ile bunlara yönelik olarak antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antiparaziter ilaçlar geliştirilmiştir. Bu ilaçların moleküler ve hücresel hedefleri ile hücreye giriş mekanizmaları birbirinden farklı olduğu için, tüm mikroorganizmalar üzerinde etkili olan ve sistemik tedavide kullanılabilen bir ajan yoktur (Brooks ve ark., 2001).

Enfeksiyon hastalıklarının tedavi edilmesinde ya da önlenmesinde kullanılan, kimyasal yapıları belli olan veya yapay olarak elde edilen ajanlara kemoterapötik madde denir. Doğal kaynaklı olanlarına antibiyotik denilse de, günümüzde kullanılan antibiyotiklerin çoğunun sentetik ya da yarısentetik yöntemlerle elde edilebildiğinden, antibiyotik deyimini tedavide kullanılan kemoterapötik ve antibiyotik niteliğindeki maddeler için genel bir ad olarak kullanılmaktadır (Usta, 2012). Moleküler ağırlıkları 150-5000 dalton arasında değişen antibiyotikler, prokaryotik ve ökaryotik organizmaların belli bölgelerine olumlu ya da olumsuz yönde etki gösterebilen, sekonder metabolitlerdir (Oskay ve Tamer, 2009). Antibiyotik ve kemoterapötikleri çeşitli kriterlere göre sınıflandırmak mümkündür. Ancak en fazla kullanılan sınıflandırma, bu ilaçların etki güçlerine ve etki mekanizmalarına göre yapılanlarıdır (Alkan, 1997).

2.8.1. Antibiyotiklerin Etki Derecelerine Göre Sınıflandırılmaları

Antibiyotikler, vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki gruba ayrılır.

Bakteriyostatikler

Bakteriyostatikler, bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önlerler. Gelişmesi ve üremesi duran bakteriler, vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilirler. Bakteriyostatik etki gücünün göstergesi Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)'dur. Bakteriyostatik ilaç verilirken dikkat edilmesi gereken faktör yeterli ve sürekli oranda kanda bulunmalarını sağlamaktır (Kayaalp, 1998). Bakteriyostatik etkili bazı ajanlar; Eritromisinler, Sülfonamidler, Tetrasiklinler, Kloramfenikol, Oksitetrasiklin, Klortetrasiklinler ve Streptomisinlerdir.

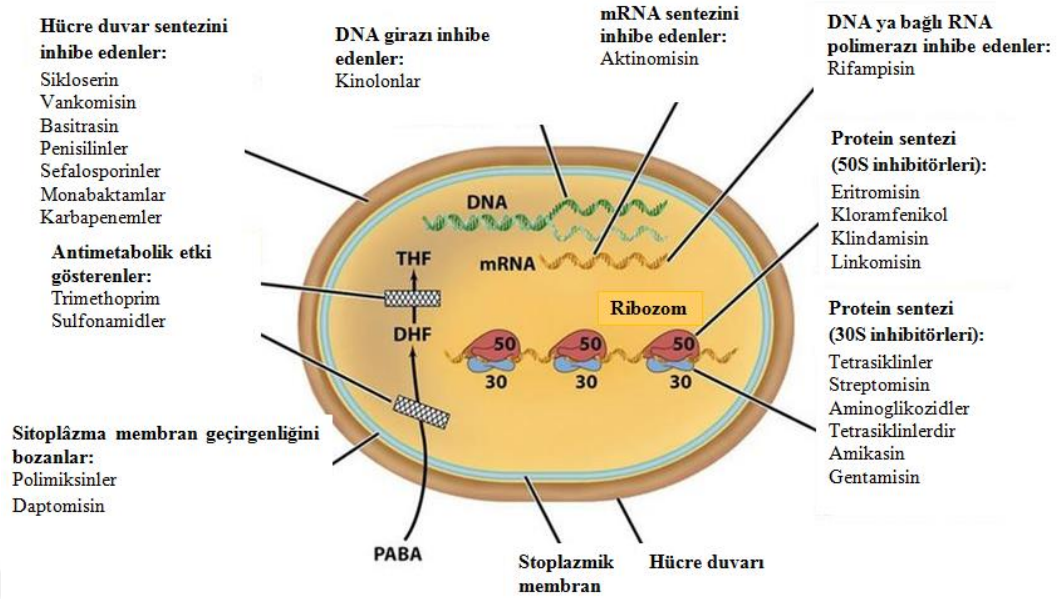
Bakterisidler

Hücre duvarını ve bakteriyel nükleik asit sentezini bozan antibiyotikler doğrudan mikroorganizmayı tahrip ederler ve bakterisit etki gösterirler. Bakterisidal etki, bakteri hücrelerinin direkt olarak öldürülüp yok edilmesidir. Bakterisid antibiyotikler her zaman daha etkilidirler ve etkileri daha kısa sürede ortaya çıkar. Bu nedenle antibiyotik tedavisinde bakterisidler, bakteriyostatiklere göre daha çok tercih edilirler (Kayaalp, 1998). Bakterisid etki gücünün göstergesi, Minimum Bakterisid Konsantrasyon (MBK)'dur. Bakterisid etkili bazı ajanlar; tüm penisilinler, sefalosporinler, metronidazol, klindamisin (yüksek dozda), linkomisin, vankomisi ve aminoglikozitlerdir.

2.8.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları

Antibiyotikler, etki mekanizmalarına göre Şekil 2.13'deki gibi beş gruba ayrılmaktadır.

1. Bakteri hücre duvar sentezini inhibe edenler
2. Sitoplazma membran permeabilitesini bozanlar
3. Protein sentezini engelleyenler
4. Nükleik asit sentezini engelleyenler
5. Antimetabolik etki gösterenler (Aygün, 1997).



Şekil 2.13. Bazı antibiyotikler ve bakteri hücresinde hedef aldıkları bölgeler (Bbosa ve ark., 2014)

Bakteri Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Edenler

Hücre duvarı, bakterinin bütünlüğünü koruyan, bölünme ve çoğalmasını sağlayan kısımdır. Bakteri hücre duvarı murein denilen bir polimer bileşikten oluşmaktadır. Bu madde bir mukopolisakarit olan lineer peptidoglikan zincirlerinin yan dallarla birbirine bağlanması sonucu oluşur. Bu tabaka Gram-pozitif bakterilerde kalın olup 50-100 peptidoglikan molekül tabakasından oluşur (Tunail, 2009). Gram-negatif bakterilerde peptidoglikan tabaka daha ince ve esnek olup 1-2 molekül tabakasından yapıldır ve bunun dışında da bir lipopolisakarit-lipoprotein yapılı ikinci bir tabaka bulunmaktadır. Bakteri hücre duvarı, bakterinin bütünlüğünü koruyarak parçalanmasına engel olur (Gülay, 2003). β -laktam antibiyotikler (penisilinler, sefalosporinler), glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin), novobiosin, basitrasin, sikloserin gibi antimikrobiyal maddeler bakteri hücre duvarının sentezlenmesinde, hücre çeperindeki temel madde olan peptidoglikan oluşumunda rol oynayan transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerinin işlevlerini bloke ederek biyokimyasal yapıyı bozar ve bakteri hücresinin ölmesine neden olur (Öztürk, 1997).

Sitoplazma Membran Permeabilitesini Bozanlar

Hücre zarı mikroorganizmalar için gerekli olan maddelerin dış ortamdan membran içerisine pasif difüzyon ve aktif taşıma ile alarak osmotik bir bariyer görevi görmektedir. Sitoplazma membranına etkili antimikrobik maddeler zarın geçirgenliğini artırıp sitoplazma içindeki aminoasitler, nükleotitler, potasyum gibi genellikle ufak moleküllü bileşiklerin dışarı çıkmasına sağlayarak mikroorganizmanın ölümüne yol açarlar (Öztürk, 1997). Memeli hücresi ile bakteri hücresi sitoplazma zarlarının fonksiyonu benzer olduğundan ilaçların seçici toksik etkileri fazla değildir. Bu yüzden organizma için oldukça toksik maddelerdir (Kiraz, 2006). Polimiksinler, gramisidin, nistatin, amfoterisin B, imidazoller gibi antibiyotikler sitoplazma membranının geçirgenliğini artırıp sitoplazma içerisinde bulunan ve yaşamsal önemi olan aminoasit, nükleotit ve potasyum gibi maddelerin hücre dışına çıkmasını sağlayarak mikroorganizmanın ölmesine neden olmaktadır (Cingi ve Erol, 1996).

Protein Sentezini Engelleyenler

Ribozomlar protein sentezinin gerçekleştiği yerlerdir. Bakterilerin ribozomları 70S ribozomudur ve insanlardaki 80S ribozomuna göre antibiyotiklere duyarlılığı daha fazladır. 70S ribozomunda 23S, 16S ve 5S proteinleri bulunur ve 70S protein sentezi sırasında 30S ve 50S alt birimlerine ayrılır. Protein sentezi yapılmıyorken bu alt birimler ayrılırlar ve sentez başlayacağı zaman birleşirler (Kohanski, 2010). Bu grup antimikrobikler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek işlev görürler. Memeli hücrelerindeki ribozomlar (80S) bakterilerindekinden (30S ve 50S) farklı olduğundan bu antimikrobikler memeli hücrelerindeki protein sentezini bozmazlar. Ribozomun 30S ünitesinin fonksiyonunu bozan antibiyotikler; aminoglikozidler ve tetrasiklinlerdir. Ribozomun 50S ünitesinin fonksiyonunu bozan antibiyotikler; kloramfenikol, tiamfenikol, eritromisin, azitromisin, spiramisin, klaritromisin, klindamisin ve linkomisinidir (Öztürk, 1997).

Nükleik asit sentezini engelleyenler

Bu grup antimikrobikler mikroorganizmanın DNA sentezini veya mRNA sentezini bozarak etki gösterirler. Ayrıca memeli hücrelerinin çekirdeğini etkileyen sitotoksik ilaçlar bu grupta yer alır. Bu ilaçlar kanser tedavisinde kullanılırlar (antineoplastikler-mitomisin, aktinomisin, doksorubisin). Memeli hücreleri üzerinde fazla toksik olmayan rifamisinler ve kinolonlar antimikrobiyal olarak kullanılırlar (Öztürk, 1997). Kinolonlar bu işlemi DNA replikasyonunu önleyerek yaparken, rifampin transkripsiyonu önleyerek yapmaktadır. Nükleik asit sentezini engelleyen antibiyotikler bakteriyostatik özellik gösterirler (Durupınar, 2001).

Antimetabolik etki gösterenler

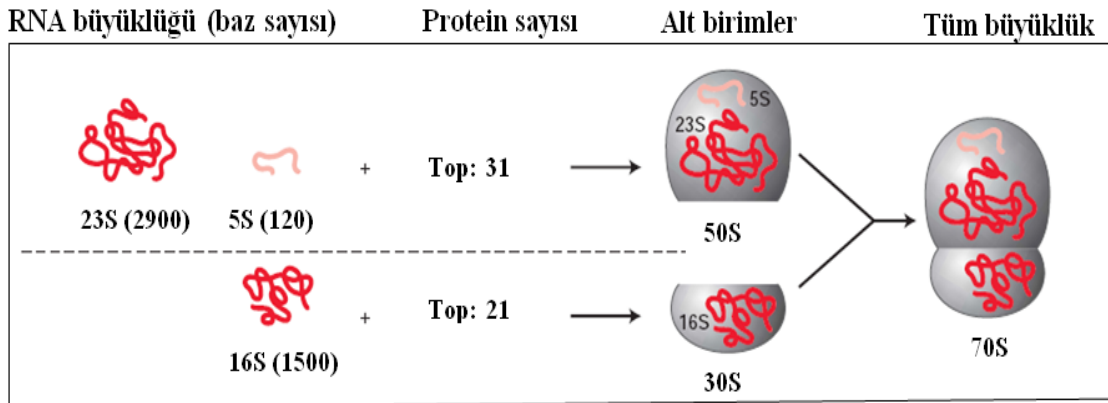
Bu grupta paraamino salisilik asit, ethambutol, sulfonamidler, dihidrofolat redüktaz inhibitörleri (trimetoprim, primetamin), izoniazit ve 5-fluorositozin bulunmaktadır (Öztürk, 1997). Bunlar bakterinin metabolizması için gerekli bazı maddelerin sentezini bozmaktadırlar. Bakterilerin çoğu p-aminobenzoik asit, pteridin ve glutamik asit gibi bileşenlerden dihidrofolik asit sentezleme yeteneğine sahiptir. Dihidrofolatın kendisi bakteri metabolizmasında önemli bir rol oynamaz fakat dihidrofolat, dihidrofolat redüktaz enzimi ile tetrahidrofolik aside parçalanır, tetrahidrofolik asit, metionin, purinlerin, timin ve nükleik asit bileşenlerinin sentezinde önemli rol oynar. Trimetoprim ve Sülfonamidler tetrahidrofolik asit üretimi için gerçekleşen reaksiyonlarda görev alan enzimlerin inhibitörleridir. Bu antibiyotikler bakteristatik etki gösterirler (Salysers, 2005).

2.9. Mikroorganizmaların Tanınmasında Moleküler Yöntemler

Belirli genler ve proteinler evrimsel kronometreler olup evrimsel değişimi ölçerler. Diğer bir deyişle işlevsel olarak benzer (homolog) makromoleküllerin nükleotit ve aminoasit dizisindeki farklılıklar, evrimsel uzaklıklarının bir sonucudur. Moleküler dizileme ile evrimsel uzaklıkların ölçülmesi amacıyla yapılacak dizileme çalışmalarında doğru moleküllerin seçilmesi şarttır (Madigan ve Martinko, 2012). Organizmalar arasındaki evrimsel ilişkilere filogeni adı verilir. Filogenetik sınıflandırma, canlıların öncelikle DNA benzerliği olmak üzere hücre yapısı benzerliği, enzim benzerliği,

protein benzerliği, anatomik benzerlik, embriyolojik benzerlik, homolog organ (kökenleri aynı, görevlerinden ötürü şekilleri farklı organlar) benzerliği gibi özelliklerine göre yapılır. Pek çok gen ve proteinin moleküler kronometreler olduğu ileri sürülmektedir. Ancak bunlar arasında en yaygın kullanılanı ribozomal RNA (rRNA)'lardır (Madigan ve Martinko, 2012). Ribozomun yapısını oluşturan rRNA, ribozomun protein senteziyle ilişkili katalitik fonksiyonundan sorumludur. Hücre sitoplazmasında bulunan RNA'nın %80'i rRNA'dan oluşur (Açıklan ve Müştak, 2016).

Prokaryotlarda ribozom, 70S büyüklüğünde olup 50S ve 30S olmak üzere iki alt birime sahiptir. "S", Swedberg'i simgeler ve bir partikülün santrifüj edildiğinde çökmesini esas alan bir kütle ölçüsüdür. 50S'lik büyük alt birim 5S rRNA ve 23S rRNA ile yaklaşık 31 protein içerirken, 30S'lik küçük alt birim 16S rRNA ile yaklaşık 21 protein içerir (Şekil 2.14). rRNA (5S, 16S ve 23S); bakteri türleri arasında yüksek oranda korunurken, aynı zamanda filogenetik sinyaller içeren farklı bölgelere de sahiptir. Bu sayede rRNA molekülü bakterilerin filogenetik identifikasyonu için iyi bir çalışma laboratuvarı olma özelliğindedir.

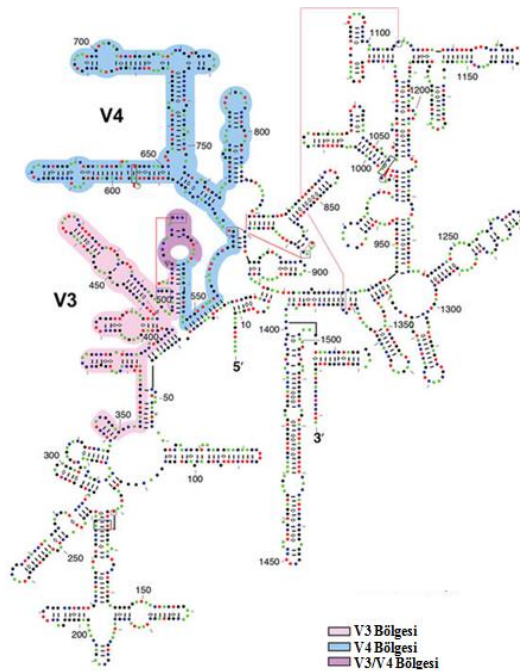


Şekil 2.14. Prokaryot Hücrelerde Ribozamların Alt Üniteleri (Siborova, 2014)

Üç rRNA geni içerisinde 16S rRNA gen dizisi dokuz yüksek oranda korunmuş (conserve) bölge ile ayrılan dokuz değişken (variable) bölgeden oluşur. Bu bölge, aynı cins ve tür içinde yüksek oranda korunmuştur. Farklı cins ve türlerde ise farklı diziler içermektedir. 16S rRNA geni tanı amaçlı en çok kullanılan bölge olmuştur. Çünkü polimeraz zincir reaksiyonu primerleri için en uygun kombinasyonların oluşturulabileceği korunmuş bölgeler taşıması, evrimsel kronometre gibi rol oynayan değişken bölgeler içermesi ayrıca pek çok mikroorganizmanın 16S rRNA geninin dizi analizi bilgilerini içeren ve

günden güne genişleyen bir veri bankasının bulunması, filogenetik identifikasyon için diğer iki rRNA genine kıyasla daha çok tercih edilmektedir (Gürsoy ve Otlı, 2017). 16S rRNA geni, yaklaşık 1550 baz çifti (bç) uzunluğundadır. Polimeraz zincir reaksiyon deneylerinde kullanılan üniversal primerler, genellikle korunmuş olan bölgelere tamamlayıcı (komplementer) olarak seçilir. Tanı amacıyla yapılan DNA dizi analizinde çoğunlukla ilk 500 bç'lik kısım incelenir. Ancak yeni tür belirlenmesi ve türler arası farklılıkların saptanması için tüm bölgenin araştırılması gerekmektedir. 16S rRNA sekanslamasında %97 veya daha fazla dizi benzerliği gösteren suşlar aynı cins kabul edilirken %99 ve üzerindeki dizi benzerlikleri aynı türe ait olduğunu gösterir (Özkuyumcu, 2009).

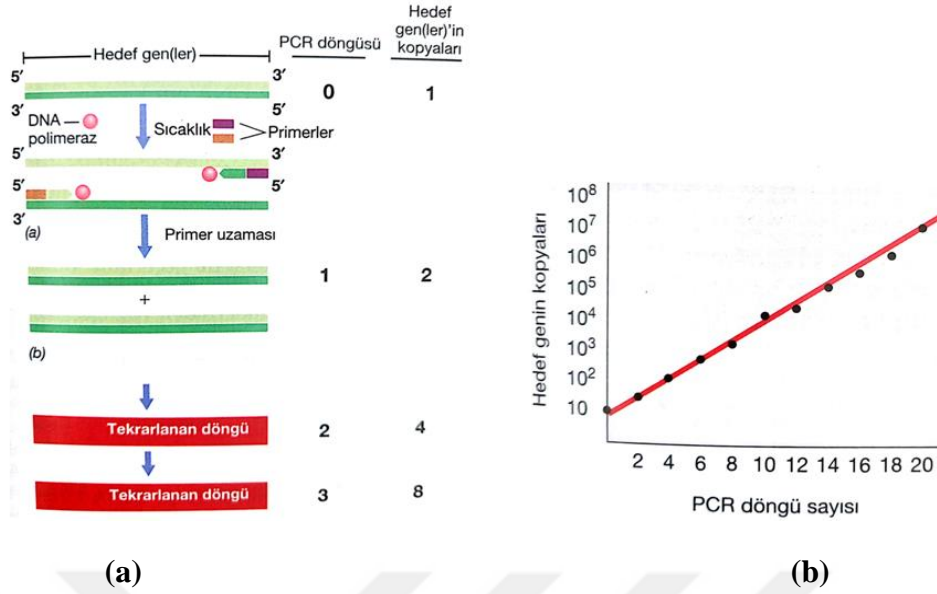
16S rRNA'yı oluşturan bölgelerden biri olan ve yüksek değişkenliğe sahip V4 bölgesi (Şekil 2.15), mikrobiyal komünitenin karşılaştırılması ve araştırılması ile ilgili çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (Caporaso ve ark., 2011; Kozich ve ark., 2013). Aynı zamanda dizinin yaklaşık olarak 250 bç uzunluğunda olması yeni nesil dizilemeye uyarlanmasını mümkün kılmıştır. Global mikrobiyom projesi olan Earth Microbiome Project (EMP) çalışmalarında ise 16S rRNA'nın V4 bölgesi, tanımlayıcı bölge olarak protokolde yer almaktadır ve günümüzde bakteri-arke filogenetik çalışmalarında sıkça tercih edilen bölge konumuna gelmiştir (Kozich ve ark., 2013).



Şekil 2.15. 16S rRNA Yapısı ve V4 Gen Bölgesi (Cannone, 2002)

2.9.1. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), rekombinant DNA teknolojisiyle birlikte gelişen, moleküler biyoloji ve genetik dallarında sıklıkla kullanılan bir tekniktir (Karataş, 2012). Sentetik DNA ve DNA dizi analiziyle ilgi gelişmeler sayesinde, DNA'nın in vitro ortamda çoğaltılması üzerine polimeraz zincir reaksiyonu adında yeni bir metot geliştirilmiştir (Madigan ve Martinko, 2012). 1985 yılında ABD'de bulunan Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen yöntem nükleik asitlerin canlı organizma içinde bulunmadan uygun koşullar sağlanarak çoğaltılmasına dayanmaktadır. Hem araştırma hem de klinik laboratuvar tanısında kullanılmak üzere PZR yöntemini geliştiren K. Mullis 1993 Nobel Kimya Ödülü'nü almaya hak kazanmıştır. Ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarda ve birçok hastalığın teşhisi için klinik tıpta kullanılmaya başlanmıştır (Saiki, 1985). Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik bir DNA parçasının in vitro koşullarda DNA polimeraz enzimi ile uygun iki primer tarafından sentezlenmesini sağlayan bir yöntemdir (Saiki, 1985). Bu yöntemin Polimeraz zincir reaksiyonu olarak adlandırılmasının sebebi, döngünün anahtar elemanlarından biri olan DNA polimerazdan türetilmesidir. DNA polimeraz, in vitro enzimatik replikasyon ile DNA'nın bir parçasını çoğaltmak için kullanılır (Esmael, 2010). Polimeraz zincir reaksiyonunun sırrı, bir primer uzatmanın ürünlerinin bir sonraki döngüde kalıp olarak iş görmesidir (Şekil 2.16.a). Gerçekte, PZR tekniğinin güzelliği her döngünün orijinal hedef DNA muhteviyatının iki katına çıkmasıdır. Pratikte, genellikle 20-30 döngü yapılarak hedef dizinin 10^6 - 10^9 kat üretilmesi sağlanır (Şekil 2.16 b) (Madigan ve Martinko, 2012).



Şekil 2.16. PZR ürünlerinin aritmetik olarak kopyalanması (Madigan ve Martinko, 2012)
(a): PZR döngüleri sonucu oluşan ürün sayısı
(b): Toplam ürün sayısı grafiği

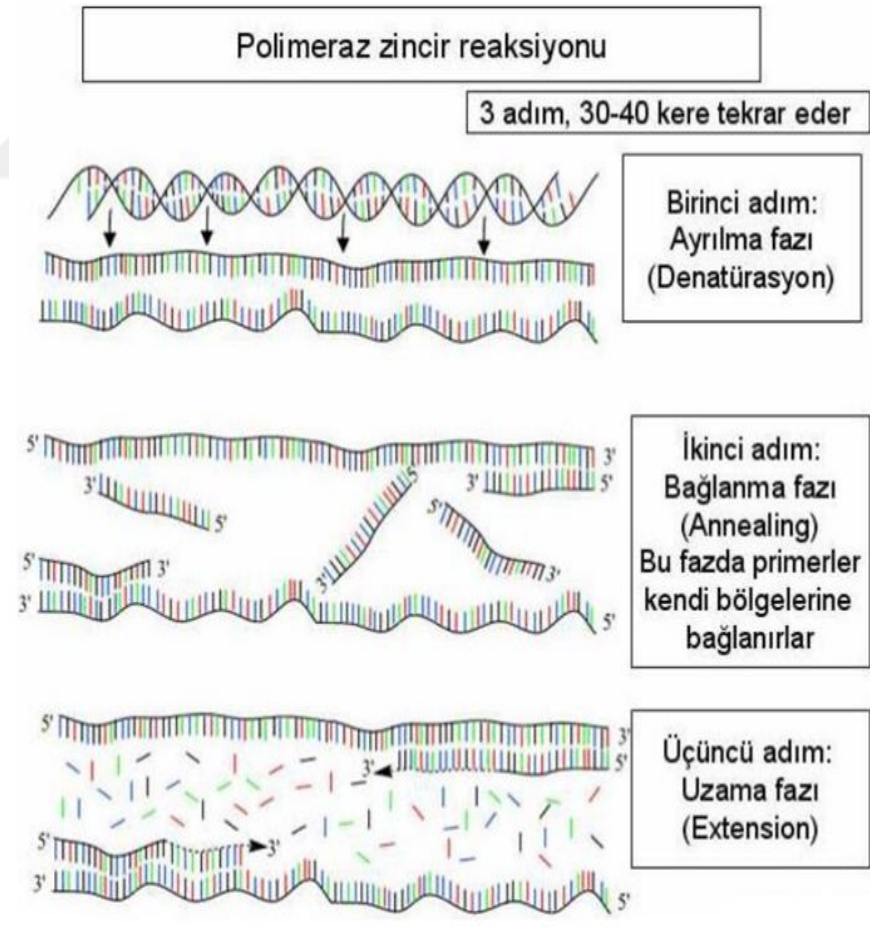
Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülüne hedef dizilere iki oligonükleotid primerin (18–20 baz uzunluğunda) bağlanması ve bu primerin uzaması esasına dayanır. Kalıp DNA molekülleri yüksek sıcaklıklarda denatüre edildikten sonra, amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle düşük sıcaklıklarda birleşir (Devrim ve Kaya, 2004). DNA polimeraz enzimi, dört çeşit deoksinükleozid trifosfat (dNTP) ve uygun tampon varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Polimerazın çalışması için uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı ile enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır (Akar, 1999).

Polimeraz zincir reaksiyonu ile DNA'nın küçük bir bölgesini DNA polimeraz enziminin de kullanımı ile milyonlarca defa kopyalamak mümkündür. Ancak bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için hedef DNA bölgesinin her iki ucunun nükleotid dizisi bilinmelidir. Bunun için çalışılacak olan DNA parçasının her iki ucu için primer tasarımının yapılması gerekmektedir. Primerler oluşturulduktan sonra iki uç arasındaki bölge PZR kullanılarak çoğaltılabilir. Amplifikasyon genellikle DNA polimeraz I enzimi ile gerçekleşir. Bu enzim sıcak kaplıca sularında yaşayan *Thermus aquaticus* isimli bakteriden izole edilir. *Taq* polimeraz adıyla kullanılan bu enzim yüksek sıcaklıklarda istikrarlı kalmasının yanı sıra reaksiyonun son basamağı olan DNA

amplifikasyon işleminin yüksek sıcaklıklarda (72°C) olmasını sağlayarak primerlerin özgün olmayan bağlanmalarını da engellemektedir. PZR işleminde kullanılan diğer bileşenler; Mg^{+2} , dNTP (A,T,C,G) karışımı ve PZR tamponudur (Karataş, 2012). Polimeraz zincir reaksiyonu thermocycler adı verilen cihazları ile gerçekleştirilmektedir. Bu cihazlarda her bir siklus esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemleri yazılım programları ile uygulanır. Günümüzde farklı firmalar tarafından siklus sayısı, inkübasyon süresi ve sıcaklığın programlanabildiği thermocycler cihazları geliştirilmiştir (Erol ve ark., 1990).

2.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ana İşlem Basamakları

PZR'nin prensibi; Amplifiye edilecek DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu, primerin hedef DNA'ya bağlanması ve primerin uzamasından oluşan 3 basamağa dayanmaktadır (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. PZR Siklusunun basamakları (Vierstraete, 1999).

Denatürasyon

Denatürasyon aşamasında kalıp DNA parçası gerekli sıcaklığa ulaşıktan sonra açılarak tek zincirli hale gelir. DNA çift zinciri genellikle 94-97°C aralığında açılır. Yüksek sıcaklığın etkisi ile hidrojen bağları kırılır (Watson, 1992). Bir hidrojen bağını kırmak için gerekli olan enerji 436 kJ/mol'dür. Guanin ve sitozinden (G+C) zengin diziler, sahip oldukları üçlü hidrojen bağları nedeniyle denatürasyon sıcaklığı yüksektir. PZR'ın gerçekleşebilmesi için denatürasyonun tam olması gerekmektedir. Bu nedenle denatürasyon sıcaklığının dikkatli seçilmelidir. Her PZR reaksiyonunda tüm genomik DNA'nın yeterince açılabilmesi için döngüsel basamaklardan önce 5-10 dakikalık ve tek adımlık bir denatürasyon aşaması uygulanmalıdır (Klug ve ark., 2009).

Primer yapışması (Annealing)

Denatürasyon aşamasından sonra sıcaklık 50-70°C'ye düşürülerek ortamda bulunan iki oligonükleotid primer tek zincirli DNA dizisine bağlanır. Primerlerin hedef DNA üzerindeki spesifik bölgelere bağlanabilmesi için, programlanan thermocycler sıcaklığı 37-65°C'ye indirmektedir. Primerlerden birinin kendine ait olan 5' ucu, hedef DNA'lardan birinin 3' ucuyla, diğer primer de ikinci tek iplikçik DNA'nın anti paralel olan diğer ucunda bulunan 3' ucuna DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak (5' → 3') bağlanırlar. Bu işlemler yaklaşık 0,5-1 dakika sürmektedir (Klug ve ark., 2009).

Zincirin uzaması (Extension):

Primerler hedef DNA parçasına bağlandıktan sonra ortamdaki Mg⁺² ve Taq Polimeraz enzimi sayesinde dNTP'ler primerin ardına 5'-3' yönünde eklenirler. Yeni oluşan DNA zincirinin baz dizilimini belirleyen, kalıp DNA'daki baz sırasındır. Yeni sentezlenen DNA'nın uzama hızı 35-100 nükleotid/saniyedir. Uzama zamanı hedef dizideki baz derişimi, dizinin uzunluğu ve ortam ısısına bağlıdır. Tercih edilen en uygun sıcaklık 72°C'de 1 dakikadır. Döngüler genellikle 30-40 kez gerçekleştirilir (VanGuilder ve ark., 2008).

2.9.3. PZR'nin Temel Bileşenleri

Kalıp DNA

Polimeraz zincir reaksiyonunda çoğaltılmak istenen diziyi içeren DNA'dır. PZR oldukça etkili bir teknik olduğu için çok küçük DNA miktarları bile yeterli olmaktadır. Genellikle 50 µL reaksiyon karışımı için 0.1-1 µg genomik DNA kullanılır (Birben, 2006).

Primerler

Reaksiyonda çoğaltılmak istenen bölgenin sınır dizilerine tamamlayıcı tek iplikli kısa DNA parçalarıdır. Primerler genel olarak %50-60 G+C bileşimine sahiptir ve 12-30 nükleotidden oluşurlar. Primer tasarımı yapılırken, hedef DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Ayrıca kullanılacak primerler yalnızca hedef DNA bölgesine spesifik olmalıdır. Konsantrasyonları 0.1-0.5 mM arasında değişebilir. Yüksek konsantrasyona sahip primerler hatalı dizilimlere sebep olabilir (Devrim ve Kaya, 2006).

Deoksiribonükleozid Trifosfat Molekülleri (dNTPs)

Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) polimerizasyon basamağında görev alırlar. Yüksek saflıkta ve ticari olarak elde edilirler. Ayrı ayrı ya da karışım halinde kullanılabilirler. Sentezlenecek olan hedef DNA'nın uzunluğu, sayısı, döngünün kaç kez tekrarlanacağı doğrudan doğruya dNTP'lerin miktarı ile yakından ilgilidir. Ayrıca reaksiyondaki fosfat grubunun da esas kaynağını oluşturmaktadırlar. (Türkyılmaz ve Esenal, 2002).

Taq DNA Polimeraz

Thermus aquaticus'tan elde edilen ısıya dayanıklı bir enzimdir. Bu enzim 5'- 3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Dolayısıyla sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğrudur. Böylece primerin serbest 3' hidroksil ucuna fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Bu enzimin reaksiyondaki miktarında

önemlidir. Çünkü yüksek konsantrasyon, spesifik olmayan ürünlerin oluşmasına, düşük konsantrasyon ise yetersiz ürün oluşmasına neden olabilir (Devrim ve Kaya, 2006).

Mg⁺² derişimi:

PCR'nin özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Mg⁺² iyonları dNTP'ler ile çözünebilir bileşikler oluştururlar, polimeraz aktivitesini uyarırlar ve primer-kalıp DNA hibridizasyonunu sağlarlar. MgCl₂'ün reaksiyon karışımındaki konsantrasyonu 0,5–5 mM'lık değerler arasında olmalıdır. Düşük Mg⁺² konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg⁺² konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürünlerin birikimine neden olur (Devrim ve Kaya, 2006).

PZR tamponu

PZR için enzime (DNA polimeraz) özgü tamponlar kullanılır. Çoğunlukla satın alınan enzimle birlikte 10X konsantrasyonda sağlanabilmektedir. Genellikle 10-50 mM arasında Tris- HCl (pH= 8,3-8,8) tampon çözeltisi kullanılır (Birben, 2006).

2.9.4. Elektroforez Çalışmaları

Elektroforez, ilk kez 1930 yılında, İsveçli kimyacı Tiselius tarafından keşfedilmiştir. Elektriksel yük taşıyan moleküllerin, bir elektriksel alan içinde birbirinden ayrılmasını sağlayan bir analitik yöntemdir. Elektroforez işlemi proteinlerin, aminoasitlerin, nükleotid ve nükleik asitlerin elektrik akımı ve uygun pH'daki tampon solüsyonlarında net elektrik yüküne, molekül büyüklüklerine ve şekillerine göre ayrıştırılmasında kullanılır (Shaw ve Prasad, 1970). Elektroforez tekniğinin kullanım alanları; saflaştırma, saflık kontrolü, molekül ağırlığı saptama, kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalık saptama, enzim izozimlerinin saptanması (tanısal amaçlı, populasyon çalışması için, adli tıpta), immünolojik ve moleküler biyolojidir (Özkan, 2005).

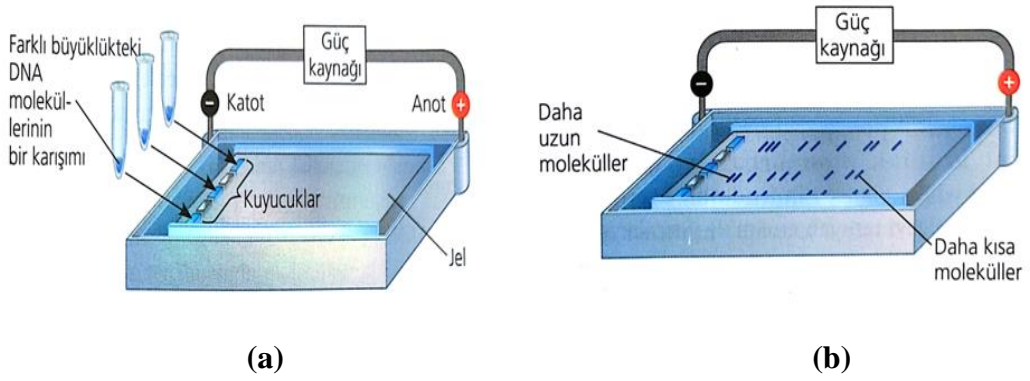
Elektroforez, yüklü moleküllerin elektriksel bir alanda yürütülmesi işlemidir. Yürümenin oranı, moleküldeki yük ve molekülün şekil ve büyüklüğüyle belirlenir (Madigan ve Martinko, 2012). Bu teknikte DNA veya RNA molekülleri uzunluklarına göre jelde ayrılırlar ve büyüklüğü bilinen markör ile karşılaştırma yapılarak, her bir

DNA veya RNA parçasının büyüklüğü saptanmaktadır. DNA veya RNA moleküllerinin yapı taşında fosfat bağları bulunduğundan negatif yüklüdür. Elektrik akımı uygulandığı zaman, negatif yüklü nükleik asitler pozitif elektrota yani anota doğru ilerler (Karataş, 2012). Elektroferez esnasında moleküller büyüklüklerine ve yapılarına göre farklı şekillerde hareket edebilirler. Büyük moleküller küçük moleküllerden daha yavaş hareket etmektedir (Williams, 2000). Çok çeşitli elektroferez türü olmasına rağmen farklı amaçlar için farklı yöntemler vardır. Bunlardan bir kaçı agaroz jel, poliakrilamid jel, nişasta jel ve selüloz asetat jel elektroferezidir.

Agaroz Jel Elektroferezi

Agaroz, kırmızı bir alg türü olan Agar agar'dan izole edilen, ortalama molekül ağırlığı 12000 olan doğrusal bir polisakkarittir. Birbiri ardına gelen galaktoz ve 3,6-anhidrogalaktoz birimleri agarobiyozu (agarobiose), agarobiyoz da agarozu oluşturur. Yüksek sıcaklıklarda suda çözünebilmesi ve soğutulduğunda bu polimerde çapraz bağların oluşması ile jel yapısı oluşur. Agaroz, orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroferezle ayırmak kullanılmaktadır (Yıldırım ve ark., 2007).

Nükleik asitlerin fosfat grupları negatif yük taşıdığından, bu nükleik asitlerin hepsi bir elektriksel alanda pozitif kutba doğru ilerler. Nükleik asitler hareket ettikçe, sık düzenlenmiş agar lifleri, kısa olanlara göre birbirinden ayırır. Böylece jel elektroferezi DNA moleküllerinin karışımını bantlar şeklinde birbirinden ayırır. Her bir bant aynı uzunlukta binlerce DNA molekülünden oluşur (Madigan ve Martinko, 2012). Hazırlanan agaroz jel, elektroferez tankına yerleştirilir. Her bir ucunda elektrotları olan bu tankın içerisine sıvı tampon çözelti eklenir. DNA moleküllerinin bir karışımından oluşan her bir örnek, agaroz jel bulunan bir kuyucuğa yüklenir (Şekil 2.18 a). Akım açıldığında negatif yüklü DNA molekülleri pozitif elektroda doğru hareket eder. Kısa moleküller uzun olanlardan daha hızlı ilerler (Şekil 2.18 b).



Şekil 2.18. Temel bir elektroforez seti (Madigan ve Martinko, 2012)

(a): DNA moleküllerinin jel üzerindeki kuyucuklara yüklenmesi

(b): Elektroforez işleminde yürütülen DNA molekülleri

Bir DNA molekülünün agaroz jelde görünür hale gelmesi için Etidyum Bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'deki UV ışığını absorblaması sonucu floresan etki göstermesi ile olur. Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak az veya kuvvetli olabilir (Temizkan ve Arda 2004). Agaroz jelin konsantrasyonu %0,3-2,0 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece düşük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için düşük konsantrasyonlar hazırlanarak DNA'nın jelde en iyi şekilde taşınması sağlanabilir. Çizelge, 2.6' da ayrıştırılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak kullanılacak olan agaroz konsantrasyonları verilmiştir (Olgun ve Topal, 1999).

Çizelge 2.6. DNA molekülünün büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonları (Klug, 2009)

Agaroz Konsantrasyonu (%ağırlık/hacim)	Doğrusal DNA Molekülünün Büyüklüğü (kb)
0,3	5,0-60,0
0,6	1,0-20,0
0,7	0,8-10,0
0,9	0,5-7,0
1,2	0,4-6,0
1,5	0,2-3,0
2,0	0,1-2,0

3. MATERYAL ve METOT

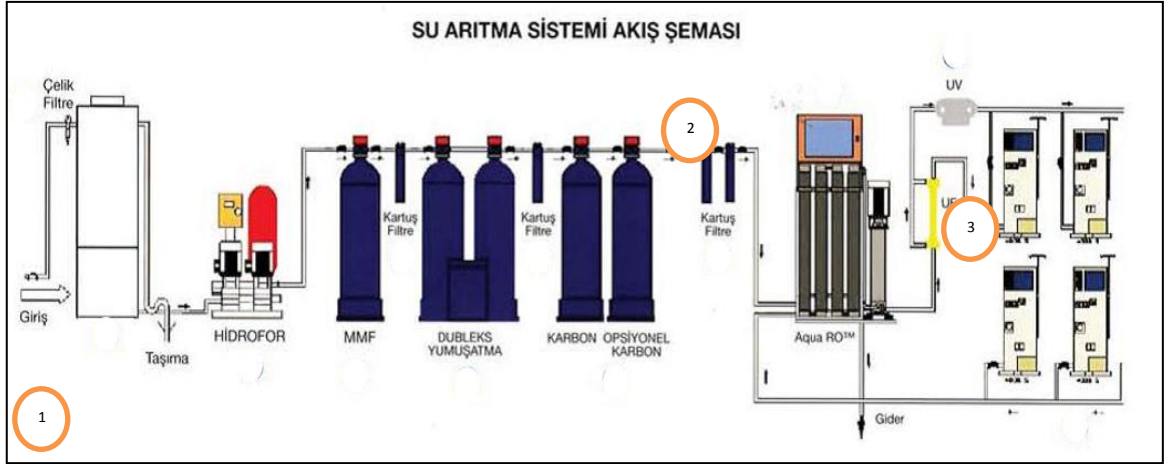
3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan materyaller ve sarf malzemeler Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), Biomerieux (Fransa) ve Thermo Fisher Scientific şirketlerinden temin edilmiştir. Besiyelerinin, kimyasalların ve hazırlanmasına ait bilgiler Ek 1 ve Ek 2’de, API 20NE identifikasyon kitinin kullanılmasına ait bilgiler ise Ek 3’de verilmiştir.

3.2. Metot

Çalışma Akışı

1. Hemodiyaliz ünitesi su sisteminde bulunan 3 farklı noktadan (Şekil 3.1) alınan su örneklerinin aynı gün içinde mikrobiyoloji laboratuvarına getirilerek membran filtrasyon yöntemi ile mikrobiyolojik ekimlerinin yapılması
2. Seçici besiyelerinde üreme olan plaklarda mikroorganizmaların izole edilmesi
3. İzole edilen suşlarda tanımlama testlerinin yapılması (gram boyama, katalaz testi, oksidaz testi)
4. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması için API 20NE test kitinin kullanılması
5. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
6. Moleküler tanı amacıyla; 16S rRNA PZR ve 16S rRNA gen bölgesi DNA dizi analizi yapılması
7. Sonuçların yorumlanması



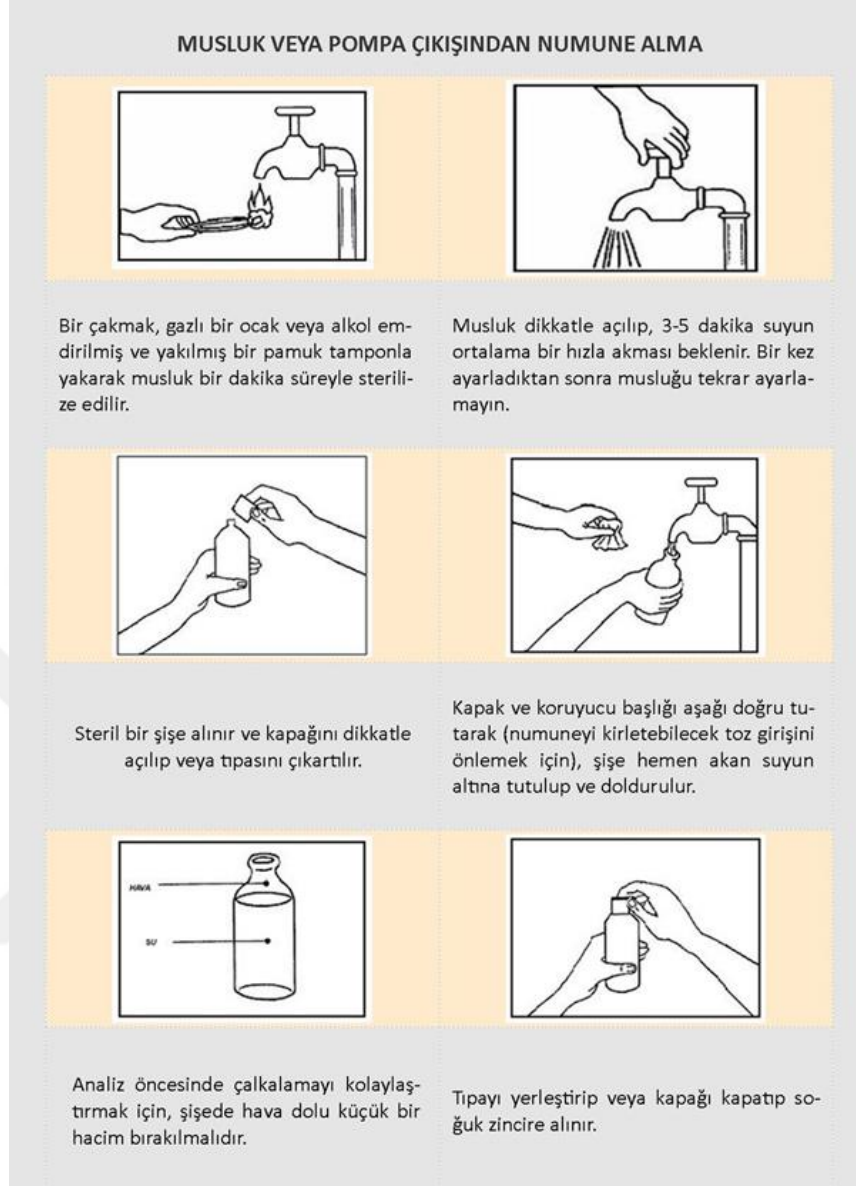
Şekil 3.1. Su numunelerini alma noktaları (Anonim, 2013)

3.2.1. Su Numunelerinin Alınması ve Taşınması

Suların mikrobiyolojik incelenmesinde en önemli bölüm, su numunesi alma basamağı oluşturmaktadır. Diyaliz kliniklerinin su arıtma sisteminde, tüm sistemi temsil eden noktalar seçilmiştir. Ayrıca dışardan kaynaklanabilecek herhangi bir mikroorganizma bulaşmasının olmamasına dikkat edilmiştir. Numune hangi noktadan alınırsa alınsın mutlaka etiketleme yapılmıştır.

Su numunesini almak için steril, tek kullanımlık, plastik şişeler kullanılmıştır. Su örnekleri doğrudan musluktan alınmıştır. Mikrobiyolojik bulaşma riskine karşı numunenin alınacağı vana veya musluğa bağlı herhangi bir hortum veya uzatma olmamasına, dikkat edilmiştir.

Numune alınmadan önce musluk sonuna kadar açılarak 5 dakika boyunca hızlı bir şekilde boşa akıtılmıştır. Böylece musluğun iç kısımlarında kaynaklanabilecek kirleticilerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra musluk, alkol emdirilmiş ve yakılmış bir pamuk tamponla yakarak bir dakika süreyle sterilize edilmiştir. Mikrobiyolojik bulaşmalara karşı şişenin ağzına el veya başka bir şey değdirilmeden ve numunenin içine herhangi bir kirleticinin düşmesine izin vermeden şişe hızlı bir şekilde kapatılmıştır (Şekil 3.3). Alınan numuneler hemen su numune taşıma çantasına konularak laboratuvara $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'da soğuk zincirde taşınmıştır. Numuneler laboratuvara ulaşırsa ulaşırsa mikrobiyolojik çalışmalara başlanmıştır.

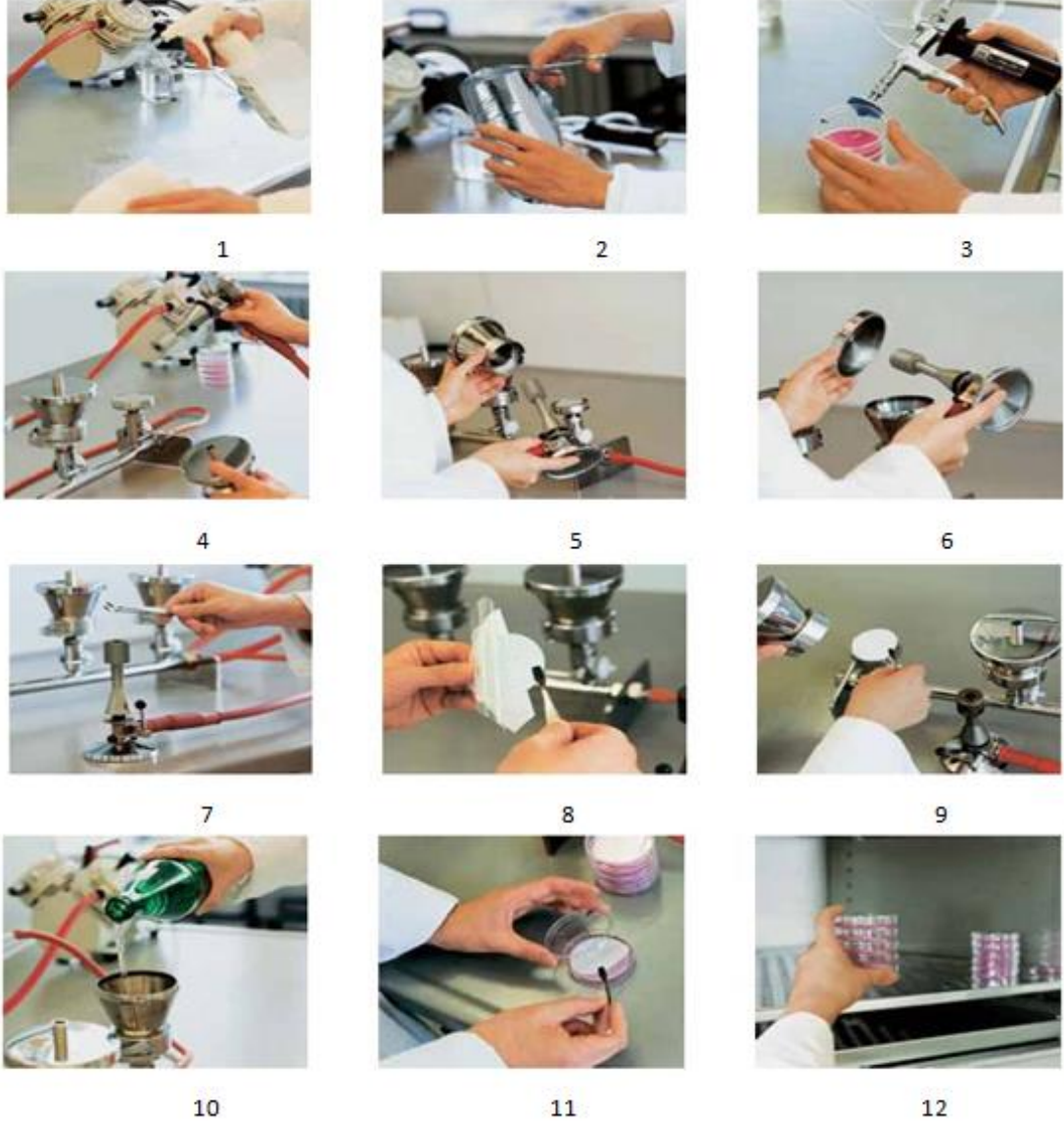


Şekil 3.2. Su numunelerinin alınması (Anonim, 2014).

3.2.2. Membran Filtrasyon Yöntemi ve Kullanılan Besiyerleri

Su siteminde belirlenen 3 noktadan alınan su örnekleri seçici besiyerine her birinde paralel olmak üzere membran filtrasyon yöntemi ile ekim yapılmıştır. 100 mL su örneği, membran filtrasyon cihazı üzerine yerleştirilen steril membran filtreden (por büyüklüğü 0,2 μm) süzülmüştür. Bu işlemde su içerisinde mevcut olan bakterilerin membran filtrede tutulması sağlanmıştır. Daha sonra membran filtre, analizi istenilen besi yerlerine taşınarak, uygun sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4). Bu süre sonunda besiyeri üzerindeki membran filtre yüzeyinde gelişen koloniler

değerlendirilmiştir. Membran filtrasyon yöntemi kullanılan her çalışmada membran filtrasyon haznesi alevden geçirdikten sonra membran filtreden 100 mL steril distile su süzülerek petri plağına yerleştirilmiştir. Böylece herhangi bir üreme olup olmadığı kontrol edilmiştir.



Şekil 3.3. Membran filtrasyon yöntemi ile su analizi (Kamanlı, 2011)

Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri (TMAB) İzolasyonu

Su örneklerinden toplam aerobik mezofilik mikroorganizmaların izolasyonu için Plate Count Agar (PCA) kullanılmıştır. Petriler 32°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen tüm koloniler nutrient agar besiyerinde izole edilmiştir.

Toplam Koliform Bakteri İzolasyonu

Koliform bakteri izolasyonu için Levin EMB besiyeri kullanılmıştır. Petriler 32°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda saydam ve amber renkli koloniler *Salmonella* ve *Shigella* gibi laktoz ve sakkaroz negatif bakterileri; menekşe renkli, yansıyan ışıkta yeşilimsi metalik parlak görülen koloniler *E. coli*’yi; pembe- menekşe renkli ve gri kahverengi merkezli koloniler diğer koliform bakteriler olarak değerlendirildi. Gelişen tüm koloniler nutrient agar besiyerinde izole edilmiştir.

Staphylococcus aureus İzolasyonu

Staphylococcus aureus izolasyonu için Baird-Parker agar kullanılmıştır. Petriler 32°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 1-1,5 mm çapında siyah, parlak konveks koloniler *S. aureus* olarak değerlendirildi. Gelişen tüm koloniler nutrient agar besiyerinde izole edilmiştir.

Enterococcus spp. İzolasyonu

Enterococcus spp. izolasyonu için Slanetz Bartley Agar kullanılmıştır. Petriler 32°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kırmızı renkli koloniler Enterekoklar olarak değerlendirildi. Gelişen tüm koloniler nutrient agar besiyerinde izole edilmiştir.

Pseudomonas aeruginosa İzolasyonu

Pseudomonas aeruginosa izolasyonu için Pseudomonas Selective Agar Base kullanılmıştır. Petriler 32°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda beyaz, sarı ve yeşil pigment veren koloniler *Pseudomonas spp.* olarak değerlendirildi. Gelişen tüm koloniler nutrient agar besiyerinde izole edilmiştir.

Salmonella ve Shigella spp. İzolasyonu

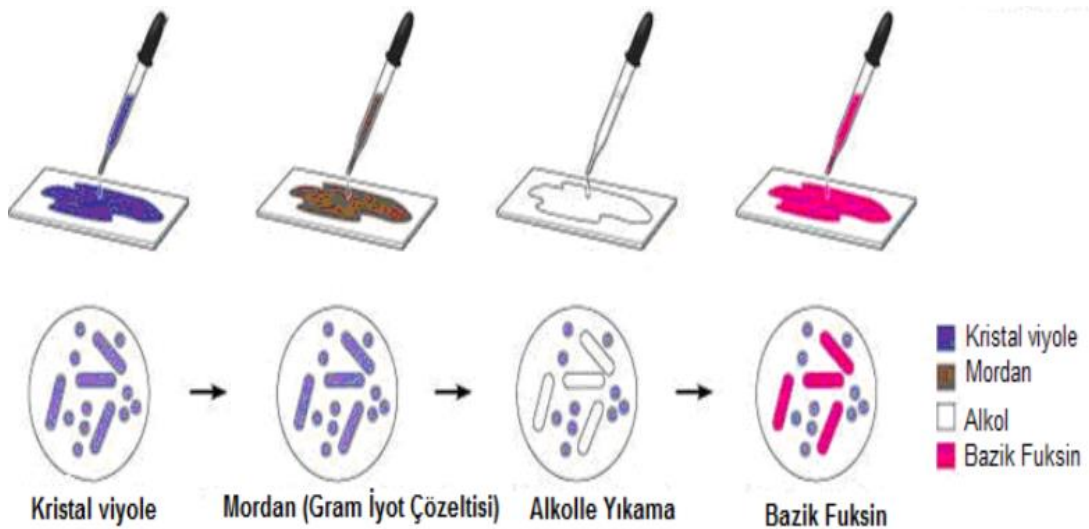
Salmonella ve Shigella spp. izolasyonu için *Salmonella- Shigella agar* (SS agar) kullanılmıştır. Petriler 32°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen tüm koloniler nutrient agar besiyerinde izole edilmiştir.

Candida İzolasyonu

Candida izolasyonu için Sabouraud %2 Dextrose Agar kullanılmıştır. Petriler 32°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen tüm koloniler nutrient agar besiyerinde izole edilmiştir.

3.2.3. Gram Boyama

32°C’de 24 saat nutrient agar besiyerinde gelişen kolonilerden preparat hazırlanmıştır. Öncelikle incelenecek olan kültürden bir öze dolusu lam üzerine aktarılmıştır ve lamın üzerine ince bir film tabakası halinde yayılmıştır. Havada iyice kurumasının ardından, bakteriler bunzen beki alevinden geçirilerek lam üzerine tespiti yapılmıştır. Preparat tespit edildikten sonra kristal viyole ile boyanarak 1 dakika bekletilmiştir. Ardından lam su ile iyice yıkandıktan sonra lugol solüsyonu uygulanarak 1 dakika beklenmiştir. Lugol, su ile giderildikten sonra preparatın üzerine %95’lik etanol uygulanarak 10-15 saniye beklenmiştir ve ardından su ile yıkanmıştır. Son olarak preparat karşıt boya olan safranin solüsyonu ile 30 saniye boyanıp su ile yıkanmıştır. Lam, kurutma kâğıdıyla kurutulduktan sonra ışık mikroskopunun 100X objektifinde immersiyon yağı damlatılarak incelenmiştir. Mor renkte görülen bakteriler gram pozitif, pembe renkte görülenler gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Gram boyama (Anonim, 2015).

3.2.4. Katalaz Testi

32°C’de 24-48 saat nutrient agarda gelişen taze koloniler bir öze ile alınarak temiz bir lam üzerine aktarılmıştır. Daha sonra lam üzerine birkaç damla %3’lük hidrojen peroksit damlatılmıştır. Hava kabarcığı görülen izolatlar katalaz enzimine sahip oldukları için pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* kullanılmıştır.

3.2.5. Oksidaz Testi

Bir parça filtre kâğıdı, Tetrametil-p-fenilendiamin-diklorür’ün (Sigma Chemical co.) %1’lik solüsyonunun birkaç damlası ile ıslatılmıştır. 32°C’de 24-48 saat nutrient agarda gelişen taze koloniden bir öze dolusu alınarak filtre kâğıdının üzerine yayılmıştır. 10 saniye içerisinde filtre kâğıdında mavi-menekşe renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* kullanılmıştır.

3.2.6. Api 20NE Hızlı Tanı Kitinin Kullanımı

İzolatların tür düzeyinde tiplendirilmeleri, enterik olmayan gram negatif basiller için spesifik olan biyokimyasal test kiti (API 20NE) ile yapılmıştır. Bu amaçla nutrient broth besiyerinden saf kültürler nutrient agar besiyerine ekilerek aktif hale getirilmiştir. Bu petrilerden öze kullanılarak 1–4 koloni daha önceden kullanıma hazırlanmış 2 mL’lik %0,85’lik steril serum fizyolojik tüplerine inoküle edilmiş ve steril mikropipetler kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklılığında homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan aynı pipetle NO₃ testinden PNPG testine kadar hava kabarcığı kalmayacak şekilde sadece tüp kısımlarına inokülasyon yapılmıştır. Daha sonra bu süspansiyondan 200 µL AUX Medium’a eklenerek hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde karışım sağlanmıştır ve bu karışım kalan GLU testinden PAC testine kadar hem tüp hem de kuyu kısımları dolacak şekilde inoküle edilmiştir. Kuyu kısımlarının konveks ya da konkav olmaması, düz bir sekil alması sağlanmıştır. Daha sonra GLU, ADH ve URE testleri için anaerobik ortam sağlamak amacıyla mikrotüplerin kuyu kısımları konveks menisküs şeklinde mineral yağ ile doldurulmuştur.

Bir tabla ve bir kapaktan oluşan inkübasyon kaplarında nemli bir ortam sağlamak amacıyla 5 mL distile su petekli yapıdaki tablaya dağıtılmıştır. Mikrotüplerden oluşan stripler bu tablalara yerleştirilerek kapakları kapatılmıştır. Suş numaraları inkübasyon kutularına yazılarak suşların karışması önlenmiş ve $30\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda GLU, ADH, URE, ESC, GEL ve PNPG test sonuçları kaydedilmiştir. NO_3 testi için ise önce NIT 1 hemen ardından NIT 2 ayıraçları damlatılarak 5 dk beklenmiş, eğer sonuç negatif ise 2–3 mg Zn tozu eklenerek 5dk sonra tekrar sonuç alınmıştır. TRP testi için kuyucuğa bir damla James ayırıcı damlatılarak reaksiyon sonucu hemen kaydedilmiştir. Asimilasyon testlerinde ise kuyu kısmında opak renk görülmesi bakteriyel gelişmenin pozitif olduğunun göstergesidir. 24 saatlik inkübasyon sonunda yapılan bu işlemlerin ardından ayıraç eklenen test tüpleri mineral yağ ile kapatılarak 24 saat daha inkübe edilmiş ve 48 saat sonunda sonuçlar tekrar kaydedilmiştir. Reaksiyon sonuçları Ek 3'te verilen çizelgeye göre okunmuş ve sonuçlar sonuç çizelgelerine kaydedilmiştir.

Sonuç çizelgelerinde testler 3 testlik gruplar halinde ayrılmışlar ve gruptaki testler 1, 2 ve 4 sayılarını kodlayacak şekilde numaralandırılmıştır. 21. test oksidaz testi olup 4 sayısı ile kodlanmıştır. Her grup içindeki sonuçlara bağlı olarak ortaya 7 haneli bir sayı ortaya çıkmaktadır. Elde edilen 7 haneli sayılara karşılık gelen bakteri suşlarının adları bilgisayar programı ile belirlenmiştir.

3.2.7. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

Araştırmamızda su örneklerinden izole edilen mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-2012) kurallarına uygun olarak disk difüzyon testi ile tespit edilmiştir.

İnokulum süspansiyonu hazırlamak üzere bakterinin seçici olmayan besiyerindeki 16-24 saatlik taze kültürü kullanıldı. Bakterinin benzer morfoloji gösteren kolonilerinden birkaç tanesi steril öze yardımıyla alınarak ve steril tuzlu su (%0,9 NaCl) içinde süspanse edildi. Süspansiyonun yoğunluğu, McFarland 0,5 standardı ile eşit olacak şekilde ayarlandı. Yoğunluk ölçümünde spektrofotometre cihazı kullanıldı. Steril pamuklu eküvyon çubuğu, inokulum süspansiyonu içine daldırıldı ve pamuktaki fazla

sıvı, çubuğun pamuklu kısmını tüp cidarına bastırıp döndürerek atıldı. Pamuktaki inokulum agar yüzeyinin her tarafına eşit olacak şekilde üç yönde çubuk yardımıyla yayıldı. Antibiyotik içeren diskler Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi uygulanarak 3 cm ara ile yerleştirildi. 35°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra diskler etrafında meydana gelen inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür. Antibiyotik duyarlılıkları; Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2012 kriterleri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (CLSI, 2012).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri, konsantrasyonları ve CLSI standartlarına göre duyarlılık kategorileri

Antimikrobik Madde	Sembol	Konsantrasyon	Disk difüzyon yöntemi (CLSI)		
			Zon çapı (mm)		
			Duyarlı	Orta	Dirençli
Amikasin	AK	30 mcg	≥17	15-16	≤14
Sefepim	FEP	30 mcg	≥18	15-17	≤14
Seftazidim	CAZ	30 mcg	≥18	15-17	≤14
Siprofloksasin	CIP	5 mcg	≥31	21-30	≤20
Imipenem	IPM	10 mcg	≥19	16-18	≤15
Tetrasiklin	TE	30 mcg	≥15	12-14	≤11
Tikarsilin	TIC	75 mcg	≥20	15-19	≤14
Tobramisin	TOB	10 mcg	≥15	13-14	≤12

3.2.8. İzolatların Moleküler Olarak Tanımlanması

Araştırmada izole edilen bakteri izolatlarını moleküler olarak da tanımlanmak amacıyla koloni PZR uygulandı. Koloni PZR’de çoğaltılan 16S rRNA’nın V4 bölgesi için universal primerler (515F-Y ve 806R-B) kullanılmıştır. Belirtilen şartlarda negatif kontrol ile beraber kurularak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonrasında çoğaltılan DNA’ların uygun bant boyu verdiği agaroz jel elektroforezinde tespit edilmiştir. PZR’den çıkarılan tüpler -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Reaksiyonun (Master mix’in) Hazırlanması

PZR’ı yapılacak her bir örnek için son hacim 50 µl olacak şekilde PZR ortamı hazırlanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.2. PZR karışım protokolü

PZR İçeriği	Miktarı (µl)
Steril distile su	34,25 µL
10X PZR buffer	5 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Forward Primer	0,25 µL
Reverse Primer	0,25 µL
MgCl ₂ (25 µM)	4 µL
Taq Polimeraz	0,25 µL
Template	1 koloni
Toplam	50 µl

PZR işlemi için termal döngü cihazında gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda uygun döngü koşulları saptanmış ve PZR ortamı kurulmuştur (Çizelge 3.3).

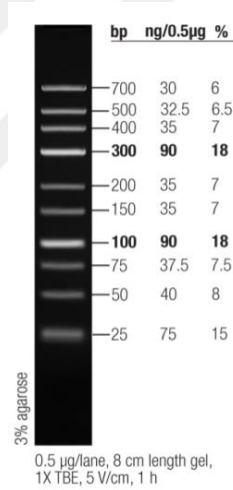
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler ve PZR protokolleri

Hedef Bölge	V4
Primer Çiftleri	515f-Y & 806 R-B
Primer Dizileri	F: GTGYCAGCMGCCGCGGTAA R: GGACTACNVGGGTWTCTAAT
Çoğaltılan Kısım	~ 250 Baz Çifti
PZR Protokolü	94°C de 3 dk ilk denatürasyon -----1x 94°C de 45 sn denatürasyon 50°C de 60 sn bağlanma 72°C de 90 sn uzama -----35x 72°C de 10 dk son uzama -----1x 4°C de bekleme

İzolatların Agaroz Jelde Elektrofrez

PCR ürünlerinin elektrofrez, %3'lük agaroz jelde uygulanmıştır. Bunun için 1,5 g agaroz hassas terazide tartıldı. Üzerine 50 mL 0,5X TBE çözeltisi eklendi. Mikrodalga fırın kullanılarak kaynatıldı. Agarozun homojen bir şekilde erimesinden ve sıcaklık 60°C' ye düştükten sonra 3 µl etidyum bromür eklendi. Elektrofrez jel tankı hazırlanarak içerisine kuyucuk oluşturmak üzere taraklar yerleştirilmiştir. Halen sıvı halde olan karışım, jel tankının içine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde

döküldükten sonra jel katılaşana kadar (30 dk-1 saat arası) beklenmiştir. Daha sonra katılaşan jelden taraklar dikkatlice çıkarılmıştır. Hazırlanmış olan jel elektroforez tankına yerleştirilip tankın içerisine 0,5X TBE tamponu jelin üzerini 1-2 mm geçecek şekilde eklenmiştir. -20°C'den çıkartılan PZR örneklerinden 3 µL alınarak temiz bir parafilm üzerinde 1 µL boya çözeltisi (6x Loading Dye Solution) ile karıştırılmış ve mikropipet aracılığı ile jel kuyucuklarına yüklenmiştir. DNA'nın büyüklüğünü belirlemek amacıyla jelin bir kuyucuğuna da 4 µL marker (Gene Ruler 25 bp DNA Ladder) yüklenmiştir. Gene Ruler 25 bp DNA Laddera ait cetvel Şekil 3,5'te verilmiştir. Yükleme işlemi bittikten sonra tank kapatılarak güç kaynağına bağlanmıştır. Elektroforez, 90 voltta da 60 dakika süre ile yapılmıştır. 1 saatlik elektroforez zamanının ardından jel elektroforez tankından dikkatlice alınarak bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki uygun odacığa yerleştirilerek ultraviyole ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirilmiştir.



Şekil 3.5. 25 bp DNA Ladder'a ait cetvel (Thermo Scientific)

16S rDNA'nın baz sırasının belirlenmesi ve BLAST Tarama

BLAST (Basic Alingment Search Tool), aranan dizi sırasını (nükleotid) veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizileri ile karşılaştırarak aynı veya en yakın olan dizi sırasının ait olduğu mikroorganizmayı, % yaklaşımla veren bir bilgisayar programıdır. BLAST, moleküler biyoloji ile bilgileri bir kaynakta toplamayı ve genom verilerinin bilgisayar ortamında analiz edilmesi için bilgisayar programları geliştirmeyi amaçlayarak, 1988 yılında kurulan National Center for Biotechnological Information adlı kuruluş tarafından geliştirilmiş bir veri tabanıdır. Baz sırası belirlendikten sonra, bu

sıra (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) adlı internet sayfasında bulunan program kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. Tarama sonucu, aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceği, benzerlik yüzdesi ile birlikte belirlenmiştir.

3.2.9. Bakterilerin Stoklanması

Bakterilerin çalışmalar sırasında ve sonrasında bozulmadan uzun süre saklanması amacıyla yapılan bu uygulama şu şekilde yapılmıştır: saklanacak kültürler LB broth besiyerinde 37°C’de etüvde 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Bakterilerin stoklanacağı eppendorf tüplerin içerisine 0,3 mL gliserol konularak, 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 mL alınarak gliserol içeren steril eppendorflara aktararak -80°C’de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışma kesitsel tipte bir durum saptama çalışmasıdır. Araştırmamızda 20.04.2017-02.08.2017 tarihleri arasında bir devlet hastanesi hemodiyaliz ünitesi su sisteminden alınan suların mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır. Çalışmanın yapıldığı diyaliz ünitesinde su sistemlerinin dezenfeksiyonu 3 ayda bir yapılmaktadır. Su numunelerini alma tarihleri ve su sisteminin dezenfeksiyon yapıldığı tarihler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Su numunelerini alma tarihleri ve su sisteminin dezenfeksiyon tarihleri

Su Numunelerini Alma Tarihi	Su sisteminin Dezenfeksiyon Tarihi
20.04.2017	20.04.2017
22.04.2017	20.07.2017
27.05.2017	
28.06.2017	
02.08.2017	

Diyaliz kliniklerindeki su sistemlerinin performansını ve tedavi için kullanılan suyun kalitesini gözlemleyebilmek için 3 noktadan su numuneleri alınarak mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır. Su numunelerinin alındığı noktalar ve gerekçeleri aşağıda verilmiştir.

1. Ham su giriş noktası; şehir şebeke suyunda kontaminasyon varlığını araştırmak için su örneği alınmıştır.
2. RO su sistemi çıkış noktası; RO membranlarının performansını ölçmek ve diyaliz için uygun kalitede suyun üretilip üretilmediğini anlamak için su örneği alınmıştır.
3. Karbon filtre çıkış noktası; bakteri üremesi için elverişli bir ortam olan karbon filtrelerde bir kontaminasyon ya da biyofilm oluşumunun varlığını anlayabilmek için su örneği alınmıştır.

4.1. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Tanılamaları

Çalışmamızda alınan su örneklerinde mikroorganizma izolasyonunda membran filtrasyon yönteminden yararlanılmıştır. Membran filtrasyon yöntemi ve seçici

besiyerleri kullanılarak; toplam mezofilik aerobik bakteri, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* ve *Candida* izolasyonları olmak üzere toplam yedi parametre çalışılmıştır. Belirlenen 3 noktadan alınan su örnekleri vakumlu filtrasyon cihazı yardımı ile 0,22 µm por çapında membran filtreden geçirilerek süzölmüştür. Daha sonra elde edilen filtreler seçici besiyerlerinin her birine paralel olmak üzere uygulanmıştır. Uygun inkübasyon süresi sonunda besiyerleri değerlendirilmiştir. Ek 4'te her üç noktadan alınan su örneklerinin seçici besiyerlerinde üreme görünümleri, koloni çeşitliliği, koloni morfolojileri, renk, koku, pigmentasyonu, gram reaksiyonları, katalaz, oksidaz test sonuçları verilmiştir. Bu çalışmanın sonunda seçici besiyerlerinde morfolojik özellikleri ve biyokimyasal test sonuçları farklı görölen 29 izolatan antibiyotik duyarlılığı, API 20NE hızlı tanılama test kiti reaksiyonları ve 16S rRNA gen bölgesi DNA dizi analizi incelenmiştir.

Şehir şebeke suyu çıkış noktasında 28.06.2017 ve 02.08.2017 tarihlerinde alınan su örneklerinin ekim sonrasında seçici besiyerlerinin bazılarında (PCA, Levin EMB ve SDA) üreme olmuştur (Ek 4). Besiyerlerinde morfolojik olarak farklı görölen koloniler için tanımlama testleri yapılmıştır. Buna göre toplam 6 farklı koloni izole edilmiştir. Bu izolatlara ait biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çalışma boyunca karbon filtre çıkış noktasından alınan su örneklerinin ekimlerinde PCA, *Pseudomonas* CFN/CN, Levin EMB, SDA ve SS Agar seçici besiyerlerinde üreme olmuştur (Ek 4). Besiyerlerinde morfolojik olarak farklı görölen koloniler için tanımlama testleri yapılmıştır. Buna göre 10 farklı koloni izole edilmiştir. Bu izolatlara ait bilgiler Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Revers ozmoz çıkış noktasından 27.05.2017 ve 28.06.2017 tarihlerinde alınan su örneklerinin ekimi sonrasında PCA, *Pseudomonas* CFN/CN, Levin EMB, SDA besiyerlerinde üreme olmuştur (Ek 4). Tanılama testleri sonucunda 13 farklı bakteri tespit edilerek izole edilmiştir. Bu izolatlara ait bilgiler Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Şehir şebeke suyu çıkış noktasından alınan su örneklerinde üreme sonuçları

Sıra	İzolot No	Örnek Alma Tarihi	Besiyeri Adı	Oksidaz	Katalaz	Gram Boyama
1	41	28.06.2017	Plate Count Agar	Pozitif	Pozitif	Gram pozitif basil
2	42	28.06.2017	Plate Count Agar	Negatif	Pozitif	Gram pozitif basil
3	43	28.06.2017	Sabouraud %2 Dextrose Agar	Negatif	Pozitif	Gram pozitif basil
4	45	28.06.2017	Levin EMB	Pozitif	Pozitif	Gram negatif basil
5	71	02.08.2017	Sabouraud %2 Dextrose Agar	Negatif	Pozitif	Gram pozitif basil
6	77	02.08.2017	Sabouraud %2 Dextrose Agar	Negatif	Pozitif	Gram pozitif basil

Çizelge 4.3. Karbon filtre çıkış noktasından alınan su örneklerinde üreme sonuçları

Sıra	İzolot No	Örnek Alma Tarihi	Besiyeri Adı	Oksidaz	Katalaz	Gram Boyama
1	26	20.04.2017	Levin EMB	Negatif	Pozitif	Gram negatif basil
2	37	20.04.2017	Sabouraud %2 Dextrose Agar	Pozitif	Pozitif	Gram negatif basil
3	38	20.04.2017	Sabouraud %2 Dextrose Agar	Negatif	Pozitif	Gram negatif basil
4	39	20.04.2017	Levin EMB	Negatif	Pozitif	Gram negatif basil
5	15	22.04.2017	Pseudomonas CFN/CN	Pozitif	Pozitif	Gram negatif basil
6	20	22.04.2017	Levin EMB	Pozitif	Pozitif	Gram negatif basil
7	21	22.04.2017	Sabouraud %2 Dextrose Agar	Negatif	Pozitif	Gram negatif basil
8	8	27.05.2017	Levin EMB	Negatif	Pozitif	Gram negatif basil
9	9	27.05.2017	Levin EMB	Pozitif	Pozitif	Gram negatif basil
10	23	27.05.2017	Plate Count Agar	Negatif	Pozitif	Gram negatif basil

Çizelge 4.4. Revers ozmoz çıkış noktasından alınan su örneklerinde üreme sonuçları

Sıra	İzolasyon No	Örnek Alma Tarihi	Besiyeri Adı	Oksidaz	Katalaz	Gram Boyama
1	3	27.05.2017	Sabouraud %2 Dextrose Agar	Pozitif	Pozitif	Gram negatif basil
2	4	27.05.2017	Sabouraud %2 Dextrose Agar	Pozitif	Pozitif	Gram pozitif basil
3	5	27.05.2017	Pseudomonas CFN/CN	Negatif	Pozitif	Gram pozitif basil
4	6	27.05.2017	Plate Count Agar	Negatif	Pozitif	Gram pozitif basil
5	11	27.05.2017	Levin EMB	Pozitif	Pozitif	Gram negatif basil
6	12	27.05.2017	Levin EMB	Negatif	Pozitif	Gram pozitif basil
7	62	27.05.2017	Sabouraud %2 Dextrose Agar	Pozitif	Negatif	Gram negatif basil
8	63	28.06.2017	Plate Count Agar	Pozitif	Negatif	Gram negatif basil
9	64	28.06.2017	Plate Count Agar	Negatif	Pozitif	Gram pozitif basil
10	65	28.06.2017	Levin EMB	Pozitif	Negatif	Gram negatif basil
11	66	28.06.2017	Levin EMB	Negatif	Pozitif	Gram pozitif basil
12	67	28.06.2017	Pseudomonas CFN/CN	Pozitif	Pozitif	Gram pozitif basil
13	68	28.06.2017	Sabouraud %2 Dextrose Agar	Pozitif	Pozitif	Gram pozitif basil

4.2. Hızlı Test Kitleri ile yapılan Tanımlama Sonuçları

Araştırmamızda seçici besiyerlerinden izole edilen ve gram negatif basil olduğu tespit edilen izolatlar API 20NE test kiti kullanılarak muhtemel tanımlamaları yapılmıştır. İncelenen izolatlar *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas Maltophilia*, *Bosea massiliensis* ve *Wautersia paucula* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.5). API 20NE test kitleri ile muhtemel tanımlamaları yapılan izolatlara ait sonuç panel görüntüleri Ek 5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. İzolatların API 20NE test sonuçları

İzolat No	Örnek Alma Tarihi	Besiyeri Adı	API 20NE İdentifikasyon Sonucu	İdentifikasyon (%)
14	20.04.2017	Pseudomonas CFN/CN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
19	20.04.2017	SS Agar	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
24	20.04.2017	Levin EMB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
26	20.04.2017	Levin EMB	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	%99,9
35	20.04.2017	PCA Besiyeri	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
36	20.04.2017	SDA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
20	20.04.2017	SDA	<i>Bosea massiliensis</i>	%99
38	20.04.2017	SDA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	%99,9
37	22.04.2017	SDA	<i>Bosea massiliensis</i>	%99
15	22.04.2017	Pseudomonas CFN/CN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
16	22.04.2017	SS Agar	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
17	22.04.2017	PCA Besiyeri	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
21	22.04.2017	SDA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	%90,8
40	22.04.2017	Levin EMB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
1	27.05.2017	Pseudomonas CFN/CN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
8	27.05.2017	Levin EMB	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	%99,9
3	27.05.2017	SDA	<i>Wautersia paucula</i>	%99,6
29	27.05.2017	PCA Besiyeri	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%99,9
11	27.05.2017	Levin EMB	<i>Wautersia paucula</i>	%99,6

4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmamızda elde edilen izolatlardan üreme görünümü ve biyokimyasal test sonuçları farklı izlenen izolatların antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları Çizelge 4.6’da verilmiştir. Elde edilen zon çaplarına göre suşların antibiyotiklere karşı duyarlılık ve dirençlilik durumları Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. İzole Edilen Suşların Antibiyotiklere Karşı Gösterdikleri İnhibisyon Zon Çapları (mm)

ANTİBİYOTİK									
Örnek Alma Noktası	İzolat No	Tobramisin (TOB) 10 mcg	Tikarsilin (TIC) 75 mcg	Seftazidim (CAZ) 30 mcg	Sefepim (FEP) 30 mcg	Siprofloksasin (CIP) 5 mcg	Amikasin (AK) 30 mcg	İmipenem (IMP) 10 mcg	Tetrasiklin (TE) 30 mcg
RO çıkış noktasından elde edilen izolatlar	3	23	>40	28	>40	32	20	>40	32
	4	22	28	20	23	28	23	35	21
	5	17	-	-	-	34	28	24	24
	6	18	-	-	-	32	22	27	26
	11	25	>40	30	>40	37	17	>40	30
	65	24	>40	24	>40	32	18	25	34
	66	-	-	-	-	-	-	-	-
Karbon filtre çıkış noktasından elde edilen izolatlar	9	22	23	25	27	33	22	23	15
	23	15	23	25	20	24	15	-	25
	37	-	>40	22	32	35	-	>40	32
	39	13	25	28	22	36	15	-	30
Şehir şebeke suyundan elde edilen izolatlar	41	27	-	-	-	10	23	25	-
	43	25	-	-	-	12	20	24	-
	45	28	8	-	-	-	-	-	-
	71	25	26	24	25	30	25	35	22
	77	22	16	-	-	28	27	32	18

(-): Antibiyotik disk etrafında inhibisyon zonu yoktur.

Çizelge 4.7. Suşların inhibisyon zon çaplarına göre antibiyotiklere olan dirençlilik ve duyarlılıkları

ANTİBİYOTİK									
Örnek Alma Noktası	İzolat No	Tobramisin (TOB) 10 mcg	Tikarsilin (TIC) 75 mcg	Seftazidim (CAZ) 30 mcg	Sefepim (FEP) 30 mcg	Siprofloksasin (CIP) 5 mcg	Amikasin (AK) 30 mcg	Imipenem (IMP) 10 mcg	Tetrasiklin (TE) 30 mcg
RO çıkış noktasından elde edilen izolatlar	3	S	S	S	S	S	S	S	S
	4	S	S	I	S	S	S	S	S
	5	S	R	R	R	S	S	S	S
	6	S	R	R	R	S	S	S	S
	11	S	S	S	S	S	S	S	S
	65	S	S	S	S	S	S	S	S
	66	R	R	R	R	R	R	R	S
Karbon filtre çıkış noktasından elde edilen izolatlar	9	S	I	S	S	S	S	S	S
	23	S	I	S	S	S	S	R	S
	37	R	S	S	S	S	R	S	S
	39	I	S	S	S	S	S	R	S
Şehir şebeke suyundan elde edilen izolatlar	41	S	R	R	R	R	S	S	R
	43	S	R	R	R	R	S	S	R
	45	S	R	R	R	R	R	R	R
	71	S	S	S	S	S	S	S	S
	77	S	I	R	R	S	S	S	S

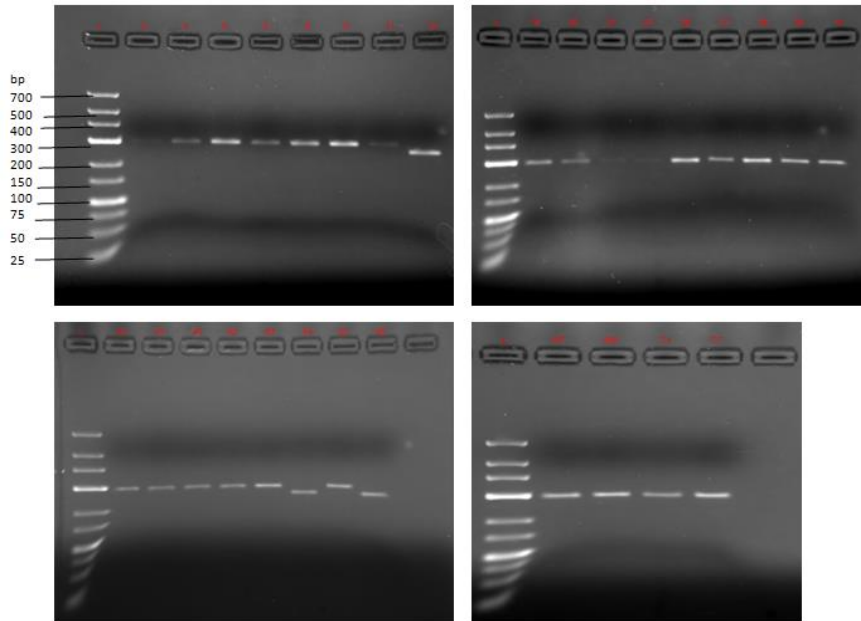
(R): Dirençli, (I): Orta derecede duyarlı, (S): Duyarlı

Çizelge 4.7’ de görüldüğü gibi RO çıkış noktasından elde edilen izolatlardan 3, 4, 11 ve 65 numaralı izolatların antibiyotik dirençlilikleri gözlenmezken 5 ve 6 numaralı izolatların üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere ve tikarsiline dirençli olduğu görülmüştür. 66 numaralı izolat ise sadece tetrasikline duyarlı iken diğer antibiyotiklere dirençlidir. Karbon filtre çıkış noktasında elde edilen 4 farklı izolatın ise imipenem, amikasin ve tobramisine dirençli oldukları gözlenmiştir. Şehir şebeke suyundan elde edilen izolatlardan 41 ve 43 numaralı izolatlarda benzer antibiyogram özellikleri görülmüştür. Bu izolatlar tikarsilin, tetrasiklin, sefepim, seftazidim ve siprofloksasine

dirençlidirler. 45 numaralı izolat sadece tobramisine karşı duyarlı iken kullanılan diğer antibiyotiklere dirençli olduğu görülmüştür. 71 numaralı izolat kullanılan antibiyotiklerin hepsine duyarlı, 77 numaralı izolat ise 3. ve 4. kuşak sefalosporinlere dirençlidir.

4.4. İzolatların Moleküler Tanımlanmaları

Çalışmamızdan morfolojik olarak farklı olduğunu belirlediğimiz 29 izolatin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amacıyla koloni PZR yapılmıştır. Öncelikle her bir izolat için Nutrient Agar besiyerine ekimi yapılan 24 saatlik taze, saf bakteri kültürü elde edilmiştir. Taze besiyeri içinden doğrudan alınan koloniler PZR ortamına konularak koloni PZR tekniği kullanılmıştır. Uygun universal primerler (515F ve 806R) kullanılarak 16S rRNA'ya ait V4 değişken bölgesinde bulunan DNA parçası amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonunda koloni PZR'nin doğruluğunu göstermek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Koloni PZR'de elde edilen ürünlere ait bantların agaroz jeldeki görüntüleri izolatlara verilen numaralara göre Şekil 4.1'de verilmiştir. Görüntülerden de anlaşılacağı gibi koloni PZR işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve jelde, çoğaltılan DNA örneklerinin görüntüleri rahatlıkla gözlenebilmektedir. Agaroz jelde kullanılan 25 bp DNA ladder'a göre değerlendirildiğinde DNA boyutlarının yaklaşık 300 bp olduğu izlenmiştir.



Şekil 4.1. Koloni PZR sonrası izolatlara ait agaroz jel elektroforezinde bant görüntüsü (izolatlara verilen numara sırasına göre jele yükleme yapılmıştır)

Amplifike olmuş ürünler sekanslama sonrasında Bioedit programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Bioedit programı internet ortamında bulunan Gen Bankası'nın <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> web sayfasında, nükleotid dizilerinin kıyaslanarak benzerliklerin icelenmesi ile yapılmıştır. Her bir izolata ait sekans dizisi ve Gen Bankası'ndan elde edilen sonuçlar sırasıyla verilmiştir.

İontek firmasına gönderilen ürünler yaklaşık 250 bp uzunluktadır. Bu uzunlukta ürünün 1 primer seti (forward ve reverse) kullanılarak okunması durumunda yöntem kaynaklı olarak arada okunmamış bölgeler oluşmaktadır. Reverse primerle elde edilen sekansın bir kısmının forward primer ile okunan sekansla eşleştirilmesi çalışmanın güvenilirliği açısından çok önemlidir. Bu nedenle PZR ürününün mümkün olan en uzun sekans dizisinin elde edilmesi amacı ile dizi analizleri iki farklı primer (515Fve 806R) kullanılarak yaptırılmıştır. İontek firması tarafından deneme sonuçları internet aracılığı ile gönderilmiştir. Gönderilen sekans sonuçları sekans cihazından çıkan ve herhangi bir işleme uğramamış verileri içermektedir. Her izolat için 2 primer tarafından belirlenen iki sonuç gönderilmiştir. Bioedit programında bu 2 farklı sonuç birleştirilerek her strain için tek bir sekans dizisi oluşturulmuştur. Bu işlem yapılırken aynı zamanda primerlerin ortak belirlediği sekanslar da eşleştirilerek kontrolü sağlanmıştır. Sekans sonuçlarının başında verilen kod numaraları çalışmamızda elde ettiğimiz sekans dizilerinin birleştirilmesi işlemi sırasında çıkan bizim sekansımızla en yüksek benzerliğe sahip Gen Bankasına kayıtlı olan sekansın accession (kayıt) numarasıdır. Sekans dizilerindeki "N" harfi o noktadaki bazın okunmadığını göstermektedir ve bu kullanılan cihazdan kaynaklanan bir durumdur. İzolatlara ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonuçları Şekil 4.2-4.9'da verilmiştir. İzolat 12, 64 ve 66 blast analizinde ise anlamlı bir sonuç çıkmamıştır.

Mycobacterium abscessus 16S ribosomal RNA, partial sequence
 Sequence ID: [NR_074427.1](#) Length: 1504 Number of Matches: 2

Range 1: 518 to 951 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
769 bits(416)	0.0	429/435(99%)	2/435(0%)	Plus/Plus
Query 13	GTCACGGAATTACTGGGCGT-AAGAGCTCGTAGGTGGTTTTGTCGCGTTGTTTCGTGAAAAAC			71
Sbjct 518	GTC-CGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTTGTCGCGTTGTTTCGTGAAAAAC			576
Query 72	TCACAGCTTAACTGTGGGCGTGCGGGGATACGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGAC			131
Sbjct 577	TCACAGCTTAACTGTGGGCGTGCGGGGATACGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGAC			636
Query 132	TGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGG			191
Sbjct 637	TGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGG			696
Query 192	CGGGTCTCTGGGCGAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAG			251
Sbjct 697	CGGGTCTCTGGGCGAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAG			756
Query 252	AAACCCCTGTAGTCAACGCCGTAACCGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCTTCTTTGGGA			311
Sbjct 757	ATACCCCTGTAGTCAACGCCGTAACCGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCTTCTTTGGGA			816
Query 312	TCCGTGCCGTAGTAAACGCATTAAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAA			371
Sbjct 817	TCCGTGCCGTAGTAAACGCATTAAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAA			876
Query 372	ATCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAA			431
Sbjct 877	CTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAA			936
Query 432	CGCGAAGAACCCTTAC 446			
Sbjct 937	CGCGAAGAACCCTTAC 951			

Şekil 4.2. İzolat 41, 42 ve 43'e ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin blast sonucu

İzolat 41, 42 ve 43 sırası ile %99, %98, %99 oranında *Mycobacterium abscessus* NR074427.1 accession numaralı straini ile benzerlik gösterdiği için bu üç izolat *Mycobacterium abscessus* olarak isimlendirilmiştir.

Sphingomonas paucimobilis strain DSM 30198 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [NR_104893.1](#) Length: 1462 Number of Matches: 2

Range 1: 431 to 684 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
429 bits(232)	7e-120	247/254(97%)	1/254(0%)	Plus/Minus
Query 284	TTTCG-ACATCAGCGTCAGTACCAGTCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCG			342
Sbjct 684	TTTCGCACCTCAGCGTCAATACCAGTCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCG			625
Query 343	AATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACCTCACCTCTCTGGATTCAAGCG			402
Sbjct 624	AATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACCTGACCTCTCTGGATTCAAGCG			565
Query 403	ATGCAGTCTCAAAGGCAGTTCTGGAGTTGAGCTCCAGGCTTTACCTCTGACTTACAAAG			462
Sbjct 564	ATGCAGTCTCAAAGGCAGTTCTGGAGTTGAGCTCCAGGCTTTACCTCTGACTTACAAAG			505
Query 463	CCGCCACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCGAAACAACGCTAGCTCCCTCCGTATTACC			522
Sbjct 504	CCGCCACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCGAAACAACGCTAGCTCCCTCCGTATTACC			445
Query 523	GCGGCTGCTGACAC 536			
Sbjct 444	GCGGCTGCTGACAC 431			

Şekil 4.3. İzolat 45'e ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin blast sonucu

İzolat 45, %97 oranında NR104893.1 accession numaralı *Sphingomonas paucimobilis* strain DSM 30198 ile benzerlik gösterdiği için, *Sphingomonas paucimobilis* olarak tanımlanmıştır.

Bacillus nakamurai strain NRRL B-41091 16S ribosomal RNA, partial sequence
Sequence ID: [NR_151897.1](#) Length: 1508 Number of Matches: 1

Range 1: 516 to 767 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
285 bits(154)	9e-77	223/256(87%)	6/256(2%)	Plus/Minus
Query 35	TTCGC-GCTTAGCGTCAGTTACGGACCACAAAGCTGCATTTTCGACATTGGTGTTCCTCCA			93
Sbjct 767	TTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGC-CTTCGCCACTGGTGTTCCTCCA			709
Query 94	CATCTCTACGCATTTTACAGCTACGGGTGGAATTCACATCTTCTCATCAGCACTCAAGT			153
Sbjct 708	CATCTCTACGCATTTTACCGCTACAGGTGGAATTCAC-TCTCTCTTCTGCACCTCAAGT			650
Query 154	TCCCCAGTTTCCAATGACCATCCACGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTAAAGAA			213
Sbjct 649	TCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAA			590
Query 214	ACGGCCTGCCAGCCTTTTACGCCAATAATTTCGGGAAAACGCTTACCACCAACGTGATT			273
Sbjct 589	ACCGCCTGCCAGCCTTTTACGCCAATAATTC-CGGACAACGCTTGCACCTACGT-ATT			532
Query 274	G-CGCGGCCGCTGACA	288		
Sbjct 531	ACCGCGGCTGCTGGCA	516		

Şekil 4.4. İzolat 4, 68 ve 71'e ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin blast sonucu

İzolat 4, 68 ve 71 sırası ile %98, %100, %87 oranında NR151897.1 accession numaralı *Bacillus nakamurai* strain NRRL B-41091 ile benzerlik gösterdiği için, *Bacillus nakamurai* olarak tanımlanmıştır.

Bacillus wiedmannii strain FSL W8-0169 16S ribosomal RNA, partial sequence
Sequence ID: [NR_152692.1](#) Length: 1540 Number of Matches: 2

Range 1: 548 to 799 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
435 bits(235)	2e-121	248/254(98%)	3/254(1%)	Plus/Plus
Query 280	AAGCGTTATTCCGGAA-TATTGGGGCGTAAAGCGCGCANGTAGGTTCTTAAGTCTGAT			338
Sbjct 548	AAGCGTTA-TCCGGAATTATT-GGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAAGTCTGAT			605
Query 339	GTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAACGGGAGACTTGAGTGCAGAA			398
Sbjct 606	GTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAACGGGAGACTTGAGTGCAGAA			665
Query 399	GAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCACT			458
Sbjct 666	GAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCACT			725
Query 459	GGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAC			518
Sbjct 726	GGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAC			785
Query 519	AGGATTAGATACCC	532		
Sbjct 786	AGGATTAGATACCC	799		

Şekil 4.5. İzolat 5, 6, 67 ve 77'ye ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin blast sonucu

İzolat 5, 6, 67 ve 77 sırası ile %99, %99, %97, %98 oranında NR152692.1 accession numaralı *Bacillus wiedmannii* strain FSL W8-0169 ile benzerlik gösterdiği için, *Bacillus wiedmannii* olarak tanımlanmıştır.

Stenotrophomonas maltophilia strain ATCC 13637 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [NR_112030.1](#) Length: 1467 Number of Matches: 1

Range 1: 488 to 744 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
448 bits(242)	1e-125	253/258(98%)	1/258(0%)	Plus/Minus
Query 11	CGCATTTTCGTGCATCAGTGT	CAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCC	70	
Sbjct 744	CGC-TTTCGTGCCATCAGTGT	CAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCC	686	
Query 71	TCCTGATCTCTACGCATTTT	CAGTGTGCCATGGATGTTCCAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCC	130	
Sbjct 685	TCCTGATCTCTACGCATTTT	CAGTGTGCCATGGATGTTCCAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCC	626	
Query 131	AGTCGTCCAGTTCCTCACTG	CAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCCAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCC	190	
Sbjct 625	AGTCGTCCAGTTCCTCACTG	CAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCCAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCC	566	
Query 191	ACGACCACCTACGCACGCTT	TACGCCATGGATGTTCCAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCCAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCC	250	
Sbjct 565	ACGACCACCTACGCACGCTT	TACGCCATGGATGTTCCAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCCAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCC	506	
Query 251	TACCGCGGCTGCTGACAC	268		
Sbjct 505	TACCGCGGCTGCTGGCAC	488		

Şekil 4.6. İzolat 8, 21, 23, 26, 38 ve 39'a ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin blast sonucu

İzolat 8, 21, 23, 26, 38 ve 39 sırası ile %90, %98, %99, %98, %92, %96 oranında *Stenotrophomonas maltophilia* strain ATCC 13637 benzerlik gösterdiği için bu altı izolat *Stenotrophomonas maltophilia* olarak isimlendirilmiştir.

Bosea massiliensis strain 63287 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [NR_025118.1](#) Length: 1431 Number of Matches: 2

Range 1: 489 to 916 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
505 bits(273)	2e-142	383/435(88%)	11/435(2%)	Plus/Plus
Query 12	GGAATCACTGTGGCGTATAGGGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTCGGGGGTGAAAGCCAG			71
Sbjct 489	GGAATCACTG-GGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGACTCTTAAGTCGGGGGTGAAAGCCAG			547
Query 72	GGCTCAACCCCTGGAATTGCCTTCGATACTGAGAGTCTTGAGTTCGGAAGAGGTTGGTGG			131
Sbjct 548	GGCTCAACCCCTGGAATTGCCTTCGATACTGAGAGTCTTGAGTTCGGAAGAGGTTGGTGG			607
Query 132	ACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGC			191
Sbjct 608	ACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGC			667
Query 192	CAACTGGTCCGATACTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGAAAC			251
Sbjct 668	CAACTGGTCCGATACTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAC			727
Query 252	CCTGGTAGTCCACTGGC-TAAACGATGCGT-CTTGATCTCGGGGGCCTTTTGAAGGCA			309
Sbjct 728	CCTGGTAGTCCAC-GCCGTAAACGATGAATGCCAGCGTTGGGGTGCA---TGCACCTCA			783
Query 310	GTATCGAAGCTACCCCGTTAAT--TTCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC			367
Sbjct 784	GTGGCGCAGCTAACGCTTAAAGCATTTCG-CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAC			841
Query 368	TCAAAGGATTTGAGGGGGGCCCGCCCAACGTTGGAGTAGGTGTTTTAATTCAATCCAAC			427
Sbjct 842	TCAAAGGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTTAATTGGAAGCAAC			901
Query 428	GCGAAGAACCCTTACC	442		
Sbjct 902	GCGCAGAACCCTTACC	916		

Şekil 4.7. İzolat 20 ve 37'ye ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin blast sonucu

İzolat 20 ve 37, sırası ile %98, %88 oranında NR025118.1 accession numaralı *Bosea massiliensis* strain 63287 ile benzerlik gösterdiği için, bu iki izolat *Bosea massiliensis* olarak tanımlanmıştır.

Cupriavidus necator strain N-1 16S ribosomal RNA, partial sequence
 Sequence ID: [NR_102851.1](#) Length: 1520 Number of Matches: 2

Range 1: 502 to 755 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
446 bits(241)	7e-125	250/254(98%)	1/254(0%)	Plus/Minus
Query 285	TTTCGTGATGAGCGTCAGTGACGTCCAGGGCG-TGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCA			343
Sbjct 755	TTTCGTGATGAGCGTCAGTGACGTCCAGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCA			696
Query 344	CATCTCTACGCAATTTCACTGCTACACGTGGAATTTACCCCTCTGACATACTCTAGCC			403
Sbjct 695	CATCTCTACGCAATTTCACTGCTACACGTGGAATTTACCCCTCTGACATACTCTAGCC			636
Query 404	TTGCAGTCACAAGCGCCATTTCCCAAGTTGAGCTCGGGGATTTACGCTGTCTTACAAAA			463
Sbjct 635	TTGCAGTCACAAGCGCCATTTCCCAAGTTGAGCTCGGGGATTTACGCTGTCTTACAAAA			576
Query 464	CCGCTTGCACAGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTCGCACCCCTACGATTACC			523
Sbjct 575	CCGCTTGCACAGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTCGCACCCCTACGATTACC			516
Query 524	GCGCTGTGACAC	537		
Sbjct 515	GCGCTGTGGAC	502		

Şekil 4.8. İzolat 3, 11, 62, 63 ve 65'e ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin blast sonucu

İzolat 3,11, 62, 63 ve 65 sırası ile %98, %96, %99, %98, %98 oranında NR102851.1 accession numaralı *Cupriavidus necator* strain N-1 ile benzerlik gösterdiği için, bu izolatlar *Cupriavidus necator* olarak tanımlanmıştır.

Pseudomonas aeruginosa strain DSM 50071 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [NR_117678.1](#) Length: 1527 Number of Matches: 2

Range 1: 511 to 753 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
431 bits(233)	2e-120	240/243(99%)	1/243(0%)	Plus/Minus
Query 295	TTTCGACCCTCAGTG-CAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCC			353
Sbjct 753	TTTCGACCCTCAGTGTCAAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCC			694
Query 354	TATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCT			413
Sbjct 693	TATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCT			634
Query 414	CAGTAGTTTTGGATGCAGTCCCAGGTTGAGCCGGGGATTTACATCCAACCTTGCTGAA			473
Sbjct 633	CAGTAGTTTTGGATGCAGTCCCAGGTTGAGCCGGGGATTTACATCCAACCTTGCTGAA			574
Query 474	CCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACC			533
Sbjct 573	CCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACC			514
Query 534	GCG 536			
Sbjct 513	GCG 511			

Şekil 4.9. İzolat 9 ve 15'e ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin blast sonucu

İzolat 9 ve 15 %99 oranında NR117678.1 accession numaralı *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071 ile benzerlik gösterdiği için, bu izolatlar *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlanmıştır.

Hemodiyaliz ünitesi su sisteminden üç noktadan alınan su örneklerinde yapılan bakteriyolojik ve moleküler testler sonucunda 9 farklı etken (4 gram negatif ve 5 gram pozitif bakteri) tespit edilmiştir. Çizelge 4.8'de örnek alma noktaları, tarihleri ve etkenler verilmiştir.

Çizelge 4.8. Su sisteminde tespit edilen etkenler (Nisan-Ağustos)

Örnek Alma Tarihleri	Örnek Alma Noktaları	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Bacillus nakamurai</i>	<i>Bacillus wiedmannii</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Bosea massiliensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Diğer
20.04.2017	Ş.Ş.Suyu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KF Çıkış S.	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	RO Çıkış S.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22.04.2017	Ş.Ş.Suyu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KF Çıkış S.	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	RO Çıkış S.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27.05.2017	Ş.Ş.Suyu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KF Çıkış S.	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	RO Çıkış S.	-	-	+	+	+	-	-	-	+
28.06.2017	Ş.Ş.Suyu	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	KF Çıkış S.	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	RO Çıkış S.	-	-	+	+	+	-	-	-	+
02.08.2017	Ş.Ş.Suyu	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	KF Çıkış S.	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	RO Çıkış S.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ş.Ş.Suyu: Şehir şebeke suyu KF Çıkış S.: Karbon filtre çıkış suyu
RO Çıkış S.: Revers ozmoz çıkış suyu

Şehir şebeke suyu çıkış noktasından Haziran ve Ağustos aylarında alınan su numunelerinde *Mycobacterium abscessus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Bacillus wiedmannii*, ve *Bacillus nakamurai* etkenleri izole edilmiştir.

Karbon filtre çıkış noktasından çalışma boyunca alınan su numunelerinde yapılan bakteriyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda üç farklı gram negatif basil izole edilmiştir. API 20NE test kitinden alınan sonuçlara göre bu izolatlar *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Bosea massiliensis* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlar 16S rRNA sekans analizinde aldığımız sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Revers ozmoz çıkış noktasından alınan saf su örneklerinde ise; Mayıs ve Haziran aylarında bakteri üremeleri oldu tespit edilmiştir. Mikrobiyolojik incelemeler sonunda *Cupriavidus necator*, *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus nakamurai* ve gram pozitif bir basil

su arıtma sisteminde üretilen saf suda tespit edilmiştir. Haziran ve Ağustos aylarında şehir şebeke suyundan alınan örnekler ile karşılaştığımızda *Bacillus wiedmannii* ve *Bacillus nakamurai* etkenlerinin RO çıkış suyunda da tespit edilmiştir.

Revers ozmoz çıkış noktasından tespit edilen 3 ve 11 numaralı izolatlar API 20NE test kitinde gözlenen reaksiyon sonucunda *Wautersia paucula* (%99,6) olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlar 16S rRNA sekans analizinde ise > %97 *Cupriavidus necator* olduğu tespit edilmiştir.

Cupriavidus pauculus, ilk olarak 1999 yılında “Centers for Disease Control and Prevention (CDC)” tarafından *Ralstonia paucula* olarak, daha sonra da *Wautersia paucula* olarak isimlendirilmiş; Vandamme ve Coenye, bu bakterileri 2004 yılında *Cupriavidus* olarak sınıflandırmışlardır (Vandamme ve Coenye, 2004). Buna göre API 20NE test kiti ve 16S rRNA sekans sonucuna arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Su, hiç şüpesiz insan vücudunun ve yaşayan tüm organizmaların ana bileşenidir. Fakat suda bulunan çeşitli mikroorganizmalar insanlarda toksijenik ve parazitik süreçlere yol açan hastalıklara sebep olabilir (Gueguim, 2016). Suların mikrobiyolojik analizinde patojen mikroorganizmaların bulunmaması suların kullanıma uygun olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilir. Ancak, hastanelerde; bağışıklık sistemi zayıf veya baskılanmış hastaların bulunması ve bu hastaların fırsatçı enfeksiyonlara eğilimli olması dolayısı ile suların incelenmesinde patojen mikroorganizmalar dışında kalan mikroorganizmalar da dikkate alınmalıdır (Hapçioğlu ve ark., 2004).

Hemodiyaliz tedavisi son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarının sağlığını sürdürmesini sağlayan umut verici bir tedavi yöntemidir. Hemodiyaliz tedavisinde hasta kanındaki toksik maddeler difüzyon ile yarı geçirgen (semipermeable) membranın diğer tarafına taşınmaktadır. Standart bir hemodiyaliz hastası haftada üç gün dört saat boyunca merkezde bu tedaviyi alır. Hemodiyaliz tedavisinde gerekli olan diyaliz solüsyonunun hazırlamak için saf suya gereksinim vardır. Çünkü hemodiyaliz tedavisinin tek bir seansında bile hastalar yaklaşık 120 L suya maruz kalmaktadırlar. Dolayısı ile suda bulunan kirleticiler, mikroorganizmalar, kimyasal maddeleri vb. ile maruziyet oranları normal popülasyona göre çok daha yüksektir. Hemodiyaliz tedavisi sırasında diyalizat solüsyonunu hastanın kanından ayıran sadece yarı geçirgen bir zar (membran) olduğu için sudaki mikrobiyolojik veya kimyasal kirleticilerin varlığı potansiyel olarak olumsuz sonuçlara yol açmaktadır. Bu yüzden tüm hemodiyaliz merkezlerinde düzgün bir şekilde tasarlanmış ve bakımı yapılan bir su sistemi gereklidir (Upadhyay ve Jaber, 2016).

Çalışma yaptığımız hemodiyaliz ünitesi su arıtma sisteminin dezenfeksiyonu üç ayda bir kimyasal bir ajan ile (hidrojen peroksit) dezenfekte edilmektedir. Hidrojen peroksit, bakterisid, virüs, fungusid, tüberkülozid, mikobakterisid etkili yüksek düzeyde bir dezenfektandır. Su sisteminin dezenfeksiyonu RO cihazı ve saf suyu hemodiyaliz makinelerine gönderen su dağıtım borularını kapsamaktadır. Dezenfeksiyon işleminde üç saat boyunca dezenfektan madde su sisteminden sürekli olarak geçirilmekte ardından durulama yapılmaktadır. Su örneklerinin incelendiği dönemde su sisteminde yer alan karbon filtre, yumuşatıcı filtre ve RO membranlarının değişimleri yapılmamıştır. Ancak

su sisteminde bir tanesi giriş suyu noktasına yakın yerleştirilen ve diğer üçü karbon filtre ve RO cihazı arasında bulunan mikropartikül tutucu filtrelerin değişimleri sık aralıklarla yapılmıştır. Bu filtreler şehir şebeke suyunun kalitesine göre haftada bir ya da ayda bir kez değiştirilmiştir. Çalışma sonunda RO membranlarının kullanım süreleri dolduğu için bu membranlarda değiştirilmiştir.

Bizim çalışmamızda; şehir şebeke suyundan aldığımız numunelerde yapılan mikrobiyolojik analizde *Mycobacterium abscessus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Bacillus nakamurai* ve *Bacillus wiedmannii* izole edilmiştir. Şehir şebeke sularında yüksek oranda klorlamaya rağmen mikroorganizmaların üremesi dikkat çekici bir durum olarak gözlenmiştir. Bununla birlikte şehir şebeke sularında koliform bakterilerin gözlemlenmemesi su dağıtım sistemine kirliliği su karışmadığının bir göstergesidir. Suların dezenfeksiyonu için kullanılan klorun konsantrasyonu veya dezenfeksiyon aralıklarının değişik olması, su kaynaklarının farklı olması, suların içerdiği organik ve inorganik maddelerin değişkenliği suyun florasını etkileyen faktörlerdir. Hatta suların dezenfeksiyonuna rağmen mantar sporlarının yok edilemediği bildirilmektedir (Arvatidou ve ark., 1999).

Bacillus cinsi bakteriler doğada yaygın olarak bulunan, gram pozitif, aerop, endospor oluşturan ve katalaz pozitif bakterilerdir. Patojen kabul edilen *B. anthracis*, fırsatçı patojen olabilen *B. subtilis* ve gıda zehirlenmelerine neden olan *B. cereus* dışındaki türler insan ve hayvanlarda hastalık oluşturmadığı bilinmekte olup diğer türlerin bazıları insanların doğal florasında yer alabilmektedir (Sevim ve ark., 2006). *B. wiedmannii*, ilk defa 2016'da çiğ süt depolarından izole edilmiş ve *B. cereus*'un yeni bir suşu olarak tanımlanmıştır (Miller ve ark., 2016). *B. nakamurai*, 2016 'da topraktan izole edilen, triptik soya agarında koyu bir pigment üreten, yeni bir *Bacillus* türü olarak tanımlanmıştır (Dunlap ve ark., 2016).

Tüberküloz dışı mikobakteriler; su, toprak, besinler, toz ve aerosollerini içeren tüm doğal ekosistemlerde yaygın olarak bulunur ve çevresel kaynaklardan insana sindirim, inhalasyon ve inokülasyon yoluyla bulaşabilir. Atipik mikobakterilerin hemodiyaliz sıvılarında, farmasötik preparatlarda ve dezenfektan solüsyonlarında kontaminant olarak bulunabildiği bildirilmektedir.

Mycobacterium abscessus, toprak ve sularda bulunan, hastalarda çoğu zaman fırsatçıpatojen olabilen ve antimikrobiyal ilaç direnci nedeniyle tedavi edilmesi daha zor olan bir etkidir (Novosad, 2006).

Revers ozmoz çıkış noktasında Mayıs ve Haziran aylarında alınan su örneklerinde ise *Bacillus nakamurai*, *Bacillus wiedmannii*, *Cupriavidus necator* ve gram pozitif bir basil izole edilmiştir. Şehir şebeke suyu ile karşılaştırdığımız zaman *Bacillus nakamurai* ve *Bacillus wiedmannii* etkenlerinin her iki noktada görülmesi ayrıca RO çıkış noktasından alınan su örneklerinde bu etkenlerin besiyerlerinde daha yoğun üremeleri dikkat çekici bir durumdur. Su isteminde yer alan filtrelerin etkinliğinin düşmesi, RO cihazı membranlarının veriminin düşmesi, mikropartikültutucu filtrelerin değişimlerinde gerçekleşen kontaminasyonlar bu durumunun nedenleri olabilir. Soyulmaz'ın (2008) Türkiye'de 22 ilde toplam 24 diyaliz kliniğinde bir yıl süren çalışmasında; şehir şebeke suyu bakteri içeriği ile kıyaslandığında RO çıkış suyunda bakteri içeriği daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi ham suyun klor konsantrasyonunun çok daha yüksek olmasından dolayı sudaki mikrobiyolojik büyümenin baskılanmasına bağlanmıştır.

Karbon filtre çıkış noktasından çalışma boyunca alınan su örneklerinde yapılan bakteriyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda üç farklı gram negatif basil izole edilmiştir. API 20NE test kitinden alınan sonuçlara ve 16S rRNA sekans analizine göre bu izolatlar; *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Bosea massiliensis* olarak tanımlanmıştır. Su sistemlerinde bulunan karbon filtrelerin bakteri üremesi için elverişli bir ortam olduğu düşünüldüğünde bu filtrede biyofilm oluşumunun varlığı akla gelmektedir. Ayrıca karbon filtrenin değiştirilme tarihinin uzaması da bu düşünceyi desteklemektedir.

Pseudomonas aeruginosa, çevre kaynaklı bir mikroorganizma olup suda, toprakta ve bitkilerde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmakta olup genellikle çoklu antibiyotik direnci gösterebildiğinden tedavilerde sorunlara neden olabilmektedir. *Pseudomonas* cinsi bakteriler su dağıtım sistemlerinde biyofilm oluşturarak klora karşı direnç gösteren bakteriler olarak bilinmektedir. *P. aeruginosa* su sistemlerinde veya suyla ilgili her ortamda genellikle biyofilm içerisinde gömülü mikrokoloniler halinde üreme eğilimi göstermektedir (Hapçioğlu ve ark., 2004; Mataracı ve gerçeker, 2011).

Stenotrophomonas maltophilia doğada yaygın olarak bulunan aerobik, non-fermentatif, gram negatif basildir. *S. maltophilia*; su, toprak, bitkisel ve hayvansal kaynaklar gibi doğal ortamlar ile hastane ortamlarında yaygın olarak bulunan, özellikle hastanede yatan hastalarda karşımıza çıkan ve çoklu ilaç direnci gösteren bir fırsatçı patojendir (Tekin ve ark., 2014). Bu bakteri, birçok antibiyotiğe doğal dirençli olduğundan tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır. *S. Maltophilia*, β -laktamlar, kinolonlar, aminoglikozidler, tetrasiklin, dezenfektanlara intrinsek olarak dirençlidir (Şen ve ark., 2017). *Bosea massiliensi*, gram negatif, non-fermentatif bir basildir. Bosea cinsi ilk kez 1996'da tanımlanmıştır. *B. Massiliensi*, 2003 yılında La Scola ve ark. tarafından hastane su kaynaklarından izole üç *Bosea* cinsinden bir tanesidir (La Scola ve ark, 2003).

Montanari ve ark. (2009) tarafından Brezilya'da (São Paulo) bir hemodiyaliz merkezinde iki yıl süren çalışmada şehir şebeke suyundan, revers ozmoz çıkış noktasından ve üç hasta odasına giden su örneklerinden yapılan mikrobiyolojik analizlerde diyaliz sularında kontaminasyona en çok *S. maltophili*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *S. epidermidis*, *E. coli*'nin sebep olduğunu bildirilmiştir. İzole edilen bakterilerin %5,5'inde *Enterobacteria*, %44'ünde *P. aeruginosa* saptanmıştır.

Arvanitidou ve ark. (2003)'nin Yunanistan'da 85 hemodiyaliz ünitesinde yürüttükleri bir çalışmada su sistemlerinde *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* ve *E. coli* en çok izole edilenler etkenler olarak rapor etmişlerdir. Oie ve ark. (2003) diyaliz solüsyonlarının en sık heterotrofik bakteriler, *P. aeruginosa* ve mantarlar ile kontamine olduğunu göstermiştir. Japonya'da Ikuto ve ark. (2006) diyaliz sularının mikrobiyal kontaminasyonunu saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada koloni sayısını 100 KOB/mL'den fazla olarak 2006 yılında %96,69 ve 2007 yılında %97,4 oranında bulmuşlardır. Gueguim ve ark. (2016) bir hemodiyaliz merkezinde 4 ay süren çalışmada su sisteminde 3 noktadan su örnekleri alarak mikrobiyolojik olarak incelemişlerdir. Su sisteminde en sık izole edilen bakterilerin *Pseudomonas* (%30.6), *Staphylococcus* (%26.1), *Aeromonas* (%13), *Bacillus* (%13), *Klebsiella* (%13) ve *Pasteurella* (%4.3) olduğu görülmüştür. Shahryari ve ark. (2016)'nin İran'da beş hemodiyaliz merkezinde yaptıkları çalışmada; diyaliz suyu örneklerinin %12,5'inde bakteriyel üreme düzeyini Avrupa Farmakopesi standardını (<100 KOB/mL) aştığı görülmüştür. Ayrıca diyaliz suyu örneklerinin içme suyu örneklerine kıyasla daha yüksek KOB değerlerine sahip olduğu fark edilmiştir. Bu çalışmada yapılan 16S rRNA dizisi analizine göre baskın

olan etkenler; *Pelomonas saccharophila*, *Sphingomonas adhaesiva*, *Bacillus subtilis*, *Dechloromonas agitata*, *Bacillus licheniformis*, *Porfirobakter donghaensis* olarak saptanmıştır. Verma ve ark. (2015)'nin Hindistan'da üçüncü basak bir hastanede saf su ve diyaliz atık suyu örneklerini inceledikleri çalışmada; saf su örneklerinin %11,1'nde, diyaliz atık sularının %11,2'sinde kontaminasyon derecesinin kabul edilebilir sınırlar üzerinde (200 KOB/mL) olduğu görülmüştür.

Çalışmanın yapıldığı diyaliz ünitesinde hastalarda sık görülen enfeksiyonlar; kan dolaşımı enfeksiyonu, akciğer enfeksiyonları ve idrar yolları enfeksiyonları olarak tespit edilmiştir. Bu enfeksiyonların tedavilerinde öncelikle etken mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılığı incelenerek uygun antibiyotiğin seçimi yapılmaktadır. Profilaktik tedavi amacıyla 3. ve 4. kuşak sefalosporinler ve kinolon grubu antibiyotikler daha çok tercih edilmektedir. İzolatların antibiyotik dirençliliklerini değerlendirdiğimizde seftazidim %33,3, sefepim %44,4 ve siprofloksasin %33,3 dirençli oldukları görülmüştür. izolatların %66,6'sının tikarsiline direnç oldukları tespit edilmiştir. Diyaliz hastaların tikarsilin genellikle gram negatif enfeksiyonlarının tedavisinde, *Pseudomonas* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır.

Diyaliz sularının mikrobiyal kontaminasyonunun kabul edilebilir sınırlar altında tutulabilmesi, diyaliz merkezleri için önemli bir sorundur. Diyaliz sularının kalitesi bu suları oluşturan bileşenlere ve bunların kimyasal özelliklerine, su arıtım sistemine, iyi ve modern cihazların kullanılmasına, kullanılan filtrelerin kalitesine ve özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca diyaliz suyu sistemlerinde en uygun dezenfeksiyon yönteminin seçilmesi ve dezenfeksiyon sıklığı da önemli bir konudur. Sonuç olarak; ülkemizde son yıllarda diyaliz hastalarının artışı göz önünde bulundurulduğunda, yetkili kurumlarca periyodik kontrollerinin yapılması, laboratuvar testlerinin zamanında, doğru güvenilir ve tam olması büyük önem taşımaktadır. Hemodiyaliz tedavisinde kullanılan saf suyun ve diyalizatın mikrobiyal kontaminasyonu hastaların çevresel kaynaklı mikroorganizmalara maruziyetine sebep olmaktadır. Hemodiyaliz ünitesi su arıtma sisteminin düzgün çalışması için yetkili ve eğitimli bir personel tarafından su sistemi elemanlarının periyodik olarak bakımın yapılması ve yenilenmesi gerekmektedir. Su sistemi ile ilişki hemodiyaliz jenaratörleri dahil su dağıtım sistemi ve revers ozmoz membranları haftada bir kere veya en azından aydan bir kez rutin dezenfekte edilmelidir.

KAYNAKLAR

- Açıklan, H. D. ve Müştak, H. K., 2016. Bakteriye Taksonomi ve Yeni Türlerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.* 13(1), 50-57.
- Akar, N., 1999. Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş (Genişletilmiş ikinci baskı). A.Ü. Tıp Fakültesi Bilimsel yayımlar serisi, No: 5, 212 s, Ankara.
- Akbaş, E., 1998. Hastane İnfeksiyonları Kaynağı Olarak Su, *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 2(1), 25-33.
- Akdemir, N. ve Birol, L., 2004. İç Hastalıkları ve Hemşirelik Bakımı. 2. Baskı Sistem Ofset, 433 s, Ankara.
- Akpolat, T. ve Utaş, C., 2007. Böbrek yetmezliği: genel bilgiler. <http://www.tsn.org.tr/folders/>
- Akpolat, T. ve Utaş, C., 2001. *Hemodiyaliz Hekimi El Kitabı*, Türk Nefroloji Derneği Yayın Organı Anadolu Yayıncılık, No: 3, 144 s, Kayseri.
- Akpolat, T. ve Utaş, C., 2010. Hemodiyaliz Hekimi El Kitabı 3, Türk Nefroloji Derneği Yayını, Organı Anadolu Yayıncılık, No: 4, 120 s, Samsun.
- Akpolat, T., Utaş, C. ve Süleymanlar, G., 2002. *Nefroloji El Kitabı*. Nobel Tıp Kitabevi, 320 s, İstanbul.
- Alkan, G., 1997. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları. *İ.Ü. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, İstanbul.
- Allison, D.G., 2003. The Biofilm Matrix. *Biofouling*, 19, 139-150.
- Alter, J., Tokars, J.I., Arduina, M.J. ve Favero, M.S., 2004. *Hospital Epidemiology and Infection Control.*, 3, 139-160.
- Anderson, J., Kabalin, J. ve Cadeddu, J., 2007. Surgical Anatomy of the Retroperitoneum, Adrenals, Kidneys, and Ureters. *Campbell-Walsh Urology*, 2, 34-37.
- Anonim, 2015. Gram Boyama. <https://www.drthrasher.org/gram-stain-> (Erişim Tarihi: 10.08.2017).
- Anonim, 2015. Hemodiyaliz Tedavisinde Su Sitemi. [http://slideplayer.com/slide/11629106/-](http://slideplayer.com/slide/11629106/) (Erişim Tarihi: 12.08.2017).
- Anonim, 2016. Hemodiyaliz Uygulaması. <https://www.mskcc.org/cancer-care/patient-education/about-your-dialysis-> (Erişim Tarihi: 25.10.2017).
- Anonim, 2017. 25 Bp DNA Ladder'a Ait Cetvel. <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/fermentas-generuler-ready-to-use-low-range-dna-ladder/10784881-> (Erişim Tarihi: 11.08.2017).
- Anonim, 2013. Su Numunelerini Alma Noktaları. [http://delta-med.com.tr/hizmetlerimiz/teklif-formu/hemodiyaliz-su-aritma-sistemleri/-](http://delta-med.com.tr/hizmetlerimiz/teklif-formu/hemodiyaliz-su-aritma-sistemleri/) (Erişim Tarihi: 10.08.2017).
- Anonim, 2014. Su Numunelerinin Alınması. <http://www.bilim.gen.tr/numunealma-1-144.htm-> (Erişim Tarihi: 19.08.2017).

- Aparna, M.S. ve Yadav, S., 2008. Biofilms: Microbes and Diseases. *Braz J. Infect Dis*, 12, 526-530.
- Arvanitidou, M., Kanellou, K. ve Konstantinides, T.C., 1999. The Occurrence of Fungi in Hospital and Community Potable Waters. *Letters in Applied Microbiology*, 29 (2), 81-84.
- Aydın, K., 2009. Ultraviyole Işınları İle Suların Dezenfeksiyonu, IX. *Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi*, İstanbul.
- Aygün, G., 1997. Antibiyotikler ve etki mekanizmaları. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, İstanbul.
- Balaban, Ö.D., Aydın, E., Keyvan, A., Yazar, M.S., Tuna, Ö. ve Özgüve H.D., 2017. Hemodiyaliz Uygulanan Hastalarda Psikiyatrik Komorbidite, Cinsel İşlev Bozukluğu ve Yaşam Kalitesi: Bir Vaka Kontrol Çalışması, *Türk Psikiyatri Dizi*, 54(2), 137-142.
- Bates, D. W, Parsonnet, J., Ketchum, P. A., Miller, E. B., Novitsky, T. J., Sands, K., Hibberd, P. L., Graman, P. S., Lankester, P. N., Schwartz, J. S., Kahn, K., Snyderman, D.R., Moore, R., Black, E. ve Platt, R., 1998. Limulus Amebocyte Lysate Assay for Detection of Endotoxin in Patients with Sepsis Syndrome. *Clinical Infectious Diseases*, 27(3), 582-591.
- Bbosa, G., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D. ve Ntale, M., 2014. Antibiotics/Antibacterial Drug Use, Their Marketing and Promotion During The Post-Antibiotic Golden Age and Their Role In Emergence Of Bacterial Resistance. *Health*, 6, 410-425.
- Berthold, W. ve Walter, J., 1994. Protein Purification: Aspects of Processes For Pharmaceutical Products. *International Journal of International Biology Standardization Association*, 22 (2), 135-150.
- Bilgem, M., 2010. Hemodiyaliz Hastalarında Serbest Radikallerin Organizmaya ve Antioksidan Savunma Sistemleri Üzerine Etkileri. *Y. Lisans Tezi*, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Birben, E. 2006. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimeraz chain reaction). *Astım Allerji İmmünoloji*, 4(2), 92-94.
- Bogaerts, A., Yusupov, M., Paal, J., Verlack, C. ve Neyts, C., 2014. Reactive Molecular Dynamics Simulations for a Better Insight in Plasma Medicine, *Plasma Processes and Polymers*, 11 (12), 1156-1168.
- Boğaziçi Üniversitesi, 2000. Kandilli Rasathanesi ve Deprem Araştırma Enstitüsü, www.koeri.boun.edu.tr
- Bone, R.C., 1996. The Sepsis Syndrome. Definition and General Approach to Management. *Clinics In Chest Medicine*, 17 (2), 175-81.
- Borges, C.R., Lascowski, K.M., Filho, N.R. ve Pelayo, J.S., 2007. Microbiological Quality of Water and Dialysate in a Haemodialysis Unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (5), 1791-1797.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., 2010. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. Editörü: Yenen, O.Ş., Nobel Tıp Kitabevi, NO:2, 134 s, Ankara.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. ve Mietzner, T.A., 2001. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. McGraw-Hill Education*, 880 s, NewYork.

- Bui, A., 2012. Structural Characteristics of Bacterial Endotoxins. *Doktora Tezi*. University of PECS. Doctoral School of Chemistry PECS / Denmark.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Urry, L.A. ve Cain, M.L., 2013. Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. ve Jackson, R.B., Campbell Biyoloji, 9thed, Ertunç Gündüz ve İsmail Türkan, *Palme Yayıncılık*, 156 s, Ankara.
- Cannone, J. J., 2002. The Comparative RNA Web (CRW) Site: an Online Database of Comparative Sequence and Structure Information for Ribosomal, Intron, And Other RNAs. *BMC Bioinformatics*, 3(1), 15-19.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N. ve Knight, R., 2011. Global Patterns Of 16S Rrna Diversity at a Depth of Millions of Sequences per Sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4516-4522.
- Cheung, A.K., Rocco, M.V. ve Yan, G., 2006. Serum Beta-2 Microglobulin Levels Predict Mortality in Dialysis Patients: Results of The HEMO Study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 546-555.
- Cingi, M.İ. ve Erol, K., 1996. Farmakoloji. Anadolu Üniversitesi Yayınları, No:2, 478 s, Eskişehir.
- Clarkson, M.R., Friedewald. J.J., Eustace, J.A. ve Rabb, H., 2008. *Brenner and Rector's the kidney*. Philadelphia, PA: Elsevier, 2870 s, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement M100-S22., Wayne, PA, USA.
- Costerton, J.W. 1999. Introduction to Biofilm. *Int J Antimicrob*, 11, 217-221.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. ve Lappin-Scott, H.M., 2005. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol*, 49, 711- 745.
- Costerton, J.W. ve Stewart, P.S., 2001. Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms. *Lancet*, 135-138.
- Çakır, İ., 2003. Laktobasillus Ve Bifidobakterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi, *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çiftçi, Y., 2003. Balıkçılık ve Su Ürünlerinde Kullanılan Genetik Marker Sistemleri-II. *Yunus Araştırma Bülteni*, 4(2), 13-16.
- Daugirdas, J.T. ve Bergman, H., 1994. Complications During. Hemodialysis, Handbook Of Dialysis, Little, *Brown and Company*, 234 s, Boston.
- Daugirdas, J.T. ve Blake, P.G., 2003. *Diyaliz El Kitabı*, Editör: Semra Bozfakıoğlu. Güneş Kitabevi Ltd Şti., 344 s, Ankara.
- Davison, A.M., 1996. Options In Renal Replacement Therapy. Replacement Of Renal Function By Dialysis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1304-1315.
- Dedeli Çaydam, Ö. ve Çınar Pakyüz, S., 2016. Hemodiyaliz Kronik Komplikasyonları ve Bakım. *Nefroloji Hemşireliği Dergisi*, 11 (1), 60-72.

- Devrim, A.K. ve Kaya, N. 2004. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 10(2), 209-214.
- Devrim, A.K. ve Kaya, N., 2006. RAPD Tekniği ve Biyokimya Alanındaki Kullanımı. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 12(1), 97-101.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surface. *Emerging Infectious Diseases journal*, 8 (9), 881-890.
- Dönmez, İ., 2012. Kronik Böbrek Yetmezliği Olan Hastalarda Hematolojik Bazı Parametrelerin Değerlendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Durmaz Akyol, A., Mertbilek, A., Kara, L ve Karadeniz, D., 2015. Arteriovenöz Fistül Kanülasyon İşlemi Sırasında Kullanılan Giriş Tekniklerinin Ağrı Düzeyine Olan Etkisinin Saptanması. *Nefroloji Hemşireliği Dergisi*, 10 (1), 10-18.
- Durupınar, B., 2001. Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğilimler. *Klinik Dergisi*, 14(2), 47-56
- El-Koraie, A.F., Hazzah, W.A., Abbass, A.A. ve El-Shazly, S.A., 2007. Bacteriological Monitoring Of Dialysis Fluid In 2 Hemodialysis Units In Alexandria, Egypt. *Saudi Medical Journal*, 28 (8), 1234-1238.
- Erol, İ., Yurtyeri, A., Hildebrant, G. ve Kleer, J., 1990. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Seminer Notu, yayımlanmamış, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.
- Ersoy, F. F., 2010. Hemodiyalizde Kullanılan Araç ve Gereçler, Hemodiyaliz Hekimi El Kitabı 3, Türk Nefroloji Derneği, 109 s, Samsun.
- Ersoy, F.F., 2005. Son Dönem Böbrek Yetmezliğinde Uygun Diyaliz Yönteminin Seçimi. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical*, 1(21), 88-92.
- Esmael, A.J., 2010. Homozigot FVL Taşıyıcılarında F5 Geni Promotor Bölgesinde Yer Alan -426G/A Gen Değişiminin Etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Eyileten, T., Yenicesu, M., Altun, B., Çakar, M., Karaman, M., Ay, S.A., Çağlar, K., Oğuz, Y., Vural, A. ve Yılmaz, M.İ., 2010. Hemodiyaliz Hastalarında Diyalizatın Mikrobiyolojik Niteliğinin Enflamasyon Belirteçleri Üzerine Etkisi, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 19 (3), 162-169.
- Fesci, H., 1996. Hemodiyaliz ve Hemşirelik, *Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 3, 1-5.
- Floege, J. ve Lonnemann, G., 2000. Complications Related To water Treatment, Substitution Fluids, and Dialysate Composition. New York: Marcel Dekker, 29-40.
- Freeman, S. ve Herron, J. C. 2001. Evolutionary Analysis. Prentice-Hall. Inc.
- Fresenius Medical Care, 2011. FX Cordiax Kullanım Klavuzu, İstanbul.
- Gangneux, J.P., Bretagne, S. ve Cordonnier C., 2002. Prevention Of Nosocomial Fungal Infection: The French Approach. *Clinical Infectious Diseases*, 35 (3), 343-6.
- Gökdoğan, F., 2015. *Hemşireler ve Teknikerler İçin Diyaliz İlke ve Teknikleri*, Akademisyen Tıp Kitapevi, 346 s, Ankara.

- Green, D., M., 2002. The Bacterial Cell Wall As A Source Of Antibacterial Targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 6 (1), 1-19.
- Gueguim, C., Nga, N., Folefack F., Ragon, A. ve Kamga, H., 2016. Microbiological Analysis of Hemodialysis Water at the University Teaching Hospital of Yaounde, Cameroon. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*, 4(6), 81-86.
- Guyton, A.C. ve Hall, J.E., 2007. Tıbbi Fizyoloji. Çev: H. Çavuşoğlu, B.Yeğen, 11.Basım. Nobel Tıp Kitabevi, 1200 s, İstanbul.
- Gülây Z., 2003. Hücre Duvar Sentezini Etkileyen Antibakteriyeller, *Ankem Dergisi*, 17(3), 192-204.
- Gün, İ. ve Ekinci, F., 2009. Biyofilmler: Yüzeyledeki Mikrobiyel Yaşam. *Gıda Dergisi*, 34 (3), 165-173.
- Gürsoy, N. C. ve Otlı, B., 2017. Mikrobiyotada Çalışmalarında Moleküler Tanı Yöntemleri. *J Biotechnol and Strategic Health Res.* 1, 56-67.
- Halkman, A. K., 2005. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık, 358 s, Ankara.
- Hapcıoğlu, B., Yeğenoğlu, Y., Erturan, Z. ve Nakipoğlu, Y., 2004. Bir Hastanenin Çeşitli Birimlerine Ait Su Dağıtım Sistemlerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 34, 56-61
- Hasde, M., Oğur, R. ve Tekbaş, Ö. F., 2002. Ankara İl Merkezinde Bulunan Askeri Birliklerdeki Kuyu Sularının Polimeraz Zincir Reaksiyon Sistemi ile Mikrobiyolojik Analizlerinin Yapılması, *Gülhane Tıp Dergisi*, 44 (4), 373 – 377.
- Heidarieh, P., Hashemi Shahraki, A., Yaghoubar, R., Hajehasani, A. ve Mirsaiedi, M.. 2016. Microbiological Analysis of Hemodialysis Water in a Developing Country, *Asaio Journal*, 62 (3), 332-339.
- Hoening, N.A., Ronco, C.I. ve Levin, R., 2006. The Importance of Water Quality and Haemodialysis Fluid Composition. *Blood Purification*, 24 (1), 11-18.
- İsmail, N. ve Becker, B.N., 1994. Treatment options and strategies in uremia: current trends and future directions. *Seminars in Nephrology*, 14, 292-299.
- İstanbuluoğlu, H., 2010. Microfilm (Biofilm) in Water Systems. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 9(6), 553-555.
- Joiner, T. J., Krau, P. F. ve Kupiec, T.C., 2002. Comparison of Endotoxin Testing Methods for Pharmaceutical Products. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 6 (6), 408-409.
- K/DOQI, 202. Clinical practice guide lines for Chronic kidney disease: Evaluation, Classification, a Stratification. *Am J Kidney Dis*, 39, 198-246
- Kamanlı Can, N., 2011. Çeşitli Su Örneklerinde Membran Filtrasyon Ve Konvansiyonel Yöntemlerle Mikrobiyolojik Kalite Analizi Ve Antibiyotik Dirençliliğinin Saptanması. *Doktora Tezi*, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Karakoç, E., 2007. Sürekli Renal Replasman Tedavileri. *Yoğun Bakım Dergisi*, 7 (2) : 240-246
- Karataş, M., 2012., *Moleküler Biyoloji*. Nobel Akademik Yayıncılık, 445 s, Ankara.

- Kayaalp, O., 1998. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. *Hacettepe Taş Yayınları*, 1, 1432-1444.
- Kıran, F. ve Osmanağaoğlu, Ö., 2011. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1, 62-74.
- Kiraz, N., 2006. Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Anadolu Üniversitesi, 280 s, Eskişehir.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. ve Spencer. C., 2009. DNA'nın yapısı ve analizi. *Genetik Kavramlarda*. Çevirmen: ÖNER, C. Palme Yayıncılık, 355 s, Ankara.
- Kohanski, M., A., Dwyer, D., J. ve Collins, J., 2010. How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks. *Nature Reviews-Microbiology*. 8 (6): 423-435.
- Kolmos, H.J., Thuesen, B., Nielsen, S.V., Lohmann, M., Kristoffersen, K. ve Rosdahl, V.T., 1993. Outbreak of Infection in a Burns Unit Due to *Pseudomonas aeruginosa* Originating from Contaminated Tubing Used for Irrigation of Patients. *Journal of Hospital Infection*, 24, 11-21.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. ve Schloss, P. D., 2013. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on The Miseq Illumina Sequencing Platform. *Applied And Environmental Microbiology*, 79(17), 5112-5120.
- Kösem, M., 2017. Hemodiyaliz İçin Damar Yolu, Nobel Tıp Kitapevleri, 208 s, İstanbul
- Lameire, N., Van, Biesen, W. ve Vanholder, R., 2005. Acute Renal Failure. *Lancet*, 365: 417-430.
- Leone, S., Molinaro, A., Alfieri, F., Cafaro, V., Lanzetta, R., Donato, A. ve Parrilli, M., 2006. The Biofilm Matrix of *Pseudomonas Sp. OX1* Grown On Phenol Is Mainly Constituted By Alginate Oligosaccharides. *Carbohydr Res*, 341, 2456 – 2461.
- Lonnemann, G., 2000. Should Ultrapure Dialysate Be Mandatory? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15, 55-59.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., Fernández, E.G., Fernández, C.R. ve Pérez, M.S., 2004. Brock mikrobiyoloji, 992 s, USA.
- Magalhães, P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G., Rangel Yagui C., Penna T.C. ve Pessoa A.J.R., 2007. Methods Of Endotoxin Removal From Biological Preparations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 10(3), 388-404.
- Marsh, C. B. ve Wewers, M. D., 1996. The Pathogenesis of Sepsis. *Clinics In Chest Medicine*, 17 (2), 183-197.
- Martin, M.A., 1997. Nosocomial Infections Related to Patient Care Support Services: Dietetic Services, Central Services Department, Laundry, Respiratory Care, Dialysis and Endoscopy. In: Wenzel RP (Ed). *Prevention And Control of Nosocomial Infections*, 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 647-88.
- Martinko, J.M., Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H. ve Stahl, D.A., 2012. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Ed. C. Çökmüş, (Brock Biology of Microorganisms, 11th edition. Pearson Education, Inc., USA), Ankara.

- Melo, L.F. ve Bott, T.R. 1997. Biofouling İn Water Systems. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14; 375-381.
- Memoli, B., 1999. Cytokine Production in Hemodialysis. *Blood Purification*, 17, 149-158.
- Mendiratta, D.K., Deotale, V., Raut, U. ve Narang, N.P., 2009. Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococcus aureus İsolated From Clinical Samples Department of Microbiology, Mahatma Gandhi Institute of Medical Sciences, Sevagram. Dist Wardha, M.S. – 543 s, Hindistan.
- Miller, T.R., Anderson, R.J., Linas, S.L., Henrich, W.L., Berns, A.S., Gabow, P.A. ve Schrier, R.W, 1978. Urinary diagnostic indices in acute renal failure: a prospective study. *Ann Intern Med.*, 89(1), 47-50.
- Mir, S., 1994. Çocuk Yaş Grubu Renal Replasman Tedavisinde (RRT) Yenilikler. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. 3, 20-24.
- Mutlu, B., Toros, H. ve Şen, O., 2003. Ultraviyole radyasyonun insan sağlığı üzerine etkileri, *III. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu*, İstanbul.
- Nadir, I., Topçu, S., Gültekin, F. ve Yöner, Ö., 2002, Kronik Böbrek Yetmezliğinde Etyolojik Değerlendirme, *Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dergisi*, 24 (2), 62-64.
- National Kidney Foundation., 2002. K/DOQI Clinical Practice Guidelines For Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification And Stratification. *National Kidney Foundation*, 43-79. New York.
- Newton, C.R. ve Graham, A., 1994. *PCR (Introduction to Biotechniques)*. Bios Scientific Publishers Limited, 144 s, İngiltere.
- Ogikubo, Y., Norimatsu, M., Noda, K., Takahashi ,J., Inotsume, M., Tsuchiya, M. ve Tamura, Y. 2004. Evaluation of the Bacterial Endotoxin test for Quantification of Endotoxin Contamination of Porcine Vaccines. *International Journal of International Biology Standardization Association*, 32 (2), 88-93.
- Oğur, R. ve Tekbaş, Ö.F., 2005. Temel Su Analiz Teknikleri . Aydın Matbaacılık, 120 s, Ankara.
- Olgun, A., Topal, A., 1999. *DNA'nın Analizi. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Ed: G.Temizkan, N. Arda. Nobel Kitap Evi, Ankara, 236-237.
- Oskay, M. ve Tamer, A.U., 2009. Streptomyces Kökenli Antibiyotiklerin Dünü, Bugünü ve Yarını. *e-Journal of New World Sciences Academy Ecological Life Sciences*, 4,(2), 48-60.
- Özçürümez, G., Tanrıverdi, N. ve Zileli, L., 2003. Psychiatric and Psychosocial Aspects of Chronic Renal Failure. *Türk Psikiyatri Dergisi*, 14, 72-80.
- Özgür, M., 2013. Edirne İlindeki Çevresel Sularda Kirlilik İndikatörü Mikroorganizmaların ve Yeni Çıkan Bakteriyel Patojenlerin Moleküler Yöntemlerle Saptanması, *Yüksek Lisans Tezi*, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Özkuyumcu, C., 2009. *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi 1 Klinik Bakterioloji El Kitabı. 1.baskı*. Ankara: Güneş Kitabevi,121 s, Ankara.
- Özkütük, N., 2007. Ultraviyole Lambalarının Kullanımı. 5. *Ulusal Sterilizasyon Kongresi*, Antalya.

- Öztürk, R., 1997. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları, Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Gelişmesi ve Günümüzde Direnç Durumu. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, İstanbul.
- Packet, L., 2005. Principles of continuous renal replacement therapy. *Orlando Regional Healthcare*, 63-89.
- Parlar, E., 2008. Diyaliz Hastalarının Nozokomiyal Enfeksiyon Kontrolü, *Hastane Enfeksiyonları: Korunma ve Kontrol Sempozyum Dizisi*, 3, 121-129.
- Perincek, S., Duran, K., Körlü, A., Bahtiyari, M., 2007. *Ultraviolet Technology. Tekstil ve Konfeksiyon*, 17 (4), 219-223.
- Pompermayer, D.M.C ve Gaylarde, C.C., 2000. The Influence of Temperature on the Adhesion of Mixed Cultures of Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli to Polypropylene. *Food Microbiology*, 17, 361-365
- Rietschel, E. T., Brade, H., Holst, O., Brade, L., Muller-Loennies, S. ve Mamat, U., 1996. Bacterial Endotoxin: Chemical Constitution, Biological Recognition, Host Response and Immunological Detoxification. *Curr Top Microbiol İmmünol*, 216, 39-81.
- Rutala, W.A. ve Weber, D.J., 1997. Uses of İnorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities. *Clinical Microbiology Reviews*, 10 (4), 597-610.
- Sağlık Bakanlığı, 2011. Su Arıtma Sistemi Yönergesi, 28.10.2011.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. ve Arnheim, N., 1985. Enzymatic Amplification of Beta-globin Genomic Sequences and Restriction site Analysis for Diagnosis of Sickle cell Anemia. *Science*, 230 (4732), 1350-1354,
- Salyers, A.A. ve Whitt, D.D., 2005. *Bacterial Pathogenesis, a Molecular Approach*, Washington, D.C., 576 s, USD.
- Schiffel, H., Lang, S.M., Stratakis, D. ve Fischer, R., 2002. Effect of Ultrapure Dialysis Fluid Loss of Residual Renal Function. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17, 1814-1818.
- Serdengeçti, K., Süleymanlar, G. ve Altıparmak, M.R., 2010. Türkiye'de Nefroloji-Diyaliz ve Transplantasyon. *Türk Nefroloji Derneği Yayınları*, 7, 14-17.
- Sezen, A., 2013. Diyaliz El Kitabı, Nobel Tıp Kitapevleri, 329 s, İstanbul.
- Sezen, A., 2014. Diyaliz Hemşireliği. Nobel Tıp Kitapevleri, 418 s, İstanbul.
- Sezen, A., 2017. Diyaliz Merkezleri Hakkındaki Yönetmeliklerde Değişen İnsan Kaynakları Standartlarının İncelenmesi. *Türk Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Hemşireleri Derneği Nefroloji Hemşireliği Dergisi*, 1 (12).
- Shaw, R. C. ve Prasad, R., 1970. Starch Gel Electrophoresis of Enzymes - A Compilation of Recipes. *Biochemical Genetics*. 4, 297-320.
- Siborova, M., 2014. Separace PCR Produktu Kapalinovou Chromatografi, *Doktora Tezi*, Masarykova Üniversitesi, Biyokimya Fakültesi, Brnoda.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S. ve Klapper, I. 2002. Biofilm Material Properties as Related to Shear-İnduced Deformation and Detachment Phenomena. *J. of Ind Microbiol and Biotech*, 29, 361-367.

- Süleymanlar, G., Altıparmak, M.R., Seyahi, N. ve Trabulus, S., 2010. Türkiye’de Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon –Registry 2012. *Türk Nefroloji Derneği Yayınları*, 2-34.
- Süleymanlar, G., Serdengeçti, K., Altıparmak, M.R. ve Seyahi, N., 2013. Türkiye’de Nefroloji, T.C. Sağlık Bakanlığı ve Türk Nefroloji Derneği Ortak Raporu, 3-28.
- Süleymanlar, G., Serdengeçti, K., Altıparmak, M.R. ve Seyahi, N., 2017. Türkiye’de Nefroloji, T.C. Sağlık Bakanlığı ve Türk Nefroloji Derneği Ortak Raporu, 1-6.
- Şen, P., Yula, E., Er, H., Güngör, S., Özdemir, R., Baran, N., Demirdal, T. ve Demirci, M., 2017. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında antibiyotiklere direnç oranı. *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 9 (3), 113-117.
- Tabarez, M.R., 2005. Discovery of the New Antimicrobial Compound 7-O-Malonyl Macrolactin. *Doktora Tezi*, Faculty of Natural Sciences, University of CaroloWilhelmina.
- Tanrıverdi, M.H., Karadağ, A. ve Hatipoğlu, E.Ş, 2010. Kronik böbrek yetmezliği. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2(2), 27-32.
- Taş, D. ve Akyol A., 2017. Egzersiz Ve Kronik Böbrek Yetmezliği. *Nefroloji Hemşireliği Dergisi*, 12(1), 10-19.
- Taş, F.S., Cengiz, K., Erdem, E., Karataş, A., Kaya, C., 2011. Akut ve Kronik Böbrek Yetmezliğinde Mortalite Nedenleri, *Fırat Tıp Dergisi*, 16(3), 120-124
- Tekin, A., Dal, T. ve Tekin, R., 2014. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Stenotrophomonas maltophilia* Suşlarının İn Vitro Antibiyotik Duyarlılık Paterni. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 16, 4-7.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitapevleri, 345 s, İstanbul.
- Tenekeci, E. G. ve Kara, B., 2016. Ev hemodiyalizinin yaygınlaşmasının önündeki engeller nelerdir?. *Nefroloji Hemşireliği Dergisi*, 11 (1), 73-78.
- Tevini, M., 1994. UV-B Effects on Terrestrial Plants and Aquatic Organisms. *Progress in Botany*, 174-190.
- Tombak, A., 2008. Yatan Hastalarda Böbrek Fonksiyon Bozukluğu Nedenlerinin, Risk Faktörlerinin ve Seyrinin İncelenmesi; Retrospektif Bir Çalışma. *Uzmanlık Tezi*, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mersin.
- Topbaş, E., 2015. Kronik Böbrek Hastalığının Önemi, Evreleri ve Evrelere Özgü Bakımı. *Nefroloji Hemşireliği Dergisi*, 10(1), 53-59.
- Türetgen, İ., 2004. Comparison of Free Residual Chlorine and Monochloramine for Efficacy Against Biofilms in Model and Full Scale Cooling Towers. *Biofouling*, 20 (2): 81-5.
- Türetgen, İ., 2006. Su Şebeke Sistemlerinde Mikrobiyal Biyofilm Tabakası. *Tesisat Mühendisliği Dergisi*, 92, 29-32
- Türkyılmaz, S. ve Esenal, Ö.M., 2002. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 8(1), 71-76.
- Usluer, G., 2003. Riskli Ünitelerde Dezenfeksiyon. 3. *Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi*, Samsun.

- Usta, A., 2012. Toprakta Antibiyotik Üreten Bacillus Sp.' lerin Taranması, Antibiyotik Üretimi Üzerine Bazı Parametrelerin Etkisi ve Sporulasyonla İlişkisinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Utaş, C., 2005. Kronik Böbrek Yetmezliği. *Türkiye Klinikleri, J Int MedSci*, 1(21), 9-10.
- Vandamme, P. ve Coenye, T., 2004. Taxonomy of the genus Cupriavidus: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol*; 54, 2285-2289.
- Vanguilder, H.D., Vrana K.E. ve Freeman, W.M., 2008. Twenty-Five Years Of Quantitative PCR For Gene Expression Analysis. *BioTechniques*, 44, 619-626.
- Vanholder, R.C. ve Peleman, R., 2000. Infectious Problems in Dialysis Patients. *Complications of Dialysis*. New York: Marcel Dekker, 377-388.
- Vierstraete, A., 1999. Principle of the PCR. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr>
- Vural, T., 1999. Bakterilerin Yaşam Siklusu ve Üremelerinin Kontrolü. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Editör: Ustaçelebi, Ş. Güneş Kitabevi, 132 s, Ankara.
- Ward, R.A., 2009. Worldwide Guidelines for the Preparation and Quality Management of Dialysis Fluid and Their Implementation. *Blood Purif*, 27(1), 2-4.
- Watnick, P. ve Kolter, R., 2000. Biofilm City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2675-2679.
- Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J. ve Zoller, M., 1992. The polymerase chain reaction in Recombinant DNA. *Scientific American Books. W. H. Freeman and Company*. 121 s, New York.
- Williams, D.R., Rapley, R., 2000. Agarose gel elektroforesis of nucleic acids. In: Rapley R, editor. *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Totowa, NJ, USA: Humana Press; s. 67–70.
- Willke, Topçu, A., Söyletir, G. ve Doğanay, M., 1996. İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, 1047 s, İstanbul.
- Yaşa, E., 2009. Ters Ozmoz (TO) Su Arıtma Tekniği ve Muhtelif Kullanım Alanları, *IX. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi*, İstanbul.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B. (Ed). 2007. *Moleküler Biyoloji*. Nobel yayınları, No:2, 312 s, Ankara.
- Yıldız, S., 2011. Su Arıtma Sisteminde Çift Ters Ozmoz Modülü Kullanımının Hemodiyaliz Hastalarında Diyaliz Yeterliliği İle İlişkili Parametreler Üzerine Etkisinin incelenmesi, *28. Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi*, Antalya.
- Ympa, Y.P., Sakr, Y., Reinhart, K. ve Vincent, J.L., 2005. Has Mortality From Acute Renal Failure Decreased? A Systematic Review Of The Literature. *American Journal of Medicine*, 118(8):827- 32.

EKLER

EK 1

KULLANILAN BESİYERLERİ

Plate Count Agar (Merck 1.05463)

Su örneklerinde toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısının belirlenmesi için Plate Count Agar (PCA) besiyeri kullanıldı. Dehidre besiyeri, 22,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilmiştir.

Bileşim

Peptone from casein	5,0 g/L
Yeast extract	2,5 g/L
D(+) Glucose	1,0 g/L
Agar-agar	14,0 g/L

Levine EMB Agar (Merck 1.01342)

Su örneklerinde *E. coli* ve diğer *Enterobacter* türlerinin izolasyonu için Levin EMB besiyeri kullanıldı. Dehidre besiyeri, 36,0 g/L olacak şekilde damıtık suda ısıtılarak eritilip ve otoklavda 121°C'da 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Bileşim

Peptone	10,0 g/L
Lactose	10,0 g/L
K ₂ HPO ₄	2,0 g/L
Eosin yellowish	0,4 g/L
Methylene blue	0,065 g/L
Agar-agar	13,5 g/L

EK 1 (Devam)

Baird-Parker Agar Base (Merck 1.05406)

Su örneklerinde *Staphylococcus aureus* izolasyonunda Baird-Parker Agar Base kullanıldı. 58,0 g dehidre besiyeri 950 mL damıtık su içinde 1-2 dakika kaynatılarak tümüyle çözüldürülüp ve otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Bazal besiyeri 45°C'a soğutularak ve manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılırken üzerine önceden oda sıcaklığına getirilmiş 50 mL yumurta sarısı- tellurit emülsiyonu (Merck 1.03785) ilave edilip, standart 9 cm çaplı steril Petri kutularına 12,5'er mL ve/veya büyük 14 cm çaplı steril Petri kutularına 50'şer mL dökülmüştür.

Bileşim

Peptone from casein	10,0 g/L
Meat extract	5,0 g/L
Sodium pyruvate	10,0 g/L
Glycine	12,0 g/L
Yeast extract	1,0 g/L
Lithium chloride	5,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L

Salmonella-Shigella (SS) Agar (Merck 1.07667)

Su örneklerinde *Salmonella* ve *Shigella spp.* izolasyonu için Salmonella-Shigella (SS) Agar kullanıldı. Dehidre besiyeri 60,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde tümüyle çözülmeye kadar kaynar su banyosunda eritilerek steril petri kutularına 12,5'er mL dökülmüştür. Bu besiyeri otoklavlanmamıştır.

EK 1 (Devam)

Bileşim

Peptones	10,0 g/L
Lactose	10,0 g/L
Ox bile	8,5 g/L
Sodium citrate	10,0 g/L
NaS ₂ O ₃	8,5 g/L
Ammonium iron(III) citrate	1,0 g/L
Brilliant green	0,0003 g/L
Neutral red	0,025 g/L
Agar-agar	12,0 g/L

Slanetz Bartley Agar (Merck 105262)

Su örneklerinde enterokokların izolasyonu için Slanetz Bartley Agar kullanıldı. Dehidre besiyeri, 41,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde agar eriyinceye kadar kaynatılıp ve sonra hızlıca 45-50°C'a soğutuldu. Daha sonra steril petri kutularına 12,5'er mL dökülmüştür. Bu besiyeri otoklavlanmamıştır.

Bileşim

Tryptose	20,0 g/L
Yeast extract	5,0 g/L
D(+) Glucose	2,0 g/L
K ₂ HPO ₄	4,0 g/L
Sodium azide	0,4 g/L
2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride	0,1 g/L
Agar-agar	10,0 g/L

EK 1 (Devam)

Pseudomonas CFC/CN agar (Merck 107620)

Su örneklerinde *Pseudomonas spp.* izolasyonu için Pseudomonas Selective Agar Base kullanıldı. 500 mL damıtık su içinde 24,2 g dehidre besiyeri ve 5 mL gliserol (Merck 1.04091) kaynatılarak çözüldükten sonra otoklavda 121°C'da 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası besiyeri 45-50°C'a soğutulurak 1 şişe Pseudomonas CN Selective Supplement (Merck 1.07624)) eklenerek ve petri kutularına dağıtılmıştır. Pseudomonas CN Selective Supplement, 2 mL eşit hacimde alkol/su karışımı içinde çözülmüştür.

Bileşim

Peptone from gelatine	16,0 g/L
Casein hydrolysate	10,0 g/L
Potassium sulfate	10,0 g/L
Magnesium chloride	1,4 g/L
Agar-agar	11,0 g/L

Sabouraud %2 Dextrose Agar (Merck 107315)

Su örneklerinde maya ve küflerin izolasyonu için Sabouraud %2 Dextrose Agar kullanıldı. Dehidre besiyeri 47,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak çözüldü, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilmiştir.

Bileşim

Peptone	10,0 g/L
D(+) Glucose	20,0 g/L
Agar-agar	17,0 g/L

EK 1 (Devam)

Nutrient Broth (Merck 1.05443)

Bakteri izolasyonunda Nutrient Broth besiyeri kullanıldı. 8,0 g besi ortamı 1 L distile suda çözülerek ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Bileşim

Peptone from meat	5,0 g/L
Meat extract	3,0 g/L

Mueller-Hinton Agar (Merck 1.05437)

İzolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için Mueller-Hinton Agar kullanıldı. Dehidre besiyeri, 34,0 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritilip otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilmiştir.

Bileşim

Meat infusion	2,0 g/L
Casein hydrolysate	17,5 g/L
Starch	1,5 g/L
Agar-agar	13,0 g/L

LB (Luria-Bertoni) Buyyon (pH:7,5)

LB buyyon izole edilen bakterilerin stoklanması için kullanılmıştır. 25 g besi ortamı 1 L distile suda çözülerek ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Bileşim

Trypton	10 g/L
Maya	5 g/L
NaCl	10 g/L

EK 2

KULLANILAN KİMYASALLAR VE BOYALAR

Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Bakterilerin identifikasyonu amacıyla yapılan biyokimyasal testlerden katalaz testinin ayırıcı olarak %3'lük H₂O₂ kullanılmıştır.

Tetrametil-p-fenilendiamin ayırıcı (%0,5'lik)

Bakterilerin identifikasyonu amacıyla yapılan biyokimyasal testlerden oksidaz testinin ayırıcı olarak %0,5'lik Tetrametil-p-fenilendiamin ayırıcı kullanılmıştır.

Kristal Viyole Boyası

Bakterilerin duvar yapılarına göre ayırımlarının sağlandığı gram boyama çalışmalarında mor renkli primer boya çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Çözelti A

Kristal viyole	2,0 g
Etil alkol (%95)	10,0 mL

Çözelti B

Amonyum oksalat	0,8 g
Distile su	80,0 mL

Çözelti A ve B karıştırılmış distile su ile 1:10 oranında sulandırılıp filtre kağıdından süzülmüştür.

İyot-Lügol Çözeltisi

Bu madde mordan olarak kullanılır. Mordan, bir boyaya karşı hücrenin eğilimini arttıran bir maddedir. Primer boyaya bağlanarak çözünmez bir bileşik oluşturur. Tüm hücreler bu esnada koyu mor boyanır.

EK 2 (Devamı)

Bileşim

İyot	5,0 g
Potasyum iyodit	10 g/L
Distile su	1000 mL

Potasyum iyodit 30 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra iyot çözeltiye eklenmiş ve çözelti hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Bazik Fuksin

Preparatlar etil alkol ile muamele edildikten sonra karşıt boya olarak sulu fuksin çözeltisi ile işleme tabi tutulmuştur.

Bileşim

Bazik fuksin	10 g
%95'lik etil alkol	100 mL

%96'lık Etil Alkol

Gram boyamada kullanılan etil alkol piyasada ticari olarak satılan %96'lık saflıkta temin edilmiştir.

İmmersiyon Yağı (Sedir Yağı)

Gram boyama sonrasında bakterilerin x100 büyütmele objektifte incelenirken kullanılmıştır.

Egg Yolk –Tellurite Emulsion %20 (Merck 1.03785.0001)

Baird-Parker Agar besiyerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal bir çözüldür. 1 litre steril ve 50°C'ye kadar soğutulan besiyerine 50 mL Egg Yolk-tellurite emülsiyon ilave edilerek örneklerin bakteriyolojik analizinde kullanılacak besiyeri hazırlanmıştır.

EK 2 (Devamı)

Bileşim

Steril Egg Yolk (Yumurta Sarısı)	200 mL
NaCl	4,25 gr
Yeast extract	1 gr
Potassium tellurite	2,1 gr

Mg² Stok Çözeltisi (100 mL)

PZR ortamında kullanılmıştır.

MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33 gr
MgSO ₂ .7H ₂ O	24,65 gr

Yukarıda verilen kimyasal maddelere distile su eklenerek 100 mL'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir ve +4°C'deki dolaba kaldırılır.

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Solüsyonu

Bileşimi:

Trisma base	21,6 gr
Borik asit	11 gr
EDTA (etilen diamin tetra asetik asit)	1,86 gr

Tartılarak son hacim 200 mL olacak şekilde saf suda çözülür ve pH 8,3'e ayarlanır.

Agaroz jel (%3) 50 mL

Agaroz	1.5 gr
5X TBE Solüsyonu	5 mL
Distile su	45 mL

Agaroz, homojen bir karışım oluşuncaya kadar ısıtılarak eritilir.

EK 2 (Devamı)

Örnek Yükleme Tamponu

Brom fenol mavisi	%0,25
Gliserol	%10

100 mL saf suda çözülerek elde edilir.

DNA Ladder (Thermo Scientific™ GeneRuler 25 bp)

Ticari olarak sağlanan marker DNA'lar, PZR ürünleri agaroz jel elektroforezde yürütüldükten sonra uygun boyutta olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Primerler

Bu primerler polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) ve DNA dizileme sırasında kullanılmıştır. DNA dizileme işlemi hizmet alımı Iontek A.Ş. tarafından yapılmıştır.

Stok Boyama Solüsyonu

Ethidium bromür	1 mg
Distile su	100 mL

Boya tamamen çözüldükten sonra koyu renkli şişede +4°C'de saklanır

EK 3

API 20NE identifikasyon kiti (Biomerieux)

API 20NE sistemi *Enterobacteriaceae* familyası dışındaki gram negatif cinslerin (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* vb.) identifikasyonu için hazırlanmış, 8 geleneksel ve 12 asimilasyon testini içeren standardize edilmiş bir mikro metot sistemidir. API 20NE veritabanı *Brucella* ve *Francisella* gibi gelişimleri için özel besinleri ve ön uyarıları gerektiren cinsleri kapsamamaktadır. Böyle türlerin varlığında ekstra deneylerin ve doğrulama testlerinin yapılması gerekmektedir. API 20NE stripleri kurutulmuş besiyeri ve substrat içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır. Saf bakteri kolonilerinden, steril serum fizyolojik içeren tüplerde süspansiyonları hazırlanarak bu mikrotüplere inoküle edilmiştir. İnkübasyon esnasında metabolizma sonucu kendiliğinden veya ayıraçlara bağlı olarak renk değişikliğine sebep olmaktadır. Asimilasyon testleri için ise AUX besiyeriyle karıştırılarak inoküle edilen bakteriler eğer substratı kullanabilirlerse gelişebilmektedir (BioMérieux, 2003).

API 20 NE Test Kitini Oluşturan Öğeler

- API 20NE stripi
- İnkübasyon kutusu
- Ampul içerisinde AUX Medium (2mL)
- Sonuç tablosu
- Mineral yağ
- McFarland standart sıvısı

AUX Medium içeriği

- Amonyum sülfat 2 g
- Agar 1,5 g
- Mineral base 82,8 mg
- Amino asit 250 mg
- Vitaminler ve diğer 35,9 mg
- Fosfat buffer 0,04 M
- Distile su 1000 mL

EK 3 (Devamı)

API 20NE Kitinde bulunan Ayıraçlar ve içerikleri

API 20NE Kitinde bulunan ayıraçlar ve içerikleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Tüm API içerikleri 2°-8°C’de buzdolabında ışık görmeyecek biçimde muhafaza edilmiştir. NIT 1 ve Zn ayıraçları oda sıcaklığında, James ve NIT 2 ayıraçları ise 2°-8°C arasında karanlık bir ortamda buzdolabında muhafaza edilmiştir. Bu ayıracın normal rengi sarıdır ve uzun süreli olarak buzdolabı dışında tutulması sakıncalıdır. Pembe renk oluşması bu ayıracın bozulmasına işaret eder (BioMérieux, 2003). API 20NE test kiti reaksiyonlarında elde edilen veriler çizelge 3.2’de verilen API 20NE okuma tablosuna göre analiz edilmiştir.

Çizelge 3.1. API 20NE test kiti ayıraçlar, ortamlar ve içerikleri (BioMérieux, 2003).

Ayıraçlar, Ortamlar	İçerikleri	
James (5 mL)	J 2183 bileşiği	0,5 g
	HCl (1 N)	100 mL
NIT 1 (5 mL)	Sülfanilik asit	0,4 g
	Asetik asit	30 g
	H ₂ O	70 mL
NIT 2 (5 mL)	N,N-dimetil-1-naftilamin	0,6 g
	Asetik asit	30 g
	H ₂ O	70 mL
Zn	Çinko tozu	10 g

EK 3 (Devamı)

Çizelge 3.2. API 20NE okuma tablosu

Test	Substrat	Reaksiyon / Enzimler	Sonuç	
			Negatif	Pozitif
NO ₃	Potasyum Nitrat	Nitratın nitrite redüksiyonu	NIT 1 + NIT 2 / 5 dk	
			Renksiz	Pembe Kırmızı
		Nitratın nitrojene redüksiyonu	Zn / 5 dk	
			Pembe	Renksiz
TRP	Triptofan	İndol Üretimi	James / hızlı reaksiyon	
			Renksiz - Açık yeşil - Sarı	Pembe
GLU	Glukoz	Asidifikasyon	Mavi –Yeşil	Sarı
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Turuncu Pembe Kırmızı
URE	Üre	Üreaz	Sarı	Turuncu Pembe Kırmızı
ESC	Eskülin	Hidroliz (β-glukosidaz)	Sarı	Gri Kahve Siyah
GEL	Jelatin	Hidroliz (Proteaz)	Pigment difüzyonu yok	Siyah pigment difüzyonu
PNPG	p-nitrofenil- β -D-galaktopiranosit	B-galaktosidaz	Renksiz	Sarı
GLU	Glukoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
ARA	Arabinoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MNE	Mannoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MAN	Mannitol	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
NAG	N-asetil glukozamin	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MAL	Maltoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
GNT	Glukonat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
CAP	Kaprat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
ADI	Adipat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MLT	Malat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
CIT	Sitrat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
PAC	Fenil-asetat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
OX	Oksidaz	Sitokrom oksidaz	Renksiz	Koyu mavi Mavi

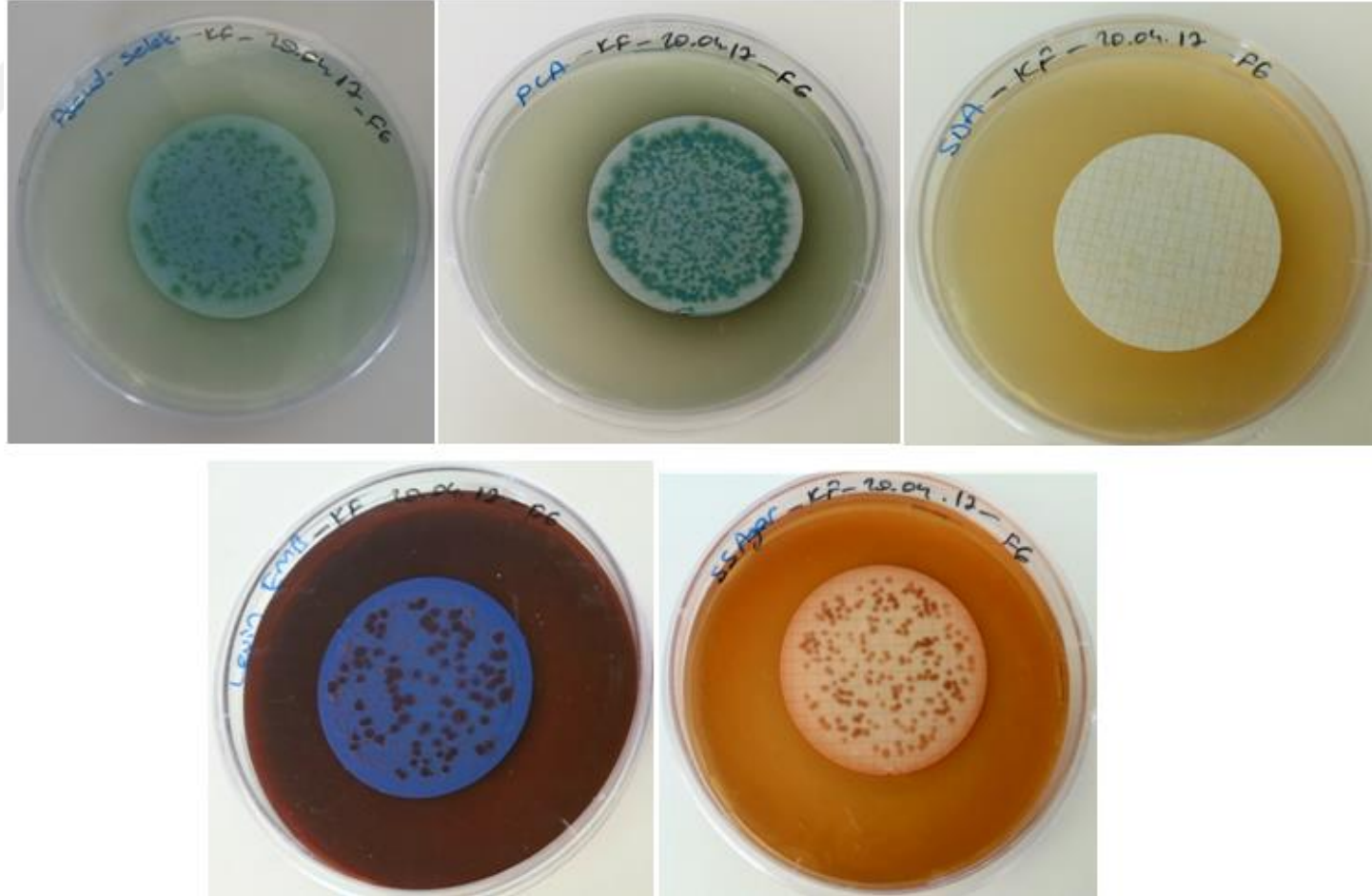
EK 4

Çizelge 4.1. 20 Nisan 2017 de alınan su örneklerine ait sonuçlar

20 NİSAN 2017-DEZENFEKSİYON ÖNCESİ				
Şehir Şebeke Suyu Çıkış Noktası				
Üreme olmadı				
Karbon Filtre Çıkış Noktası				
Besiyeri	Koloni Çeşitliliği	Koloni Sayısı (KOB/100 mL)	Besiyeri No	Morfoloji
Pseudomonas CFN/CN	1	UC	14	Yeşil renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
Levin EMB	1	UC	24	Büyük pembe-bordo koloni renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	26	Küçük parlak pembe renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
SDA	1	UC	36	Krem renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	38	Sarı renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	3	UC	37	Krem renkte, küçük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
SS Agar	1	148	19	Pembe renkli, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
PCA Besiyeri	1	UC	35	Yeşil renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
Revers Osmoz Çıkış Noktası				
Üreme olmadı				

UC: Uncountable (sayılamayacak kadar çok)

EK 4 (Devamı)



Şekil 4.10. 20.04.2017 tarihinde karbon filtre çıkış noktasında alınan su örneklerine ait besiyeri üreme görüntüleri

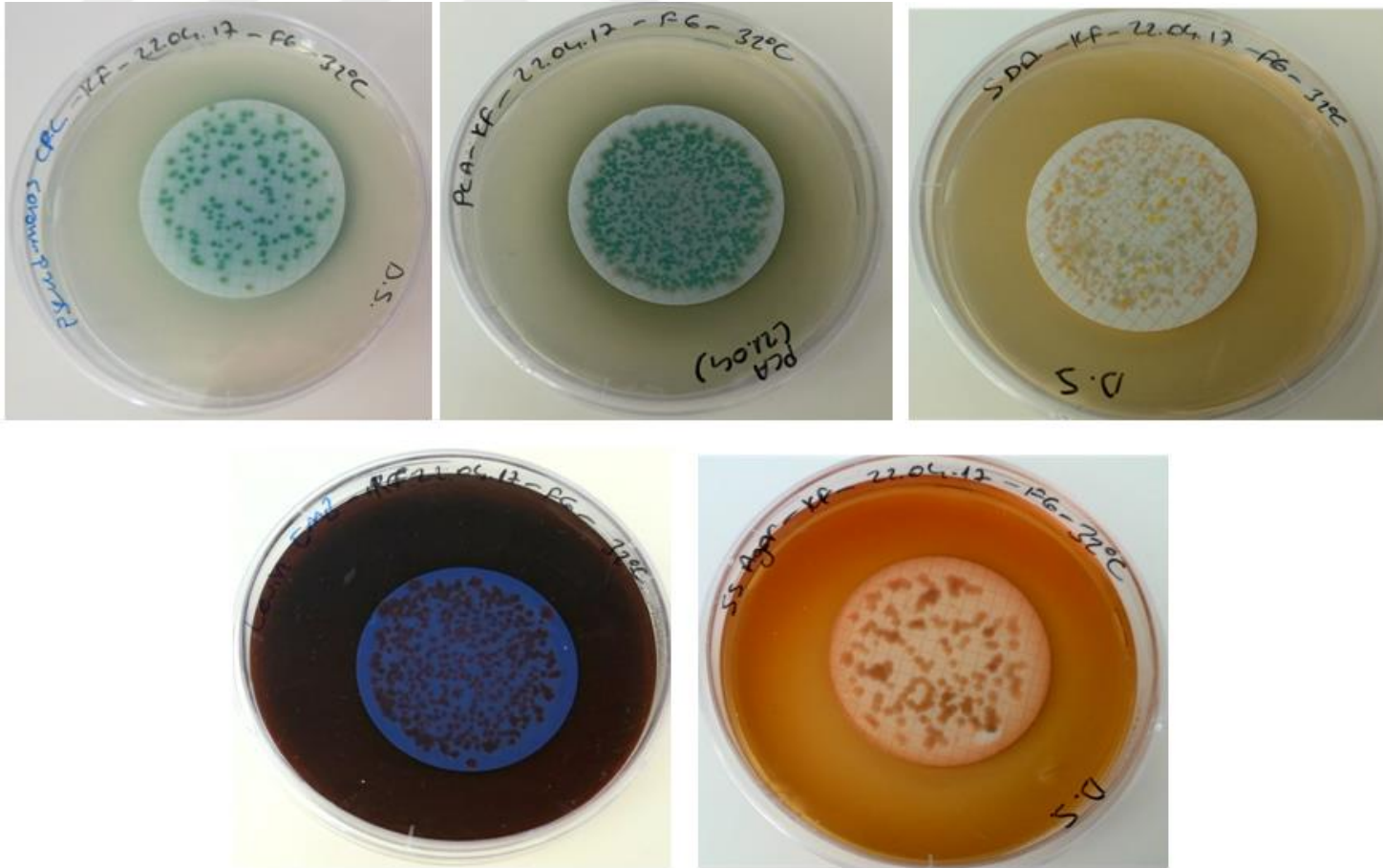
EK 4 (Devamı)

Çizelge 4.2. 22 Nisan 2017 de alınan su örneklerine ait sonuçlar

22 NİSAN 2017 DEZENFEKSİYON SONRASI				
Şehir Şebeke Suyu Çıkış Noktası				
Üreme olmadı				
Karbon Filtre Çıkış Noktası				
Besiyeri	Koloni Çeşitliliği	Koloni Sayısı (KOB/100 mL)	Besiyeri	Morfoloji
Pseudomonas CFN/CN	1	145	15	Yeşil renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
Levin EMB	1	UC	40	Büyük pembe-bordo koloni renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	39	Mor renkte, küçük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
SDA	1	UC	20	Krem renkte, küçük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	22	21	Sarı renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	3	UC	22	Krem renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
SS Agar	1	125	16	Pembe renkli, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
PCA Besiyeri	1	UC	17	Yeşil renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
Revers Osmoz Çıkış Noktası				
Su örneği teknik bir arızadan dolayı alınamadı				

UC: Uncountable (sayılamayacak kadar çok)

EK 4 (Devamı)



Şekil 4.2. 22.04.2017 tarihinde karbon filtre çıkış noktasında alınan su örneklerine ait besiyeri üreme görüntüleri

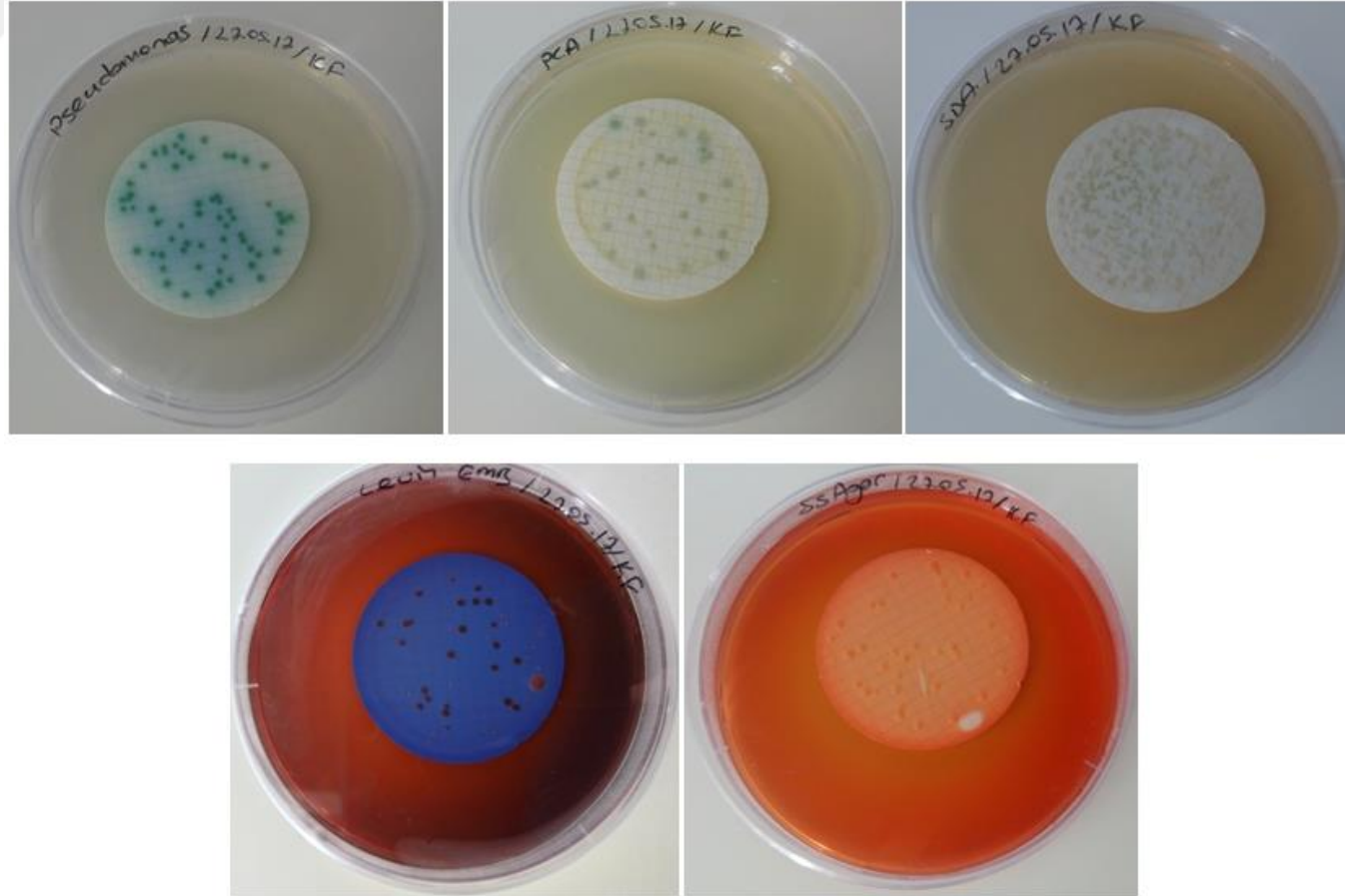
EK 4 (Devamı)

Çizelge 4.3. 27 Mayıs 2017 de alınan su örneklerine ait sonuçlar

27 Mayıs 2017 Cumartesi				
Şehir Şebeke Suyu Çıkış Noktası				
Üreme olmadı				
Karbon Filtre Çıkış Noktası				
Besiyeri	Koloni Çeşitliliği	Koloni Sayısı (KOB/100 mL)	Besiyeri	Morfoloji
Pseudomonas CFN/CN	1	62	1	Yeşil renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
Levin EMB	1	23	9	Büyük pembe-bordo koloni renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	26	8	Mor renkte, küçük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
SDA	1	UC	34	Krem renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	10	Krem renkte, alt zemini yeşil renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
SS Agar	1	38	18	Açık pembe, parlak koloniler
PCA Besiyeri	1	30	29	Yeşil renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	23	Krem-beyaz renkte, küçük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
Revers Osmoz Çıkış Noktası				
Besiyeri	Koloni Çeşitliliği	Koloni Sayısı (KOB/100 mL)	Besiyeri	Morfoloji
Pseudomonas CFN/CN	1	UC	2	Kahverengi renkte, küçük, mat koloniler
	2	UC	5	Beyaz renkte, büyük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	3	UC	19	Beyaz renkte, küçük, agar yüzeyine gömülü
SDA	1	UC	4	Beyaz renkte, kenarları girintili, mat koloniler
	2	UC	3	Kahverengi renkte, küçük, mat koloniler
	3	UC	25	Beyaz renkte, küçük, agar yüzeyine gömülü
Levin EMB	1	103	11	Açık pembe renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	12	Beyaz renkte, küçük, agar yüzeyine gömülü
PCA Besiyeri	1	62	6	Beyaz renkte, büyük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	7	Kahverengi renkte, küçük, mat koloniler
	3	UC	13	Beyaz renkte, küçük, agar yüzeyine gömülü

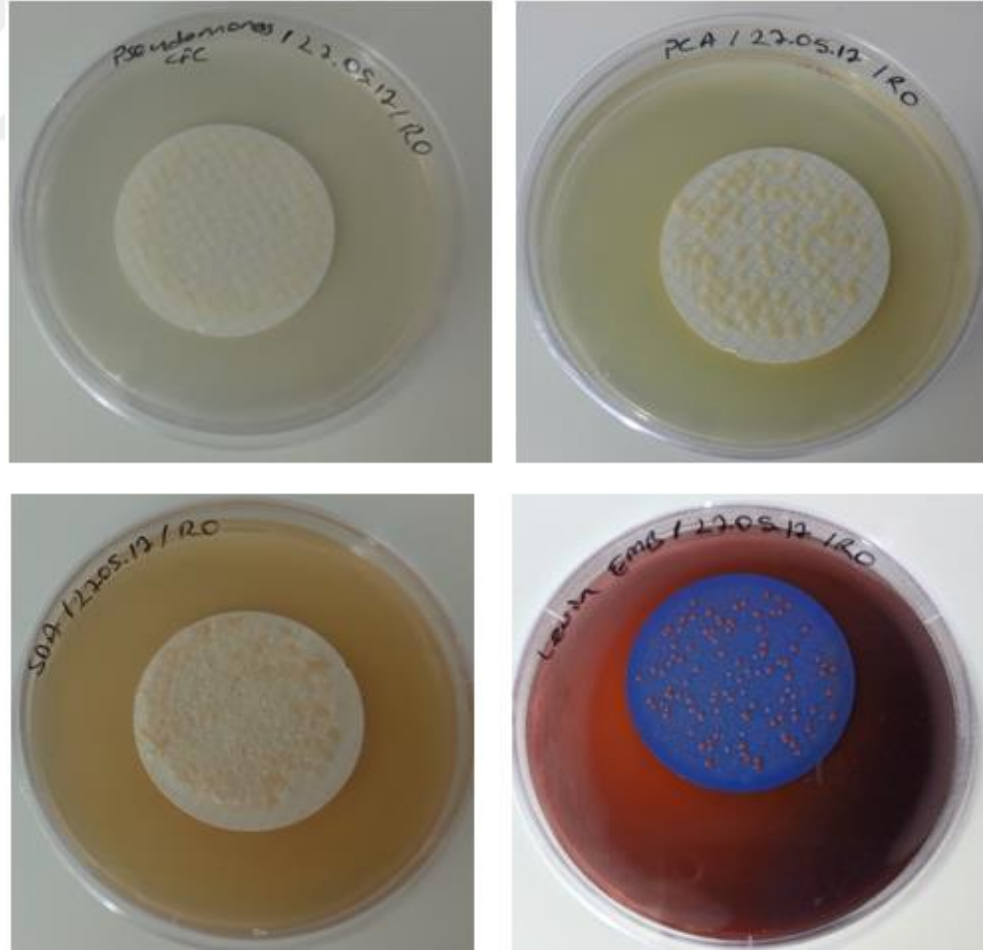
UC: Uncountable (sayılamayacak kadar çok)

EK 4 (Devamı)



Şekil 4.3. 27.05.2017 tarihinde karbon filtre çıkış noktasında alınan su örneklerine ait besiyeri üreme görüntüleri

EK 4 (Devamı)



Şekil 4.4. 27.05.2017 tarihinde revers ozmoz çıkış noktasında alınan su örneklerine ait besiyeri üreme görüntüleri

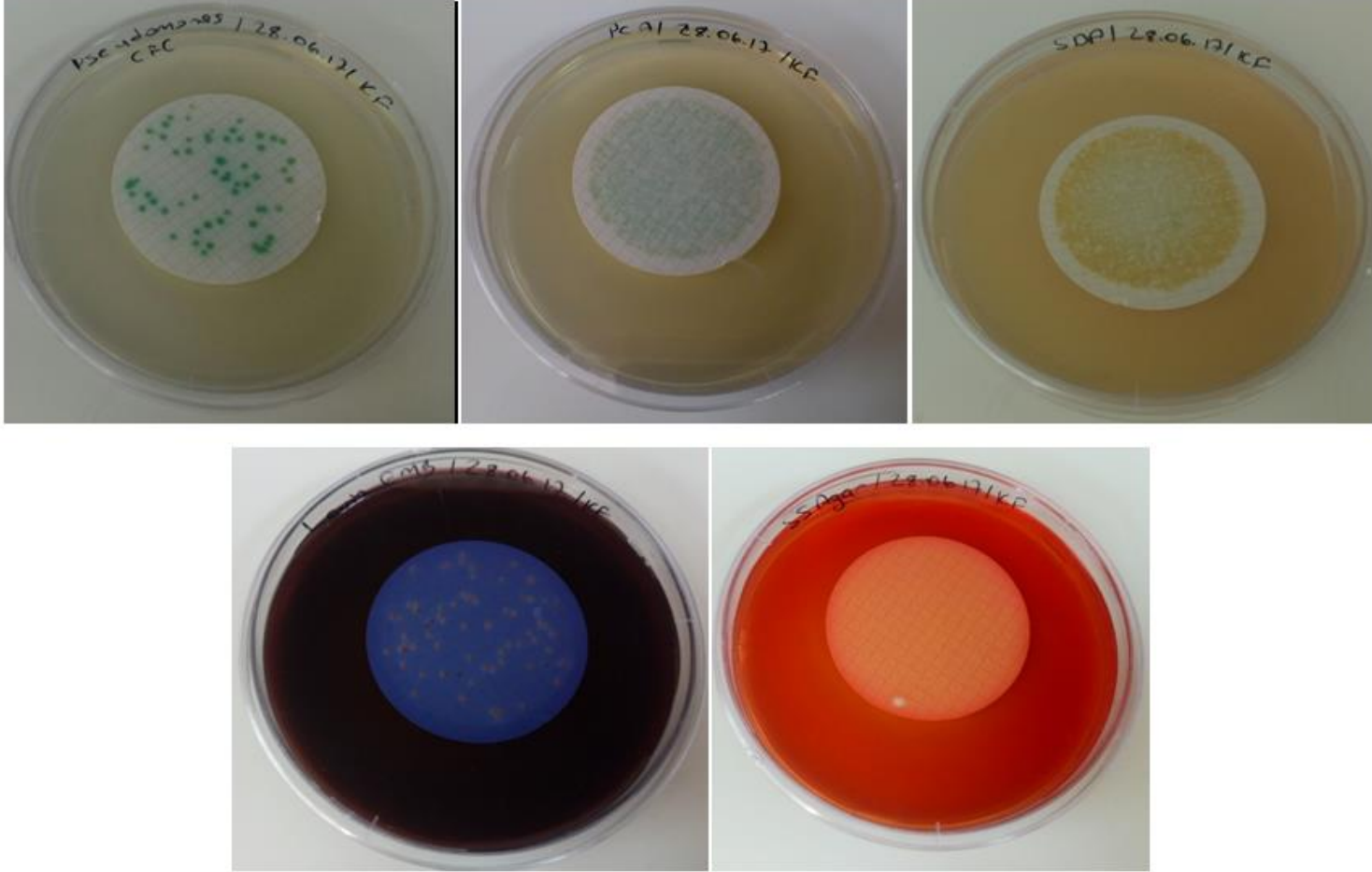
EK 4 (Devamı)

Çizelge 4.4. 28 Haziran 2017 de alınan su örneklerine ait sonuçlar

28 Haziran 2017 Çarşamba				
Şehir Şebeke Suyu Çıkış Noktası				
Besiyeri	Koloni Çeşitliliği	Koloni Sayısı (KOB/100 mL)	Besiyeri	Morfoloji
Levin EMB	1	30	45	Mor renkte, büyük, yuvarlak koloniler
	2	10	46	Pembe renkte, kenarları girintili, küçük koloniler
PCA Besiyeri	1	UC	41	Krem renkte, küçük yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	42	Sarı renkte, küçük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
SDA	3	UC	43	Beyaz, çokküçük, kenarları girintili mukoid koloniler
Karbon Filtre Çıkış Suyu Örneği				
Besiyeri	Koloni Çeşitliliği	Koloni Sayısı (KOB/100 mL)	Besiyeri	Morfoloji
Pseudomonas CFN/CN	1	53	52	Yeşil renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
Levin EMB	2	55	59	Büyük, açık pembe renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	3	UC	60	Mor renkte, küçük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
SDA	1	UC	50	Sarı renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	51	Krem renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
SS Agar	1	UC	57	Açık pembe, parlak koloniler
PCA Besiyeri	1	UC	54	Yeşil renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	55	Krem renkte, küçük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
Revers Osmoz Çıkış Noktası				
Besiyeri	Koloni Çeşitliliği	Koloni Sayısı (KOB/100 mL)	Besiyeri	Morfoloji
Pseudomonas CFN/CN	1	UC	61	Krem renkte, küçük, yuvarlak kenarlı mukoid koloniler
	2	16	67	Koyu sarı renkte, büyük, mukoid koloniler
	3	UC	53	Beyaz renkte, küçük, agar yüzeyine gömülü
SDA	1	UC	68	Beyaz renkte, kenarları girintili, mat koloniler
	2	12	62	Sarı renkte, büyük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	3	UC	69	Beyaz renkte, küçük, agar yüzeyine gömülü
Levin EMB	1	26	65	Açık pembe renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	66	Beyaz renkte, küçük, agar yüzeyine gömülü
PCA Besiyeri	1	7	63	Sarı renkte, büyük, dağınık, mukoid koloniler
	2	UC	64	Krem renkte, küçük, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	3	UC	56	Beyaz renkte, küçük, agar yüzeyine gömülü

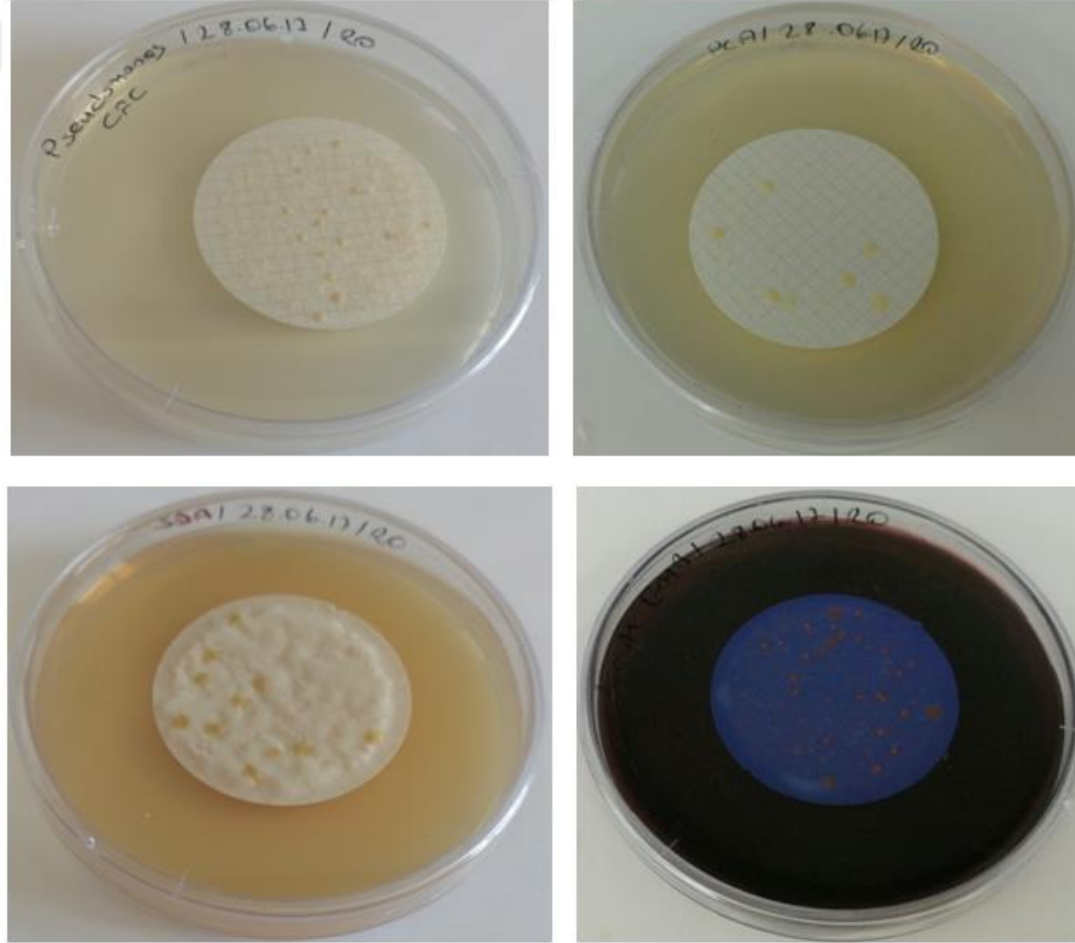
UC: Uncountable (sayılamayacak kadar çok)

EK 4 (Devamı)



Şekil 4.5. 28.06.2017 tarihinde karbon filtre çıkış noktasında alınan su örneklerine ait besiyeri üreme görüntüleri

EK 4 (Devamı)



Şekil 4.6. 28.06.2017 tarihinde revers ozmoz çıkış noktasında alınan su örneklerine ait besiyeri üreme görüntüleri

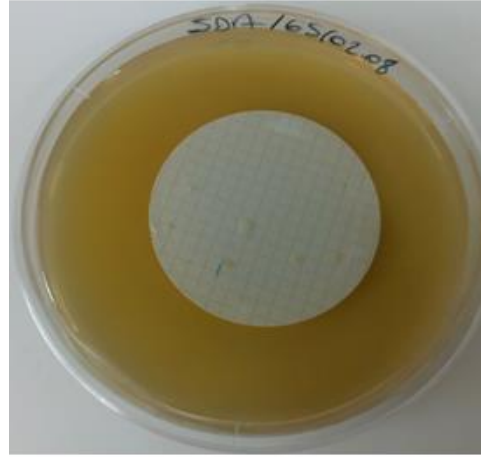
EK 4 (Devamı)

Çizelge 4.5. 2 Ağustos 2017 de alınan su örneklerine ait sonuçlar

02.08.2017 (revers osmoz membranı değiştirildikten sonra)				
Şehir Şebeke Suyu Çıkış Noktası				
Besiyeri	Koloni Çeşitliliği	Koloni Sayısı (KOB/100 mL)	Besiyeri	Morfoloji
SDA	1	2	71	Beyaz renkte,büyük, mukoid koloniler
	2	4	77	Krem- mat renkte, büyük, mukoid koloniler
Karbon Filtre Çıkış Suyu Örneği				
Besiyeri	Koloni Çeşitliliği	Koloni Sayısı (KOB/100 mL)	Besiyeri	Morfoloji
Pseudomonas CFN/CN	1	55	80	Yeşil renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
Levin EMB	1	30	75	Büyük pembe-bordo renkte renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
	2	UC	78	Açık pembe renkte, mukoid, küçük koloniler
SDA	1	UC	79	Krem renkte, yuvarlak kenarlık, mukoid koloniler
	2	UC	76	Sarı renkte, yuvarlak kenarlı, mukoid koloniler
SS Agar	1	30	70	Açık pembe, parlak, yuvarlak kenarlı mukoid koloniler
PCA Besiyeri	1	60	72	Krem renkte, alt zemini yeşil renkte, mukoid koloniler
	2	UC	73	Krem renkli, küçük ve yoğun koloniler
Revers Osmoz Çıkış Noktası				
Besiyeri	Koloni Çeşitliliği	Koloni Sayısı (KOB/100 mL)	Besiyeri	Morfoloji
Üreme olmadı				

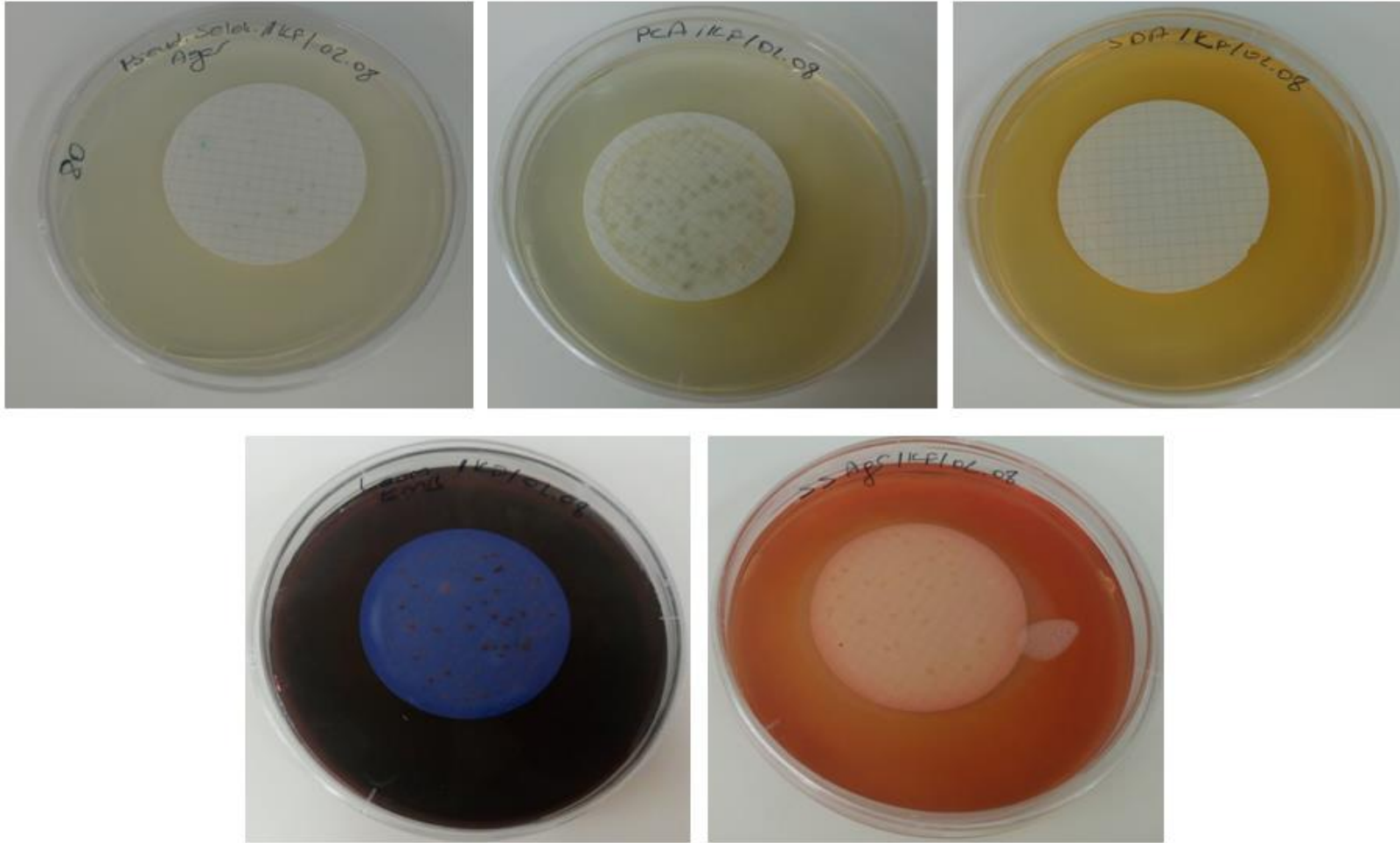
UC: Uncountable (sayılamayacak kadar çok)

EK 4 (Devamı)



Şekil 4.7. 02.08.2017 tarihinde giriş suyundan alınan su örneklerine ait besiyeri üreme görüntüleri

EK 4 (Devamı)

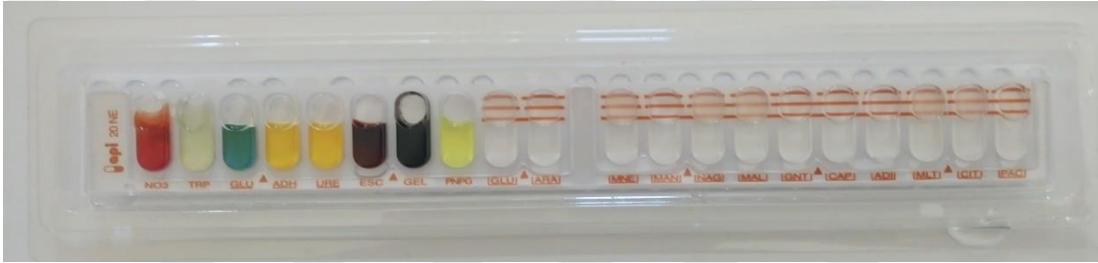


Şekil 4.8. 02.08.2017 tarihinde karbon filtre çıkış noktasında alınan su örneklerine ait besiyeri üreme görüntüleri

EK 5



Şekil 5.1. API 20NE test kitinde *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlanan izolata ait reaksiyon görünümü

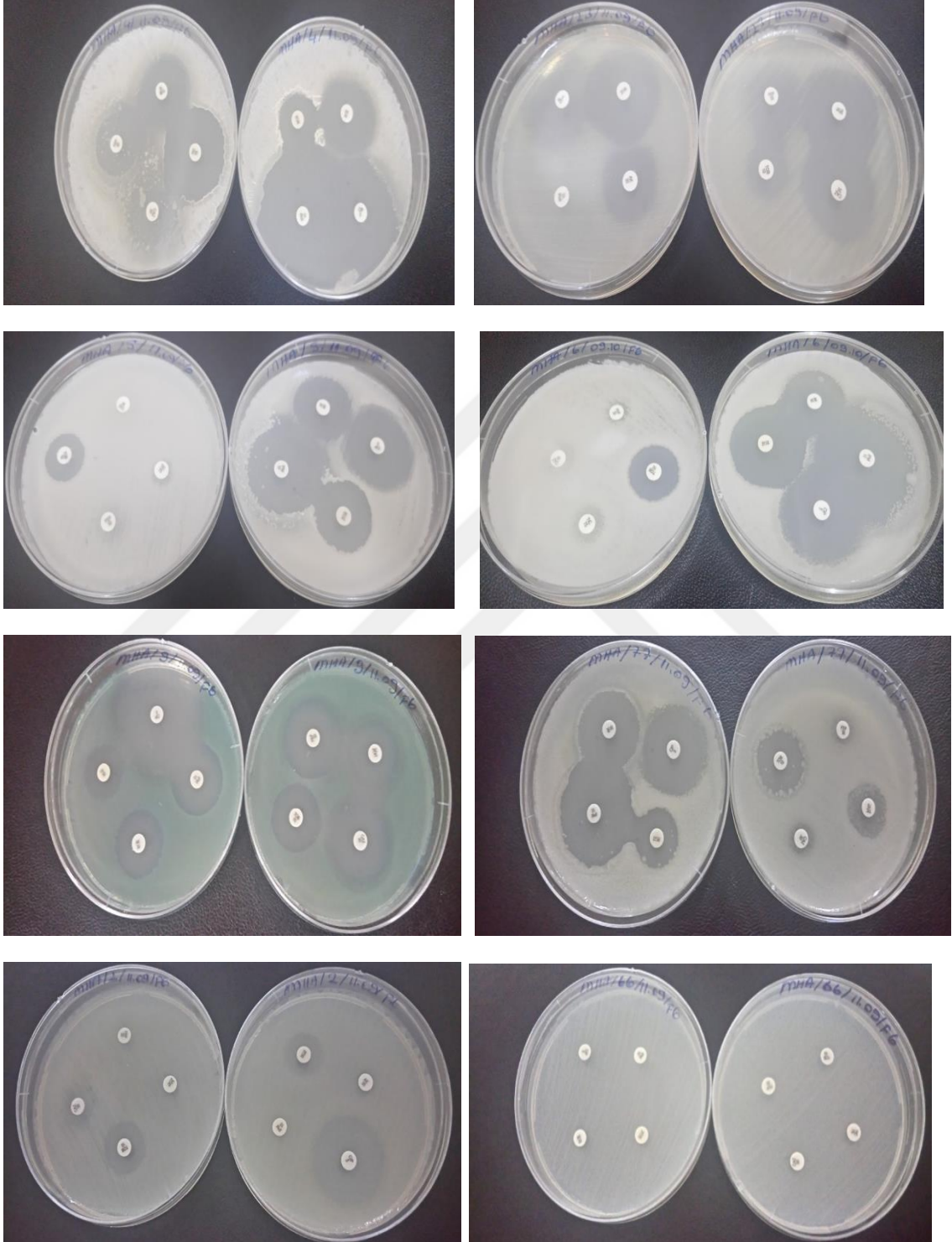


Şekil 5.2. API 20NE test kitinde *Stenotrophomonas maltophilia* olarak tanımlanan izolata ait reaksiyon görünümü



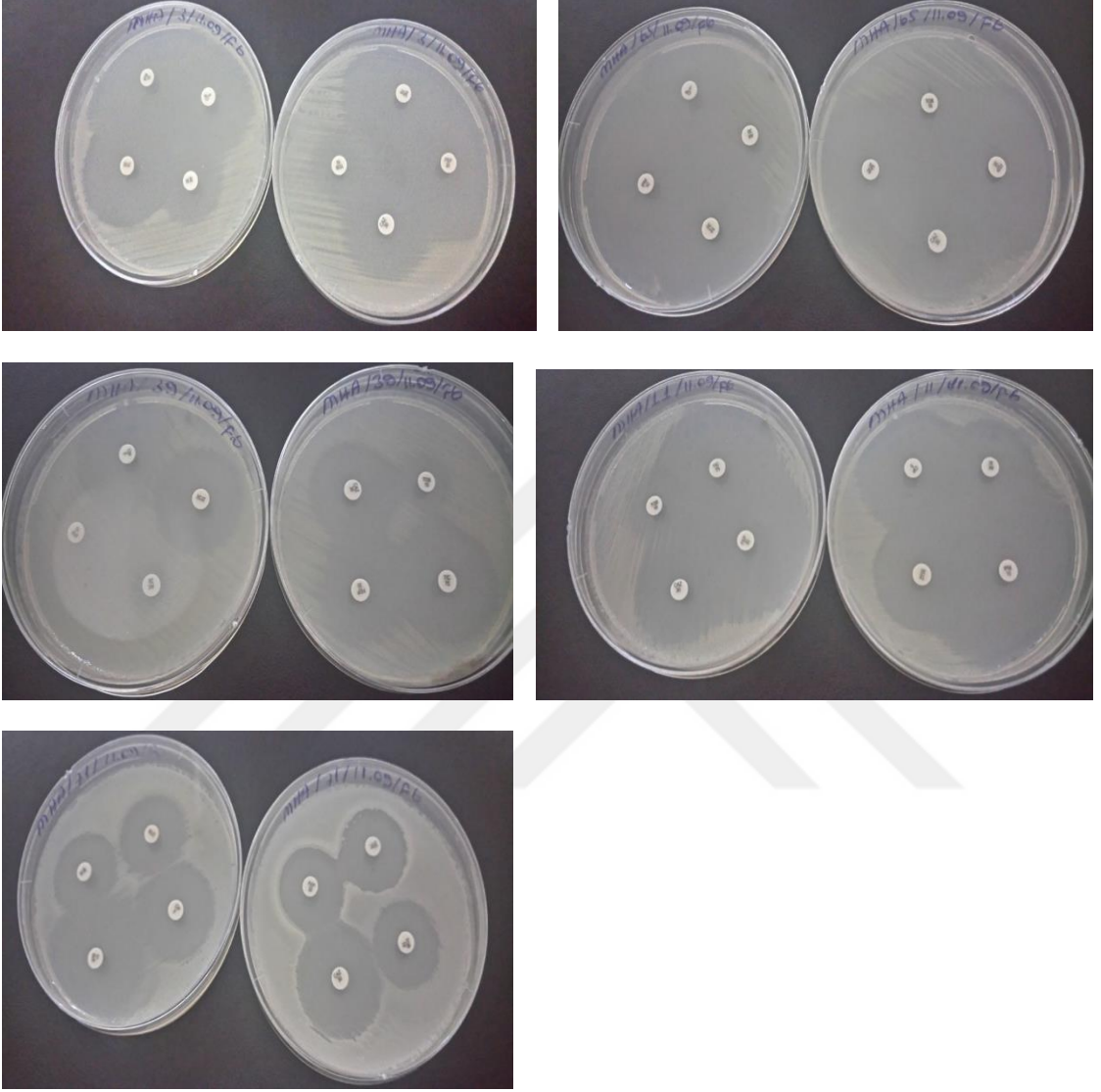
API 20NE test kitinde *Wautersia paucula* olarak tanımlanan izolata ait reaksiyon görünümü

EK 6



Şekil 6.1. İzolatların antibiyotik duyarlılık test görüntüleri

EK 6 (Devam)



Şekil 6.2. İzolatların antibiyotik duyarlılık test görüntüleri

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı-Soyadı : Fadime GÖKTAŞ
Doğum Tarihi ve Yer : 1985, Karaman
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dil : İngilizce
Telefon : 05077659385
e-mail : fadimeertap@kmu.edu.tr

EĞİTİM

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji ABD	2018
Lisans	Gazi Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu	2007
Lise	Karaman Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)	2003

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer	Görev
2007-2008	Meram Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi	Hemşire
2009-2012	Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi	Enfeksiyon Kontrol Hemşiresi
2012-	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi SHMY Diyaliz Programı	Öğretim Görevlisi