



**T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI**

THE MINISTRY OF HEALTH OF TURKEY  
REFİK SAYDAM NATIONAL PUBLIC HEALTH AGENCY

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

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 68 ■ Sayı/Number 2 ■ Yıl/Year 2011

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND  
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

## TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner  
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı adına  
On behalf of Refik Saydam National Public Health Agency

**Başkan Prof. Dr. Mustafa ERTEK**  
Prof. Dr. Mustafa ERTEK, President

### EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

### EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Demet CANSARAN-DUMAN  
Yavuz UYAR

### YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Sühendan ADIGÜZEL  
Canan BAYAR  
Fatih BAKIR  
Arsun ESMER  
Sibel KARACA  
Ayşe PEKER-ÖZKAN  
Özcan ÖZKAN  
Saime ŞAHİNÖZ  
Pınar ÜNAL  
Gerard A. van ZOELLEN

### TEKNİK YÖNETMEN / TECHNICAL MANAGER

Nevzat IŞIK

### TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Murat BAYRAM  
Murat DUMAN  
Hasan KAYA  
Zeynep KÖSEOĞLU  
Selahattin TAŞOĞLU

**REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI**  
**REFIK SAYDAM NATIONAL PUBLIC HEALTH AGENCY**  
**ANKARA-TÜRKİYE**

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

**Tasarım - Dizgi / Design - Editing :**  
RSHMB / RSNPHA  
Yayın ve Dokümantasyon  
Müdürlüğü / Department of  
Publication and Documentation

**Baskı ve Cilt / Press and Binding :**  
Alka Matbaacılık  
Kazım Karabekir Cad. No: 7/11 İskitler-Ankara  
Tel: 0312 342 30 28  
e-posta: alka.orhan@gmail.com

**Yayın Türü / Type of Publication :**  
Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication  
**Basım Tarihi / Date of Publication :**  
Haziran 2011 / June 2011

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

## TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

### BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Adil ALLAHVERDİYEV, Yıldız Tek. Üniv., Kimya Fak., İstanbul

Ahmet ÇARHAN, Türk Akreditasyon Kurumu, Ankara

Ahmet KART, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Akçahan GEPEĐREMEN, Abant İzzet Baysal Üniv., Tıp Fak., Bolu

Ali ALBAY, GATA, Ankara

Ali MİRAZİMİ, Swedish Inst. for Infect. Dis. Control, Sweden

Alper AKÇALI, 18 Mart Üniv., Tıp Fak., Çanakkale

Anna PAPA, Aristotle Univ., Medical School, Thessaloniki, Greece

Aşkın YAŞAR, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

Ayhan FİLİZİ, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

Aykut ÖZKUL, Ankara Üniv., Vet Fak., Ankara

Ayşen GÜNEL-ÖZCAN, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Aziz SANCAR, Univ. North Carolina, Dep Bipchem & Biophysics, USA

Bahadır GÖNENÇ, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

Banu ÇAKIR, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Berrin ESEN, RSHMB, Ankara

Bülent ALTEN, Hacettepe Üniv., Fen Fak., Ankara

Celal GÖKÇAY, ODTÜ, Çevre Müh., Ankara

Çağatay GÜLER, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Daniel MOTLHANKA, Botswana College of Agriculture, Botswana

Delia Teresa SPONZA, Dokuz Eylül Üniv., Çevre Müh., İzmir

Diler ASLAN, Pamukkale Üniv., Tıp Fak., Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara Eğ. & Arş. Hast., Ankara

Dürdal US, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Dwight D. BOWMAN, Cornell Univ., College of Vet. Med., USA

Ender YARSAN, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

Fatih KÖKSAL, Çukurova Üniv., Tıp Fak., Adana

Gönül ŞAHİN, Hacettepe Üniv., Eczacılık Fak., Ankara

Gülberk UÇAR, Hacettepe Üniv., Eczacılık Fak., Ankara

Gülnur TARHAN, Ahievran Üniv., Sağlık MYO, Kırşehir

Hakan LEBLEBİCİOĞLU, 19 Mayıs Üniv., Tıp Fak., Samsun

Haluk VAHABOĞLU, Kocaeli Üniv., Tıp Fak., Kocaeli

Hürrem BODUR, Numune Eğ. & Arş. Hast., Ankara

İşıl MARAL, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara

Iva CHRISTOVA, NCIPD, Sofia, Bulgaria

İ.Mehmet Ali ÖKTEM, Dokuz Eylül Üniv., Tıp Fak., İzmir

İrfan EROL, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

İsmail CEYHAN, RSHMB, Ankara

Johan LINDH, Swedish Ins. for Infections Dis. Cont., Sweden

Kosta Y. MUMCUOĞLU, Hebrew Univ., Hadassah Med. Sch. Israel

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

## TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

### BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Levent AKIN, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Mahinur AKKAYA, ODTÜ, Kimya Müh., Ankara

Manfred WEIDMANN, Göttingen Univ., Virology Ins., Germany

Mehmet Ali ONUR, Hacettepe Üniv. Fen Fak., Ankara

Metin KORKMAZ, Ege Üniv., Tıp Fak., İzmir

Mithat ŞAHİN, Kafkas Üniv., Vet. Fak., Kars

Murat DİZBAY, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara

Murat GÜLMEZ, Kafkas Üniv., Vet. Fak., Kars

Murat GÜNAYDIN, 19 Mayıs Üniv., Tıp Fak., Samsun

Murat HÖKELEK, 19 Mayıs Üniv., Tıp Fak., Samsun

Murat ÖZSAN, Ankara Üniv., Tıp Fak., Ankara

Mustafa KAVUTÇU, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara

Mükerrem KAYA, Atatürk Üniv., Ziraat Fak., Erzurum

Nazmi ÖZER, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Nilay ÇÖPLÜ, RSHMB, Ankara

Nur Münevver PINAR, Ankara Üniv., Fen Fak., Ankara

Oğuz GÜRSOY, Pamukkale Üniv., Gıda Müh., Denizli

Orhan BAYLAN, GATA, Ankara

Orhan YILMAZ, KBB, Dışkapı Eğ. & Arş. Hast., Ankara

Osman GÜNAY, Erciyes Üniv., Tıp Fak., Kayseri

Paul HEYMAN, Queen Astrid Military Hospital, Belgium

Pauline MWINZI, Medical Research Inst., Kenya

Pınar OKYAY, Adnan Menderes Üniv., Tıp Fak., Aydın

Rahmet ÇAYLAN, Atatürk Eğ. & Arş. Hast., Ankara

Recep AKDUR, Ankara Üniv., Tıp Fak., Ankara

Recep ÖZTÜRK, İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., İstanbul

Rıza DURMAZ, İnönü Üniv., Tıp Fak., Malatya

Roberto Canete VILLAFRANCA, Centre for Hygiene, Cuba

S. Aykut AYTAÇ, Hacettepe Üniv. Gıda Müh., Ankara

Sami AYDOĞAN, Erciyes Üniv., Tıp Fak., Kayseri

Sema BURGAZ, Gazi Üniv., Eczacılık Fak., Ankara

Sercan ULUSOY, Ege Üniv., Tıp Fak., İzmir

Sıraç DİLBER, Karolinska Univ., Medical School, Sweden

Suzan ÖZTÜRK-YILMAZ, Sakarya Üniv., Müh. Fak., Sakarya

Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Celal Bayar Üniv., Tıp Fak., Manisa

Takashi AKAMATSU, Prof. Emeritus, Japan

Tevfik PINAR, Kırıkkale Üniv., Tıp Fak., Kırıkkale

Yesim ÖZBAŞ, Hacettepe Üniv. Gıda Müh., Ankara

Yeşim ÇETİNKAYA-ŞARDAN, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Yeşim TUNÇOK, Dokuz Eylül Üniv., Tıp Fak., İzmir

Zafer KARAER, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

## TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

Dergide yayınlanmak üzere gönderilen makaleler, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yazım kurallarına göre hazırlanmalıdır. Başvurular [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org) adresinden "Çevrimiçi Makale Gönder, Takip Et, Değerlendir Programı" aracılığıyla online olarak yapılabilir.

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallar aranır:

1- "Telif hakkı devir formu" (Copyright Release Form) tüm yazarlarca imzalanarak onaylandıktan sonra Dergimize iletilmelidir. Bu forma [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org) adresinden ulaşılabilir.

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

a) Yazının başlığı kısa olmalı ve büyük harfle yazılmalıdır.  
b) Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.  
c) Akademik unvan kullanılmadan meslek unvanı belirtilebilir.  
d) Makale birden fazla yazar tarafından yazılmış ise, aynı üniteye çalışan yazarların kurumlarının sıralaması göz önünde bulundurulacak soyadları sonuna numara verilmelidir (Örnek; Duman 1, Yılmaz 2, Çetin 1, .....).

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

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

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

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

5- Metin içerisinde bahsedilen birimlerin sembolleri "The Systême International" (SI)'e göre verilmelidir.

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

7- A4 kağıtların yalnız bir yüzü kullanılmalı, her bir kenarlarından 2,5'ar cm boşluk bırakılmalıdır. 12 punto, "Times New Roman" yazı karakteri ve iki satır aralığı (double space) kullanılmalıdır.

8- Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, yazarlardan araştırma ve yayın etiğine uyumlu olunmasını istemektedir. İnsan araştırmalarında, çalışmaya katılanlardan bilgilendirilmiş olurun (yazılı veya sözlü) alındığının gereç ve yöntem bölümünde belirtilmesi gerekmektedir. Gönüllü ya da hastalara uygulanacak prosedürlerin özelliği tümüyle anlatıldıktan sonra, kendilerinin bilgilendirilip onaylarının alındığını gösterir bir cümle bulunmalıdır. Yerel etik kurullarına sahip olmayan yazarlar, Helsinki Bildirgesinde ([www.wma.net/e/policy/pdf/17c.pdf](http://www.wma.net/e/policy/pdf/17c.pdf)) ana hatlarını çizen ilkeleri izlemelidirler. Yazarlar, bu tür bir çalışma söz konusu olduğunda, uluslararası alanda kabul edilen kılavuzlara ve "İlaç Araştırmaları Hakkında Yönetmelik" ve daha sonra yayınlanan diğer yönetmelik ve yazılarda belirtilen hükümlere uyulduğunu belirtmeli ve kurumdan aldıkları "Etik Kurul Onayı"nı göndermelidirler.

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

10- Hasta kimliğini tanıttak fotoğraf kullanıldığında, hastanın yazılı onayı gönderilmelidir.

11- Makale yazımında dikkat edilecek hususlar şunlardır:

a) **Araştırma yazıları;** Türkçe Özet, İngilizce Özet, Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Kaynaklar bölümlerinden oluşmalıdır. Bu bölümler, sola yaslanacak şekilde büyük harflerle katın yazılmalıdır. İngilizce makalelerde Türkçe Başlık ve Özet bulunmalıdır.

**Türkçe Özet:** Amaç, Yöntem, Bulgular ve Sonuç alt başlıklarından oluşmalıdır (yapılandırılmış özet) ve en az 250, en fazla 400 sözcük içermelidir. Kısa raporlarda sözcük sayısı en az 100, en fazla 200 olmalıdır.

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

**Anahtar Sözcükler:** Türkçe ve İngilizce özetlerin altında verilmelidir. Anahtar kelime sayısı 3-8 arasında olmalı ve Tıp Konuları Başlıkları (Index Medicus Medical Subject Headings-MeSH)'nda yer alan sözcükler kullanılmalıdır. MeSH için şu internet adresine başvurulabilir: [www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html](http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html)

**Giriş:** Araştırmanın amacı, benzer çalışmalarla ilgili literatür bilgisi kısaca sunulmalı ve iki sayfayı aşmamalıdır.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırmanın gerçekleştirildiği kuruluş ve tarih belirtilmeli, araştırmada kullanılan araç, gereç ve yöntem açıkça sunulmalıdır. İstatistiksel yöntemler açıkça belirtilmelidir.

**Bulgular:** Sadece elde edilen bulgular açık bir şekilde belirtilmelidir.

**Tartışma:** Bu bölümde, araştırmanın sonunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulgularıyla karşılaştırılmalıdır. Araştırmacı, kendi yorumlarını bu bölümde aktarmalıdır.

**Teşekkür Bölümü:** Teşekkür bölümü, ana metnin sonunda kaynaklardan hemen önce yer almalı ve bir paragrafı geçmemelidir.

**Kaynaklar:** Yazarlar kaynakların eksiksiz ve doğru yazılmasından sorumludur. Kaynaklar, metnin içinde geçiş sırasına göre numaralandırılmalıdır. Numaralar, parantez içinde cümle sonlarında verilmelidir. Kaynakların yazılımı ile ilgili aşağıda örnekler verilmiştir. Daha detaylı bilgi için "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997; 277: 927-934) (<http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>) bakılmalıdır.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

b) **Derleme türü yazılarda;** tercihen yazar sayısı ikiden fazla olmamalıdır. Yazar(lar) daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olmalı; bu deneyimlerini derleme yazısında tartışmalı ve kaynak olarak göstermelidir. Derlemelerde Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet (en az 250, en fazla 400 sözcük içermelidir) ve anahtar sözcükler bulunmalıdır.

c) **Olgu sunumlarında;** metin yedi sayfayı, kaynak sayısı 20'yi aşmamalıdır. Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet (en az 100, en fazla 200 sözcük) ve anahtar sözcükler ayrıca giriş, olgu ve tartışma bölümleri bulunmalıdır.

d) Daha önce yayınlanmış yazılara eleştiri getirmek, katkıda bulunmak ya da bilim haberi niteliği taşıyacak bilgilerin iletilmesi amacıyla yazılan yazılar, Yayın Kurulunun inceleme ve değerlendirmesinin ardından "Editöre Mektup" bölümünde yayınlanır. Bu yazıların bir sayfayı aşmaması ve en fazla beş kaynakla desteklenmesi gerekmektedir.

12- Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

13- Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi  
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı  
Yayın ve Dokümantasyon Müdürlüğü

Tel : (0312) 458 23 64

Faks : (0312) 458 24 08

e-posta : [turkhijyen@rshm.gov.tr](mailto:turkhijyen@rshm.gov.tr)

## WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Articles should be prepared according to the writing rules of the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology. Submissions can be made online at the address [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org) through the "Online Manuscript Submission, Track, Evaluation Program".

Manuscripts are sought according to the following rules:

1- The "Copyright transfer form" (Copyright Release Form) should be sent to the Journal and signed by all authors. This form can be downloaded from [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org)

2- The title page should consist of the article title, English title, short title, author name(s), names of the institutions and the departments of the authors, full address, telephone numbers (fixed and mobile) and mail address of the correspondence author:

- The title should be short and in capital.
- The short title should not exceed 40 characters.
- Occupational titles can be stated without the use of academic titles.
- If the article is written by multiple authors and the authors working in the same Department, than according to their institutional orders, numbers should be given after their surname (e.g., Duman1, Yılmaz2, Çetin1, .....).
- Studies supported by a fund or organisation must be mentioned in a footnote or in the acknowledgements.
- Articles presented in a conference / symposia must be mentioned with the type of presentation in footnotes or in the acknowledgements.

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

4- Latin names of microorganisms used for the first time in the text have to be written in full. If these names are used later, they should be abbreviated in accordance to international rules. The original Latin names of microorganisms should be written in Italic: for example, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*. Genus names like staphylococcus and streptococcus that had settled into our language can be written in Turkish. Names of antibiotics should be written as they are read in terms of language integrity. Names of antibiotics should be abbreviated in accordance with international standards.

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

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

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

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

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

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

11- When writing an article the following items should be considered:

a) Research papers should consist of Turkish abstract, English abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and References section. These sections should be written in bold capital letters and aligned left. English articles should have a Turkish abstract and title in Turkish.

Turkish abstracts should be structured and consist of subheadings (Objective, Methods, Results and Conclusion) and at least have 300 words, and should contain no more than 500 words.

English abstract: The title should be in English, and structured like the Turkish abstract (Objective, Methods, Results, and Conclusion).

Key words should be given under Turkish and English.

The number of keywords should be between 3-8 and the terminology of the Medical Subjects Headings (Index Medicus Medical Subject Headings-MeSH) should be used. These MeSH terms can be found at the following Internet address: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>

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

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

**Results:** The findings should be stated clearly.

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

Acknowledgements should be placed at the end of the main text and before the references, and should not exceed more than one paragraph.

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

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

• Example of standard journal article: Demirci M, Celebrity M, Sahin U. A case of hydatid cyst diagnosed by kinyoun staining of lung bronco-alveolar fluid. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2001; 25 (3): 234-5.

• Example of an article with authors unknown: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J*, 1981; 283:628.

• Example of journal supplement: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: Demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood*, 1979; 54 (Suppl 1): 26a.

**Books:** Surname of the author(s) initial name(s) of author(s). The name of the book. The edition number. Place of publication: Publisher, Publication year.

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

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

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

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

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

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

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

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

b) In reviews, it is preferred to have not more than two authors. Author(s) must have done research and published articles previously on this subject; they should discuss their experience and use as reference in the review. Reviews should have Turkish and English titles, abstracts and key words.

c) Case reports should have a maximum of seven pages of text and the number of references should not exceed 20. Case report should have a Turkish and English title, abstract, keyword(s) and also introduction, case description and discussion sections should be given.

d) Letters written to make criticisms, contributions or to give news related to previously published articles will be published in the "Letters to the Editor" section after review and assessment of the Editorial Board. Letters should not exceed one page of text and must be supported with up to five references.

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology  
Refik Saydam National Public Health Agency  
Department of Publication and Documentation

Tel : +90 312 458 23 64 Fax : +90 312 458 24 08 e-mail : [turkhijyen@rshm.gov.tr](mailto:turkhijyen@rshm.gov.tr)

# TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

## YAYIN İLKELERİ

- Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı yayın organıdır. Dergi üç (3) ayda bir çıkar ve dört (4) sayıda bir cilt tamamlanır.
- Dergide mikrobiyoloji, immünoloji, farmakoloji, toksikoloji, parazitoloji, entomoloji, biyokimya, gıda güvenliği, çevre sağlığı, halk sağlığı, epidemiyoloji, patoloji, fizyopatoloji, moleküler biyoloji ve genetik ile ilgili alanlardaki özgün araştırma, olgu sunumu, derleme, editöre mektup türündeki makaleler Türkçe ve İngilizce olarak yayımlanır.
- Dergide, daha önce başka yerde yayınlanmamış ve yayınlanmak üzere başka bir dergide inceleme aşamasında olmayan makaleler yayımlanır.
- Dergi Yayın Kurulu ve Bilimsel Danışma Kurulu tarafından uygun görülen yazılar, konu ile ilgili en az iki Bilimsel Danışma Kurulu Üyesinden olumlu görüşü alındığında yayımlanmaya hak kazanır. Bu kurulların, yazının içeriğini değiştirmeyen her türlü düzeltme ve kısaltmaları yapma yetkileri vardır.
- Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlarına aittir.
- Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.
- Dergide yayınlanan yazıların yayın hakkı Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne aittir. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

## YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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



## EDITORIAL POLICY

- The Turkish Journal of Hygiene and Experimental Biology, is a publication of the Refik Saydam National Public Health Agency. The Journal is published every other three months and one volume consist of four numbers.
- The journal publishes microbiology, immunology, pharmacology, toxicology, parasitology, entomology, biochemistry, food safety, environmental health, public health, epidemiology, pathology, pathophysiology, molecular biology and genetics in the field of original research, case reports, reviews, and letters to the editor. Articles are published in Turkish and English.
- Articles which are not previously published in another journal or are not currently under evaluation elsewhere can be published in the journal.
- Articles approved by the Scientific Committee and Editorial Board are eligible to be released when received at least two positive opinions from the Scientific Committee members. Those committees have the authority to make all corrections and abbreviations but not to change the content of the article.
- The authors have the all the scientific and legal responsibilities of the articles.
- The authors should obey the ethics of research and publication.
- The copyright of the article published in the Bulletin of Experimental Hygiene belongs to the Journal. Copyright fee is not paid to the authors.

## CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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



Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne  
[www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org) adresinden online olarak makale gönderilebilir.

Submissions can be made online at the address [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org) to  
Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi;

CABI Index



Ulrichsweb and  
Serials Solutions



Chemical Abstracts  
Service (CAS)



TURK MEDLINE



DOAJ



Türkiye Atıf Dizini



Index Copernicus



Genamics  
JournalSeek



Google Scholar



NewJour



Open J-Gate



TUBİTAK-ULAKBİM



tarafından dizinlenmektedir.

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (Türk Hij Den Biyol Derg) is indexed in CAB Abstracts, Index Copernicus, Google Scholar, DOAJ (Directory of Open Access Journals), Open J-Gate, CAS (Chemical Abstracts Service), Ulrichsweb and Serials Solutions, NewJour, Genamics JournalSeek, TUBİTAK-ULAKBİM, TÜRKİYE ATIF DIZINI and TURK-MEDLINE.

## İLETİŞİM

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi  
Yayın ve Dokümantasyon Müdürlüğü

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 06100 Sıhhiye/ANKARA  
Tel: 0312 458 23 64 [http: www.rshm.gov.tr](http://www.rshm.gov.tr)  
Faks: 0312 458 24 08 e-posta: [turkhijyen@rshm.gov.tr](mailto:turkhijyen@rshm.gov.tr)

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

## CORRESPONDENCE

Refik Saydam National Public Health Agency  
Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology  
Department of Publication and Documentation

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 06100 Sıhhiye/ANKARA-TURKEY  
Tel: +90 0312 458 23 64 [http: www.rshm.gov.tr](http://www.rshm.gov.tr)  
Fax: +90 0312 458 24 08 e-mail: [turkhijyen@rshm.gov.tr](mailto:turkhijyen@rshm.gov.tr)

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



### ■ Araştırma Makalesi

- 1. *Agaricus sylvaticus* mantarının besin takviyesi olarak kemoterapi gören meme kanserli hastaların hematolojik ve bağışıklık sistemine etkisi** 59 - 72  
Fabiana VALADARES, Maria Rita Carvalho Garbi NOVAES, Roberto Cañete VILLAFRANCA, Marília da Cunha MENEZES, Mariana Campos REIS, Daniella Rodrigues GONÇALVES
- 2. Çiğ süt ve peynir örneklerinden *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocokların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığı** 73 - 78  
Nihal YÜCEL, Yeliz ANIL
- 3. Tokat ili Erbaa Devlet Hastanesine başvuran kene tutunması olgularının değerlendirilmesi** 79 - 84  
İbak GÖNEN
- 4. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının antibiyotik direnci** 85 - 92  
Murat ARAL, Nuriye İsmihan Ece PAKÖZ, İbrahim ARAL, Serpil DOĞAN

### ■ Olgu Sunumu

- 5. Alt göz kapağında şarbon** 93 - 96  
Recep TEKİN, Mustafa Kemal ÇELEN, Vuslat BOŞNAK, İhsan ÇAÇA, Celal AYAZ

### ■ Derleme

- 6. Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri** 97 - 104  
Zeki ARAS
- 7. Su kalitesinin iyileştirilmesinde ozon kullanımı ve kimyasal etkileri** 105 - 113  
Sibel UZUN

## CONTENTS

### ■ Original Article

1. Effect of dietary supplementation with *Agaricus sylvaticus* fungus on the hematology and immunology systems of breast cancer patients undergoing chemotherapy 59 - 72

Fabiana VALADARES, Maria Rita Carvalho Garbi NOVAES, Roberto Cañete VILLAFRANCA, Marília da Cunha MENEZES, Mariana Campos REIS, Daniella Rodrigues GONÇALVE

2. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from raw milk and cheese samples 73 - 78

Nihal YÜCEL, Yeliz ANIL

3. Evaluation of tick bite cases admitted to the Erbaa State Hospital in Tokat Province 79 - 84

İbak GÖNEN

4. Antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from various clinical samples 85 - 92

Murat ARAL, Nuriye İsmihan Ece PAKÖZ, İbrahim ARAL, Serpil DOĞAN

### ■ Case Report

5. Anthrax on lower eyelid 93 - 96

Recep TEKİN, Mustafa Kemal ÇELEN, Vuslat BOŞNAK, İhsan ÇAÇA, Celal AYAZ

### ■ Review

6. Rapid diagnostic methods in microbiology 97 - 104

Zeki ARAS

7. Use of ozone for improving of water quality and its chemical effects 105 - 113

Sibel UZUN

# Effect of dietary supplementation with *Agaricus sylvaticus* fungus on the hematology and immunology systems of breast cancer patients undergoing chemotherapy

## *Agaricus sylvaticus* mantarının besin takviyesi olarak kemoterapi gören meme kanserli hastaların hematolojik ve bağışıklık sistemine etkisi

Fabiana VALADARES<sup>1</sup>, Maria Rita Carvalho Garbi NOVAES<sup>2</sup>, Roberto Cañete VILLAFRANCA<sup>3</sup>  
Marília da Cunha MENEZES<sup>4</sup>, Mariana Campos REIS<sup>4</sup>, Daniella Rodrigues GONÇALVES<sup>4</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Kanser hastaları hastalığın seyri sırasında immünolojik ve hematolojik değişimler gelişmesine eğilimlidir. Tıbbi mantarlar, prognozda iyileşme ve fizyolojik yanıtı artırıcı etkiyle bağışıklık ve hematopoetik sistemleri uyarabilirler. Bu çalışmada *Agaricus sylvaticus* ile besin takviyesi sonrası kemoterapi gören meme kanserli hastalardaki hematolojik ve immünolojik parametrelerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Randomize seçilmiş, çift-kör, plasebo kontrollü bir çalışma uygulanmıştır. 46 hastaya (grup II ve III) rastgele olarak ya plasebo ya da besin kaynağı olarak *A. sylvaticus* (2,1 g/gün) verilmiştir. Hastalara 3 doz (n=26) ve 6 doz kemoterapi uygulanmış, klinik ve laboratuvar değerlendirmeleri yapılmıştır. Çalışma sonuçları Microsoft Excel 2003 ve R-version 2.11.1 kullanılarak analiz edilmiş ve p<0.05 olduğunda sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

**Bulgular:** *A. sylvaticus* grubunun hematokrit (p=0.04), kırmızı kan hücresi sayısı (p=0.03), ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu (p=0.001), lökosit, monosit (p=0.001) ve total lenfosit sayısı (p=0.009)'nda artış görülmüştür. Bu gruptaki

### ABSTRACT

**Objective:** Patients with cancer tend to develop hematological and immunological alterations during the disease process. Medicinal fungi can stimulate the immune and hematopoietic systems, promoting improvements in the prognosis and physiological response. In this trial it is aimed to evaluate changes in hematological and immunological parameters in patients with breast cancer undergoing chemotherapy after dietary supplementation with *Agaricus sylvaticus*.

**Method:** A randomized, double-blind, placebo-controlled study was carried out. 46 patients (stadiums II and III), were randomly assigned to receive either: nutritional supplement with *A. sylvaticus* (2.1 g/day) or placebo. Patients received three cycles (n=26) and six cycles (n=20) of chemotherapy. Clinical and laboratory evaluations were performed. The results were analyzed using Microsoft Excel 2003 and R-version 2.11.1, significant results at p≤ 0.05.

**Results:** The *A. sylvaticus* group showed an increase of hematocrits (p=0.04), red blood count (p=0.03), mean corpuscular hemoglobin concentration (p=0.001), leukocytes (p=0.03), monocytes (p=0.001), and total lymphocyte count (p=0.009) after three months. Those

<sup>1</sup> Clinical Nutrition Institute. University of Brasília - DF, BRAZIL

<sup>2</sup> School of Medicine. Institute of Health Science- ESCS; University of Brasília - DF, BRAZIL

<sup>3</sup> Centre for Hygiene, Epidemiology and Microbiology. Matanzas City, CUBA Cuban Institute of Gastroenterology. Havana City, CUBA

<sup>4</sup> School of Medicine. Institute of Health Science- ESCS

İletişim / Corresponding Author : Maria Rita Garbi NOVAES

SHIS-QI-09-conj. 06- cs 14- Lago Sul, Brasília- DF, BRAZIL

Tel : +90 537 832 55 94

E-posta / E-mail : ritanovaes@ig.com.br

Geliş Tarihi / Received : 13.12.2010

Kabul Tarihi / Accepted : 25.03.2011

değişiklikler plasebo grubunda gözlenmemiştir. 6 ay sonra da *A. sylvaticus* alan hastalar total lenfosit sayısı (TLC) ( $p=0.02$ ), nötrofil ( $p=0.02$ ), lenfosit ( $p=0.02$ ), lökosit ( $p=0.02$ ), korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu ( $p=0.02$ ), hematokrit ( $p=0.02$ ), hemoglobin ( $p=0.02$ ) ve kırmızı kan hücresi ( $p=0.02$ ) düzeyinde artış göstermiştir. Plasebo grubu TLC ( $p=0.01$ ) ve bazofil ( $p=0.005$ ) ve lökosit ( $p=0.004$ )'lerde azalma göstermiştir.

**Sonuç:** Çalışma sonuçları kemoterapi alan meme kanserli hastalarda *A. sylvaticus*'un besin takviyesi olarak alınımının faydalı olacağını önermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Hematolojik sistem, immun sistem, kemoterapi, *A. sylvaticus*

changes were not observed in the placebo group. After six months, patients receiving *A. sylvaticus* showed increased levels of red blood count ( $p=0.02$ ), hemoglobin ( $p=0.02$ ), hematocrits ( $p=0.02$ ), corpuscular hemoglobin concentration ( $p=0.02$ ), leukocytes ( $p=0.02$ ); lymphocytes ( $p=0.02$ ), neutrophils ( $p=0.02$ ) and TLC ( $p=0.02$ ). The placebo group showed a reduction in leukocytes ( $p=0.004$ ), basophiles ( $p=0.005$ ) and TLC ( $p=0.01$ ).

**Conclusion:** The results suggest the usefulness of dietary supplementation with *A. sylvaticus* in patients with breast cancer undergoing chemotherapy.

**Keywords:** Hematological system, immune system, Chemotherapy, *A. sylvaticus*

## INTRODUCTION

Breast cancer is the most prevalent malignant cancer among women worldwide. Based on confidence data from the Brazilian Ministry of Health the experts estimate the existence of more than 49.000 new cases in Brazil annually both 2010 and 2011. Urbanization, increasing access to education and, health care is directly associated with improvement of breast cancer notification and management (1-3).

It is well known that treatment for breast cancer is complex and varies according to the histological diagnosis, age, clinical management, treatment, surgery and staging of the disease (4-6). Factors associated with tumor growth and chemotherapy can cause functional damage mainly in the hematological and immune systems of this patients.

It is important, additionally, to consider the side effects caused by conventional cancer treatments because could reduce significantly the caloric intake and absorption of nutrients, complicating treatment and reducing quality of life (7-11).

Chemotherapy is a treatment method widely used to treat breast cancer. The therapy aims at striking cell populations in different phases of the cell cycle, interfering with the reproduction, eliminating the hidden spread of the disease. However, during

treatment, chemotherapy can also destroy normal cells and cause serious side effects (7-8).

The most serious complication of chemotherapy is bone marrow suppression, with consequent worsening of hematological and immunological patterns that lead to systemic infection, coagulation disorders, amenorrhea and ovarian failure (6-11).

Different studies have suggested that the *Agaricus sylvaticus* mushroom, a fungus from the Agaricaceae family, has modulatory substances such as lectin,  $\beta$ -Glucan, proteoglycans, ergosterol, and arginine. The use of *A. sylvaticus* as adjuvant therapy to conventional treatment has showed promising results improving the quality of life of cancer patients (12-17).

The use of *A. sylvaticus* fungus as a dietary supplement in patients with various types of cancer has been studied (1-2). Although it's active mechanism is not clear yet (3), researchers have shown that the use of this mushroom acts to inhibit tumor growth and stimulate the hematological and immunological systems (12-17).

Experimental studies in animals and in vitro using cell lines of malignant breast cancer and other cancers have shown that preparations containing extracts of

*A. sylvaticus* have favorable effects improving blood profile and immune response (17-29). Likewise, clinical studies in patients with breast cancer show a significant increase in red cell count and a change in host biological response by stimulating the immune system, preventing the proliferation of cancer cells, metastasis and the recurrence of malignant cells (30-36).

The aim of this study was to evaluate changes in hematological and immunological parameters of patients with breast cancer treated with conventional chemotherapy at the Oncology Clinic, Federal District Hospital - Brazil, after three and six months of dietary supplementation with fungi *A. sylvaticus*.

## MATERIAL AND METHODS

### Study setting

A randomized, double-blind, placebo-controlled trial was carried out at the Oncology Clinic of the Federal District Hospital in Brazil, from September 2007 to July 2009.

### Enrolment and subject selection

The subjects were 46 women with breast cancer receiving chemotherapy treatment at the hospital; 26 undergoing three chemotherapy cycles and 20 undergoing six chemotherapy cycles.

Among women undergoing three chemotherapy cycles 14 were diagnosed in stadium II and 12 in stadium III. Of the patients undergoing 6 chemotherapy cycles 10 were located in stadium II and 10 in stadium III. Patients were separated in placebo group [(group of 3 cycles, n=13), (group of 6 cycles, n=10)], and supplemented with *A. sylvaticus* fungus [group (3 cycles, n=13), (group of 6 cycles, n=10)].

### Inclusion criteria

Only women among 40 and 65 years old with breast cancer in stadiums II or III undergoing chemotherapy were included.

### Ethics

The research process was approved by the Ethics Committee of the Ministry of Health of the Federal District, under protocol No. 041/2007. The enrolment also required that the agreement model were signed by patients, after being fully informed about the aim of the study and the characteristics of the product under investigation. The doctors signed the agreement model as well as the patients.

### *A. sylvaticus* extract

The *A. sylvaticus* fungus, known popularly as Sun Mushroom- Cogumelo do Sol®, was obtained from a producer accredited by Empresa Brasileira de Agropecuária- Embrapa, in Tapiraí Country, São Paulo state.

The fungus' extract was obtained by soaking the dried material in hot water for 30 minutes, liquefied, sieved and dried in a dissector. The composition analysis of *A. sylvaticus* was conducted by the Japan Food Research Laboratories Center, which revealed the presence of carbohydrates (18.51 g/100 g), lipid (0.04 g/100 g), ergosterol (624 mg/100g), protein (4.99 g/100 g), amino acids (arginine-1.14% lysine-1.23%; histidine-0.51%, phenylalanine-0.92%, tyrosine-0.67%, leucine-1.43%, methionine-0.32% valine -1.03% 1-alanine, 28% glycine-0.94% proline-0.95%, glutamic acid-3.93%, serine-0.96%, threonine-0.96% acid aspart-1.81%, tryptophan-0.32%, cysteine-0.25%) and trace amounts of micronutrients.

The dry extract was processed into tablets according to pharmacotechnical procedure. The dosage of fungus administered to patients in the supplemented group was equivalent to 2.1 g/day, divided into three daily doses. The group of patients, who received placebo tablets, was administered the same quantities, with the same ingredients and calories, but without *A. sylvaticus* extract.

All patients ingested six tablets a day (two in the morning, two in the afternoon and evening, between meals) for a period of three and six months.



### Clinical outcome

A validated questionnaire, full physical exam and interview were used to assess patients. The questionnaire was applied on the first day. In subsequent appointments directed interviews were carried out. All data were collected by trained researchers.

Up to six laboratory tests of complete patient blood count were carried out: immediately before and after supplementation. Blood collection was performed following the criterion of 12 h fasting. The collected material was deposited in dry vacuum tubes to obtain serum, following protocols recommended by the Brazilian Society of Pathology for venous blood collection. The examinations were performed at the Clinical Pathology Laboratory, Base Hospital, Ministry of Health-Federal District, and analyzed according to standardized reference values utilized by this institution.

Regarding Complete Blood Count (CBC), the samples were centrifuged and the analysis performed in COULTER T-540 manufactured in 1988, according to laboratory routine. The determination of the analysis followed the principle of flow cytometry, using the following reagents: isotonic (diluent), lytic (Hemolysing erythrocytes) and clean Coulter (detergent used in washing the machine).

All patients were contacted weekly by researchers, via telephone, to classify doubts, check the appropriate use of mushroom according to guidelines and confirm appointments, thus ensuring greater adherence to treatment and control over the continuity of study.

Dropout patients were considered those who only attended the first consultations or did not attend consultations during the three months or underwent less than four tests. Mushrooms were made available to patients who wished to use mushroom supplementation after the end of study.

### Statistical Analysis

Patients were separated into groups of three and six chemotherapy cycles and later on in placebo and *A. sylvaticus* groups in order to compare results. All collected data were analyzed as qualitative and descriptive, using Microsoft Excel 2003 for database and statistical software R: Regulatory Compliance and Validation Issues for statistical analysis, version 2.11.1.

### RESULTS

After six months of attendance at the Oncology Clinic of the Federal District Hospital, 46 patients with breast cancer completed the study; they were separated according to chemotherapy cycles and later on placebo or study groups.

#### Results of Patients with three chemotherapy cycles

Patients with three chemotherapy cycles after allocation into placebo or study groups presented the following results: placebo (n=13) had a mean age of  $50.61 \pm 6.65$  years. Regarding stadium, 61.5% (n=8) were in stadium II 38.5% (n=5) in stadium III. Patients supplemented with *A. sylvaticus* (n=13) had mean age of  $53 \pm 5.4$  years. As for stadium, 46.2% (n=6) were in stadium II and 53.8% (n=7) in stadium III of disease.

Placebo group showed a significant decrease in serum levels of red blood cells, monocytes and lymphocytes count. In group receiving *A. sylvaticus*, there was a significant increase in red blood cell count, hematocrit, corpuscular hemoglobin concentration, leukocyte, monocytes and total lymphocyte count after three months of supplementation (Table 1).

When comparing the first and third months of chemotherapy, considering reference values from  $3.9$  to  $5.03 / \text{mm}^3$  for evaluation of red blood cells, the placebo group showed significant decrease (from  $4.47 \pm 0.04 / \text{mm}^3$  to  $4.14 \pm 0.53$ ,  $p = 0.02$ ), while the supplemented group showed significant blood cell increase (of  $4.31 \pm 0.29 / \text{mm}^3$  to  $4.76 \pm 0.58$ ,  $p = 0$ , 2003) (Table 1).

**Table 1.** Results of red blood cell count series for patients in the placebo group and *Agaricus sylvaticus* with three chemotherapy cycles

Red Series	Placebo (n = 13)			<i>Agaricus sylvaticus</i> (n = 13)			Reference value
	Initial	Three months	p-value *	Initial	Three months	p-value *	
Hemoglobin (g/dL)	12.66 ± 0.77	12.08 ± 1.07	0.12	11.9 ± 1.41	12.09 ± 1.23	0.07	12 to 15.5 g/dl
Hematocrit (%)	36.99 ± 3.24	34.60 ± 3.21	0.10	34.29 ± 4.17	37.46 ± 2.34	0.04	35-45%
RBC (10 <sup>6</sup> /m $\mu$ L)	4.47 ± 0.44	4.14 ± 0.53	0.02	4.31 ± 0.29	4.76 ± 0.58	0.03	3.9 to 5.00 10 <sup>6</sup> /m $\mu$ L
MCV (Ft)	82.62 ± 6.58	89.49 ± 4.59	0.40	4.13 ± 86.36	87.04 ± 4.04	0.64	82-98 fL
MCH (pg)	29.55 ± 3.09	31.32 ± 5.44	0.40	29.38 ± 3.58	30.99 ± 3.31	0.15	26-34 pg
MCHC (g/dL)	34.55 ± 3.81	33.67 ± 1.72	0.40	32.46 ± 1.11	34.94 ± 2.1	0.001	31-36 g/dL

T-student tests applied. The values represent sit mean ± standard deviation

\* Comparison between baseline and after three months

Hemoglobin levels of both groups were no significant considering reference values from 12 to 15.5 g/dL, however there was a slight hemoglobin increase for the group supplemented with *A. sylvaticus* (placebo group: 12.66 ± 0.77 to 12.08 ± 1.07, p=0.12; study group: 11.9 ± 1.41 to 12.9 ± 1.23, p=0.07) (Table 1). There was a significant increase in hematocrits value of group *A. sylvaticus* (from 34.29 ± 4.17 to 37.46 ± 2.34, p=0.04). For placebo group no significant value was found (from 36.99 ± 3.24 to 34.60 ± 3.21, p=0.1) (Table 1).

By analyzing hematological parameters, rates of Mean Corpuscular Volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) showed statistically significant increase for both groups, the MCV values found for the placebo group and *A. sylvaticus* respectively: from 88.62 ± 6.58 to 89.49 ± 4.59, p = 0.46, and 86.36 ± 4.13 to 87.04 ± 4.04, p = 0.64; and MCH values for the placebo group and *A. sylvaticus*: from 29.55 ± 3.09 to 31.32 ± 5.44, p = 0.41 and 29.38 ± 3.58 to 30.99 ± 3.31, p = 0.15, respectively (Table 1).

In relation to values of mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) there was a significant difference for the *A. sylvaticus* group. There was an increase in MCHC values when comparing the first and last months of supplementation (from 32.46 ± 1.11 to 34.94 ± 2.1, p = 0.001). As for the placebo group there was no significant decrease (from 34.55 ± 3.81 to 33.67 ± 1.72, p = 0.45) (Table 1).

Regarding immunological parameters, the number of white blood cells was observed. There was a significant increase in the number of leukocytes (5.07 ± 1.54 to 5.9 ± 1.90, p = 0.03) for the *A. sylvaticus* group. Findings in the placebo group showed a slight decrease, but revealed no significant difference (5.28 ± 1.70 to 4.36 ± 1.55, p = 0.26). Observed reference values were 3.5 to 10.5 / mm<sup>3</sup> (Table 2).

The values of myeloid elements found revealed a significant increase only in the number of monocytes for group *A. sylvaticus* (5.67 ± 1.76 to 7.007 ± 1.41, p = 0.001) and placebo (5.59 ± 1.50 to 7.89 ± 2.46, p = 0.01). Regarding neutrophils, eosinophiles, and basophiles there was no significant difference for both groups (Table 2).

Regarding lymphocyte percentages, there was no significant difference for both groups, however, for total lymphocyte count (TLC) there was a significant difference in the placebo groups with significant reduction of data ( $1738.45 \pm 744$   $1115.15 \pm 218$  for,  $p=0.01$ ) and for the *A. sylvaticus* group a significant increase was revealed (from  $1454.32 \pm 381.47$  to  $1931.39 \pm 649.60$ ,  $p=0.009$ ) (Table 2).

Platelets showed no significant values for the placebo or the *A. sylvaticus* group. However platelets presented a slight decrease for the supplemented group ( $281 \pm 38.02$  to  $249 \pm 47.8$ ,  $p=0.06$ ), upon comparing the first and third months of follow up (Table 2).

#### Outcome of Patients with six chemotherapy cycles

After six months of attendance at the Oncology Clinic, 20 patients with breast cancer completed the

study, which were separated into placebo or study group (*A. sylvaticus*).

Patients in the placebo group ( $n=10$ ) had mean age of  $48.2 \pm 3.64$  years. With regards to stadium, 30% ( $n=3$ ) were in stadium II 70% ( $n=7$ ) in stadium III. Patients receiving *A. sylvaticus* ( $n=10$ ) had a mean age of  $52.3 \pm 5.86$  years. As for stadium, 40% ( $n=4$ ) were in stadium II and 60% ( $n=6$ ) in stadium III of disease.

Data analysis was performed on two times. Initially first and third month's chemotherapy was compared. After that a comparative analysis was performed between the first and sixth month of observation. This evaluation was performed for placebo and *A. sylvaticus* groups.

Regarding CBC results, the group supplemented with *A. sylvaticus*, showed significant levels of red blood cells, hemoglobin, hematocrit, mean

**Table 2.** Results of white blood cell counts for patients in the group and *Agaricus sylvaticus* with three chemotherapy cycles

White Series	Placebo (n = 13)			<i>Agaricus sylvaticus</i> (n = 13)			Reference value
	Initial	Three months	p-value*	Initial	Three months	p-value*	
Leukocytes (/ mm <sup>3</sup> )	$5.28 \pm 1.70$	$4.36 \pm 1.55$	0.2	$5.07 \pm 1.54$	$5.92 \pm 1.90$	0.03	$10.5 \pm 3.5$ /mm <sup>3</sup>
Lymphocytes (%)	$32.57 \pm 6.47$	$27.47 \pm 8.68$	0.10	$29.99 \pm 6.09$	$33.12 \pm 4.83$	0.10	20-35%
CTL (/ mm <sup>3</sup> )	$1738.45 \pm 744.08$	$1115.15 \pm 218.16$	0.01	$1454.32 \pm 381.47$	$1931.39 \pm 649.6$	0.009	1200-2000 /mm <sup>3</sup>
Neutrophiles (%)	$50.86 \pm 9.84$	$47.33 \pm 4.71$	0.20	$52.5 \pm 10.69$	$58.56 \pm 6.86$	0.10	40-80%
Monocytes (%)	$5.59 \pm 1.5$	$7.89 \pm 2.46$	0.01	$5.67 \pm 1.76$	$7.0 \pm 1.41$	0.01	3-9%
Eosinophiles (%)	$2.46 \pm 0.87$	$2.69 \pm 0.85$	0.38	$2.69 \pm 0.85$	$2.84 \pm 0.98$	0.60	1-5%
Basophiles (%)	$0.69 \pm 0.48$	$0.61 \pm 0.5$	0.50	$0.69 \pm 0.48$	$0.61 \pm 0.5$	0.60	0-1%
Platelets (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	$248 \pm 48.7$	$285 \pm 63.71$	0.10	$281 \pm 38.02$	$249 \pm 47.8$	0.06	150-450 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>

T-student tests applied. The values represent the sit mean  $\pm$  standard deviation

\* Comparison between baseline and after three month

corpuscular hemoglobin (MCH), leukocytes, lymphocytes, neutrophils and total lymphocytes (TLC) after six months of supplementation. The placebo group showed a significant decrease in serum levels of erythrocytes, leukocytes, basophiles and CTL (Table 3).

When comparing the first and third month of chemotherapy, considering reference values from  $3.9$  to  $5.03 \times 10^6 / \mu\text{L}$ , to assess the number of red blood cells, the placebo group showed a significant decrease (from  $4.21 \pm 0.55 \times 10^6 / \mu\text{L}$  to  $3.94 \pm 0.66 \times 10^6 / \mu\text{L}$ ,  $p=0.02$ ). As for values observed in the sixth month of treatment, there was a decrease in the number of red blood cells ( $4.21 \pm 0.55$  to  $3.63 \pm 0.33 \times 10^6 / \mu\text{L}$ ,  $p=0.03$ ). The group supplemented with *A. sylvaticus* revealed a significant increase in the number of red blood cells for the third month of supplementation (from  $1.18 \pm 4.23 \times 10^6 / \mu\text{L}$  to  $4.6 \pm 0.9 \times 10^6 / \mu\text{L}$ ,  $p=0.0007$ ) and for the sixth month of supplementation (from  $1.18 \pm 4.23 \times 10^6 / \mu\text{L}$  to  $5.01 \pm 0.5 \times 10^6 / \mu\text{L}$ ,  $p=0.0008$ ) when compared to the first month of treatment (Table 3).

In relation to hemoglobin level assessed in both periods, the *A. sylvaticus* group presented significant results showing increase in hemoglobin parameters of reference values from  $12$  to  $15.5 \text{ g/dL}$  ( $12.04 \pm 1.2 \text{ g/dL}$  to  $12.61 \pm 1.27 \text{ g/dL}$ ,  $p=0.01$ - the third month,  $12.4 \pm 1.2 \text{ g/dL}$  to  $13.17 \pm 1.29 \text{ g/dL}$ ,  $p=0.01$ - the sixth month). The placebo group showed no significant result in hemoglobin parameters (from  $12.22 \pm 1.32 \text{ g/dL}$  to  $11.52 \pm 1.98 \text{ g/dL}$ ,  $p=0.08$  and  $12.22 \pm 1.32 \text{ g/dL}$  to  $11.68 \pm 1.66 \text{ g/dL}$ ,  $p=0.02$ , respectively for three and six months of supplementation (Table 3).

Hematocrit analysis revealed a significant increase in the percentage of the *A. sylvaticus* group in the third month of supplementation (from  $36.44 \pm 3.06\%$  to  $38.7 \pm 3.41\%$ ,  $p=0.02$ ). There were no significant values for the placebo group (Table 3).

Table 3. Results of red blood cell count of placebo patients and *A. sylvaticus* with six chemotherapy cycles

Red series	Placebo (n = 10)				<i>A. sylvaticus</i> (n = 10)				Reference value
	Initial	Three months	Six months	* p value	Initial	Three months	Six months	* p value	
Hemoglobin (g/dL)	$12.22 \pm 1.32$	$11.52 \pm 1.98$	$11.68 \pm 1.66$	0.25	$12.04 \pm 1.21$	$12.61 \pm 1.27$	$13.17 \pm 1.26$	0.01	$12$ to $15.5 \text{ g/dL}$
Hematocrit (%)	$35.10 \pm 3.37$	$32.97 \pm 4.49$	$35.32 \pm 4.74$	0.80	$36.44 \pm 3.06$	$38.07 \pm 3.41$	$38.23 \pm 3.06$	0.10	$35$ - $45\%$
RBC ( $10^6 / \mu\text{L}$ )	$4.22 \pm 0.55$	$3.94 \pm 0.66$	$3.63 \pm 0.33$	0.03	$4.23 \pm 1.18$	$4.6 \pm 0.94$	$5.01 \pm 0.5$	0.0007	$3.9$ to $5.00 \times 10^6 / \mu\text{L}$
MCV (fL)	$85.75 \pm 4.78$	$83.39 \pm 9.6$	$75.15 \pm 17.4$	0.12	$86.06 \pm 3.03$	$86.61 \pm 5.10$	$88.84 \pm 3.41$	0.70	$82$ - $98 \text{ fL}$
MCH (pg)	$27.95 \pm 1.86$	$26.74 \pm 0.36$	$29.23 \pm 1.83$	0.08	$26.05 \pm 1.76$	$28.89 \pm 12.85$	$29.04 \pm 2.12$	0.20	$26$ - $34 \text{ pg}$
MCHC (g/dL)	$33.05 \pm 0.88$	$32.51 \pm 1.5$	$33.63 \pm 1.74$	0.30	$31.91 \pm 1.28$	$33.91 \pm 3.27$	$32.73 \pm 2.15$	0.10	$31$ - $36 \text{ g/dL}$

T-student tests applied. The values represent mean  $\pm$  standard deviation \* Comparison between baseline, after three and six months

Analyzing the hematimetric rates of Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH) and Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), showed no statistically significant decrease during the treatment period in the placebo group; MCH values (from  $26.05 \pm 1.76$  pg to  $29.04 \pm 2.12$  pg,  $p=0.01$ ) found for the *A. sylvaticus* group showed statistical significance in the last month of supplementation; regarding MCV and MCHC values a slight, yet irrelevant, increase was seen (Table 3).

With respect to immunological parameters, the white blood cells count series was observed. Regarding leukocyte numbers, there was a significant increase in the last month of supplementation for the *A. sylvaticus* group ( $4.7 \pm 1.4 / \text{mm}^3$  to  $5.95 \pm 1.23 / \text{mm}^3$ ,  $p=0.008$ ). Compared to the placebo group, there was a significant reduction in the number of leukocytes in the third month of supplementation ( $4.51 \pm 1.05 / \text{mm}^3$  to  $3.14 \pm 0.55 / \text{mm}^3$ ,  $p=0.004$ ). Observed reference values were 3.5 to  $10.5 / \text{mm}^3$  (Table 4).

The percentage values of myeloid elements found for the *A. sylvaticus* group revealed significant results in the number of neutrophils (from  $46.17 \pm 13.19\%$  to  $54.5 \pm 10.3\%$ ,  $p=0.01$ ). For the placebo group, there was but a significant decreases in the percentage of basophiles ( $0.8 \pm 0.4\%$  to  $0.2 \pm 0.4\%$ ,  $p=0.005$ ). As for data on eosinophiles and monocytes, neither group showed any difference (Table 4).

Regarding lymphocyte percentage, there was no significant difference in both periods observed for the placebo group. In relation to the *A. sylvaticus* group there was significant increase in both periods ( $24.25 \pm 2.34\%$  to  $29.88 \pm 4.16\%$ ,  $p=0.01$ - third month,  $24.25 \pm 2.34\%$  to  $29.7 \pm 3.26\%$ ,  $p=0.0004$ - sixth month). In relation to TLC the *A. sylvaticus* group showed significant results only during the sixth months of research, revealing values of  $1152.5 \pm 431.5 / \text{mm}^3$  to  $1761 \pm 376.8 / \text{mm}^3$ ,  $p=0.003$ . Compared to the placebo group, results were significant only in the third month of the survey which showed the following

values: from  $1384.6 \pm 405.88 / \text{mm}^3$  to  $896.98 \pm 185.4 / \text{mm}^3$   $p=0.01$  (Table 4).

Platelets showed no significant values for the placebo group or the *A. sylvaticus* group in relation to the survey follow-up period (Table 4).

## DISCUSSION

Patients with breast cancer often have hematological and immunological alterations during the disease process. Drugs used in chemotherapy induce bone marrow depression impairing the body's defenses to fight the disease itself depriving patients with malignant neoplasm of quality of life (8-9). Bone marrow cells renew quickly and, therefore, are very susceptible to the action of chemotherapeutic agents and other factors related to tumor development, which can lead to leucopenia, granulocytopenia, thrombocytopenia, and anemia (6, 11-36).

The toxicity of chemotherapy in hematological profile is expressed on three medullar lines: red cells, platelets and leucocytes. Because of the erythrocytes half-life, the development of anemia is belated. The concentration of the hemoglobin is related to red blood cells count and is used to monitor therapy response (8-11).

In the current study, with respect to the blood count of patients undergoing three chemotherapy cycles, data analysis revealed a significant increase in hematocrit serum levels ( $p=0.04$ ), and hemoglobin ( $p=0.03$ ), MCHC ( $p=0.001$ ) in the group treated with *A. sylvaticus* after three months of supplementation. These findings were not observed in patients included in the placebo group which showed a significant reduction ( $p=0.02$ ) in the number of red blood cells (Table 1 and 2).

Regarding CBC, the results observed for patients undergoing six chemotherapy cycles in group supplemented with *A. sylvaticus* showed relevant levels of red blood cells ( $p=0.02$ ), hemoglobin ( $p=0.02$ ), hematocrit ( $p=0.02$ ), MCH ( $p=0.02$ ), leukocytes ( $p=0.02$ ), lymphocytes ( $p=0.02$ ), neutrophils ( $p=0.02$ )

Table 4. Results of white blood cell counts in placebo patients and *A. sylvaticus* with six chemotherapy cycles

White series	Placebo (n = 10)				<i>A. sylvaticus</i> (n = 10)				Reference value
	Initial	Three months	Six months	* p-value	Initial	Three months	Six months	* p-value	
Leucocytes (/mm <sup>3</sup> )	4.51 ± 1.05	3.14 ± 0.55	4.29 ± 12.8	0.004	4.70 ± 1.43	4.6 ± 0.86	5.95 ± 1.23	0.008	10.5 ± 3.5 /mm <sup>3</sup>
Lymphocytes (%)	30.7 ± 5.63	28.83 ± 5.49	27.84 ± 5.37	0.40	24.25 ± 2.34	29.88 ± 4.16	29.7 ± 3.26	0.0004	20-35%
CTL (/mm <sup>3</sup> )	1384.6 ± 405.88	896.96 ± 185.4	1185 ± 493.01	0.01	1152.5 ± 431.5	1379.05 ± 279.9	1761 ± 376.8	0.003	1200-2000 /mm <sup>3</sup>
Neutrophiles (%)	50.3 ± 7.53	40.71 ± 11.1	49.82 ± 7.8	0.06	46.17 ± 13.19	48.9 ± 12.03	54.54 ± 10.33	0.01	40-80%
Monocytes (%)	10.67 ± 5.03	7.6 ± 3.54	12.87 ± 7.85	0.63	9.34 ± 2.7	10.8 ± 2.19	10.37 ± 2.17	0.2	3-9%
Eosinophiles (%)	2.3 ± 1.41	1.7 ± 1.15	2.2 ± 1.31	0.19	2.3 ± 1.4	1.6 ± 0.96	1.7 ± 0.8	0.3	1-5%
Basophiles (%)	0.8 ± 0.42	0.5 ± 0.52	0.2 ± 0.42	0.10	0.4 ± 0.5	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.4	0.6	0-1%
Platelets (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	282.1 ± 80.8	289.3 ± 71.9	266.9 ± 62.12	0.01	317.4 ± 42.6	328 ± 78	271.6 ± 64.8	0.1	150-450

T-student tests applied. The values represent mean ± standard deviation

\* Comparison between baseline, after three and six months.



and TLC ( $p=0.02$ ) after six months of supplementation. The placebo group showed a significant reduction in serum levels of red blood cells ( $p=0.02$  and  $p=0.03$ ), leukocytes ( $p=0.004$ ), basophiles ( $p=0.005$ ) and TLC ( $p=0.01$ ) (Table 3 and 4).

Concerning CBC, patients undergoing three chemotherapy cycles in the placebo group showed decreased values in all analyzed patterns. However, only the number of erythrocytes was significant (3<sup>rd</sup> month-  $p=0.02$ ) upon completion of three month supplementation. The same result was observed in patients undergoing six chemotherapy cycles, which showed a significant decrease for the two periods observed (3<sup>rd</sup> month-  $p=0.02$  and 6<sup>th</sup> month-  $p=0.03$ ). In relation to hematimetric values, patients in both groups (3/6 cycles-placebo) revealed no significant decrease.

The red series of patients supplemented with *A. sylvaticus* for three months, upon completion of treatment showed an increase in blood cells ( $p=0.03$ ), in hematocrit percentage ( $p=0.03$ ) and MCHC ( $p=0.001$ ). Similar results were observed in the third month of treatment in patients undergoing six chemotherapy cycles, besides an increase in hemoglobin values ( $p=0.01$ ). Upon conclusion of treatment, supplement patients undergoing six therapy cycles, demonstrated significant increases in blood cells ( $p=0.0008$ ), hemoglobin ( $p=0.01$ ) and MCH ( $p=0.01$ ). As for the hematocrits rate, there was no significant increase of values found after six months of supplementation; some significance was seen only in the third month of the research segment. Regarding hematimetric values, although there was an increase in observed values, these were not significant in both groups.

Fortes et al (31) in randomized placebo-controlled, double-blind clinical trial evaluated the effects of supplementation with *A. sylvaticus* extracts in cancer patients undergoing chemotherapy, where the supplemented group showed significant hematocrits and red blood cell increase, and no significant

increase in hemoglobin, MCH, MCV, revealing the possible benefits on the hematological system.

Novaes et al. (17) in a prospective, randomized, blind, placebo-controlled study evaluated the effects of the administration of *A. sylvaticus* extracts in rats with Walker 256 ascitic tumor and observed significant improvement in hematologic and immune functions, where the probable mechanism of action is the inhibition of tumor growth and stimulation of the hematological and immunological systems.

Dolby et al. (32) reported that the D-fraction of the  $\beta$ -Glucan found in medicinal mushroom of the Agaricaceae family such as *A. sylvaticus*, had a positive effect on the health status of women diagnosed with breast cancer. There was an improvement in clinical parameters and laboratory tests showed improvement in the hematological system, further to reducing vomiting caused by chemotherapy, increasing appetite of patients, reducing anorexia which can also be a side effect of conventional treatments (25).

See et al. (33) in a clinical study of various types of cancers including breast cancer (stadium IV), provided the patients with immunomodulatory components complex, among them *Agaricus blazei* tea (10mg/day). Six months after starting treatment, some patients had increased NK cells activity (Natural Killer), levels of TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), of erythrocytes, hemoglobin and glutathione. The receptors for TNF- $\alpha$  had decreased. Diarrhea and occasional nausea were reported, but quality of life had improved. The combination of immune active components was effective in increasing NK cells function and other immunological parameters in patients in advanced stages of cancer, thus enabling the effectiveness of a nutritional combination in the treatment of late stages of cancer (24).

The data from this study suggest that there is evidence which indicates the presence of bioactive compounds in *A. sylvaticus* fungi capable of acting positively on the hematological system in patients



with breast cancer. By observing the reported data, it appears that there was improvement in clinical parameters of red series in all periods of the study, regardless the degree of significance.

The analysis of white blood cell count in patients undergoing three chemotherapy cycles, who were supplemented with *A. sylvaticus* showed a significant increase in parameters for leukocytes ( $p=0.03$ ), monocytes ( $p=0.01$ ) and TLC ( $p=0.009$ ) after 3 months of segment. Patients undergoing six chemotherapy cycles revealed a significant increase in lymphocytes parameters ( $p=0.01$ ) in the first quarter of the survey, other immunological parameters showed increase, but with no statistical relevance. After six months of supplementation the *A. sylvaticus* group revealed significant values for leukocytes ( $p=0.008$ ), lymphocytes ( $p=0.0004$ ), TLC ( $p=0.003$ ) and neutrophils ( $p=0.01$ ), other parameters were not significant during the research period.

Statistically significant findings in the placebo group undergoing three cycles of treatment were the decrease in numbers of monocytes ( $p=0.01$ ) and TLC ( $p=0.01$ ). Other parameters did not show statistical relevance despite being reduced. In relation to patients of the placebo group with six chemotherapy cycles, statistically relevant findings for the first quarter of survey revealed a decrease in leukocyte numbers ( $p=0.004$ ) and TLC ( $p=0.01$ ). Other parameters showed no statistical relevance, despite being slightly decreased. After six months of research the placebo group also showed decreased values in relation to the first month of supplementation, however, only the percentage of basophils ( $p=0.005$ ) showed significant decrease.

Scientific evidence indicates that dietary supplementation with medicinal fungi such as *A. sylvaticus* is capable of significantly improving the physiological condition and prognosis of cancer patients (30-36).

Research with medicinal mushrooms indicate that  $\beta$ -glucan polysaccharide acts in the body by increasing

immune functions, stimulating and activating NK cells, T lymphocytes, B lymphocytes and complementary cells, with consequent increase in the number of macrophages and monocytes, in addition to promoting proliferation and/or production of antibodies and various cytokines such as interleukins 2 and 6, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (12-17).

The  $\beta$ -glucan bind to receptors on macrophages membranes, neutrophils, NK cells, T cells, dendritic cells, fibroblasts and vascular endothelial cells. The molecular structure of these substances influences their affinity for the receptors. These receptors have been described as phagocytic receptors for antigens. Research carried out with  $\beta$ -glucan extracted from fungi proved that these act by stimulating the action of neutrophils, eosinophils, monocytes, macrophages and NK cells via their specific receptors (17). However, the exact active mechanism of this polysaccharide is not yet fully elucidated. These components can regulate various aspects of humoral and/or cellular components of the immune system. Padilha et al (37) observing the action of  $\beta$ -glucan from Agaricales mushrooms extracts reported the possibility of this substance to reduce the inflammatory process of diseases by stimulating the immune system, increasing the number of defense cells.

Clinical studies show that the combination of reduced eosinophils and basophiles count in patients with cancer is a common finding. These changes may occur owing to direct action of tumor presence. Moreover, the decrease in lymphocyte count is also associated with more aggressive tumor behavior (14).

Takimoto et al. (18) in a randomized clinical trial orally administered *Agaricus blazei* extract in rats. The control group was treated orally with water. The study showed an increase in NK cells and increment in cytotoxic T lymphocytes. The research indicates that the mushroom extract potentializes innate and adaptive immunological cytotoxic activity (10).

Gennari et al (34,35) in two studies on women diagnosed with breast cancer, noted that dietary supplementation with *A. sylvaticus*, could stimulate the immune system increasing the number of NK cells and CD 56+.

Leucopenia, neutropenia and lymphocytopenia are the main immunological changes seen in studies on chemotherapy. Aguiar (36) in a study carried out with women in stadiums II and III of breast cancer undergoing chemotherapy and supplementation with arginine found an improvement in the numbers of leukocytes, lymphocytes and neutrophils after three months of supplementation and chemotherapy.

Fortes et al (17) evaluated the immune function of cancer patients after supplementation with *A. sylvaticus* during a period of three months and observed a significant increase in leukocyte count, lymphocytes, and basophiles TLC and non-significant reduction of monocytes, eosinophils and neutrophils in the supplemented group reaching reference values. In the placebo group no alterations were observed. The authors concluded that a dietary supplementation with *A. sylvaticus* is capable of significantly increasing the immunity of cancer patients. Similar results were observed in those groups reported in this study.

Factors related to tumor development in patients with cancer can be blamed on platelet increase. It is believed that reactive thrombocytosis commonly observed in patients with cancer can be justified by this rise in platelet. However, the deleterious effects caused by chemotherapy may emerge as a protective factor against this excessive augment of platelets, reducing their production. Aguiar (36) found that patients with breast cancer maintained platelet values preserved within the normal range after three months of supplementation with arginine. Fortes et al observed a significant reduction in platelet count for the group supplemented with *A. sylvaticus*. Yet, both groups remained within the normal

range, suggesting that *A. sylvaticus* is capable of preventing thrombocytosis in patients with malignant neoplasia.

In this study, as related in the literature, the platelet count remained at normal levels in both groups. A significant increase in platelet count was observed in the placebo group patients with three chemotherapy cycles ( $p=0.01$ ) after three months of treatment. However, in other groups the increase was not significant. In the group supplemented with *A. sylvaticus*, a reduction of platelets was observed when compared to the group that received placebo, however, these values were not significant. The data found in the research show the possible action of the *A. sylvaticus* fungus in controlling platelet production, suggesting the prevention of thrombocytosis in patients with malignant neoplasia.

Factors such as dose, rate, duration and frequency of supplementation, further to the active mechanism, interfere with the ability of the bioactive compounds present in medicinal fungi to improve or suppress the immune response of patients. Few studies have been conducted in relation to the pharmacological effects of these substances. In vivo studies have revealed that extracts of certain fungi do not have significant effects on patients with normal hematologic and immunologic profile, although they have the ability to restore the impaired immune response due to tumors, reaching normal levels (19). All these factors may explain, though in part, results found in red and white cells count of patients supplemented with *A. sylvaticus* in this study.

The mechanism of action of these fungi and their bioactive molecules in cancer therapy need to be better clarified; nevertheless, research has shown that many of these substances exert an anticarcinogenic, antiviral, antithrombotic, antibiotic and anti-inflammatory further to many more functions that provide health benefits (12-17).

## CONCLUSION

The hematological and immunological effects of medicinal mushrooms reported in several clinical and experimental published studies, have shown promising results when used as an adjuvant element in breast

cancer treatment. Nevertheless, new protocols to conduct clinical trials are needed to elucidate the possible active mechanisms and clinical benefits of these fungi in various types of cancer.

## KAYNAKLAR

1. Brazil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer [INCA]. Estimate 2010: Cancer Incidence in Brazil. Rio de Janeiro: INCA 2009. Brazil.
2. Tiezzi DG. Epidemiology of breast cancer. Rev Bras Obstetr Ginecol. 2009; 3(5): 213-5.
3. Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS. Risk of cancer in Brazil: trends and recent epidemiological studies. Rev Cancer Brazil, 2005; 51(3):227- 34.
4. Brazil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer [INCA]. Control of Breast Cancer: Consensus Document. Rio de Janeiro: INCA 2004.
5. Brito C, Portela MC, Vasconcellos MTL. SUS oncological care to women with breast cancer in Rio de Janeiro. Rev Public Health, 2005; 39(6): 874- 81.
6. Brito C, Portela MC, Vasconcellos MTL. Survival of women treated for breast cancer in Rio de Janeiro. Rev S Pub, 2009; 43(3): 481-9.
7. Shang EC, Weiss PS, Kaehler G. The Influence of early supplementation of parenteral on nutrition quality of life and body composition in patients with advanced cancer. J Par Ent Nutr, 2006; 30(3): 222-30.
8. Giglio A. A quimioterapia adjuvante para cancer de mama engorda? Rev Assoc Med Bras, 2004; 50(3): 238-45.
9. Giglio A. A quimioterapia adjuvante para câncer de mama engorda? Rev Assoc Med Bras, 2004; 50(3): 32-9.
10. Neugut AI, Matthew M, Xiaoyan W, Russell M, Jacobson JS, Wei-Yann T, Grann VR, Dawn LH. Duration of adjuvant chemotherapy for colon cancer and survival among the elderly. J Clin Oncol, 2006; 24(15): 2368-75.
11. Perez E, Muss HB. Optimizing adjuvant chemotherapy in early-stage of breast cancer. Oncology, 2005; 19(4): 1759-67.
12. Novaes MRCG, Fortes RC. Antitumor effects of edible Agaricaceae mushrooms. Nutrition Brazil, 2005; 4(4): 15-9.
13. Novaes MRCG, Novaes LCG. Drug-nutrient in edible mushrooms and other basidiomycetous Agaricales. Rev Bras Nutr Clin, 2005; 20(3): 181-7.
14. Fortes RC, Novaes MRCG. Effects of dietary supplementation with Agaricales mushrooms and other fungi in medicinal therapy against cancer. RBC, 2006; 52(4): 363-71.
15. Novaes MRCG, Fortes R, Melo A, Recova V. Alterations on the metabolism of lipids in post-surgery patients suffering from colorectal cancer supplemented with *Agaricus sylvaticus* fungus. Proceedings of the 27th International Congress of ESPEN and Clinical Nutrition. August, 27-30, Brussels, Belgium. 2005.
16. Novaes MRCG, Novaes LCG, Recova V, Melo A. Evaluation of acute toxicity of edible mushroom *Agaricus sylvaticus*. Proceedings of the 27th International Congress of ESPEN and Clinical Nutrition. August, 27-30, Brussels, Belgium. 2005.
17. Novaes MRG, Novaes Garcez LCG, Melo A, Recova V. Effects of administration of *Agaricus sylvaticus* fungi on hematological and immunological systems of rats with Walker carcinoma-256. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2004; 18 (S1): 125-9.
18. Takimoto HD, Wakita KK, Kumazawa Y. Potentiation of cytotoxic activity in naive and tumor-bearing mice by oral administration of hot-water extracts from *Agaricus braze f* ruiting bodies. Biol Pharm Bull, 2004; 27: 404-6.
19. Chu KKW, Ho SSS, Chow AHL. *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. J Clin Pharmacol, 2002; 42: 976-84.
20. Soh CSR, Phung HS, Ye JJ, Kwok SL, Shroder GE, Belury M, Adams LS. Williams D. Anti-aromatase activity of phytochemicals in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*). Cancer Res, 2006; 66: 12026-34.

21. Grube JB, Eng ET, Kao YC, Kwon A, Chen S. White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. *J Nutr*, 2001; 131: 3288-93.
22. Shang EC, Weiss PS, Kaehler G. The influence of early supplementation of parenteral on nutrition quality of life and body composition in patients with advanced cancer. *J Par Ent Nut*, 2006; 30(3): 222-30.
23. Fang N, Li Q, Yu S, Zhang J, He L, Ronis MJ, Badger TM. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by an ethyl acetate fraction from shiitake mushrooms. *J Altern Complement Med*, 2006; 12(2): 125-32.
24. Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 2001; 131: 1409-13.
25. Jedinak A, Sliva D. *Pleurotus ostreatus* inhibits proliferation of human breast cancer and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway. *Inter J Oncol*, 2008; 33(6): 1307-13.
26. Hetland G, Johnson E, Lyberg T, Bernardshaw S, Tryggestad AM, Grinde B. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. *Scand J Immunol*, 2008; 68(4): 363-70.
27. Ajith TA, Janardhanan KK. Indian Medicinal Mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *J Clin Biochem Nutr*, 2007; 40(3): 157-62.
28. Bernardshaw S, Lyberg T, Hetland G, Johnson E. Effect of an extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill on expression of adhesion molecule and production of reactive oxygen species in monocytes and granulocytes in human whole blood ex vivo. *APMIS*. 2007; 115(6): 719-25.
29. Talorete TP, Isoda H, Maekawa T. *Agaricus blazei* (class Basidiomycotina) aqueous extract enhances the expression of c-Jun protein in MCF-7 cells. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(18): 5162-6.
30. Hong SA, Kim K, Nam SJ, Kong G, Kim MKA case-control study on the dietary intake of mushrooms and breast cancer risk among Korean women. *Int J Cancer*. 2008; 122(4th): 919-23.
31. Fortes RC, Novaes MRCG. The impact of dietary supplementation with *Agaricus sylvaticus* on immune function of post-surgical patients suffering from colorectal cancer: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. Proceedings of the I. World Congress of Public Health Nutrition / VII National Congress of the Spanish Society of Community Nutrition. Public Health Nutrition, 28- 30 September 2006, Barcelona, Spain: NS 2006.
32. Dolby V. In maitake mushroom extract from is important in anti-cancer. *Better Nutrition*. 1997; 59(8): 38.
33. See D. Mason St. Roshan R. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and natural killer cell (NK) function using an integrative approach in late stage cancers. *Immunol Invest*. 2002; 31: 137-53.
34. Gennari J, Gennari M, Felipe J. The *Agaricus sylvaticus* increases the number of natural killer cells in cancer patients. *J Com Med*. 2001; 7: 42-5.
35. Gennari JL, Veronesi R, Gennari M. Use of *Agaricus sylvaticus* as a supplement therapy in patients with breast cancer and lung metastasis. *Revista Brasileira de Medicina*. 2002; 59(7): 237-8.
36. Aguiar MRS. Impact of Food Supplementation on Hematologic Toxicity And Quality of Life and Women with Breast Cancer under Adjuvant Chemotherapy Regimen. Thesis [Master's Degree - Science and Environmental Health] Catholic University of Goiás, 2008.
37. Padilha MM, Avila AA, Sousa PJ, Cardoso LG, Perazzo FF, Carvalho JC. Anti-inflammatory activity of aqueous and alkaline extracts from mushrooms (*Agaricus blazei* Murill). *J Med Food*. 2009; 12(2): 59-64.

## Çiğ süt ve peynir örneklerinden *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocokların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığı

### Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from raw milk and cheese samples

Nihal YÜCEL<sup>1</sup>, Yeliz ANIL<sup>2</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada Ankara İlinde çeşitli firma ve mandıralardan temin edilen çiğ süt ve peynir örneklerinde koagülaz pozitif stafilocok (KPS), koagülaz negatif stafilocok (KNS)'lerin bulunma sıklığı ve bu suşların antimikrobiyal dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** İncelenen 190 çiğ süt ve 90 peynir örneğinden izole edilen KPS ve KNS'lerin standart biokimyasal yöntemler kullanılarak cins ve tür düzeyinde identifikasyonları yapılmıştır. İzolatların antimikrobiyal direnç özellikleri disk difüzyon metodu ile Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) rehberine göre değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** İncelenen çiğ süt ve peynir örneklerinden 236'sı KPS, 94'ü KNS olmak üzere toplam 330 stafilocok izolatı elde edilmiştir. KPS türleri içinde çiğ süt ve peynir örneklerinde sırasıyla en fazla *Staphylococcus intermedius* (% 40,0 - % 44,3) ve *Staphylococcus aureus* (% 35,0 - % 20,2); KNS türleri içinde de en fazla *Staphylococcus saprophyticus* (% 26,4 - % 43,0) ve *Staphylococcus caseolyticus* (% 9,2 - % 14,3) tespit edilmiştir. Çiğ süttten izole edilen KPS izolatları en fazla ampisilin % 62,4 ve penisiline % 47,0, KNS izolatları da metisilin ve penisiline %39,0 dirençli bulunmuştur. Bununla beraber; peynirden izole edilen KNS izolatları ampisiline % 42,8; metisilin, penisilin ve eritromisine ise % 28,5 dirençli bulunmuştur.

#### ABSTRACT

**Objective:** In this study, it was aimed to evaluate raw milk and cheese samples obtained from various markets and dairies in Ankara, Turkey for the presence of coagulase positive staphylococci (CPS) and coagulase negative staphylococci (CNS) and to determine of antimicrobial resistance in these strains.

**Method:** CPS and CNS, isolated from 190 raw milk and 90 cheese samples, were analyzed by conventional biochemical tests to identify for genus and species of these strains. Antimicrobial susceptibility features of these isolates were evaluated by disc diffusion method according to the guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

**Results:** Total of 330 isolates of *Staphylococcus* spp. which consist of 236 CPS and 94 CNS were found from raw milk and cheese samples. The predominant species of the CPS in raw milk and cheese samples were *Staphylococcus intermedius* (40.0 - 44.3 %) and *Staphylococcus aureus* (35.0 - 20.2 %); while the CNS were identified as *Staphylococcus saprophyticus* (26.4 - 43.0 %) and *Staphylococcus caseolyticus* (9.2 - 14.3 %). CPS strains isolated from raw milk more resistant to ampicillin (62.4 %) and penicillin (47.0 %); while CNS strains were more resistant to methicillin (39.0 %) and penicillin (39.0 %). Besides this, CNS strains isolated from cheese samples were resistant to ampicillin (42.8 %), methicillin (28.5 %) penicillin (28.5 %) and erythromycine (28.5 %).

<sup>1</sup> Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi, Sağlık Kültür Spor Dairesi Başkanlığı, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Nihal YÜCEL

Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA

Tel : +90 312 202 11 89

E-posta / E-mail : nyucel@gazi.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 19.01.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 28.02.2011

**Sonuç:** Değerlendirilen gıda örneklerinden izole edilen stafilocok türlerinin bu gıdaların hazırlanması sırasındaki zayıf sanitasyon ve çapraz kontaminasyonun göstergesi olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca KNS izolatlarının KPS izolatlarına göre uygulanan antibiyotiklere daha yüksek oranda dirençli olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Stafilocok, çiğ süt, peynir, antibiyotik direnci

**Conclusion:** These results suggests the contamination of raw milk and cheese samples by *Staphylococci* spp. indicates poor personel hygiene and cross contamination during the production process. In addition, the strains of CNS were much more resistant than the strains of CPS to antibiotics.

**Keywords:** *Staphylococcus* spp., raw milk, cheese, antimicrobial resistant

## GİRİŞ

Micrococcaceae familyasından olan *Staphylococcus* türleri Gram pozitif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, hareketsiz, katalaz pozitif olan bakterilerdir. *Staphylococcus aureus*'un da dahil olduğu pek çok stafilocok türü, insanların üst solunum yolları ve derilerinde doğal olarak bulunurlar. Stafilocoklar hem hastane enfeksiyonlarında hem de gıda sektöründe epidemi yapabilme özellikleri bulunduğundan halk sağlığı açısından önemli mikroorganizmalardır. Uygun olmayan şartlarda üretilen süt ve süt ürünleri gıda zehirlenmeleri ve enfeksiyonlara neden olan riskli gıda grupları arasında yer almaktadır. Bu zehirlenmeler ortama salınan protein yapısında, yüksek toksisiteli, bağırsak bölgesi ve sinir sistemi üzerine etkili olan enterotoksinler ile meydana gelmektedir (1). Günümüzde bu zehirlenmelerin esas nedeni olarak *Staphylococcus aureus* sorumlu tutulurken, *Staphylococcus hyicus* ve *Staphylococcus intermedius* gibi diğer koagülaz pozitif stafilocokların (KPS) enterotoksin ürettiği; ayrıca *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus xylosum* gibi koagülaz negatif olan stafilocokların (KNS) da az da olsa enterotoksin ürettiği belirlenmiştir. *S. aureus* çiğ sütte bulunan en önemli mikroorganizmalardan birisi olup, insan ve hayvanlar üzerindeki patojenitesi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (2- 4). KNS uzun süredir kommensal ve kontaminant bakteriler olarak değerlendirilmesine karşın, insanlarda patojenik etkilerinin olduğu ve çeşitli enfeksiyonlara sebep oldukları bilinmektedir

(5). Tüm bu nedenlerden dolayı gerek enfeksiyona yol açmadaki patojenitesi ve gerekse gıdalarda meydana getirdiği zehirlenmeler nedeniyle stafilocoklar üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır ve yapılmaya da devam edilmektedir.

Hayvanlarda tedavi veya koruyucu amaçlı olarak kullanılan antibiyotikler patojen ve normal flora bakterilerinde antimikrobiyal direncin oluşumunu artırır. Direnç genlerini taşıyan patojen veya flora üyesi bakteriler gıdalar yoluyla insan florasına kolonize olarak oluşan bu direncin insana geçmesine aracılık ederler (6). Penisilin tedavisi amacıyla kullanılmaya başlandığı ilk yıllarda stafilocok kökenlerinin tümü bu antibiyotiğe duyarlı iken daha sonraları  $\beta$ -laktamaz üretimi sonucu büyük oranda direnç geliştirmişlerdir. Metisiline dirençli stafilocoklar klinik yönden penisilin, sefalosporin gibi diğer tüm  $\beta$ -laktam halkası içeren antibiyotiklere dirençli olması nedeniyle önemlidir (7).

Ülkemizde süt ve süt ürünlerinin üretimi oldukça yüksek olup bu ürünlerin çoğu küçük işletmelerde, mandıralarda kontrolsüz olarak üretilmektedir. Peynirin mikroflorasının yapımı sırasında kullanılan süt ve starterin peynirin olgunlaşma süresine bağlı olarak değiştiği de bilinmektedir. Özellikle çiğ süttten elde edilen peynirler halk sağlığı açısından büyük riskler oluşturmaktadırlar. Bu üretim koşullarından dolayı süt ve süt ürünleri kaynaklı enfeksiyon ve gıda zehirlenmelerinin riski artmaktadır (1-5). Bu nedenle



araştırmamızda Ankara ve çevresinde tüketime sunulan çiğ süt ve peynir örneklerinden stafilocok türlerinin dağılımı ile çeşitli antibiyotiklere direnç profillerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Örneklerin Toplanması ve Analize Hazırlanması

Araştırmamızda Ankara ilinde tüketime sunulan (148 işletme sütü, 42 sokak sütü) 190 çiğ süt örneği ile farklı firmaların ürettiği beyaz peynir (61 adet), kaşar peyniri (13 adet), tulum peyniri (11 adet) ve lor peyniri (5 adet)'nden oluşan toplam 90 adet peynir örneğinden stafilocokların izolasyon ve identifikasyonu yapılmıştır. Çiğ süt örnekleri Türk Standartları Enstitüsü TSE-1018 esaslarına göre 200 ml'lik şişelerde alınmış en kısa sürede laboratuvara getirilerek analize alınmıştır. Çiğ süt örneklerinden 25 ml alınarak 225 ml steril "pepton water (PW)" (Oxoid CM0509) ile 10-3 kadar dilüsyon serisi hazırlanarak mikrobiyolojik ekimleri yapılmıştır. Peynir örneklerinin ise Türk Standartları Enstitüsü TSE-591'de belirtilen esaslara göre 25 gramı alınmış, içerisinde 225 ml steril sodyum sitrat bulunan homojenizatörde (Stomacher 400) ezilerek homojenize edildikten sonra 10-3 kadar dilüsyon yapılarak mikrobiyolojik ekimleri yapılmıştır.

### Stafilocokların İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Braid-Parker Agar Besiyeri (Oxoid CM 0275, Oxoid, Basingstoke, U.K.) steril edildikten sonra 50°C'ye soğutulup, içerisine %5 egg yolk tellurite emulsiyon (Oxoid SR 0054) ilave edilmiş petri kutularına döküldükten sonra yüzeye, Dragalsky özesi ile hazırlanan dilüsyon örneklerinden sürme ekim yapılmıştır. Plaklar 37°C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra gri ve siyah renkli karakteristik koloniler stafilocok şüpheli koloniler olarak değerlendirilmiştir. Gram pozitif, katalazi pozitif, oksidazı negatif, oksidasyon fermentasyon (O/F glukoz) pozitif olan koloniler stafilocok cinsi olarak tanımlandı. Stafilocok suşlarına tüp koagulaz test yapıldıktan sonra suşlar koagulaz pozitif

(KPS) ve koagulaz negatif (KNS) stafilocok olarak gruplandırılmıştır. Koagülaz pozitif olan *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* türlerinin ayırımı için de asetoin testi (Voges-Proskauer test) ile manitolün anaerobik kullanım testleri yapılmıştır (8, 9).

### Stafilocokların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

İzole ve identifiye edilen stafilocok suşlarının antibiyotik direnç profillerinin penisilin (10 µg), ampisilin (10 µg), tetrasiklin (30µg), oksasilin (1 µg), gentamisin (10 µg), eritromisin (15 µg), siprofloksasin (5 µg) ve trimethoprin-sulfametaksazol (1.25/23.75 µg) (Bioanalyse) disklerinden yararlanılmış ve Kirby Bauer disk diffüzyon yöntemi kullanılmıştır (10). Test yapıldıktan sonra 37 °C, 18 saat inkübe edilen suşların inhibisyon zon çapları ölçülerek sonuçlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI, 2005) kriterlerine göre yorumlanmıştır (11). Test yapılırken *S. aureus* ATTC 25923 standart suşu kullanılmıştır.

## BULGULAR

Araştırmamızda materyal olarak kullanılan çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen toplam 330 stafilocok izolatının 244'ü çiğ süttten, 86'sı da peynirden izole edilmiştir. Çiğ süt orijinli izolatların 157'si KPS, 87'si KNS olmak üzere tanımlanmıştır. Tanımlanan bu izolatların türlere göre dağılımları Tablo 1 ve 2'de verilmiştir. Çiğ sütte ve peynirde sırasıyla; KPS türlerinden en çok *S. intermedius* (% 40,0 - 44,3) ve KNS türlerinden *Staphylococcus saprophyticus* (% 26,4 - 43,0) saptanmıştır.

Tablo 3'de izole edilen KPS ve KNS izolatlarının antibiyotik direnç oranları gösterilmiştir. Çiğ süt örneklerinden izole edilen KPS ve KNS'lerde sırasıyla penisiline % 47,1-39,0, ampisiline % 62,4-21,8, metisiline % 22,2-39,0, tetrasikline % 12,7-6,8, gentamisine % 21,6-6,8, eritromisine % 13,3-12,6, siprofloksasine % 2,0-2,2 ve trimethoprim-sulfometoksazole % 3,1-1,1 direnç tesbit edilmiştir.



Peynir örneklerinden de izole edilen KPS ve KNS'ler sırasıyla penisiline % 14,0 - 28,5, ampisiline % 3,7 - 42,8, metisiline % 11,3 - 28,5, tetrasikline % 11,3 - 14,2, gentamisine % 5,0 - 14,2, eritromisine % 3,7 - 28,5, siprofloksasine % 1,2 - 14,2, trimetoprim-sulfometoksazole % 1,2-14,2 dirençli olduğu bulunmuştur.

**Tablo 1.** Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen KPS türlerinin dağılımı

KPS türleri	Çiğ süt		Peynir	
	n	(%)*	n	(%)*
<i>S. intermedius</i>	63	(40,0)	35	(44,3)
<i>S. aureus</i>	55	(35,0)	16	(20,2)
<i>S. schleiferi</i>	14	(9,0)	1	(1,6)
<i>S. lugdunensis</i>	10	(6,4)	3	(3,8)
<i>S. delphini</i>	10	(6,4)	7	(9,0)
<i>S. hyicus</i>	5	(3,2)	17	(21,5)
<b>TOPLAM</b>	<b>157</b>	<b>(100,0)</b>	<b>79</b>	<b>(100,0)</b>

n: izolat sayısı

\*: yüzde değerleri toplam izolat sayısına göre alınmıştır

**Tablo 2.** Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen KNS türlerinin dağılımı

KPS türleri	Çiğ süt		Peynir	
	n	(%)*	n	(%)*
<i>S. saprophyticus</i>	23	(26,4)	3	(42,8)
<i>S. caseolyticus</i>	8	(9,2)	1	(14,3)
<i>S. epidermidis</i>	7	(8,0)	-	
<i>S. auricularis</i>	7	(8,0)	1	(14,3)
<i>S. hominis</i>	7	(8,0)	-	
<i>S. saccharolyticus</i>	6	(6,9)	-	
<i>S. cohnii</i>	6	(6,9)	-	
<i>S. lentus</i>	6	(6,9)	-	
<i>S. simulans</i>	5	(5,8)	-	
<i>S. xylois</i>	4	(4,6)	-	
<i>S. haemolyticus</i>	2	(2,3)	-	
<i>S. sciuri</i>	2	(2,3)	-	
<i>S. gallinarum</i>	2	(2,3)	-	
<i>S. chromogenes</i>	1	(1,2)	1	(14,3)
<i>S. warneri</i>	1	(1,2)	1	(14,3)
<b>TOPLAM</b>	<b>87</b>	<b>(100,0)</b>	<b>7</b>	<b>(100,0)</b>

n: izolat sayısı

\*: yüzde değerleri toplam izolat sayısına göre alınmıştır

**Tablo 3.** Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen KPS ve KNS izolatlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları

KPS türleri	Çiğ süt		Peynir	
	KPS dirençli izolat/n (n: 157) (%)	KNS dirençli izolat/ n (n: 87) (%)	KPS dirençli izolat/n (n: 79) (%)	KNS dirençli izolat/n (n: 7) (%)
Metisilin	35 (22.2)	34 (39.0)	9 (11.3)	2 (28.5)
Tetrasiklin	20 (12.7)	6 (6.8)	9 (11.3)	1 (14.2)
Ampisilin	98 (62.4)	19 (21.8)	3 (3.7)	3 (42.8)
Penisilin	74 (47.1)	34 (39.0)	11 (13.9)	2 (28.5)
Gentamisin	34 (21.6)	6 (6.8)	4 (5.0)	1 (14.2)
Eritromisin	21 (13.3)	11 (12.6)	3 (3.7)	2 (28.5)
Siprofloksasin	3 (2.0)	2 (2.2)	1 (1.2)	1 (14.2)
Trimetoprim-sulfometoksazol	5 (3.1)	1 (1.1)	1 (1.2)	1(14.2)

n: toplam KPS/KNS izolat sayısı

## TARTIŞMA

Çiğ süte çevreden genellikle hava, toz, toprak, su ve gübre kaynaklı mikroorganizmalar bulaşabilir. Bulaşan bu mikroorganizmalar mikrobiyal gelişmeyi önleyen muhafaza yöntemleri uygulanmadığı takdirde çiğ sütte hızla gelişerek bozulmaya neden olurlar.

Normannoa ve ark. İtalya'da yaptıkları bir çalışmada 437 çiğ süt örneğinin 168 (%31)'inin, 102 ısı işlemi görmüş süt örneğinin ikisinin *S. aureus* içerdiğini tesbit etmişlerdir (12). İtalya'nın Bologna bölgesinde satılan süt ürünlerinde *S. aureus*'un varlığınının araştırıldığı bir diğer çalışmada mozzarella tipi peynirlerde % 25, yumuşak peynirlerde ise % 18.9 oranında pozitiflik bulduklarını bildirmişlerdir (13). Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada da Güven ve ark., Eskişehir ve Kütahya bölgesinde *S. aureus*'u çiğ süt'ten % 33.3, peynir'den % 27.9 oranında izole etmişlerdir (4). Araştırmamızda Ankara bölgesinden toplanan çiğ süt ve peynir örneklerinde *S. aureus* sırasıyla % 35 ve % 20,2 bulunmuştur. Çalışmamızdaki hem çiğ süt hem de peynir örneklerinden izole edilen *S. aureus*'un bulunma sıklığı diğer araştırmacıların sonuçlarına benzerlik göstermektedir.

KNS'lerin eskiden derinin normal florasında bulunan zararsız etkenler olduğu düşünülürdü ancak günümüzde mastitis etkeni önemli fırsatçı patojenler oldukları bilinmektedir (14). Bu araştırmada incelediğimiz çiğ süt ve peynir örneklerinden KNS olarak en fazla *S. saprophyticus*, *S. caseolyticus*, *S. auricularis*, *S. hominis* türleri izole edilmiştir (Tablo 2). Sawant ve ark. inceledikleri çiğ süt örneklerinden izole ettikleri 168 KNS izolatının % 36 *S. chromogenes*, % 22 *S. epidermidis*, % 22 *S. hyicus*, % 10 *S. simulans*, % 4 *S. warneri*, % 2 *S. hominis* ve % 1'de *S. intermedius*, *S. sciuri*, *S. xylosus* olarak tanımlamışlardır (5). Tablo 2'de görüldüğü gibi bu çalışmada çiğ süttten izole edilen KNS türleri % 8 *S. epidermidis*, % 6,9 *S. lentis*, % 6,9 *S. cohnii* subsp. *cohnii*, % 2,3 *S. haemolyticus*, % 2,3 *S. sciuri* ve % 1,2 *S. chromogenes* olarak bulunmuştur.

Kırkan ve ark., Aydın bölgesinde yaptıkları araştırmada toplam 300 adet mastitisli süt örneğini incelemişler, 85 (% 28) *S. aureus*, 60 (% 20) KNS izole etmişlerdir. KNS'ların tür düzeyindeki dağılımları % 33,3 *S. hyicus*, % 26,6 *S. chromogenes*, % 15,0 *S. epidermidis*, % 8,3 *S. haemolyticus*, % 6,6 *S. sciuri*, % 5,0 *S. lentis*, % 5,0 *S. cohnii* subsp. *cohnii* olarak tanımlamışlardır (15).

Ünal ve Yıldırım; Kırıkkale ve çevresinde bulunan çeşitli süt işletmelerindeki ineklerin süt, meme başı derisi ve burun mukoza örneklerinden izole edilen stafilocokların antibiyotik direncini araştırmışlar; hem orta hem de küçük ölçekli süt işletmelerindeki süt örneklerinden izole ettikleri stafilocoklarda *S. aureus*'u % 48,0 olarak tanımlarken; KNS izolasyon oranını da % 52,0 olarak belirlemişlerdir (16).

Stafilocoklar, antibiyotiklere karşı gittikçe artan dirençleri nedeniyle gerek hastanelerde ve gerekse toplum kökenli enfeksiyonlarda büyük bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütüne bağlı bilimsel kuruluşlar ve organizasyonlar, bakterilerde antibiyotiklere karşı gelişen direnci,

halk sağlığını tehdit eden önemli tehlikelerden biri olarak görmektedirler. Özellikle gıda kaynaklı antibiyotiklere dirençli izolatlar gıdaların hazırlanmasında zayıf sanitasyonun göstergesi olabileceği gibi tüketici açısından da sağlık riski taşımaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde yaygın ve kontrolsüz antimikrobiyal kullanılması bu direncin oluşmasında ana etkenlerden biridir (17). Stafilocoklarda beta-laktam antibiyotiklerine direnç mekanizması mecA geninin taşınması ile ilgilidir. Kromozomunda mecA genini taşıyan suşlar tüm beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere intrensek direnç gösterirler. Çalışmamızda çiğ süt örneklerinden elde edilen KPS izolatları antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre penisiline ve ampisiline % 47,1 ve % 62,4 dirençli bulunurken; aynı antibiyotiklere peynir izolatlarının % 13,9 ve % 3,7 dirençli olduğu belirlenmiştir.

Ünal ve Yıldırım'ın yaptıkları araştırmada çeşitli işletmelerden temin ettikleri süt örneklerinden izole ettikleri stafilocoklarda en fazla penisiline karşı (küçük ölçekli işletmelerde % 46,0, orta ölçekli işletmelerde ise % 53,3) direnç olduğunu tesbit etmişlerdir (16). Pereira ve ark. çeşitli gıda örneklerinden izole ettikleri *S. aureus*'un ampisiline % 70,0, penisiline % 73,0 ve metisiline % 38,0 oranında dirençli olduğunu saptamışlardır (3). Bizim araştırmamızda ise KPS izolatlarında metisilin direnci çiğ süt izolatlarında % 22,2 peynir izolatlarında ise % 11,3 oranında bulunmuştur. Kırkan ve ark., mastitisli sütlerden izole ettikleri *S. aureus* suşlarını penisiline (% 95,0), oksasiline (% 60,0); KNS suşlarının penisiline (% 90,0), oksasiline (% 73,0) dirençli olduklarını bildirmişlerdir (15). Güven ve ark., et ve süt örneklerinden izole ettikleri *S. aureus* izolatlarında penicilin G'ye % 92,7 gibi yüksek oranda direnç belirlemişlerdir (4).

Sonuç olarak çalışmada farklı antibiyotik grupları arasında en yüksek direncin hem KPS (%62.4) hem

KNS'de ampisiline (%42.8) karşı olduğu belirlenmiştir. Gerek klinik kaynaklı gerekse gıda kaynaklı izolatlarda direnç sorununun önlenmesi için

kontrollü antibiyotik kullanımı yanısıra bakterilerdeki antibiyotik direnç oranlarının da düzenli olarak takip edilmesi önerilir.

## KAYNAKLAR

1. Bergdoll MS. *Staphylococcus aureus*. In, Doyle MP (Ed): Foodborne bacterial pathogens. Pp. 463-523, Marcel Dekker, Inc., New York, 1989.
2. Gundogan N, Citak S, Turan E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. Food Control, 2006; 17: 389-92.
3. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, and Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiol, 2009; 26: 278-82.
4. Güven K, Mutlu M B, Gulbandilar A, Cakir P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. J Food Safety, 2010; 30: 196-212.
5. Sawant AA, Gillespie BE, Oliver SP. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus species* isolated from bovine milk. Vet Microbiol, 2009; 134: 73-81.
6. Barton D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. Nut Res Rev, 2000; 13: 279-99.
7. Enright MC. The evolution of resistant pathogen- the case of MRSA. Curr Opin Pharmacol, 2003; 3: 474-79.
8. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams TS. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. William & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA., 1994; 532.
9. Winn JrW, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006; 623-71.
10. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol, 1966; 45: 493.
11. Anonim. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fifteenth informational supplement. Approved Standard MS100-S16, 2005, Wayne, PA, USA.
12. Normanno G, Firinu A, Virgillio S, Mula G, Dambrosio A, Poggio A, et al. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. Int J Food Microbiol, 2005; 98: 73-9.
13. De Luca G, Zanetti F, Stampi S. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area Int J Food Microbiol, 1997; 35: 267-70.
14. Smith KL. World perspectives on mastitis. In: Proceeding of the Second International Mastitis and Milk Quality Symposium, National Mastitis Council, Madison (WI), 2001.
15. Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydın region of Turkey. Turk J Vet Animal Sci, 2005; 29: 791-96.
16. Ünal N, Yıldırım M. İneklerin süt, meme başı derisi ve burun mukozalarından izole edilen stafilocok türlerinin antibiyotik direnç profilleri. Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 2010; 16 (3): 389-96.
17. Aslim B, Yucel N. In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter spp.* Food Chem, 2008; 107: 602-6.

## Tokat ili Erbaa Devlet Hastanesine başvuran kene tutunması olgularının değerlendirilmesi

### Evaluation of tick bite cases admitted to the Erbaa State Hospital in Tokat Province

İbak GÖNEN<sup>1</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Keneler, çeşitli viral, bakteriyel ve paraziter hastalıkların bulaşında rol oynamaktadır. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), keneye bulaşan hastalıklar arasında en yaygın coğrafi dağılıma sahiptir. Bu çalışmada KKKA'nin endemik seyrettiği yörelerden biri olan Tokat İli Erbaa İlçesi Devlet Hastanesine kene yapışması nedeniyle başvuran olguların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Tokat Erbaa Devlet Hastanesi'ne 1 Nisan - 30 Eylül 2009 tarihleri arasında kene tutunması nedeniyle başvuran olgular demografik özellikleri, KKKA hastalığı gelişme sıklığı, epidemiyolojik ve klinik özellikleri açısından retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Bu çalışmada 312 kene ısırması vakası değerlendirilmiştir. Bu olguların 182'si erkek, 130'u kadın olup % 21,1'i 16 yaşından küçük ve yaş ortalaması  $34,4 \pm 14,6$  'dır. % 56,4'ü kırsal bölgede ikamet eden olguların vücuduna tutunmuş kenelerin % 81'i devlet hastanesinde sağlık personeli tarafından çıkarılmıştır. Kene tarafından en sık tutulunan vücut bölgesi, alt ekstremiteler olarak belirlenmiştir. En çok olgu Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında tespit edilirken, sekiz hastada KKKA gelişmiştir.

**Sonuç:** KKKA'nin endemik olarak görüldüğü bölgelerde kene yapışması olguları semptom ve bulgular açısından dikkatli bir şekilde takip edilmeli ve bu bölgelerde yaşayan halk kene tutunmasına karşı alınacak önlemler ve kene yapışması sonrası yapılacak uygulamalar konusunda eğitilmelidir.

**Anahtar Sözcükler:** Kene yapışması, Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi, epidemiyoloji

#### ABSTRACT

**Objective:** Ticks play a role in transmission of various of viral, bacterial and parasitic diseases. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF), has widest geographic distribution among these tick born diseases. In this study, it was aim to evaluate the tick bite cases admitted to the state Hospital in Tokat where CCHF is endemic in this region.

**Method:** Tick bite cases, between 1 April and 30 September 2009, admitted to the State Hospital of Tokat were assessed retrospectively in terms of frequency of CCHF disease development; demographic, epidemiological and clinical characteristics.

**Results:** In this study, 312 tick bites cases were evaluated. 182 of these cases were male and 130 were female. Of the cases, 21,1% was under the age of 16 years old and the mean age was  $34,4 \pm 14,6$ . Of the cases, 56,4 % were living in urban area and 81% of the ticks were removed by the health personnel in the state hospital. The most common body area bitten by the ticks were the lower extremities. Most of the cases were recorded in May, June, July and August and, CCHF developed in eight cases.

**Conclusion:** Cases of tick bites should be carefully monitored in terms of symptoms and signs in endemic areas in which CCHF is seen. People living in these regions, should be trained in terms of preventive measures to be taken against tick bite, and the applications after tick bite.

**Keywords:** Tick bite, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, epidemiology

<sup>1</sup> Erbaa Devlet Hastanesi, TOKAT

İletişim / Corresponding Author : İbak GÖNEN

Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ad., DÜZCE

Tel : +90 380 542 14 16

E-posta / E-mail : dribak77@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 04.01.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 14.03.2011

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2011.44227

## GİRİŞ

Yaşam aktivitelerini kan emerek devam ettiren keneler; insan, sürüngen, kuş ve evcil hayvanları konak olarak kullanabilirler. Bu nedenle çeşitli viral, bakteriyel ve hatta paraziter hastalıkların bulaşından sorumlu olabilmektedirler. Bunlar arasında Lyme hastalığı, riketsiya enfeksiyonları, tularemi, babesiosis, ehrlichiosis yanında son yıllarda gittikçe artan sıklıkta görülen Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) de yer almaktadır.

KKKA, kene ile bulaşan hastalıklar arasında en yaygın coğrafi dağılıma sahiptir. Bunyaviridae ailesinin nairovirus grubundan bir virüsün neden olduğu bu enfeksiyon hastalığı ateş ve kanamalarla karakterize olup % 5-10 civarında mortalite ile seyretmektedir (1, 2). Esas olarak kene yapışması ile bulaşmakta iken, enfekte hayvan veya insanın dokuları ve vücut sıvıları ile temasla da bulaşabilmektedir (3, 4). Bulaşta en sık *Hyalomma* cinsi keneler özellikle *Hyalomma marginatum* sorumludur (4).

Ülkemizde ilk defa 2002 yılının ilkbahar ve yaz aylarında Tokat, Sivas, Yozgat, Çorum, Amasya, Erzurum, Erzincan ve çevresinde kene teması olan kişilerde ateş ve kanamalarla seyreden bir salgın dikkati çekmiş ve 2003 yılında da hastalığın KKKA olduğu saptanmıştır (5). O tarihten Eylül 2010'a kadar 5317 hasta ve 267 ölüm bildirilmiştir (6). Olgu sayılarının yıllar içinde sürekli çoğalması ve buna bağlı olarak ölüm sayılarındaki artış nedeniyle hastalık güncelliğini ve önemini yitirmemektedir.

Bu çalışmada KKKA'nın endemik seyrettiği yörelerden biri olan Tokat İli Erbaa İlçesi'nde hastanemize kene yapışması nedeniyle başvuran olguların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Nisan-Eylül 2009 tarihleri arasında Erbaa İlçesinde yapılmıştır. Erbaa Devlet Hastanesine kene yapışması nedeniyle başvuran hastalar, yaş, cinsiyet, ikamet adresi, meslek, kenenin yapışma yeri,

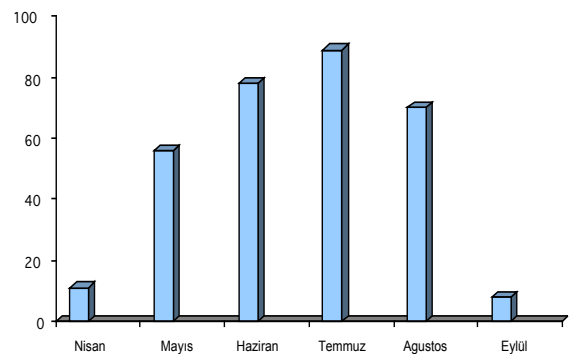
kenenin fark edilme ve çıkarılma zamanı açısından sorgulanmıştır. Hastalardan ilk başvuru esnasında tam kan sayımı tetkiki istenmiştir. Semptomlar açısından sorgulanan hastaların fizik muayeneleri yapılarak, KKKA bulgularına yönelik bilgilendirildikten sonra herhangi bir şikayetleri olması durumunda derhal bir sağlık kuruluşuna başvurmaları konusunda uyarılmıştır.

## BULGULAR

Orta Karadeniz bölümünün iç kesimlerinde yer alan Erbaa İlçesi, Karadeniz ikliminin özelliklerini göstermektedir. İlçe nüfusu, adrese dayalı nüfus kayıt sisteminde (<http://tuikapp.tuik.gov.tr/adnksdagitapp/adnks.zul>) 95.815 olarak bildirilmiştir. Nüfusun % 60'ı ilçe merkezinde yaşamaktadır. Köylerde yaşayan halkın büyük çoğunluğu tarım ve hayvancılıkla uğraşmaktadır.

Kene yapışması nedeniyle hastanemize, 312 olgu başvurmuştur. Hastaların yaşları 2 ile 76 arasındadır, 182 (% 58,3)'si erkek ve 130 (% 41,7)'u kadındır. Olguların çoğunluğu Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında başvurmuştur (Şekil 1).

Kene yapışması nedeniyle başvuran hastaların değişik özellikleri Tablo 1 ve 2'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Tokat ili Erbaa Devlet Hastanesine 1 Nisan - 30 Eylül 2009 tarihleri arasında kene yapışması şikâyeti ile başvuran olgularının aylara göre dağılımı

**Tablo 1.** Tokat ili Erbaa Devlet Hastanesine 1 Nisan - 30 Eylül 2009 tarihleri arasında kene yapışması nedeniyle başvuran hastaların özellikleri

Hasta özellikleri	n	%
Erkek hasta	182	58,3
Çocuk hasta	66	21,1
Kırsal bölgede yaşama	176	56,4
Tarım ve hayvancılıkla uğraşma	196	63
KKKA gelişme oranı	8	2,5
Başvuru esnasında semptom veya bulgu varlığı	3	1
Birden fazla kene yapışması	12	4

**Tablo 2.** Tokat ili Erbaa Devlet Hastanesine 1 Nisan - 30 Eylül 2009 tarihleri arasında kene yapışması nedeniyle başvuran olgularda saptanan kenelerin vücuttaki tutunma bölgeleri

Vücut bölgesi	n	%
Üst ekstremiteler	68	21
Alt ekstremiteler	86	26,55
Yüz-boyun	19	5,86
Saçlı deri	23	7,1
Sırt	72	22,22
Göğüs ve karın duvarı	46	14,2
Kulak memesi	4	1,23
Genital organlar	4	1,23
Kulak zarı	2	0,61
<b>TOPLAM</b>	<b>324</b>	<b>100</b>

n: Hasta sayısı

Hastaların 66 (% 21,1)'sının 16 yaş altında olduğu saptanmış; başvuruların, 176 (% 56,4)'sının köylerden, diğerlerinin ilçe merkezinden yapıldığı belirlenmiştir. Kene yapışması nedeniyle başvuran hastaların 196 (% 63)'sının tarım ve hayvancılıkla uğraştığı ve kene yapışmasının günlük tarım ve hayvancılık ile ilgili faaliyetler esnasında olabileceği düşünülmüştür. İlçe merkezinde yaşayan 24 olgunun ise piknik, diğer olguların ise normal günlük aktiviteleri esnasında kene yapışmasına maruz kaldıkları tespit edilmiştir.

Keneler tarafından en sık tutulan vücut bölgesi alt ekstremitelerdir. Tüm olgular, vücutlarına tutunan keneyi fark eder etmez ya kendileri ya da bir yakınları tarafından çıkartılmış veya bir sağlık kuruluşuna başvurarak kenenin sağlık personeli tarafından çıkarılmasını sağladıkları belirlenmiştir. Kene tutunmasına maruz kalan 224 (%72) kişinin yapışan keneyi akşam evlerinde fark ettikleri tespit edilmiştir.

Hastanemize başvuran 312 hastanın toplam sekizinde (% 2,5) KKKA klinik ve laboratuvar bulguları gelişmiştir. KKKA tanısı alan bu olguların altısının erkek, ikisinin kadın olduğu ve bu hastaların yedisinin köyde, birinin ise ilçe merkezinde ikamet ettiği belirlenmiştir. Köyde yaşayan yedi hastanın hepsi tarım işleri ile uğraşırken, ilçe merkezinde yaşayan hastanın ise olaydan yaklaşık bir hafta önce köydeki bahçesine gittiği ve meyve bahçesindeki ağaçlarla uğraştığı öğrenilmiştir.

Klinik değerlendirmede, başvuru esnasında olguların üçünde ateş, yaygın kas ve eklem ağrısı, karın ağrısı gibi şikâyetlerinin mevcut olduğu belirlenmiştir. Bu üç olgunun sistemik fizik muayenesi sırasında sırtında kene olduğu saptanarak çıkarılmıştır. İki olgunun laboratuvar bulgusunda lökopeni, trombositopeni AST, ALT, CK ve LDH düzeylerinde yükseklik olduğu tespit edilmiştir. Bir olgunun ise ateş, halsizlik ve şiddetli baş ağrısı şikâyeti olmasına rağmen laboratuvar bulgularının tamamen normal sınırlarda olduğu ve gözlem altına alınan bu olgunun



24 saat sonraki laboratuvar değerlerinin ise dramatik olarak bozulduğu görülmüştür.

Bu üç olgu dışında kene yapışması nedeniyle başvuran beş hastada da KKKA klinik ve laboratuvar bulguları gelişmiştir. Bu beş olgunun dördünün vücutlarına yapışan keneyi fark eder etmez kendilerinin çıkardığı, bir olgunun ise keneyi sağlık merkezinde çıkarttığı tespit edilmiştir. Bu olgularda kene çıkarılma zamanı ile semptomların gelişme zamanı arasındaki sürenin 2-5 gün olduğu belirlenmiştir. KKKA tanısı alan sekiz hastadan, 77 yaşındaki erkek hasta dışında kaybedilen hasta olmamıştır.

### TARTIŞMA

KKKA; kimi olgularda ölümle sonuçlanabilen ciddi bir enfeksiyon hastalığıdır. Bulaşta keneler aktif rol oynamaktadır. Keneler aynı zamanda virüsün doğal rezervuarıdır. Evcil ve yabani hayvanlarda virüs ancak 7-10 gün barınabilirken, kenelerde 1-1,5 yıl yaşayabilmekte ve nesiller arasında da aktarılabilir (7). KKKA olgularının çoğunluğu da kene yapışması sonrası oluşmaktadır. Ülkemizde, son yıllarda kene yapışmasına bağlı olarak hastanelerin acil servislerine başvuran olguların sayısı giderek artmaktadır (8).

Bu çalışmada diğer çalışmalarla benzer olarak kene yapışması olgularının erkeklerde daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin erkeklerin tarım ve hayvancılık işlerine daha aktif katılmaları olabileceği düşünülmüştür (8, 9). Kene yapışması ve KKKA doğal olarak en sık tarım ve hayvancılıkla uğraşan kişileri etkilemektedir. Yine kırsal alana gezi ve piknik amaçlı seyahatler sonucunda da kene yapışması oluşabilmektedir. Bu çalışmada diğer çalışmalara benzer şekilde kırsal alanda yaşayan kişi sayısı ilçe merkezinden gelen kişilere göre yüksek bulunmakla birlikte olguların çoğunluğunda ya tarım işleri nedeniyle ya da piknik veya gezi amaçlı kırsal alan seyahat öyküsü bulunmaktadır (8-11).

Kene yapışması her yaştan insanı etkileyebilmekle birlikte özellikle kırsal alanda tarım ve hayvancılıkla aktif olarak uğraşan yaş grubunu daha fazla etkilemektedir. Bu çalışmada da diğer çalışmalarla benzer olarak 20-60 yaş grubu daha fazla etkilenmiştir ve olguların çoğunluğu (% 63) tarım ve hayvancılıkla uğraşan kişilerdir (8).

Yine en çok tutulan vücut bölgesi diğer çalışmalarla benzer şekilde alt ekstremitelerdir (8, 10). İki olguda keneler kulak zarında tespit edilmiş olup, bu olgulardaki keneler Kulak-Burun-Boğaz Hastalıkları Uzmanı tarafından ameliyathane ortamında çıkarılmıştır. Kene yapışması olgularını kenelerin aktifleştiği ve tarım işlerinin çoğaldığı yaz aylarında artmakta olup bu çalışmada da benzer olarak en sık Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında yoğunlaşmıştır (8).

Kene tutunması nedeniyle başvuran olgularda kenelerin en kısa sürede ve uygun yöntemle çıkartılması önemlidir. Bu işlemin, bir sağlık merkezinde sağlık personeli tarafından yapılmasına gerek yoktur. Eğer kısa sürede bir sağlık merkezine ulaşamıyorsa kene üzerine herhangi bir madde ile müdahalede bulunulmadan, bir pens yardımıyla, eğer pens yoksa kene iki parmak arasına alınarak mekanik olarak çıkarılmalıdır (12). Sağlık müdürlükleri tarafından, kene yapışmasına sık maruz kalan çiftçilere dağıtılan kene kartları bu amaçla kullanılabilir. On iki olgunun birden fazla kene tutunmasına maruz kaldığı göz önüne alınırsa, kene tutunması nedeniyle başvuran olguların vücutları dikkatli bir şekilde muayene edilmeli ve başka bir kene yapışması olup olmadığı araştırılmalıdır. Herhangi bir şikâyeti olmayan hastalar hastalığın belirti ve bulguları açısından bilgilendirilmeli, 10 gün boyunca kendilerini izlemeleri ve şikâyetleri olması durumunda en yakın sağlık kuruluşuna başvurmaları konusunda uyarılmalıdır. Kene yapışması öyküsü ile birlikte ateş, halsizlik, baş ağrısı, bulantı, kusma, yaygın kas ve eklem ağrısı gibi yakınmaları olan hastalar KKKA laboratuvar



bulguları açısından tetkik edilmeli, şüpheli olgular tedavi açısından ileri tetkik yapılarak değerlendirilmelidir. Hastalığın erken döneminde laboratuvar bulguları normal olabileceğinden, şüpheli olgularda tetkikler bir gün sonra tekrarlanmalıdır.

Kenelerle mücadelenin zorluğundan dolayı kene-konakçı temasının engellenmesi korunma yolları açısından ön plana çıkmaktadır. KKKA bulaşından sorumlu kenelerin aktif olduğu nisan ve ekim ayları arasında mümkün olduğunca kenelerin bulunduğu alanlardan uzak kalınmalıdır. Bu alanlarda bulunan kişiler belirli aralıklarla vücutlarını kene açısından kontrol etmeli yapışan keneler kesinlikle ezilmeden uygun şekilde çıkartılmalıdır. Bu çalışmada kene tutunmasına maruz kalan olguların % 72'sinin yapışan keneleri akşam evlerinde fark ettikleri göz önüne alınacak olursa, tarım ve hayvanlıkla uğraşan kişilerin iş dönüşü evlerinde günlük olarak kene kontrolü yapmalarının önemi ve gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu alanlarda bulunacak kişilerde repellent denilen böcek kovucular da kullanılabilir (2).

Bu çalışmanın ışığında özet olarak;

Kene yapışması ve KKKA olguları en sık Mayıs-Ağustos ayları arasında görülmekte ve en çok tarım ve hayvancılıkla uğraşanları etkilemektedir. Bu nedenle, bu kişilerin kene yapışmasına karşı alınacak önlemler konusunda eğitilmeleri büyük önem arz etmektedir.

Kene yapışması olgularının çoğunluğu vücutlarındaki keneleri akşam iş dönüşü yaptıkları vücut kontrolünde tespit ettiklerinden bunun önemi eğitim çalışmalarında özellikle vurgulanmalıdır. KKKA gelişen üç olguda keneler vücudun sırt lokalizasyonunda KKKA geliştikten sonra hekim tarafından fark edilmiş olup özellikle gözle görülmeyen vücut bölgelerinin el veya ayna yardımıyla kontrol edilmesinin önemi anlatılmalıdır. Yine ateş şikâyetiyle gelen hastaların kene yapışması açısından sorgulanması ve muayene edilmeleri, şüpheli olgularda KKKA açısından hemogram tetkiklerinin yapılması önerilebilir.

Bu çalışmadaki bir olguda olduğu gibi KKKA klinik bulguları olan hastalarda başlangıçta laboratuvar bulguları normal olabilmektedir. Bu olguların takip altına alınmaları ve bir gün sonra tetkiklerinin tekrarlanması tanı açısından önemlidir.

KKKA hastalığının inkübasyon periyodu bu çalışmadaki olgularda 2-5 gün olup, 10 güne kadar uzayabilmektedir. Bu nedenle kene yapışması nedeniyle başvuran olgulara KKKA semptom ve bulguları hakkında bilgi verilmeli ve 10 gün boyunca herhangi bir şikayetin ortaya çıkması durumunda hekime başvurmaları konusunda uyarılmalıdırlar.

Bu önlemler, hastalığın gelişme sıklığını azaltmak, hastalık gelişen hastaların tanılarının ve tedavilerinin erken dönemde yapılmasını sağlamak açısından önemlidir.

## KAYNAKLAR

1. Peters CJ, California encephalitis, hantaa virus pulmonary syndrome, bunyavirid hemorrhagic fevers. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York. Churchill Livingstone, 2000; 1849-55.
2. Bodur H. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No:55, 2007; 267-77.
3. Elaldı N. Kırım Kongo Hemorajik Ateşi Epidemiyolojisi. Klimik Dergisi, 2004; 17(3): 151-6.

4. Ergonul O. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Lancet Infect Dis*, 2006; 6: 203-14.
5. Karti S, Odabaşı Z, Kortten V, et al. Crimean Congo Hemorrhagic Fever in Turkey. *Emerg Infect Dis*, 2004; 10(8): 1379-84.
6. Elaldı N. Klinik ve epidemiyolojik olarak KKKA hastalığında son durum. III. Türkiye Zoonotik İnfeksiyonlar Sempozyumu. 2010, 1-2 Kasım, Ankara-Türkiye.
7. Vatansver Z. Vektör kenelerin ekolojisi. II. Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. Kasım, 27-28, Ankara-Türkiye. 2008.
8. Kandış H, Katırcı Y, Uzun H, Güneş H, Kara İH, Geyik MF. Endemik bir bölgede kene ısırığı nedeniyle acil servise başvuran olguların demografik ve epidemiyolojik özellikleri. *Düzce Tıp Dergisi*, 2010; 12(1): 18-3.
9. Al B, Yıldırım C, Söğüt Ö, Yeşilkaya A. Batman Devlet Hastanesi acil servisine yedi ayda başvuran 39 kene ısırığının değerlendirilmesi. *JAEM*, 2008; 7(1): 40-3.
10. Sümer A. Kene ısırığı nedeniyle Kaş Devlet Hastanesi acil servisine başvuran olguların değerlendirilmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2010;16(1): 49-3.
11. Taşkesen M, Okur N, Taş MA. Kene ısırması ile başvuran 19 olgunun değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi*, 2008; 35(2): 110-3.
12. Ergönül Ö. Kırım-Kongo kanamalı ateşi. *Klinik Gelişim*, 2010; 23(3): 14-27.

## Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının antibiyotik direnci

### Antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from various clinical samples

Murat ARAL<sup>1</sup>, Nuriye İsmihan Ece PAKÖZ<sup>1</sup>, İbrahim ARAL<sup>2</sup>, Serpil DOĞAN<sup>1</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada Ocak 2007-Mayıs 2010 tarihleri arasında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden gönderilen numunelerden izole edilen 158 *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşlarının *in vitro* antibiyotik duyarlılık oranlarının araştırılması hedeflenmiştir.

**Yöntem:** Kültürü yapılmak üzere gönderilen örnekler koyun kanlı agara ve eosin methylene-blue (EMB) agara ekilmiştir. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonunda Gram pozitif kok görünümünde, katalaz testi negatif, PYR testi olumlu koloniler elde edilmiştir. Tüm suşlar VITEK 2 (bioMerieux, Fransa) identifikasyon yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılıkları The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına uygun olarak belirlenmiştir. Aynı hastadan izole edilen ardışık suşlar test edilmemiştir.

**Bulgular:** 158 örnekten 96'sında *E.faecium*, 62'sinde *E.faecalis* suşu izole edilmiştir. *E.faecalis* ve *E.faecium* farklı örneklerde benzer oranlarda bulunmuş olup, bu oranlar sırasıyla idrarda % 55, % 59; kanda % 14, % 17; balgamda % 3, % 6; yarada % 22, % 23'dür. *E.faecium* suşlarının % 59'u idrardan, % 23'ü yara örneklerinden izole edilmiştir. *E.faecalis* suşu ampisilin, klindamisin ve trimetoprim/sulfametoksazole % 100 dirençli bulunmuştur. İzole

#### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from 158 clinical samples of in-patients from various clinics of the Kahramanmaraş Sutcu Imam University Medical Faculty Hospital between January 2007 - May 2010.

**Method:** Sheep blood agar and eosin methylene-blue (EMB) agar were used for culturing. At the end of 18-24 hours incubation at 37°C, Gram-positive cocci colonies with negative catalase test and positive PYR test were obtained. Species-level identification of these strains, were identified by VITEK 2 (bioMerieux, France) method. The antibiotic susceptibility of isolated strains are defined according to of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standards. Multiple isolates from the same patient has not been tested.

**Results:** Total of 158 strains were isolated and, 96 of them were *E.faecium* and 62 were *E.faecalis*. *E.faecalis* and *E.faecium* strains isolated from different samples have got similar rates which were very close to each other. *E.faecalis* and *E.faecium* strains were isolated 55%, 59% from urine; 14%, 17% from blood; 3% and 6% from mucus; 22%, 23% from wound, respectively. It was determined that 59% of *E.faecium* strains isolated from urine and 23% from wounds. *E.faecalis* strains were determined as resistant to ampicillin,

<sup>1</sup> Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, KAHRAMANMARAŞ

<sup>2</sup> Refik Saydam Hifzıssıhha Merkezi Başkanlığı, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Murat ARAL

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, KAHRAMANMARAŞ

Tel : +90 344 225 75 75-516

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

Geliş Tarihi / Received : 13.10.2010

Kabul Tarihi / Accepted : 10.04.2011

edilen suşlar ardışık olmayıp enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmişlerdir. Çalışmanın yapıldığı dönemde vankomisin dirençli enterokok salgını olmamıştır. Vankomisin ve teikoplanin direnci *E.faecalis* için saptanmazken, *E.faecium* için sırasıyla % 7 ve % 6 oranında belirlenmiştir. Linezolid direnci de her iki suş için oldukça düşük oranda (% 2-3) saptanmıştır. Enterokok suşları en sık çocuk hastalıkları (% 34) ve cerrahi kliniklerinden (% 27) gönderilen numunelerden izole edilmiştir.

**Sonuç:** Sonuç olarak, *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının vankomisin, teikoplanin ve linezolidine diğer antibiyotiklere göre daha yüksek duyarlılıkta olduğu gözlenmiş ve tedavide kullanımı uygun bulunmuştur. Fakat direnç oranları gözardı edilmemeli ve hastanelerin kendi antibiyogram değerlendirmelerine göre antibiyotik kullanım politikası oluşturmaları gerekmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, vankomisin, teikoplanin, linezolid, antibiyotik direnci

clindamycin, and trimethoprim/sulfamethoxazole (100%). The isolated strains were recognized as cause of infection is not consecutive. Has not been an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in the study was conducted. Although vancomycin and teicoplanin resistance was not determined for *E.faecalis*, resistance rate for *E.faecium* were 7% and 6%, respectively. Linezolid resistance is also quite low for both strains (2-3%). The most of enterococci strains were isolated in the samples submitted from pediatrics (34%) and surgical clinics (27%).

**Conclusion:** As a result, *E. faecium* and *E. faecalis* strains were observed with a higher sensitivity to vancomycin, teicoplanin and linezolid than other antibiotics and were found as appropriate for treatment. However, resistance rates should not be ignored and each hospitals should establish their antibiotic policies according to assessing their antibiogram evaluations.

**Keywords:** *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, vancomycin, teicoplanin, linezolid, antibiotic resistance

## GİRİŞ

İnsan bağırsağı, ağız, vajina, üretra ve safra yollarında normal flora elemanı olarak bulunan enterokoklar; düşük virülansa sahip olmalarına rağmen hastane enfeksiyonlarında ve toplum kökenli enfeksiyonlarda giderek artan sıklıkta etken olarak saptanmaya başlanmışlardır (1,2). Son yıllarda dikkatlerin enterokoklar üzerinde yoğunlaşmasının nedeni sadece hastane enfeksiyonlarına yol açmaları ve toplum kökenli enfeksiyonlarda daha sık saptanmaya başlanmaları değil, aynı zamanda birçok antibiyotiğe karşı belirgin ve artan derecede direnç kazanmalarındır (3).

Son yıllarda enterokok türlerinde ampisilin ve penisiline direnç artışı gözlenmekte, ayrıca vankomisine dirençli suşlara da rastlanmaktadır. Özellikle vankomisine dirençli suşların diğer birçok

antibiyotiğe de dirençli olması tedavide güçlükler neden olmaktadır (4). Ülkemizde yapılan bazı araştırmaların sonuçları, enterokok suşlarındaki antibiyotik direncinin göz ardı edilemeyecek düzeyde olduğunu göstermektedir (5,6).

Bu çalışmanın amacı hastanemizde çeşitli kliniklerden izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarını belirlemek ve bu konuda yapılan çeşitli çalışmalara katkıda bulunmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Ocak 2007-Mayıs 2010 yılları

arasında farklı kliniklerden gönderilen numunelerden izole edilen 158 enterokok suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Kültürü yapılmak üzere gönderilen örnekler koyun kanlı agara ve eosin metylen blue agara (EMB) ekilmiştir. 37° C’de 18-24 saat inkübasyon sonunda Gram pozitif, katalaz testi negatif, PYR testi (L-pirolidonil-β-naftilamid) olumlu suşlar enterokok olarak tanımlanmıştır. Tüm suşların VİTEK 2 (bioMerieux, Fransa) yöntemi ile tür düzeyindeki tanımlaması yapılmış ve antibiyotik direnç oranları CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) standartlarına göre belirlenmiştir.

## BULGULAR

İzole edilen 62 *E. faecalis* ve 96 *E. faecium* türlerinin örneklerle göre dağılımı Tablo1’de gösterilmektedir. Saptanan enterokokların % 39’u *E. faecalis*, % 61’i *E. faecium*’dur. Hem *E. faecalis* (% 55) hem de *E. faecium* (% 59) suşları en sık idrar örneklerinden izole edilmiştir.

**Tablo 1.** Enterokok türlerinin örneklerle göre dağılımı [n (%)]

Örnek	<i>E. faecalis</i> [n (%)]	<i>E. faecium</i> [n (%)]	Toplam [n (%)]
İdrar	34 (% 55)	57 (% 59)	91 (% 58)
Kan	9 (% 14)	16 (% 17)	25 (% 16)
Balgam	2 (% 3)	6 (% 6)	8 (% 5)
Yara	14 (% 22)	13 (% 23)	27 (% 17)
Diğer*	3 (% 4)	4 (% 4)	7 (% 4)
<b>Toplam</b>	<b>62 (% 39)</b>	<b>96 (% 61)</b>	<b>158</b>

\*Sperm, vajen, kateter ucu, tüp ucu

İzole edilen suşlar en sık hastanemizin çocuk hastalıkları (% 34) ve cerrahi kliniklerinden (% 27) gönderilen örneklerden saptanmıştır (Tablo 2).

**Tablo 2.** İzole edilen enterokok suşlarının kliniklere göre dağılımı [n (%)]

Klinikler	n	(%)
Çocuk Hastalıkları	54	(% 34)
Cerrahi	43	(% 27)
Yoğun Bakım	31	(% 20)
Dahiliye	15	(% 9)
Ortopedi	6	(% 4)
Üroloji	3	(% 2)
Diğer*	6	(% 4)
<b>Toplam</b>	<b>158</b>	

\*Acil, Dahiliye, Göğüs Hastalıkları, Kulak-Burun-Boğaz (KBB)

İzole edilen 62 *E. faecalis* suşu ampisilin, klindamisin ve trimetoprim/sulfametoksazole %100 dirençli bulunurken vankomisin, teikoplanin ve imipeneme ise herhangi bir direnç saptanamamıştır. Diğer antibiyotiklere ise % 3 ile % 56 arasında direnç belirlenmiştir (Tablo 3).

İzole edilen 96 *E. faecium* suşunun ise eritromisin, trimetoprim/sulfametoksazole %100, ampisilin (% 92), klindamisin (% 99) ve imipeneme (% 94) ise yüksek oranda dirençli olduğu belirlenmiştir. Linezolid (% 2), teikoplanin (% 6) ve vankomisin (% 7) gibi antibiyotiklere ise düşük oranda direnç bulunmuştur (Tablo 3).

## TARTIŞMA

Enterokokların en önemli özelliği, Gram pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan birçok antimikrobiyal ajana karşı kısmi veya tam direnç göstermeleridir (1). Enterokokların birçok antibiyotiğe intrensek direnç göstermelerinin yanında, dikkat çekici bir şekilde yeni mekanizmalarla antibiyotik direnci oluşturduğu ve bu direnci aktarabildiği bilinmektedir (7). Bu nedenle klinik örneklerden izole edilen enterokokların duyarlılığının saptanması uygun tedavinin seçilebilmesi için büyük önem taşımaktadır (1).

Tablo 3. İzole edilen 158 enterokok suşunun türlere göre antibiyotik direnç oranları [n (%)]

Antibiyotik	Antibiyotik direnç oranları		Toplam direnç oranı
	<i>E.faecalis</i> [n (%)]	<i>E.faecium</i> [n (%)]	Toplam [n (%)]
Ampisilin	62 (% 100)	88 (% 92)	150 (% 95)
Siprofloksasin	17 (% 27)	66 (% 69)	83 (% 52,5)
Klindamisin	62 (% 100)	95 (% 99)	157 (% 99)
Eritromisin	35 (% 56)	96 (% 100)	131 (% 83)
Yüksek Düzey Gentamisin	10 (% 16)	58 (% 60)	68 (% 43)
Yüksek Düzey Streptomisin	26 (% 42)	62 (% 65)	88 (% 55)
Imipenem	0 (% 0)	90 (% 94)	90 (% 57)
Linezolid	2 (% 3)	2 (% 2)	4 (% 2,5)
Moksifloksasin	16 (% 26)	63 (% 65)	79 (% 50)
Trimetoprim/sulfametoksazol	62 (% 100)	96 (% 100)	158 (% 100)
Teikoplanin	0 (% 0)	6 (% 6)	6 (% 3)
Vankomisin	0 (% 0)	7 (% 7)	7 (% 4)

\*Orta duyarlı suşlar dirençli olarak kabul edilmiştir.

Enterokokların her tür nozokomiyal enfeksiyonlardan, özellikle üriner sistem enfeksiyonlarından izolasyon sıklığı gittikçe artmaktadır. Ülkemizde yapılan araştırmaların çoğunda enterokoklar en sık idrardan izole edilmişlerdir (8-11). Mert-Dinç ve ark. (12)'nin yaptığı çalışmada *E.faecium* suşu % 100 oranında idrardan izole edilirken, idrar örneklerinde *E.faecalis* suşuna hiç rastlanmamıştır. Aynı çalışmada *E.faecalis* % 62,5 oran ile en sık kandan saptanmıştır. Gazi ve ark. (13)'nin yaptığı çalışmada ise *E.faecalis* suşu % 60 oranında en sık idrardan izole edilirken *E.faecium* suşu % 100 oranında kateter ucundan, % 50 oranında kandan ve % 40 oranında idrardan izole edilmiştir. Aykut-Arca ve ark. (14)'nin yaptığı çalışmada ise *E.faecalis* suşları % 13,48 ile en sık idrardan, ikinci sıklıkta (% 12,3) yara örneklerinden izole edilmiştir. *E.faecium* suşları ise % 18,47 oranı ile en sık idrardan izole edilirken, yara örneklerinden ise % 14,36 oranında izole edilmiştir. Çalışmamızda ise diğer çalışmalarla uyumlu olarak *E.faecalis* ve

*E.faecium* suşlarına sırasıyla % 55 ve % 59 oranlarıyla en sık idrarda rastlanmıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda beta-laktam antibiyotiklere dirençli enterokokların giderek arttığına dikkat çekilerek, bu artışta penisilinlere dirençli, beta-laktamaz üretmeyen suşların rol aldığı gösterilmiştir (11). Penisilin ve ampisilin direncini Gazi ve ark. (13) % 46 ve % 46, Ruhi ve ark. (15) % 60,8 ve % 31,8, Esen ve ark. (8) % 51 ve % 33 oranında saptamışlardır. Mert-Dinç ve ark. (12)'nin yaptığı çalışmada ise enterokok enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde önemli bir seçenek olan ampisiline direnç *E.faecalis* suşlarında %3, *E.faecium* suşlarında ise % 89 bulunmuştur. Meriç ve ark. (16) ve Kaçmaz ve ark. (17) ampisilin direncini *E.faecalis* izolatlarında sırasıyla % 4 ve % 11, *E.faecium* izolatlarında ise sırasıyla % 78 ve % 77 olarak tespit etmişlerdir. Ülkemizde yapılan ve tür tayinin yapılmadığı çalışmalarda ise enterokokların ampisilin direnci % 23 ile % 70 arasındadır (1,18). Simonsen ve ark.

(19) ve Hallgren ve ark. (20) çalışmalarında ampisilin direncini *E.faecium* suşlarında sırasıyla % 49 ve %74 olarak tespit ederken, her iki araştırma grubu da *E.faecalis* izolatlarında hiç ampisilin direncine rastlamamışlardır. Rodriquez ve ark. (21) ise ampisilin direncini *E.faecalis* suşlarında % 1, *E.faecium* suşlarında ise % 80 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise ampisiline direnç, *E.faecalis* ve *E.faecium* suşlarında sırasıyla % 100 ve % 92 oranında bulunmuştur. *E.faecalis* 'in *E.faecium*'a göre direnç oranı daha yüksek olmakla birlikte, her ikisinin de ampisiline direnç oranları beklenenin üzerinde bulunmuştur. *E.faecalis* suşlarındaki ampisilin direnci ise beklenenin çok üzerindedir. *E.faecalis* suşlarında ampisiline bu denli yüksek oranda direnç bulunmasının nedeni hastanemizde CLSI standartlarına göre kısıtlı bildirim yapılmasına rağmen kliniklerin çoğunun bu bildirimini dikkate almamasından kaynaklanmış olabilir.

Yüksek düzey aminoglikozid direncinin giderek yaygınlaşması, enterokokların neden olduğu, aminoglikozidlerin sinerjik etkisi beklenen enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorundur. Çünkü böyle bir direncin varlığında penisilin ve aminoglikozid kombinasyonunun etkisi ortadan kalkar. Bu nedenle enterokoklar ile oluşan ağır enfeksiyonlarda yüksek düzey aminoglikozid direncinin belirlenmesi gerekmektedir (7). Çalışmamızda yüksek düzey gentamisin ve yüksek düzey streptomisin direnç oranları *E.faecalis* suşunda sırasıyla % 16 ve % 42 iken, *E.faecium* suşunda ise sırasıyla % 60 ve % 65'tir. Mert-Dinç ve ark. (12)'nin yaptığı çalışmada aynı antibiyotiklere direnç oranlarını yine sırasıyla *E.faecalis* suşunda % 14 ve % 11 bulurken, *E.faecium* suşunda ise % 52 ve % 61,5 bulmuşlardır. Meriç ve ark. (16)'nin yaptığı çalışmada *E.faecalis* suşlarında yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direnç oranları sırasıyla % 13 ve % 22 belirlenirken, *E.faecium* suşlarında direnç oranları % 41 ve % 67 belirlenmiştir. Kaçmaz ve ark. (17)'nin yaptığı çalışmada da yüksek düzey gentamisin direnç oranları *E.faecalis* için % 8 iken *E.faecium* için % 41 olarak saptanmıştır. Karadenizli ve ark. (22)'nin enterokok türlerine göre

yüksek düzey aminoglikozid düzeyleri üzerine yaptığı çalışmada da *E.faecalis* suşları için yüksek düzey gentamisin ve yüksek düzey streptomisin direnç oranları sırasıyla % 7,5 ve % 6,4 olarak, *E.faecium* suşları için % 25,6 ve % 11,6 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direnç oranları, ülkemizde bu konuda yapılan çalışmaların bulgularıyla uyumlu bulunmuştur.

Teikoplaninin ve vankomisin halen enterokoklara en etkili antibiyotikler olduğunu bildiren çok sayıda yayın bulunmasına karşılık, vankomisine dirençli suşların sayısında önemli oranlarda artış olduğu da bildirilmektedir (23-29). Ulusoy ve ark. (30)'nın yaptığı çalışmada incelenen 72 *E.faecalis* ve 31 *E.faecium* suşunda vankomisin direnci saptanmamıştır. Mert-Dinç ve ark. (12) çalışmalarında tüm suşları vankomisin ve teikoplanine duyarlı bulmuşlardır. Gazi ve ark. (13) vankomisine direnci % 1 oranında saptamışlar ve dirençli suşların *E.faecium* olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda *E.faecium* ve *E.faecalis* suşlarına en yüksek duyarlılık teikoplanin ve vankomisine bulunmuştur. *E.faecalis* suşları teikoplanin ve vankomisine % 100 duyarlıyken, *E.faecium* suşları bu antibiyotiklere sırasıyla % 6 ve % 7 oranlarında direnç göstermektedirler. Buna göre belirttiğimiz direnç oranları literatürle uyumludur fakat *E.faecium* suşlarında görülen direnç oranlarının yüksek olması dikkat çekicidir. Bu dönemde vankomisin dirençli enterokoka bağlı hastane enfeksiyonu gelişmemiştir.

Linezolid oksazolidinonlar sınıfından yeni bir antibiyotik olup klinik açıdan önemli tüm Gram pozitif bakterilere karşı mükemmel in-vitro aktiviteye sahiptir. Linezolid direnci ile ilgili yapılan yurtdışı kaynaklı yayınlarda hiç direnç saptamayan çalışmalar olduğu gibi linezolid direncinin (enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan diğer antimikrobiyallerin aksine) *E.faecalis* suşlarında *E.faecium* suşlarına göre daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (20,21,31-33). Dilek ve ark. (34)'nin yaptığı çalışmada ise enterokok suşlarında linezolid direnç



saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda linezolid direnci *E.faecalis* suşlarında (% 3) *E.faecium* suşlarına oranla (% 2) daha yüksek bulunmuştur. Linezolide karşı spontan mutasyon sonucu direnç gelişimi oldukça düşük olmasına karşın linezolidin suboptimal dozlarda kullanılmasının dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olacağı bildirilmektedir (35). Bu nedenle diğer antibiyotiklerde olduğu gibi linezolidin de uygun dozlarda ve gerekli endikasyonlarda kullanılması gerekmektedir.

Siprofloksasinin enterokoklara in-vitro aktivitesi olmasına rağmen, bakterisidal olmaması nedeniyle tedavide kullanımı sınırlıdır. Gazi ve ark. (13) çalışmalarında kinolon grubu siprofloksasin ve levofloksasin dirençlerini araştırmışlardır. Buna göre *E.faecalis* suşlarının siprofloksasin ve levofloksasin direnci sırasıyla % 44 ve % 23 oranında bulunurken, *E.faecium* suşlarının bu antibiyotiklere direnç oranı sırasıyla % 39 ve % 21'dir. Çalışmamızda ise siprofloksasine direnç *E.faecium* için % 69, *E.faecalis* için % 27 oranında saptanmıştır. Kinolon türevi bir antibiyotik olan moksifloksasine direnç oranlarının ise siprofloksasine benzer oranlarda olduğu belirlenmiştir. Bu oranlar *E.faecium* suşunda % 65 ve *E.faecalis* suşunda % 26 oranlarında bulunmuştur.

Makrolid grubu antibiyotikler ve klindamisine karşı gerek *E.faecalis* gerekse *E.faecium* için belirlenen direnç oranları oldukça yüksektir (% 40-% 100) (30). Benzer sonuçlar Pesce ve ark. (36) tarafından da bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu çalışmalara benzer olarak; makrolid grubu antibiyotik olan eritromisine direnç *E.faecalis* ve *E.faecium* suşları için sırasıyla % 56 ve % 100 oranında bulunurken, klindamisine direnç ise sırasıyla % 100 ve % 99 oranında bulunmuştur.

Sonuç olarak, enterokokal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan çeşitli antibiyotiklerin birçoğunda değişik direnç oranları olduğu belirlenmiştir. Özellikle ampisilin direncinin yüksek oranda bulunması dikkat çekicidir. Vankomisin, teikoplanin ve linezolidin diğer antibiyotiklere göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu gözlenmiştir ve tedavide kullanımı uygun bulunmuştur. Ancak direnç oranlarının gözardı edilmemesi ve hastanelerin kendi antibiyogram değerlendirmelerine göre antibiyotik kullanım politikası oluşturmaları gerektiği kanaatine varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Ağuş N, Sarıca A, Özkalay N, Cengiz A. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnci. ANKEM Derg, 2006; 20(3): 145-7.
2. Ekşi F, Gayyurhan DE. Klinik örneklerden izole edilen streptokok ve enterokok suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg, 2008; 22(2): 53-8.
3. Erbek S, Özakın C, Gedikoğlu S. Enterokok suşlarında saptanan yüksek düzeyli aminoglikozid ve glikopeptid direnci. Hastane İnfek Derg, 2002;6: 142-9.
4. Murray BE. The life and times of *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev, 1990; 3(1): 46-65.
5. Erbek S, Özakın C, Gedikoğlu S. Toplum ve hastane kaynaklı olarak dışkıda enterokok türlerinin dağılımı. İnfek Derg, 2002; 4: 451-7.
6. Usluer G. Çoklu direnç patojenler: Epidemiyoloji ve kontrol. Flora, 2002; 7: 135-41.
7. Moellering RC. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species, "Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds): Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5.baskı" kitabında s.2147-56, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000.

8. Esen Ş, Sünbül M, Şener B, Eroğlu C, Saniç A, Leblebicioğlu H. Glikopeptid, beta-laktam ve aminoglikozid grubu antibiyotiklerin enterokoklara in-vitro etkinliği. ANKEM Derg, 2001; 15(1): 59-63.
9. Akıncı E, Balık İ, Tekeli E. Klinik örneklerden izole edilen enterokok türlerinin antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. Flora, 1999; 4:40.
10. Çınar T, Leblebicioğlu H, Sünbül M, Eroğlu C, Esen Ş, Günaydın M. Enterokoklarda yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direncinin araştırılması. Flora, 1999; 4:114.
11. Gür D. Beta-laktamazlar. Flora, 1997;2(3):3
12. Mert-Dinç B, Aykut-Arca E, Yağcı S, Karabiber N. Çeşitli Klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarında in-vitro antibiyotik duyarlılığı. Türk Hij Den Biyol Derg, 2009;66(3): 117-21.
13. Gazi H, Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Ecemiş T, Özbakkaloğlu B. Hastane kökenli *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarında antimikrobiyal direnç. ANKEM Derg, 2004; 18(1): 49-52.
14. Aykut-Arca E, Mert-Dinç B, Karabiber N. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok türlerinin kliniklere dağılımı. Türk Hij Den Biyol Derg, 2009; 66 (1): 1-5.
15. Ruhi MZ, Aysev D, Aksu G. AÜTF Çocuk Hastalıkları Kliniğinde izole edilen enterokok suşlarının türlere göre dağılımı ve antimikrobiklere direnç durumu. 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Özet Kitabı s.154, Antalya, 1997.
16. Meriç M, Rüzgar M, Gündeş S, Willke A. Hastanede yatan hastalardan izole edilen enterokok türleri ve antibiyotiklere direnç durumu. ANKEM Derg, 2004;18(3):141-4.
17. Kaçmaz B, Akça G, Sultan N. Enterokokların antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. Infek Derg, 2004;18(3): 287-92.
18. Ersoy Y, Bayraktar M, Fırat M, Yağmur M, Durmaz R. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg, 2005; 19(2): 92-9.
19. Simonsen GS, Smabrekke L, Monnet DL, et al. Prevalance of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isoltes from clinical specimens and use of antimicrobials in fivae Nordic hospitals. J Antimicrob Chemother, 2003; 51(2): 323-31.
20. Hallgren A, Abednazari H, Ekdohl C, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care untis in Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems. J Antimicrob Chemother, 2001;48(1): 53-62.
21. Rodriguez J, Vasquez GJ, Bermudez M, et al. Prospective study using standardizes methodology for antimicrobial susceptibility of Gram positive cocci isolated from the Puerto Rico Medical Center. PR Health Sci, 2002;21(4): 343-7.
22. Karadenizli A, Kolaylı F. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen enterokok türleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2002; 32(3-4): 212-5.
23. Barry AL, Jones RN, Gavan TL, Thornsberry C. Quality control limits for teicoplanin susceptibility tests and conformation of disk diffusion interpretive criteria. J Clin Microbiol, 1987; 25: 1812.
24. Graninger W, Ragette R. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. Clin Infect Dis, 1992; 15: 49.
25. Malone DA, Wagner RA, Myers JP, Watanakuakorn C. Enterococcal bacteremia in teo large community teaching hospitals, Am J Med, 1986; 81: 60.
26. Schmit JL. Efficacy of teicoplanin for enterococcal infections: 63 cases and review. Clin Infect Dis, 1992; 12: 302.
27. Shorekan D, Milduan D, Handwerger S. Comparative in vitro activities of teicoplanin, daptomycin, ramoplanin, vancomycin and PD 1227.39 against blood isolates of Gram-positive cocci. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1570.
28. Bezia MC, Ribon Musqelie B. In-vitro activity of vancomycin and teicoplanin against Gram-positive cocci. Pathol Biol, 1992; 40: 461.
29. Uttley AHC, Collins CH, Naidodo J, George RC. Vancomycin resistant enterococci. Lancet, 1998; 1:57.
30. Ulusoy S, Hoşgör M, Özkan F, Özinel MA, Tokbaş A. *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'un antibiyotik direncinin araştırılması. ANKEM Derg, 1995; 9(1): 12-16.
31. Ballow CH, Biedenbach DJ, Rossi F, Jones RN. Multicenter assasment of the linezolid spectrum and activity using the disk diffusion and E test methods: report of the Zyvox (R) antimicrobial potency study in Latin America (LA-ZPS). Braz J Infect Dis, 2002; 6(3): 100-9.
32. Billström H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. Int J Antimicrob Agents, 2008; 32(5): 374-7.

33. Bell JM, Turnidge JD, Ballow CH, Jones RN. Multicentre evaluation of the in vitro activity of linezolid in the Western Pacific. J Antimicrob Chemother, 2003; 51(2): 339-45.
34. Dilek AR, Yıldız F, Dilek N, Bülent Y, Toraman Z. Linezolidin MRSA ve Enterococcus spp suşlarına in-vitro etkinliği. ANKEM Derg, 2007; 21(4): 211-3.
35. Jones RN, Della-Latta P, Lee LV, Biedenisbach DJ. Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolated from a patient without prior exposure to an oxazolidinone: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, Diagn Microbiol Infect Dis, 2002; 42(2): 137.
36. Pesce A, Debbia EA, Toni M, Schito GC. Antibiotic resistance of clinical isolates of *Enterococcus* in Italy. Clin Infect Dis, 1992; 15: 490.

## Alt göz kapağında şarbon

### Anthrax on lower eyelid

Recep TEKİN<sup>1</sup>, Mustafa Kemal ÇELEN<sup>2</sup>, Vuslat BOŞNAK<sup>2</sup>, İhsan ÇAÇA<sup>3</sup>, Celal AYAZ<sup>2</sup>

#### ÖZET

Esas olarak ot yiyen hayvanların hastalığı olan şarbon, insanlara enfekte hayvanlardan bulaşan bir zoonozdur. Bu hastalığın en sık görülen formu, olguların yaklaşık % 95'inde saptanan deri şarbonudur; alt göz kapağı tutulumu ise nadirdir. 17 yaşındaki kadın hastanın sağ alt göz kapağında kaşıntılı ve eritemli papül şeklinde başlayan ve daha sonra kapağın tamamına yayılan, ödemin de eşlik ettiği lezyon mevcuttu. Alınan materyalde zincir şeklinde Gram pozitif basiller görüldü, ancak kültürde üreme olmadı. Orbital bilgisayarlı tomografide periorbital bölgede yumuşak doku şişliği saptandı. Lezyonun tipik olması ve Gram pozitif basiller görülmesi ile hastaya deri şarbonu tanısı kondu. Hastanın başlangıç ve idame tedavisi için ampisilin/sulbaktam verildi. Hastanın iki hafta sonraki kontrolünde her hangi bir komplikasyon gelişmeden tamamen iyileştiği gözlemlendi. Periorbital şarbon olgularında tedaviye rağmen skatrisyel ektropion ve lagoftalmus benzeri komplikasyonlar gelişebilir. Erken tanı konulup antibiyotik tedavisine başlanması komplikasyon oluşumunu anlamlı derecede azaltabilir. Bu olgu sunumunda şarbon hastalığında nadir olarak görülen, alt göz kapağı şarbonlu bir olgu rapor edilmiş olup, tanı ve tedavi yaklaşımları değerlendirilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Şarbon, deri şarbonu, göz kapağı, tanı, tedavi

#### ABSTRACT

Anthrax is mainly a disease of grass-eating animals and this zoonosis is transmitted to humans from infected animals. Cutaneous anthrax is the most common form, and it constitutes approximately 95 % of the cases but lower eyelid involvement is uncommon. A 17 year old female patient had an itchy and erythematous papule started on right lower eyelid and later spreaded to the entire cover, and a lesion accompanied by edema. Gram-positive bacilli in the chain form were seen in the material but the culture was negative. Orbital computed tomography showed periorbital soft tissue swelling in the region. Since the lesion is typical and Gram-positive bacilli were seen, the patient was diagnosed as skin anthrax. The initial and maintenance treatment of patient was planned with intravenous ampicillin/sulbaktam. After two weeks the patient has been found as completely healed without any complication. In periorbital anthrax cases complications, such as scatrisyel ectropion and lagoftalmus may develop even the treatment. Early diagnosis and antibiotic treatment can significantly reduce the developments of complications. We report a case of lower eyelid antrax which is rarely seen and evaluation of applications regarding diagnosis and treatment.

**Keywords:** Anthrax, cutaneous anthrax, eyelid, diagnosis, treatment

<sup>1</sup> Diyarbakır Çocuk Hastalıkları Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, DİYARBAKIR

<sup>2</sup> Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, DİYARBAKIR

<sup>3</sup> Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, DİYARBAKIR

İletişim / Corresponding Author : Recep TEKİN

Diyarbakır Çocuk Hastalıkları Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, DİYARBAKIR

Tel : +90 412 245 75 11

E-posta / E-mail : rectek21@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 06.12.2010

Kabul Tarihi / Accepted : 10.03.2011

## GİRİŞ

Şarbon; *Bacillus anthracis*'in neden olduğu insanlarda nadir görülen bir hastalıktır. Şarbon temel olarak bir hayvan hastalığı olup, hayvancılıkla uğraşan kişilerde daha sık görülmektedir. Enfekte hayvan ile direkt temas veya etinin yenilmesi veya sporların inhale edilmesiyle insana bulaş olmaktadır. Şarbon insanda; deri, akciğer ve gastrointestinal şarbon olmak üzere üç farklı formda görülür. İnsanlarda görülen şarbonun yaklaşık % 95'ini deri şarbonu oluşturmaktadır. Deri şarbonu en çok baş, boyun ve üst ekstremitelerde görülmekte olup, alt göz kapağı tutulumu ise nadirdir (1-3). Periorbital şarbon olgularında tedaviye rağmen skatrisyel ektropion ve lagoftalmus benzeri komplikasyonlar gelişebilir. Erken tanı ve tedavi, komplikasyon oluşumunu anlamlı derecede azaltabilir (2). Bu olguda; alt göz kapağında gelişen şarbonun tanı ve tedavisi rapor edilmektedir.

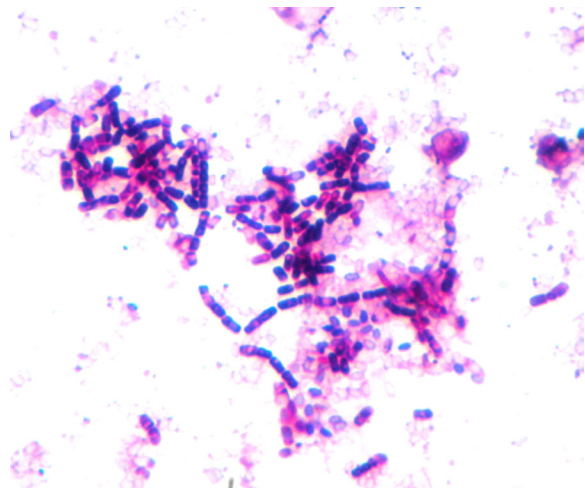
## OLGU

Onyediy yaşındaki bayan hasta dört gündür devam eden ateş yüksekliği, gözde şişlik ve kızarıklık şikayeti ile kliniğimize yatırıldı. Sağ alt göz kapağında kaşıntılı ve eritemli papül şeklinde başlayan ve daha sonra alt göz kapağına yayılan, ödemin de eşlik ettiği

lezyonu olduğu öğrenildi. Hikayesinde on gün önce aşısız küçük baş hayvan kesimi ve post yüzme öyküsü mevcuttu. Yatış esnasında yapılan fizik muayenesinde ateşi 38,7°C, TA: 120/70 mmHg, nabızı: 90/dk, solunum sayısı: 18/dk, genel durumu orta ve şuur açık idi. Fizik muayenesinde sağ göz altında 1x1 cm çapında eritemli zemin üzerinde, keskin ve kenarları düzensiz, üzerinde nekrozun olduğu siyah krutlu ülserle lezyon mevcuttu. Periorbital ödem ile birlikte sağ iç kantusta pürülasyon, sarı-kahve renkte ve hemorajik krutlu ülserle lezyon ile birlikte yer yer yalancı veziküller mevcut olup (Şekil 1), diğer sistem muayeneleri normal idi. Hastanın lökosit sayısı 16.000/mm<sup>3</sup>, sedimentasyon hızı 17 mm/saat, CRP düzeyi 20 mg/dl bulundu. Lezyondan alınan materyalden yapılan Gram boyamada zincir şeklinde Gram pozitif basiller görüldü (Şekil 2), ancak alınan kültürde üreme olmadı. Çekilen orbital bilgisayarlı tomografide periorbital bölgede yumuşak doku şişliği saptandı. Lezyonun tipik olması ve Gram boyamada Gram pozitif basiller görülmesi ile hastaya deri şarbonu tanısı kondu. Hastada sekonder enfeksiyon da düşünüldüğünden ampisilin/sulbaktam 6 g/gün başlandı. Tedavinin yedinci gününde hastanın



Şekil 1. Alt göz kapağında ödem, ülserle lezyon ve siyah eskar



Şekil 2. Lezyonun gram boyamasında görülen zincir şeklinde gram pozitif basiller

periorbital ödemi azaldı ve ülser lezyon siyah, keskin sınırlı skar halini aldı. Antibiyotik tedavisi ondört güne tamamlanan hasta daha sonra kontrole gelmek üzere taburcu edildi. Hasta iki hafta sonra kontrole geldiğinde krutun kendiliğinden düşmüş olduğu, yerinde granülasyon dokusunun kaldığı, ancak göz kapaklarında herhangi bir patoloji gelişmediği saptandı.

### TARTIŞMA

Ülkemizin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yaygın olan kontrolsüz hayvancılık nedeniyle deri şarbonu bu bölgelerde endemiktir (4). Deri şarbonu sıklıkla hasta hayvanların kesilmesi sırasında direkt temasla deri bütünlüğünün bozulduğu bir bölgeden basilin vücuda alınması ile oluşur. Tipik periorbital şarbon üst göz kapağından başlar, alt kapak ve yanağa doğru yayılır (1,2). Olgumuzda ise alt göz kapağında başlayan lezyon vardı. Deri şarbonunda ilk bulgu, enfeksiyon alanındaki yaygın ve ciddi ödemdir. Ödem karakteristik olarak gode bırakmaz ve ağrısızdır. Periorbital bölgede yerleşen lezyonlarda ödem fazladır ve yayılma eğilimi gösterir. Ödem yüze, boyuna ve göğüs ön duvarına yayılabilir. Tipik eskar bir ile iki hafta içinde gelişir. Göz kapağındaki bu lezyon, skar ve kontraktüre sebep olmakta ve skatrisyel ektropion a yol açabilmektedir (5). Hayvanlar ile sıkı temas hikayesi olan tüm şarbon vakalarında göz kapağının olaya karıştığı bildirilmiştir (1,2). Hastamızda da hayvan kesimi ve temizleme öyküsü mevcuttu. Şarbon çoğunlukla tarımsal ve hayvansal üretim işlerinde çalışan işçilerin mesleki hastalığı olup, özellikle bu popülasyonun göz kapağı ve orbita enfeksiyonlarının ayırıcı tanısında göz önünde tutulmalıdır (6). Ayırıcı tanıda, karbonkül, erizipel, selülit, nekrotizan selülitler, primer sifiliz şankırı, orf, tularemi ve tropikal ülser düşünülmalıdır (1).

Şarbonun her üç klinik formu da tedavi edilmediği takdirde öldürücü olabilir. Bu nedenle şarbonunda erken

tanı ve tedavi önemlidir. Tedavi edilmeyen olguların % 10-20'sinde sepsis gelişir ve ölümler sonuçlanır (7). Uygun antibiyotik tedavisi, havayolu açıklığının sağlanması ve uygun steroid tedavisi ile ölüm oranı % 1'den düşüktür (5). Hastalığın tanısı, basilin kültürde üremesi veya direkt yaymada görülmesi ve PCR ile konur. Son yıllarda şarbon tanısında PCR giderek daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. *B.anthraxis* in vitro bir çok antimikrobiyale duyarlıdır. Penisilin, amoksisilin, vankomisin, amikasin, tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, sefalosporin ve siprofloksasinin *in vitro* *B.anthraxis* suşlarına etkili oldukları gösterilmiştir. Tedavide yüksek doz parenteral penisilin ilk tercih edilecek antibiyotiktir. Engin ve arkadaşlarının yapmış oldukları 39 vakalık bir seride, deri şarbonu olan hastaların büyük çoğunluğunun penisilin ile tedavi edilmiş olduğu, üç hastanın yaygın ödemden dolayı steroid tedavisi aldığı; iki-dört gün içinde genel durumda düzelme ve ödeminde azalmanın, tedavinin etkili olduğunun en önemli göstergesi olduğu belirtilmiştir (3).

Deri şarbonunda cerrahi insizyon yapılması semptomların artmasına ve lezyonun genişlemesine yol açtığından kesinlikle yapılmamalıdır. Topikal antibiyotik uygulamasının etkisi yoktur. Deri lezyonunun lokal pansumanının yapılması ve gazlı bezle kapatılması yeterlidir (8). Göz kapağını tutan cilt şarbonunda, çoğu zaman antibiyotikler ile sistemik semptomlarda düzelme, skatrizasyon ve eskarın progresyonunda durma olmaktadır (1). Bracham, lezyona cerrahi girişimde bulunulmaması gerektiğini, aksi takdirde bunun başka bir yerde enfeksiyonun yayılmasına ve semptomların şiddetlenmesine neden olacağını bildirmiştir (5). Soysal ve ark. ise yüksek doz penisilin ile tedavi ettikleri şarbon vakasında, alt göz kapağında skatrisyel ektropion geliştiğini, daha sonra tarsokonjonktival rezeksiyon ve tam kat deri grefti uyguladıkları hastalarından tatmin edici sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir (7). Erken ve etkin tedaviye rağmen, lezyonun derecesine paralel olarak değişik

oranlarda skatrizasyon gelişebilir. Bizim olgumuzda ise antibiyotik tedavisi sonrası lezyonlar geriledi ve herhangi bir skatrizasyon gelişmedi.

Şarbon dünyada gittikçe azalan enfeksiyon hastalıklarından biri olmasına rağmen, gelişmekte olan ülkelerde halen sorun oluşturmaktadır. Bölgemizde tarımcılık ve hayvancılığın yaygın olmasından dolayı şarbon olgularına daha sık rastlanılmaktadır. Kaçak hayvancılık ve hayvan kesiminin önüne geçilmesi, hayvan yetiştiricilerinin

eğitilmesi, hayvanların aşılması ve kontrollerin daha sık yapılması şarbon olgularının görülme sıklığında azalmaya yol açacaktır. Bununla birlikte özellikle ülkemizin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde çalışan hekimlerin, şarbonun bulgu ve semptomlarını kolayca tanımaları, erken ve etkili bir tedaviye başlanabilmesi açısından önemlidir. Özellikle hayvanlar ile sıkı teması olan hastalarda preseptal ve orbital sellülitin ayırıcı tanısında şarbon mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Lucey D. *Bacillus anthracis* (anthrax). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone; 2005. p.2215-20.
2. Çaça I, Cakmak SS, Unlü K, Sakalar YB, Kadiroğlu AK. Cutaneous anthrax on eyelids. Jpn J Ophthalmol, 2004;48: 268-71
3. Engin A, Elaldı N, Dökmetaş İ, Bakıcı MZ, Kaya Ş, Bakır M. Cutaneous anthrax in the Central Anatolia Region of Turkey: A review of 39 adults cases. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 2010; 30(3): 1032-8.
4. Irmak H, Buzgan T, Karahocagil MK, Sakarya N, Akdeniz H, Caksen H ve ark. Cutaneous manifestations of anthrax in Eastern Anatolia: a review of 39 cases. Acta Med Okayama, 2003; 57: 235-40.
5. Duke-Elder SJ. The ocular adnexa: Disease of the eyelid. In: System of Ophthalmology. Kimpton Publishers, Bristol. 1974;13: 97-101.
6. Çelebi S, Çelebi H, Çeliker ÜÖ, Kandemir B, Alagöz G, Esmertigil S. Anthrax as the cause of preseptal cellulitis. Acta Ophthalmol Scand, 1997; 75: 462-3.
7. Soysal HG, Kıratlı H, Recep ÖF. Anthrax as the cause of preseptal cellulitis and cicatricial ectropion. Acta Ophthalmol Scand, 2001; 79: 208-9.
8. Brachman PS. Anthrax . In: Evans A S, Brachman P S, eds. Bacterial Infections of Humans, Epidemiology and Control. 3th ed. New York: Plenum Medical; 1991:75



# Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri

## Rapid diagnostic methods in microbiology

Zeki ARAS<sup>1</sup>

### ÖZET

Mikrobiyoloji uygulamalarında önemli bir yere sahip olan hızlı yöntemler klinik, gıda ve çevresel örneklerde bulunan patojen mikroorganizmalar ve onların metabolitlerinin erken tespiti, izolasyonu, identifikasyonu ve sayımı için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İlk olarak 1960'ların ortalarında geliştirilmeye başlayan bu yöntemler, minyatürize biyokimyasal, immunolojik, genetik ve biyosensör tekniklerini kapsamaktadır. Minyatürize biyokimyasal identifikasyon yöntemleri 1965 ile 1975 yılları arasında geliştirilmiş, 1975 ile 1985 yılları arasında kalan süre immunolojik test yöntemlerinin altın çağı olarak adlandırılmıştır. Genetik tanı yöntemleri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamaları 1985 ile 1995 yılları arasında gelişim göstermiştir. 1995 yılından günümüze kadar ise biyosensör ve mikroarray test sistemleri, çeşitli örneklerde bulunan patojen organizmaların direk tanısı amacıyla geliştirilmiştir. Bu derlemede anlatılan immunolojik testler, manüel ve otomatik ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) testlerini, lateral migrasyon immunoassay, latex aglutinasyon testlerini ve immunomanyetik separasyon yöntemlerini kapsamaktadır. Genetik tanı yöntemlerinden birisi olan PZR, patojen mikroorganizmaların doğru tanısını güçlendirmek için son yıllarda daha da geliştirilmiştir. Hızlı testlerin güvenilirliği ile ilgili bir çok

### ABSTRACT

Rapid methods are an important part of applied microbiology and are widely used for isolation, identification, early detection, and enumeration of pathogen microorganisms and their products in clinical, food, and environmental samples. These methods which were comprised as miniaturized microbiological, advanced immunological, genetic, and biosensor techniques were began to be developed in mid-1960s. The miniaturized microbiological diagnostic kits were developed from 1965 to 1975. The years of among 1975-1985 were called the golden age of immunological tests. The genetic diagnostic methods and polymerase chain reaction (PCR) applications have developed between the years 1985 and 1995. Since 1995, the biosensor and microarray test systems have been developed for direct detection of pathogen microorganisms in different samples. The immunological tests described in this review include manual and automated enzyme linked immunosorbant assays, lateral migration immunoassays, latex agglutination tests and immuno-magnetic separation assays. PCR process which is one of the genetic procedures has been improved in order to strenghten the diagnosis of pathogen organisms. Numerous studies have been conducted to determine the sensitivity and specificity of these tests. They have determined that the

<sup>1</sup> Konya İl Sağlık Müdürlüğü, KONYA

İletişim / Corresponding Author : Zeki ARAS

Konya İl Sağlık Müdürlüğü, KONYA

Tel : +90 332 351 18 32

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

Geliş Tarihi / Received : 08.09.2010

Kabul Tarihi / Accepted : 14.12.2010

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2011.96530

araştırmanın sonuçları göstermiştir ki; bu testler ucuz ve hızlıdır ayrıca yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahiptirler. Bu makalede hızlı testlerin çalışma prensipleri ve araştırma sonuçlarının karşılaştırılması sunulmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Hızlı yöntemler; tanı testleri; ELISA; PZR, biyosensör

tests are rapid, highly sensitive, specific and inexpensive methods. Theoretical information and results of comparative studies about these methods are described in detail in this review.

**Keywords:** Rapid methods, diagnostic test, ELISA, PCR, biosensor

## GİRİŞ

Mikrobiyolojik yöntemler; geleneksel ve hızlı yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır. Geleneksel yöntemler halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Hızlı yöntemler terimi, farklı tiplerdeki minyatürize biyokimyasal kitleri, antikor temelli serolojik testleri, nükleik asit hibridizasyon kökenli yöntemleri ve biyosensörleri kapsamaktadır. Bu test yöntemleri manuel, yarı otomatik veya tam otomatik kullanıma sahiptirler (1, 2). Hızlı yöntemler; klinik, gıda ve çevresel örneklerde bulunan bakteri, mantar, virüs ve protozoon gibi mikroorganizmalar ile onlara ait metabolitlerin izolasyonu, identifikasyonu, erken tanısı, sayımı ve bakterilerin antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (1). Bu yöntemler yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olmalı, ayrıca ucuz ve kısa sürede sonuç vermelidir. Günümüzdeki yöntemlerin tamamı bu sayılan özellikleri taşımaktadır (2).

Mikrobiyoloji uzmanları, hızlı yöntemlerle ilk olarak 1960'ların ortalarında tanışmaya başlamışlardır. 1970'lerde gelişimi ivme kazanan bu yöntemlerin ilerlemesi 1980'lerden günümüze kadar devam etmiştir (1). Hızlı yöntemlerin yıllara göre gelişimi şöyle tanımlanabilir:

1965 - 1975 : minyatürize biyokimyasal identifikasyon yöntemlerinin gelişimi,

1975 - 1985 : immunolojik testlerin gelişimi,

1985 - 1995 : moleküler sistemlerin ve polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) uygulanması,

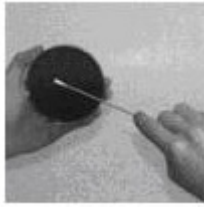
1995 - ... : biyosensör ve mikroarray gibi sistemlerinin gelişimi (3).

## MİNYATÜRİZE BİYOKİMYASAL İDENTİFİKASYON YÖNTEMLERİ

Mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılan geleneksel biyokimyasal testlerde yoğun işgücü ile yüksek miktarda ayıraç ve besiyeri tüketilmektedir. Minyatürize biyokimyasal yöntemlerde ise dehidrate ayıraçlar veya kullanıma hazır besiyerleri kullanılmaktadır. Bu teknikler genellikle "modern biyokimyasal identifikasyon teknikleri" adı ile anılmakta ve günlük laboratuvar uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (2).

Minyatürize biyokimyasal yöntemlerde, pleytlerde hazır bulunan çeşitli sıvı veya katı besiyerlerine saf kültürler inokule edilip inkübe edilir ve enzim-substrat ilişkisine bağlı oluşan renk değişimi ya da gaz oluşumu ile bakteri belirlenir. Sonuçlar tanı çizelgeleri ile karşılaştırılabileceği gibi veritabanları ile de analiz edilebilir (Şekil 1) (1, 2).

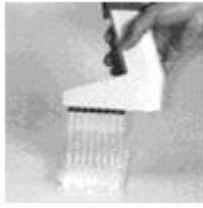
Bilim adamları tarafından, 1960 ve 1970 yılları arasında birçok sistem minyatürize edilmiş ve tanı amaçlı kullanılmıştır. Son yıllarda API (Biomerieux), Enterotube (Becton-Dickinson), Minitek (BBL Microbiology), Crystal ID (Bacto Laboratories), MicroID (Remel), RapID (Rapid), Biolog (Biolog Systems) ve Vitek (Biomerieux Diagnostics) gibi çeşitli minyatürize ticari tanı sistemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler, önceleri enterik bakterileri (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter* vb.) identifiye etmek için tasarlanmışken daha sonraları fermentatif olmayan bakteriler, Gram pozitifler, anaeroblar ve mayaların identifikasyon ve antibiyogramlarını yapabilecek



1- Katı besiyerinde saf kültürün elde edilmesi ve kullanılacak test kiti çeşidinin belirlenmesi için gram boyama yapılması



2- İnokulumun yoğunluğunun ayarlanması



3- Mikropleyde inokulasyonun yapılması ve inkübasyona bırakılması



4- Mikropleyten okunması ve mikroorganizmanın identifiye edilmesi

Şekil 1. Minyatürize biyokimyasal yöntemlerde işlem basamakları

şekilde geliştirilmişlerdir. Bu sistemlerde kullanılan test kartları, değişik büyüklükte ve antibiyotik veya identifikasyon substratları içeren değişik sayıda mikro kuyucuklardan oluşmaktadırlar. Plastik kartların her gözünde farklı ayraçlar bulunmaktadır. Bilinmeyen kültürün sıvı formu plastik kartların her bir gözünün vakum dairesinden verilmekte ve kart bir inkübatöre kaldırılarak 4-12 saat inkübe edilmektedir. Otomatik yöntemlerde, sistem belirli sürelerle her bir kartı taramakta ve renk değişimi veya gaz oluşumunu her bir göz için veritabanı ile karşılaştırmaktadır (1-4).

İlk karşılaştırmalı analizlerin çoğu klinik örneklerinin değerlendirilmesine odaklanmıştır. Minyatürize diagnostik sistemlerin kriterlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan ilk çalışmalarda, minyatür sistemlerin geleneksel yöntemlerden daha hızlı, daha doğru ve daha ucuz oldukları ve ayrıca insan gücünden ve çalışma alanından tasarruf sağladıkları sonucuna varılmıştır. Başlangıçta, hızlı tanı kitlerinin her bir gözündeki renk değişimi gözle okunup daha sonra elde edilen manuel identifikasyon kodu kullanılarak mikroorganizma belirlenirken, son zamanlarda diagnostik tanı şirketleri bilinmeyen

kültürlerin identifikasyonlarının hızlı ve doğru yapılabilmesi için bilgisayarlı otomatik okuyucular geliştirmişlerdir (4).

Mikrobiyolojik yöntemlerin minyatürizasyonu, materyal ve zaman kazancı ile ticari mikrobiyolojiye hızlı ve kolay çalışma imkanı sağlamıştır. Geliştirilen sistemler ile özellikle rutin teşhis laboratuvarlarında kısa sürede fazla sayıda örnek işlenebilmektedir. Ayrıca bu sistemler gelişmiş laboratuvarların çok sayıda kültür işlenmesi gereken çalışmalarında ve birçok araştırmada kullanılabilir (1, 4).

Swanson ve Collins (5) tarafından 503 veteriner kökenli patojen enterik bakteri kullanılarak yapılan bir çalışmada, hızlı minyatürize test kitlerinden birisi olan API 20E'nin veteriner mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Test kiti veteriner izolatların % 96'sını doğru, % 3'ünü yanlış identifiye etmiş ve % 1'ini identifiye edememiştir. Yanlış identifikasyonun *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Escherichia coli* suşlarından ileri geldiği belirlenmiştir. Veteriner ve beşeri izolatlar arasındaki biotip farklılığı da bazı biyokimyasal reaksiyonlar (sitrat kullanımı gibi) arasındaki farklılığa bağlanmıştır.

Jayarao ve ark. (6) tarafından yapılan bir çalışmada, 144 veteriner kökenli *Streptococcus* suşu (mastitis vakalarından izole edilmiş suşların dağılımı: *Streptococcus uberis* (60), *Streptococcus dysgalactiae* (32), *Streptococcus agalactiae* (15), *Streptococcus bovis* (15), *Enterococcus faecium* (10) ve *Enterococcus faecalis* (12)) Vitek Gram pozitif identifikasyon kiti ve API Rapid Strep system kitleri ile değerlendirilmiş elde edilen sonuçlar klasik biyokimyasal identifikasyon yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Referans suşlar her iki kit ile de doğru identifiye edilmiştir. Vitek Gram pozitif identifikasyon kiti ile toplam 144 suşun % 94,4'ü identifiye edilebilirken bu sonucun türlere göre dağılımı ise şöyle olmuştur: *S. uberis* % 95, *S. dysgalactiae* % 93,8, *S. agalactiae* ve *S. bovis* % 93,3, *E. faecium* % 90 ve *E. faecalis* % 100. API Rapid Strep kiti ile ise % 96,5 doğrulukla identifikasyon sağlanmıştır. Suşların büyük bir çoğunluğu istenilen identifikasyon seviyesinde identifiye edilmişlerdir. Ayrıca suşların identifikasyonları ortalama 4-8 saatte gerçekleştirilmiştir.

API sistem birden fazla bakteriyel taksonomik grubu identifiye etmek için kullanılmıştır. Domuzlardan izole edilmiş 60 *Pasteurella multocida* suşu ile yapılan bir çalışmada, API 20NE testi PZR ile karşılaştırılmış ve API 20NE ile izolatların tamamı doğru identifiye edilmiştir. Ayrıca, API 20NE test kiti, API 20E, API 50CHB/E ve API ZYM kitleri ile birlikte kullanıldığında izolatların alt tiplerini de belirleyebildiği ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabileceği bildirilmiştir (7).

## İMMUNOLOJİK YÖNTEMLER

Mikroorganizmaların belirlenmesi ve karakterizasyonunda antikor antijen reaksiyonu yıllardır uygulanmaktadır. Ayrıca, düşük moleküler ağırlığa sahip mikotoksin, pestisit veya veteriner ilaçları gibi gıda kontaminantlarının belirlenmesinde de tercih edilmektedir. Bir immunolojik yöntemin spesifitesini büyük ölçüde kullanılan antikorun spesifitesi belirlemektedir. Immunolojik yöntemlerde üç çeşit

antikor kullanılmaktadır: Poliklonal antikorlar, monoklonal antikorlar ve rekombinant antikorlar (1, 2).

Antijen-antikor reaksiyonu tüm patojenlerin hızlı belirlenmesi için güçlü bir sistemdir. Bazı sistemler yüksek oranda otomatize edilmişken bazı sistemler ise basit kullanıma sahiptir. Bu testler şöyle sınıflandırılabilir:

### 1. Lateks Aglütinasyon Testleri

Antikor kaplı ve boyalı lateks ya da kolloidal altın partikülleri, hızlı serolojik identifikasyon ya da saf bakteri kültür izolatlarının teşhis ve tiplendirilmesinde kullanılır. Antijen ile antikorun birleşmesi sonucu gözle görülür aglütinasyon şekillenir. Ters lateks aglütinasyon testleri çözünebilir antijenler içindir ve çoğunlukla toksinlerin aranmasında kullanılırlar (2, 8).

Papasian ve ark. (8) tarafından, 191 stafilokok izolatu ile yapılan bir çalışmada, Staph Latex Kit (Remel), Staphaurex Plus (Murex), Staphyloslide (Becton Dickinson Microbiological Systems) rapid lateks aglütinasyon test kitleri tüp koagülaz testi ile karşılaştırılmıştır. Kitlerin ve tüp koagülaz testinin identifikasyon doğruluk yüzdeleri sırası ile % 98,4, % 100, % 99,5 ve % 99,5 olarak bulunmuştur.

Lee ve ark. (9) tarafından, veteriner kökenli 48 Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatu ile yapılan bir çalışmada, MRSA-Screen lateks aglutination test kiti (Denka Seiken) PZR ile karşılaştırılmıştır. Test kitinin spesifitesi ve sensitivitesi % 100 olarak bulunmuştur.

### 2. Otomatik ve Manuel ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Yöntemleri

Antijen antikor reaksiyonunu gerçekleştirmek için birçok yöntem olmasına rağmen son yıllarda en çok kullanılan yöntem ELISA testidir. Bu yöntemde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir (10, 11). ELISA testinin direkt, indirekt ve sandviç ELISA gibi farklı şekilleri olmasına rağmen en sık kullanılanı sandviç ELISA yöntemidir (1).

Patojen mikroorganizmaları ve toksinlerini belirlemek için birçok ELISA testi geliştirilmiştir. Fakat bunun yanında ELISA'nın manuel prosedürü çok zahmetli olduğu için son zamanlarda bazı ELISA testleri (VIDAS, Assurance EIA, Transia ElisamaticII, Detex vb) tamamen otomatik hale getirilmiştir. Bu sistemler ile *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *E.coli* 0157, stafilakokkal enterotoksin ve *Campylobacter* gibi patojen ve toksinleri kısa sürede otomatik olarak teşhis edilmektedir (1, 2). Günümüzde kullanılan birçok ELISA kiti yüksek standarda sahiptir ve otomatik olarak çalışmaları için hız ve verimi arttırmakta ve insan hatalarını azaltmaktadır (4).

Sewell ve ark. (12), doğal kontamine 44 çiğ süt örneğinde yaptıkları çalışmada, *Listeria spp.* araştırılması yönünden VIDAS sistemini klasik yöntemle karşılaştırmışlar ve sistemin duyarlılığını % 98,1 özgüllüğünü % 97 olarak belirlemişlerdir.

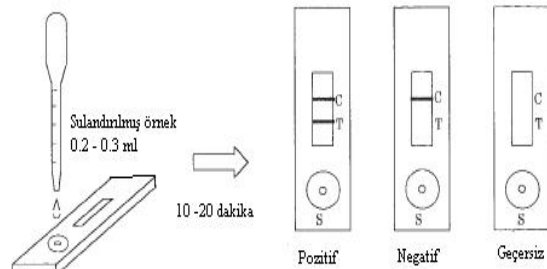
Oktay ve ark. (13) tarafından yapılan bir çalışmada, 42 kaşar peyniri, 42 tereyağı ve 38 kumpir örneği *L. monocytogenes* ve *Salmonella spp.* varlığı yönünden mini-VIDAS ve klasik yöntemle incelenmiştir. Doğal kontamine örneklerde *L. monocytogenes* analizinde klasik yöntemin özgüllüğü peynir için % 99, tereyağı için ise % 98 olarak belirlenmiştir. Bu örneklerde mini-VIDAS sisteminin duyarlılığı ve özgüllüğü ise % 100 olarak bulunmuştur. Gıda numunelerinde *Salmonella spp.* tayini açısından mini-VIDAS yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir. Mini-VIDAS cihazı ile *L. monocytogenes* ve *Salmonella spp.* tayininde hatalı sonuç alınmamış olması büyük bir avantaj olarak belirtilmiş, ayrıca cihaz kullanımının pratikliği ve tüm besiyerlerinin kullanıma hazır olmasının, işgücü ve zamandan tasarruf sağladığı da vurgulanmıştır.

### 3. Lateral Migrasyon İmmunoassay (İmmunokromatografi) Yöntemi

İmmunoloji alanındaki diğer bir gelişme ise antijen-antikor ilişkisine dayanan "Lateral Flow Teknoloji"sinin kullanımınıdır. Bu test formatında da sandviç prosedürü kullanılır fakat ikinci antikor

lateks partikülleri veya koloidal altın ile bağlanmıştır. Zenginleştirilmiş örnek bir seri dairelere transfer edilir ve yıkama işlemine gerek yoktur (2).

Bu sistemde, test kiti üç reaksiyon bölgesine sahiptir. Birinci kuyucuk hedef antijenle reaksiyona girecek antikoları içerir. Bu antikolar renk partikülleri ile bağlanmıştır. Sıvı formdaki örnek (bir gece süreyle zenginleştirilmiş) bu kuyucuğa eklenir eğer örnekte aranan organizma varsa antikolarla reaksiyona girecektir. Oluşan kompleksler kapiller hareket ile ikinci bölgeye lateral olarak yığılacaktır. İkinci bölge, hedef antijen ile reaksiyona girebilecek şekilde düzenlenmiş ikinci bir antikor grubu içerir. Eğer aranan mikroorganizma örnekte varsa oluşan kompleksler bu ikinci antikor grubunca kaplanacaktır ve birinci antikor grubunun renk partikülleri ile kaplı olmasından dolayı mavi bir çizgi hattı oluşacaktır. Fazla antikolar üçüncü bölgeye yığılmaya devam edeceklerdir. Üçüncü bölge ilk antikolar ile reaksiyona girebilen diğer bir üçüncü çeşit antikora sahiptir. Böylece üçüncü bölgede ikinci bir mavi hat oluşacaktır. Bu çizgiye "kontrol" çizgisi denilmektedir ve sistemin çalıştığını göstermektedir (Şekil 2). Tüm bu prosedürler yalnızca 10 dakikada oluşmaktadır ve gerçek bir hızlı testtir (4).



Şekil 2. Lateral migrasyon immunoassay  
C: kontrol çizgisi, T: test çizgisi S: örnek gözü

*Bacillus anthracis*, *E. coli* 0157, *Salmonella*, *Listeria* ve Avian influenza gibi patojenlerin çeşitli örneklerden hızlı tespiti ve identifikasyonu için çeşitli testler geliştirilmiştir. Örnekler 8-24 saatlik zenginleştirmeye tabi tutulduktan sonra test kutusuna

aktarılmaktadır. Sadece kontrol çizgisinin oluşması sonucun negatif olduğunu, hem kontrol çizgisinin hem de test çizgisinin oluşması sonucun pozitif olduğunu gösterir.

Bird ve ark. (14), çeşitli gıda örneklerinden izole ettikleri toplam 1095 *E. coli* O157:H7 suşunu kullanarak, Reveal *E. coli* test kitini klasik yöntem ile karşılaştırmışlardır. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak ( $p < 0,05$ ) bir fark olmadığını bildirmişlerdir.

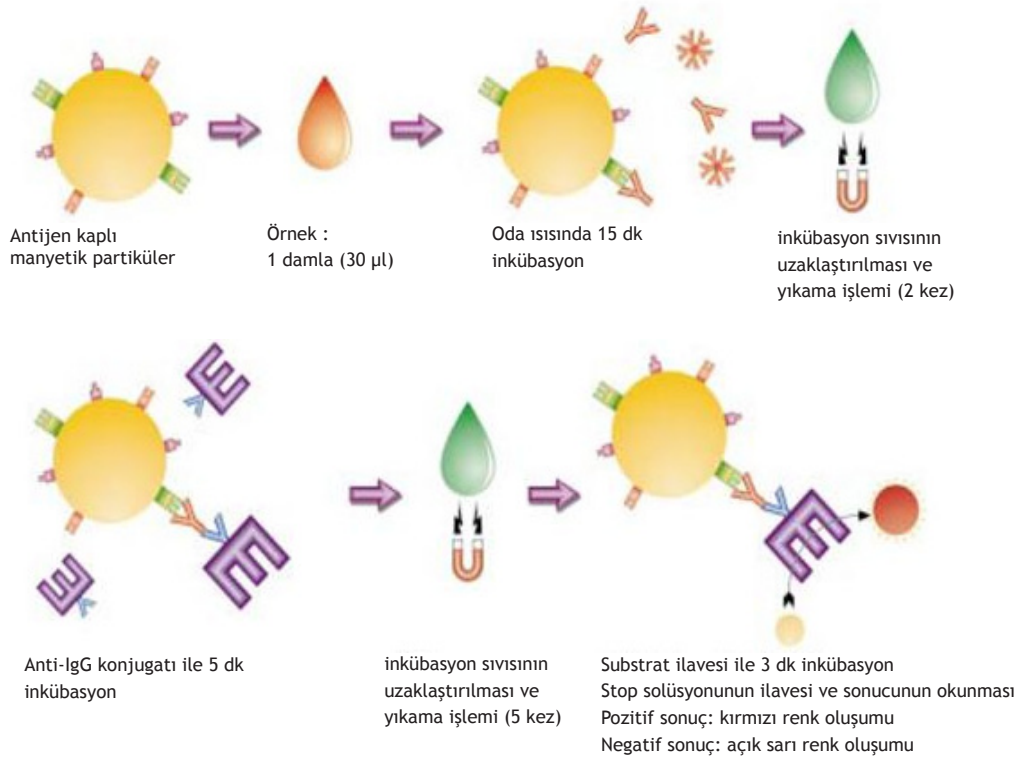
#### 4. İmmüno-Manyetik Seperasyon (IMS) Teknolojisi

Bu yöntemde, metalik partikülleri antikorlarla kaplanmakta ve milyonlarca metalik partikül şüpheli sıvı numuneye eklenmektedir. Örnek bir saat kadar karıştırıldıktan sonra partiküllerdeki antikorlar antijen ile bağlanmaktadır. Reaksiyondan sonra tüp manyetik güç kaynağına yerleştirilip partiküller mıknatısın yardımı ile tüpten uzaklaştırılır. Daha sonra

bu metal partiküller selektif agar, ELISA, PZR ya da diğer mikrobiyolojik yöntemler ile saf kültür olarak elde edilebilirler (Şekil 3). IMS sistem, gıdalardan patojenlerin belirlenmesinde zenginleştirme ve ön zenginleştirme basamaklarından en az bir gün tasarruf sağlamaktadır (4). Son zamanlarda birçok tanı sistemi (ELISA, PZR vb) immüno-manyetik kaplama sistemi ile kombine edilmiştir. Bu sayede inkübasyon süresi kısaltılmış ve duyarlılık arttırılmıştır (2). Sommerfelt ve ark. (15) tarafından yapılan bir çalışmada, HIV virüsünü tespit amacı ile geliştirilmiş Bionor HIV-1&2 isimli test IMS kitinin spesifitesi ve sensitivitesi sırasıyla % 98 ve % 97,9 olarak bulunmuştur.

#### GENETİK YÖNTEMLER

Mikroorganizmaların fenotipik özellikleri üreme şartlarına bağlıdır. Bu üreme şartlarına örnek olarak, ısı, pH, besin ihtiyacı, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli, çevresel ve kimyasal stresler, toksinler



Şekil 3. İmmüno-manyetik seperasyon sistemlerinin çalışma prensibi



vb. verilebilir (4). Bakteri ve hücrelerin genotipik özellikleri ise çok stabildir. Bakteriyel kültürlerde doğal mutasyon oranı yüz milyonda birdir. Son yıllardaki gelişmeler genetik testlerde diagnostik mikrobiyoloji içerisinde identifikasyon ve doğrulayıcı testler olarak kullanılmasını sağlamıştır (2).

Bilinmeyen bir bakteriye ait DNA dizisinin bilinen bir DNA probu ile hibridizasyonu genetik testlerin ilk aşamasını oluşturmuştur. Genetrak Sistem (Framingham) patojenlerin enzimle işaretli DNA problemleri kullanılarak tespit edilmesi için geliştirilmiş hassas bir yöntemdir. Stewart ve ark. (16) tarafından yapılan bir çalışmada, *Salmonella* ile kontamine 64 su örneği kullanılarak "Assurance Gold *Salmonella* EIA", "BAX for Screening/*Salmonella*" ve "GENE-TRAK *Salmonella* DLP" test kitleri karşılaştırılmıştır. Test kitlerinin doğruluk oranları sırası ile % 100 (64/64), % 90,6 (58/64), % 100 (64/64) olarak bulunmuştur.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), çeşitli örneklerde bulunan patojen mikroorganizmaların hızlı ve doğru teşhisi için son yıllarda hızlı bir gelişim göstermiştir. Bu yöntemde, aranan mikroorganizmaya ait hedef gen bölgesinin kısa oligonükleotid parçaları ile amplifikasyonu yapılmakta ve çoğaltılan DNA parçaları elektroforez yardımı ile görüntülenmektedir. Bu yöntemin, çeşitli örneklerde bulunan mikroorganizmaları teşhis etmede, altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemi kadar güvenilir olduğu tespit edilmiştir (17, 18). Birçok mikroorganizmanın tespit ve identifikasyonu için çok sayıda PZR protokolü geliştirilmiştir.

### BİYOSENSÖR KÖKENLİ YÖNTEMLER

Biyosensörler, bünyesinde biyolojik bir duyarlıcı bulunan ve bir fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörlerin amacı, bir veya bir grup analit (analiz edilecek madde) miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir (19). Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır.

Bunlar; seçici tanıma mekanizmasına sahip "biyomolekül/ biyoajan", bu biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen "çevirici" ve "elektronik" bölümlerdir (4).

Biyosensörün görevi biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesidir. Biyosensörler biyokomponentler (reseptör) ile fiziksel komponentlerden (transdeuser) oluşurlar. Yapılarında görev alan biyokomponentler çoğu kez biyoreseptör olarak adlandırılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Enzim - substrat ve antikor - antijen arasındaki etkileşimin ilk adımı analitlerin protein moleküllerine bağlanmasıdır (19).

Biyosensörlerin, klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, kalite kontrol, tarım ve veteriner hekimlik, bakteriyel ve viral teşhis, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda kullanımı söz konusudur. Biyosensörler, enzim, mikrobiyal, immuno ve DNA-sensörler olarak gruplandırılabilirler (4).

"Detex" sistem bu alandaki otomatize edilmiş bir sistem olup elektroimmunoassay biyosensör teknolojisi kullanılmıştır. Tüm ayraçlar kullanıma hazır bir şekilde cihazın içinde hazır bulunmaktadır. Test edilecek örnek test kasetine yerleştirilir ve immunolojik reaksiyonlar için ayraç sekansı otomatik olarak başlar. Reaksiyonlar tamamlanınca sonuç cihaz tarafından rapor edilir. Et ve kültür örneklerinin sonuçlarına göre sensitivite ve spesifite *Salmonella* için sırasıyla % 100 ve % 99, *Campylobacter* için % 99 ve % 99 bulunmuştur (4).

### SONUÇ

Hızlı yöntemler, yoğun numune akışının olduğu gıda ve hastane laboratuvarları başta olmak üzere tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda gelişimi ivme kazanan PZR yöntemi, birçok patojen mikroorganizmanın gen sekanlarının belirlenmesi



ile yaygın bir kullanım alanına kavuşmuştur. Bu yöntemle bir gün gibi kısa bir süre içerisinde sonuç verilerek zaman tasarrufu da sağlanmaktadır. Gelecekte, biyosensör çeşitlerinin gelişmesiyle,

hızlı tanı yöntemlerinin özellikle HACCP programları kapsamında kontaminasyon noktalarının değerlendirilmesinde kullanılacağı beklenmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Fung DYC. Rapid methods and automation in microbiology: 25 years of development and predictions. *Bull Tech U Ist*, 2006; 54 (4): 45-55.
2. Blankenfeld-Enkvist GV, Brannback M. Technological trends and needs in food diagnostics. *Technol Review*, 2002; 132/2002.
3. Fung DYC. What's needed in rapid detection of foodborne pathogens, *Food Technol*, 1995; 6: 64-7.
4. Fung DYC. Rapid methods and automation in microbiology. *Compreh Rev Food Sci Food Safety*, 2002; 1: 3-21.
5. Swanson EC, Collins MT. Use of the API 20E system to identify veterinary Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 1980; 12: 10-4.
6. Jayarao BM, Oliver SP, Matthews KR, King SH. Comparative evaluation of Vitek gram-positive identification system and API Rapid Strep system for identification of Streptococcus species of bovine origin. *Vet Microbiol*, 1991; 26(3): 301-8.
7. Vera Lizarazo YA, Rodríguez Ferri EF, Gutiérrez Martín CB. Evaluation of different API systems for identification of porcine Pasteurella multocida isolates. *Res Vet Sci*, 2008; 85(3): 453-6.
8. Papasian CJ, Garrison B. Evaluation of a rapid slide agglutination test for identification of Staphylococcus aureus. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999; 33: 201-3.
9. Lee JH, Jeong J, Park Y, Choi S, Kim Y, Chae J, Moon J, Park H, Kim S, Eo S. Evaluation of the Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(6): 2780-2.
10. Uçan US, Aras Z, Zorlutuna M. Detection of canine brucellosis by a rapid agglutination test using Rhizobium tropici as antigen. *Revue Med Vet*, 2010; 161: 51-6.
11. Uçan US, Aras Z, Semaçan A. Serodiagnosis of Brucella canis infection in dogs by a dipstick enzyme immunoassay. *Eurasian J Vet Sci*, 2010; 26 (2): 109-12.
12. Sewell AM, Warburton DW, Boville A, Daley EF, Mullen K. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of Listeria spp. from foods. *Int J of Food Microbiol*, 2003; 81: 123-9.
13. Oktay İ, Heperkan D. Listeria ve Salmonella tayininde ISO yönteminin VIDAS otomatik sistemi ile karşılaştırılması. *Dünya Gıda Dergisi*, 2005; 74-81.
14. Bird CB, Hoerner RJ, Restaino L. Comparison of the Reveal 20-hour method and the BAM culture method for the detection of Escherichia coli O157:H7 in selected foods and environmental swabs: Collaborative study. *J AOAC Int*, 2001; 84(3): 737-51.
15. Sommerfelt MA, Ohlsson I, Flolid I, Thorstenson R, Sorensen B. A simple semi-rapid HIV-1&2 confirmatory immunoassay using magnetic particles. *J Virol Methods*, 2004; 115(2): 191-8.
16. Stewart DS, Reineke KF, Tortorello ML. Comparison of assurance gold Salmonella EIA, BAX for screening/Salmonella, and GENE-TRAK Salmonella DLP rapid assays for detection of Salmonella in alfalfa sprouts and sprout irrigation water. *J AOAC Int*, 2002; 85(2): 395-403.
17. Aras Z, Uçan US. Detection of Brucella canis from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. *Theriogenology*, 2010; 74: 658-62.
18. Aras Z, Uçan US, Ateş M. Brucella suşlarının identifikasyon ve biyotiplendirilmesi. *Eurasian J Vet Sci*, 2009; 25: 51-9.
19. Ramsay G. Commercial biosensors applications to clinical bioprocess and environmental samples. A Wiley - Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc. Virginia, 1998.

# Su kalitesinin iyileştirilmesinde ozon kullanımı ve kimyasal etkileri

## Use of ozone for improving of water quality and its chemical effects

Sibel UZUN<sup>1</sup>

### ÖZET

Ozon günümüzde su kalitesinin arttırılmasında sıklıkla kullanılan bir dezenfektandır. Ancak yarılanma ömrü kısa ve sudaki çözünürlüğü nispeten düşük olduğundan dağıtım sırasında ortamdaki varlığının sürekliliği mümkün değildir. Bu nedenle ozon ancak primer dezenfektan olarak kullanılabilir. Ozonlamadan sonra dağıtım sistemindeki dezenfeksiyon işleminin tamamlanabilmesi için klor, klordioksit, monokloramin gibi sekonder bir dezenfektan kullanılması gerekir. Ozon sudaki kokun, demir ve mangan gibi inorganik maddelerin yanı sıra herhangi bir sebeple suya karışan organik maddeleri, ilaç kalıntılarını ve pestisitleri etkin şekilde yükseltgeyerek ortamdan uzaklaştırır. Ozon, uygun şekilde ve doğru miktarlarda kullanıldığında etkin bir kimyasal ve mikrobiyolojik dezenfektandır. Buna karşılık uygun olmayan koşullarda veya yüksek miktarlarda kullanıldığında ise istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına neden olabilir. Ozon dezenfeksiyon etkisini yükseltgen özelliği ve yüksek reaktivitesi aracılığıyla gösterir. Ozonun sudaki etki mekanizması pH başta olmak üzere pek çok parametreye bağlıdır. Asidik ortamda moleküler halde etki eden ozonun, daha yüksek pH değerlerinde hidroksil radikal formları baskındır. Her iki mekanizma sonucu oluşan yan ürünler birbirinden farklıdır.

### ABSTRACT

In recent years, ozone is a disinfectant frequently used for enhancing water quality. However, since its short half-life and relatively low solubility in water, it is not possible to ensure its presence continuously in distribution system. Hence, ozone can only be used as a primary disinfectant. After ozonization, in order to complete the disinfection process in the distribution system, a secondary disinfectant like chlorine, chlorodioxide and monochloramine must be used. As well as odor in water, and inorganic materials such as iron and manganese, ozone effectively removes organic matter, drug residues and pesticides mixed into the water for any reason by oxidation from media. When used appropriately and in the correct amount ozone is an efficient chemical and microbiological disinfectant. However, when ozone is used in unfavorable conditions and/or in large quantities, it can cause the production of unwanted by-products. Ozone shows its disinfection effect through oxidation properties and high reactivity. The effect mechanism of ozone in water is depended on many parameters, mainly on pH. While ozone effects in molecular form at acidic conditions, hydroxyl radical forms are dominant in much higher pH values. By-products formed by both of the mechanisms are different from each other.

<sup>1</sup> Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Gıda Güvenliği ve Beslenme Müdürlüğü, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Sibel UZUN

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Gıda Güvenliği ve Beslenme Müdürlüğü, ANKARA

Tel : +90 312 458 21 45

E-posta / E-mail : sibel.uzun@rshm.gov.tr

Geliş Tarihi / Received : 21.09.2010

Kabul Tarihi / Accepted : 07.02.2011

Ozonlama yan ürünü olan organik asitler ve aldehitler kolayca özümlebilir organik karbon veya biyobozunur karbon türevlerine dönüşebilirler. Bu nedenle ozonlama işlemine biyolojik aktif prosesin eşlik etmesi biyobozunur yan ürünlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Ozonlamanın uygun şekilde yapılması için sudaki ozon ihtiyacının belirlenmesi gerekir.

**Anahtar Sözcükler:** İçme suyu, ozon, ozon ihtiyacı, dezenfeksiyon, su kimyası

Organic acids and aldehydes which are by-products of ozonization can easily be converted to the assimilable organic compounds or to the biodegradable carbon derivatives. Thus the application of the biological active process with ozonization makes easier removal of the biodegradable by-products. To apply ozonization appropriately, it is needed to determine the ozone demand in water.

**Keywords:** Drinking water, ozone, ozone demand, disinfection, chemistry of water

## GİRİŞ

Endüstride; içme suyunun iyileştirilmesi, atık su yönetimi, saf su eldesi, balıkçılık, tarım, kağıt, gıda ve boya sanayi gibi pek çok uygulama alanı bulunan ozon (O<sub>3</sub>) özellikle kaynak sularında dezenfektan olarak, gıdalarda tazeliğin korunması ve depolama ömrünün uzatılması amacıyla kullanılan bir maddedir (1).

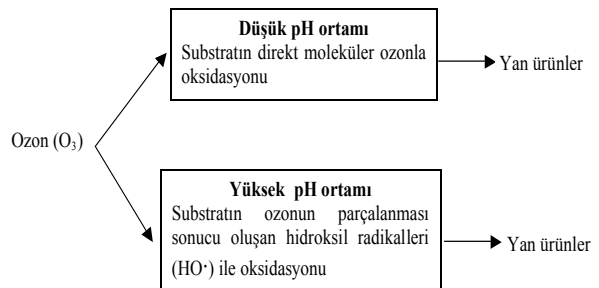
Organik maddeler, canlı organizma faaliyetleri, inorganik bileşikler, endüstriyel atıklar, klorlama, yüksek mineral konsantrasyonu, çözünmüş gazlar gibi faktörler suda kötü tat ve kokuya neden olurlar. Uygun koşul ve miktarlarda olmak koşuluyla ozonlama işlemi yapılarak suda renk giderimi, koku ve tat kontrolünü sağlamak mümkündür. Tablo 1’de sudaki bazı önemli estetik parametreler ve etkileri ilgili değerlendirmeler verilmiştir (2,3).

## 1. OZON KİMYASI

Ozon (O<sub>3</sub>; triatomik oksijen CAS No: 10028-15-6); oda koşullarında renksiz ve keskin kokulu bir gazdır. Hem gaz hem de çözelti halinde oldukça reaktif ve güçlü bir yükseltgen olan ozonun sudaki çözünürlüğü 570 mg/L’dir. Yine bir dezenfektan olarak kullanılan klor gazının sudaki çözünürlüğü ise ozondan 12 kat fazladır.

Ozon, suda direkt moleküler ozon (O<sub>3</sub>) olarak kompleks yapılar oluşturmak suretiyle ve/veya

ozonun parçalanma ürünü olan hidroksil radikalleri aracılığıyla olmak üzere iki farklı mekanizma ile yükseltgen etki gösterir (Şekil 1). Moleküler ozon ve hidroksil radikalinin sudaki bulunuşu ortamın pH’sına bağlıdır. Asidik ortamda etkili yükseltgen tür moleküler ozon iken daha yüksek pH’larda radikalik türleri baskındır. Düşük pH’da ozon öncül yan ürünler oldukça etkin şekilde parçalar. Ancak bazı kritik pH değerlerinin üstünde ozonun etkinliği azalır ve yan ürün miktarı artar. pH 7,5 civarında oluşan hidroksil radikalleri üzerinden gerçekleşen oksidasyonun hızı çok yüksektir. Hidroksil radikali, moleküler ozona göre daha güçlü yükseltgendir. Ancak yarılanma ömrü daha kısa olduğundan sudaki miktarı 10-12 M’ı geçmez. UV ışını veya hidrojen peroksit kullanılması da radikal türün baskın olmasına neden olur. 1 mol ozon 1,5 mol hidroksil radikali oluşturur (4).



**Şekil 1.** Ozonun pH'ya bağlı olarak değişen yükseltgen türleri (4)

**Tablo 1.** Su ile ilgili bazı estetik parametreler ve etkileri (2,3)

Fiziksel parametreler	Etkileri
Renk	Dışarıdan yabancı bir madde eklendiği konusunda şüphelerini arttırır.
Tat ve koku	Kendiliğinden meydana gelen kirlenmeyi gösterir.
Sıcaklık	Yüksek sıcaklık damak tadı açısından kabul edilemeyeceği gibi mikroorganizmaların gelişimine neden olur.
<b>İnorganik</b>	
Alüminyum	Bulanıklık oluşturur (alüminyum flokları).
Klorür	Kötü tat nedenidir.
Bakır	Galvenizli demir ve çelik bağlantı ekipmanlarının korozyonunu arttırır. Çamaşırlarda ve sıhhi malzemelerde boyamaya neden olur.
Sertlik	Borularda ve buhar kazanlarında tortuların yerinden oynamasına ve yüksek miktarda sabun kullanımına neden olur. Kötü tat oluşturur.
Hidrojen Sülfür	Koku ve kötü tat nedenidir.
Demir	Ferrik demir suya kırmızı-kahve renk verir. Demir, çamaşırları ve boru ekipmanlarını boyar. Borularda tortuya neden olan "demir bakterilerinin" gelişimini tetikler.
pH	Önemli bir işlem parametresidir, örneğin klorür ve ozonun dezenfeksiyonunu etkinliği pH değerine bağlıdır.
Sülfat	Eşlik eden katyona bağlı olarak suya kötü tat verir.
Toplam çözünmüş katı maddeler	Tat üzerinde etkilidir.
<b>Organik</b>	
Diklorobenzenler	Koku
Etilbenzen	Koku
Monoklorobenzen	Koku ve kötü tat
Stiren	Koku
Toluen	Koku
Triklorobenzen	Koku
Ksilen	Koku ve kötü tat
Deterjanlar	Köpük oluşumu, koku ve kötü tat
<b>Dezenfektanlar ve dezenfeksiyon yan ürünleri</b>	
Klor	Koku ve kötü tat
Klorofenoller	Koku

## 1.1 Ozonun Sulu Ortamdaki Reaksiyonları

Suda ozon ile reaksiyona giren organik ve inorganik türler ozon ihtiyacını belirler. Ortam koşulları ozonun etkinliği üzerinde önemli rol oynadığından, ortamdaki organik ve inorganik bileşiklerle olan reaksiyon mekanizmaları üzerindeki çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Özellikle son dönemlerde tüm dünya gündeminde olan su kirliliğindeki artış ve gelecekte temiz su bulma kaygısı bu çalışmaları hızlandırmıştır.

### 1.1.1 Organik türler

Ozon büyük organik maddeleri kısmi oksidasyona uğratarak daha küçük moleküllü bozunabilir veya özümlelenebilir türlerine dönüştürür. Oluşan bu biyobozunur türler biyolojik filtrelerden geçirildiğinde, tat ve koku giderimi sağlanarak, sudan uzaklaştırılmış olur.

Organik bileşikler ve halojenleri içeren suların ozonlanması sonucu meydana gelen yan ürünler arasında en sık rastlanan türler triholometan (THM)'lerdir. Ancak, ozonlamanın moleküler ozon mekanizması (pH 6-7) veya hidroksil radikalleri mekanizması (pH  $\geq 7,5$ ) üzerinden gerçekleşmesine bağlı olarak oluşan THM bileşikleri birbirinden farklıdır. Alkalinite arttıkça ozonlama sırasında açığa çıkan hidroksil radikalleri tutularak reaktivitesi engellenir ve ozon molekülü tek oksidant olarak etkiyerek daha düşük oksidasyon basamaklarında THM'lerin oluşma potansiyelini arttırır. Yapılan çalışmalarda nötral pH'da 1 mg karbon için 0,2-1,6 mg ozon kullanılmasıyla THM oluşma potansiyelinde % 3-20 arasında azalma olduğu gözlenmiştir (4,5).

Herhangi bir sebeple suya karışan veya suda oluşan poliaromatik, fenolik, aromatik-heteroaromatik bileşikler, hümik asitler, pestisitler ve alifatik organik bileşikler ozonla yükseltgenerek biyobozunur türlerine dönüşürler (6,7). Tablo 2'de bazı organik bileşiklerin ozonla reaksiyonları sonucu oluşan yan ürünler verilmiştir.

**Tablo 2.** Bazı organik bileşiklerin ozonla reaksiyonları sonucu oluşan yan ürünler (6)

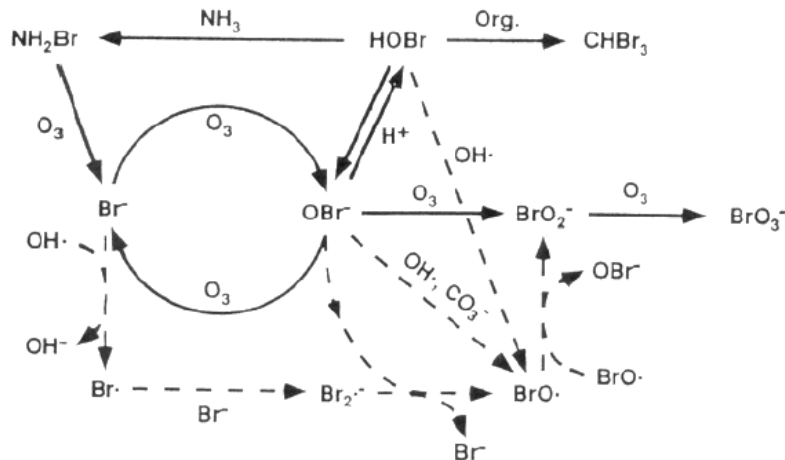
Substrat	Ürünler
Fenantren	2'-Formil-2-bifenilkarboksilik asit, 2'-Hidroksi metil-2-bifenil karboksilik asit, Difenid, Difenik asit
o,m,p-Krezoller	Salisilik asit, Maleik asit, Asetik asit, Okzalik asit, Glioksilik asit, Mezentartarik asit, Glikolik asit
2,4-Diklorfenol	Formik asit, Okzalik asit, Klorür iyonu, Asetik asit Metil gliokzal
Fenol	Kinonlar, hidrokinonlar, rezorsinol, katekoller, gliokzalik asit, gliokzal
İndol	2-Amino-benzaldehit, 2-Amino-benzoik asit
Hümik asit	Malonik Asit, Süksinik Asit, Hekzanoik Asit, Benzoik Asit, Oktanoik Asit, Glutarik Asit, Adipik Asit

### 1.1.2 İnorganik türler

Ozon 2+ yüklü demir iyonlarını 3+, 2+ yüklü mangan iyonlarını ise 4+ yüklü türlerine yükseltir. Bu oksidasyon sonucu demir ve mangan iyonları hidroksitleri ve/veya oksitleri halinde çökerek ortamdaki uzaklaşır. Çöken türün kimyasal formu işlem yapılan suyun özelliklerine, ortam sıcaklığına ve pH'ya bağlıdır. Örneğin 1 mg demiri uzaklaştırmak için 0,43 mg ozon gerekirken, 1 mg mangan için

0,88 mg ozona ihtiyaç vardır. Demir 6-9 gibi geniş bir pH aralığında oksitlenebilirken, mangan oksidasyonu pH = 8 civarında mümkündür. Bunun yanı sıra aşırı ozon kullanımı demir iyonu üzerinde etkili olmazken, mangan iyonunun tekrar çözünmesine neden olur.

Bromür iyonu içeren suların ozonlanması ile bromat, bromoform, bromlanmış asetik asitler, asetonitriller, bromopikrin ve eğer ortamda amonyak varsa siyanobromür gibi bromlanmış yan ürünler oluşur. Şekil 2'de bromür iyonu içeren sulardaki ozon ve hidroksil iyonları ile açığa çıkan bromlanmış yan ürünlerin oluşma mekanizmaları gösterilmiştir (8). 2 mg/L bromür iyonu içeren bir kaynak suyu için 2 mg/L ozon kullanıldığında 53 µg/L bromoform ve 17 µg/L dibromasetik asit oluşur. Bromür iyonu içeren suların ozonlanması ile ortamda bulunan hipobromit yükseltenecek karsinojen bromat iyonları oluşturur. Ozonlanmış suda ölçülen bromür iyonu ve dezenfeksiyon yan ürün miktarlarının toplamı ham suda mevcut olan bromür iyonunun 1/3'dür. Bu sonuç bromür içeren ham suların ozonlanması sonucu belirlenemeyen bromlanmış yan ürünlerin varlığını gösterir.



**Şekil 2.** Bromür iyonu içeren sulardaki ozon ve hidroksil iyonları ile açığa çıkan bromlanmış yan ürünlerin oluşma mekanizmaları (8)

## 2. OZONUN TEMEL KULLANIM AMAÇLARI

1940-1986 yıllarında Amerika, su tesislerinde ozonu başlıca koku ve tat giderimi için kullanmıştır. Günümüzde de iyi üretim uygulamaları (Good Manufacturing Practice: GMP) takip edildiği sürece ozonun kullanılmasında yasal bir engel bulunmamaktadır.

Yüksek miktarda kullanıldığında toksik ve korozif etkiye sahip olan ozon, suda hem inorganik hem de organik türleri yükseltgeyebilir. Ozon ihtiyacının belirlenebilmesi için sudan uzaklaştırılması istenen organik ve inorganik türlerin ve bunların miktarlarının bilinmesi gerekir. Suffet ve ark. (7) belirledikleri farklı özellikteki suları ozon ile muamele etmiş ve 2,5-2,7 mg/L ozonun 10 dakika içinde koku ve kötü tadı önemli ölçüde azalttığını belirlemiştir.

Uygun koşullarda yapıldığında ve doğru miktarlarda kullanıldığında içme sularının kalitesini arttıran ozonlama işleminin avantajları ve sınırlamaları aşağıda verilmiştir (10-12).

### a) Ozon kullanımının avantajları:

1. Suda koku ve renk oluşturmaz.
2. Yüksek oksidasyon gücü nedeniyle birkaç saniye gibi kısa bir sürede jermeleri ve virüsleri öldürür.
3. Sudaki rengi, kötü tadı ve kokuyu yok eder.
4. Dezenfeksiyon sonrası sudaki oksijen miktarını artırır.
5. Kimyasal reaktif gerektirmez.
6. Demiri ve manganı yükseltgeyerek ortamdan uzaklaştırır.
7. Algleri öldürerek sudan uzaklaştırır.
8. Organik maddelerle reaksiyon vererek ortamdan uzaklaştırır.
9. Suda hızlı bozunarak uzaklaşır, böylece istenmeyen kalıntı oluşumuna neden olmaz.
10. Koagülasyona yardımcı olur.
11. Pek çok ham su üzerinde ön ozonlama ve/veya dahili ozonlama daha sonra kullanılacak klor ihtiyacını azaltır ve kararlı klor bileşikleri oluşmasını sağlar.

### b) Ozon kullanımının sınırlamaları:

1. Toksik etkiye neden olabilir (toksik etki ozon konsantrasyonu ve maruz kalma süresine bağlıdır).
2. Ozonlama işlemi klorlama ile karşılaştırıldığında yüksek maliyetli bir işlemdir.
3. Ozonlama sisteminin kurulumu nispeten zordur.
4. Ozonun bazı organik maddelerle reaksiyonu sonucu istenmeyen aldehit ve ketonlar oluşabilir.
5. Karasız olduğundan dağıtım sisteminde klorlama işlemi gerektirir.
6. Çözünürlüğü klorndan daha az olduğundan özel karıştırıcılar gerekir.
7. Bazı organik türler üzerinde hiç oksitleyici etkisi olmayabilir veya ihmal edilebilecek kadar az olabilir.
8. Ozon kullanımı sonucu açığa çıkan biyobozunur organik maddeler organizma gelişmesine neden olabilir. Bu ise biyolojik aktif filtrasyon işlemi uygulanmazsa dağıtım sisteminde korozyon hızının artmasına neden olur. Ozonlama filtrelemeden önce kullanıldığında, biyolojik gelişme filtreleri etkileyerek geri yıkama sıklığının artmasına neden olur.
9. Kullanılan ozon, klor, monokloramin, klordioksit gibi diğer oksidantlarla reaksiyona girebilir.
10. Ozon oksidasyonu sonucu demir ve mangan suda çözünmeyen bileşiklerine dönüştüğünden sedimentasyon veya filtreleme işlemi gerekir. Bu çözünmeyen katı türler filtreleri tıkayabilir ve böylece geri yıkama sıklığını arttırabilir.

### 2.1 Uygulama Noktaları

İşlemin uygulanacağı ham suyun kalitesi, bulanıklığı ve ozon ihtiyacı (tüm oksidasyon için gerekli olan yükseltgen miktarı) ozonun süreçte nasıl ve ne kadar kullanılacağını belirleyen parametrelerdir. Ozonlamanın sedimentasyon sonrası yapılması genellikle ihtiyaç duyulan ozon miktarını

ve oluşan yan ürün miktarını azaltır. Tablo 3’de bu parametrelere bağlı olarak arıtma tesisinde ozonun uygulama noktaları sunulmuştur.

1. Grupta, su kalitesi nispeten yüksek olduğundan ozonlama doğrudan ham suya yapılır. 2. Gruba giren sularda ozon ihtiyacının düşük olması suda organik maddelerin az, bulanıklığın yüksek olması ise alüvyon ve kil gibi inorganik maddelerin varlığını gösterir. 3. Gruba giren sularda ozon ihtiyacının yüksek olması ve buna karşılık bulanıklığın düşük olması suda çözülmüş (süspanse olmayan) organik maddelerin ve bromür, demir, mangan gibi inorganik türlerin varlığını gösterir. Yeraltı suları genellikle bu özelliklere sahiptir. Suda çözülmüş bu inorganik ve organik türler koku ve tat oluşumu yanı sıra genellikle renklenmeye neden olurlar. Böyle sularda ozonlama doğrudan ham ve/veya sedimentasyon sonrasındaki suya yapılır. Ozonlama sonrası organik türler biyobozunur ürünler açığa çıkardığından biyolojik işlem basamağı gereklidir (Bkz 2.4). Bu tip sularda kolay yükseltgenebilir organik madde veya bromür iyonu varlığı yapılan ozonlama sonrası dezenfeksiyon yan ürünlerinin oluşmasına neden olur. 4. Grup su, yüksek ozon ihtiyacı ve bulanıklığının yüksek olması nedeniyle dezenfeksiyonu en zor olan gruptur. Bu özellikler suyun yüksek miktarda organik ve inorganik partiküller içerdiğini gösterir.

Yüzey suları genelde bu özelliklere sahiptir. Bu grup sulara ozonlama, sedimentasyon sonrasında ve eğer filtreleme gerekli ise filtreleme basamağından sonra yapılmalıdır. Eğer suyun ozon ihtiyacı çok yüksek ise iki aşamalı ozonlama tercih edilmelidir. Dezenfeksiyon yan ürünlerinin oluşabileceği ve açığa çıkan biyobozunur ürünleri uzaklaştırmak için biyolojik işlem gerekeceği göz önüne alınmalıdır (4,7).

Ozonlama işleminin on-line izlenmesi ve kontrolü standart uygulama haline gelmiştir. Günümüzde, makul maliyetlerle, ozonun hem gaz halinde hem de sulu çözeltide ölçümü için son derece güvenilir teknikler geliştirilmiştir. Ozon çok kararsız olduğundan, bu parametrenin ölçümü için bir kalibrasyon standardı mevcut değildir. Ozon kalibrasyonu kolorimetrik veya diğer bağımsız ölçümlere dayanmaktadır ve örnekteki ozon konsantrasyonu değişmeden önce çok hızlı bir şekilde yapılmalıdır.

Daha önce de belirtildiği gibi ozon; klor, klordioksit, monokloramin gibi alternatiflerinden daha kısa sürede ve daha düşük konsantrasyonlarda dezenfeksiyon sağlayan güçlü bir yükseltgendir. Ancak sudaki çözünürlüğü daha az olduğundan dağıtım sırasında ortamda varlığının sürekli olarak sağlanması mümkün değildir. Bu nedenle

**Tablo 3.** Küçük sistemlerde ozonlama noktalarının seçim kriterleri (4)

Ham su kalitesi	Ozon uygulama noktası	Değerlendirme
<b>1. Grup</b> Bulanıklık < 10 NTU O <sub>3</sub> ihtiyacı < 1 mg/L	Doğrudan ham suya veya sedimentasyon sonrası	Ozon ihtiyacı düşüktür. Dezenfeksiyon yan ürünü azdır. Biyobozunur organik miktarı düşüktür.
<b>2. Grup</b> Bulanıklık > 10 NTU O <sub>3</sub> ihtiyacı < 1 mg/L	Sedimentasyon sonrası	Ozon ihtiyacı düşüktür. İnorganik partikül miktarı yüksektir. Biyobozunur organik miktarı düşüktür.
<b>3. Grup</b> Bulanıklık < 10 NTU O <sub>3</sub> ihtiyacı > 1 mg/L	Doğrudan ham suya ve/veya sedimentasyon sonrası	Ozon ihtiyacı yüksektir. Dezenfeksiyon yan ürünleri fazladır. Biyobozunur organik madde oluşumu fazladır.
<b>4. Grup</b> Bulanıklık > 10 NTU O <sub>3</sub> ihtiyacı > 1 mg/L	Sedimentasyon sonrası ve eğer gerekli ise ilk filtreleme basamağı sonrası	Ozon ihtiyacı yüksektir. Dezenfeksiyon yan ürünleri fazladır. Biyobozunur organik madde oluşumu fazladır.



ozon ancak primer dezenfektan olarak kullanılabilir. Ozonlamadan sonra dağıtım sistemindeki dezenfeksiyon işleminin tamamlanabilmesi için klor, klordioksit, monokloramin gibi sekonder bir dezenfektan gerekir. Tablo 4’de ortam sıcaklığına bağlı olarak ozonun yarılanma ömrü verilmiştir (5).

## 2.2 Dezenfeksiyon yan ürünleri

Ozonlama ile yükseltgenme/indirgenme reaksiyonları sonucu farklı türde organik/ inorganik yapılar oluşur. Organik bileşiklerin ozonla reaksiyonlarından genellikle aldehitler, ketonlar, asitler ve diğer organik bileşikler meydana gelir. Ozonla dezenfekte edilmiş içme sularındaki toplam aldehit konsantrasyonu, toplam organik karbon (TOC) miktarına ve uygulanan ozon miktarı/organik karbon miktarı oranına bağlı olarak 5 µg/L’den daha küçük veya 5-300 µg/L aralığındadır. Tablo 5’de sık karşılaşılan organik ve inorganik ozonlama yan ürünleri Şekil 3’de ise oluşma reaksiyonları verilmiştir. Normal koşullarda ortamda halojenler olmadığında ozonlama sonucu halojenli yan ürünler açığa çıkmaz. Ancak ham su da bromür iyonu varsa, ozonla yükseltgenerek sağlık üzerinde ciddi riskleri olan bromlu yan ürünler oluşur (4,6).

Ozon dağıtım sisteminde kalıntı olarak sekonder dezenfektan halinde muhafaza edilemez. Bu amaçla en çok tercih edilen sekonder dezenfektan; halojenlenmiş dezenfeksiyon yan ürünlerini en az miktarda oluşturan (veya hiç oluşturmayan) monokloramindir. Klor sekonder dezenfektanlardan biridir, ancak klor eklenmesinden önce biyolojik olarak etkin bir ön filtrasyon yapılmadığı takdirde ozonlama işlem sonucu oluşan organik maddelerin doğasına bağlı olarak klora işlemi sonucu az veya çok dezenfeksiyon yan ürünleri oluşabilir. Ozonlama işleminden sonra oluşan öncüller uzaklaştırılıp ortamdaki miktarları düşük seviyelere indirildikten sonra serbest klor uygulanarak suda dezenfeksiyon yan ürünleri oluşma potansiyeli azaltılır (4,6).

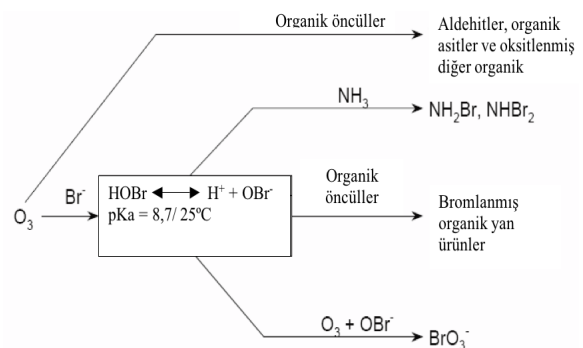
Tablo 4. Ozonun yarılanma ömrünün sıcaklığa bağlılığı (5)

Sıcaklık (°C)	Yarı ömrü (dk)
15	30
20	20
25	15
30	12
35	8

Tablo 5. Sık karşılaşılan organik ve inorganik ozonlama yan ürünlerinin bileşik sınıfları halinde gösterimi (9)

Dezenfeksiyon yan ürünleri	
<b>1. Aldehitler</b> Formaldehit Asetaldehit Glioksal Metil glioksal	<b>2. Aldo ve keto asitler</b> Pirüvik asit
<b>3. Asitler</b> Okzalik asit Süksinik asit Formik asit Asetik asit	<b>4. Bromlanmış yan ürünler*</b> Bromat iyonu Bromoform Bromlanmış asetik asitler Bromopikrin Bromlanmış asetonitriller
<b>5. Diğer</b> Hidrojen peroksit Aromatik bileşiklerin ve pestisitlerin yan ürünleri	

\*Bromlanmış yan ürünler sadece bromür iyonu içeren sularda oluşur.



Şekil 3. Ozonlama sonucu oluşan önemli yan ürünlerin reaksiyonları (4)

Ozonlamayı takiben sekonder dezenfektan kullanılması durumunda dezenfektanlar arasındaki olası etkileşime dikkat edilmelidir. Örneğin ozonlama ile birlikte sekonder dezenfektan olarak klor kullanıldığında ozonlama yan ürünü olarak açığa çıkan asetaldehit sekonder dezenfektan ile etkileşerek kloral hidrat (klorlama yan ürünü) oluşturur. Ancak ozonlamadan sonra biyolojik filtrasyon uygulanıp daha sonra klorlama yapıldığında Kloral hidrat oluşumu bertaraf edilir. Benzer şekilde sekonder dezenfektan olarak monokloramin kullanıldığında oluşma olasılığı yüksek olan kloropikrin tehlikesi ozonlamadan hemen sonra biyolojik filtrasyon uygulanarak engellenir (4).

### 2.3 Ozonlama yan ürünlerinin kontrolü

Bromlanmış yan ürünlerin türlerini ve konsantrasyonlarını etkileyen en önemli faktörler ortam pH'sı, ozon/bromür iyonu oranı ve TOC/ bromür iyonu oranıdır. Bromat iyonu oluşumu asidik pH'larda ozonlama yapılarak ve böylece ortamda hipobromit iyonu yerine (BrO<sup>-</sup>), hipobromöz asit (HOBr) oluşumu sağlanarak kontrol edilebilir. Diğer taraftan yüksek pH'larda ozonlama sonucu hipobromöz asit bromat iyonuna yükseltgenir. Yüksek pH'larda bromat iyonu daha çok bulunurken, düşük pH'larda daha çok bromlanmış organik yan ürünler oluşur. Buna göre kaynak suyuna ozon uygulanması, içerdiği bromür iyonu konsantrasyonuna bağlıdır. Bromat iyonu oluşması bromür iyonları konsantrasyonu düşürülerek, kalıntı ozon miktarı azaltılarak ve daha düşük pH'da ozonlama yapılarak kontrol edilebilir. Ozonlama ile birlikte amonyak ilavesi ile ortamda oluşan bromaminler hem bromat iyonlarının hem de organik yan ürünlerin oluşumunu azaltır. Ancak amonyağın azot bakterileri için bir besin kaynağı olabileceğine dikkat edilmelidir (4).

Ozonlama yan ürünü olan organik asitler ve aldehitler kolayca biyobozunmaya uğrayabilir,

özümlenebilir organik karbon veya biyobozunur karbon bileşenlerine dönüşebilirler. Bu nedenle ozonlama işlemine biyolojik aktif prosesin eşlik etmesi biyobozunur yan ürünlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır.

### 2.4 Biyolojik aktif filtrasyon

Ozon; büyük nötral organik molekülleri, küçük ve biyobozunur türlerine dönüştürür. Açığa çıkan bu biyobozunur çözülmüş organik maddeler, bakteri gelişimini hızlandırır ve eğer ortamdaki uzaklaştırılmazlarsa bakteriler dağıtım sisteminden yayılırlar. Yapılan çalışmalar 100 ppb'den daha düşük özümlenebilir organik karbon miktarının ortamda bulunmasının bakteriyel büyümenin kontrol edilmesi için önemli olduğunu göstermiştir.

Ozonlama filtrasyon girişine uygulandığında ve çözülmüş oksijen, pH, sıcaklık gibi çevresel koşullar uygun olduğunda filtrede mikrobiyolojik aktivite artar, biyobozunur/özümlenebilir organik karbon uzaklaştırılması artar (4,13). Ozon ilavesi, çözülmüş organiklerin biyobozunurluğunu arttırması yanı sıra suya büyük miktarda oksijen katkısı sağladığından oluşan ortam biyolojik gelişme için mükemmel bir ortam sağlar. Biyolojik aktif türler; durgun kum filtreler (slow sand), ani hızlı filtreler (rapid rate filtre), granüler aktif karbon filtreler (GAC) gibi bakterilerin tutunabileceği ortamlar kullanılarak bertaraf edilebilir. Ozon kullanılan arıtma tesislerinde biyolojik aktif filtrasyonun avantajları aşağıda sıralanmıştır (4):

1. Dağıtım sisteminde ileri bakteriyel gelişmeyi engelleyerek biyolojik olarak stabil ortam yaratır.
2. Nötral organik maddelerin uzaklaşmasını sağladığından daha sonra uygulanacak olan klorlama sonucu oluşması muhtemel yan ürünler bertaraf edilir.
3. Biyolojik aktif filtrasyon işleminden önce birincil dezenfektan olarak uygulanan ozon, çözülmüş biyobozunur organik karbon konsantrasyonunu azaltarak biyolojik gelişmeyi düşürür.

4. Dağıtım sisteminde dezenfeksiyonun sürekliliğini sağlamak için kullanılan klor ihtiyacını azaltarak, yönetmelikte belirtilen maksimum kalıntı klor değerlerinin aşılma olasılığını azaltır.
5. Ozonlama yan ürünlerinin kontrolü sağlanır.

## SONUÇ

Günümüze kadar elde ettiğimiz literatür verilerine dayanarak ozonun daha uzun süre vazgeçilmez bir dezenfektan olacağını söylemek mümkündür. Ancak

ozonlama işleminin doğru şekilde yapılmamasının önemli sağlık risklerini ortaya çıkaracağı da bir gerçektir. Oldukça karmaşık olan ozon kimyası, olası yan ürünler ve mikrobiyolojik aktiviteler hakkında bilgi sahibi olmak güvenli ozonlama uygulamaları için önemlidir. Bu nedenle sürecin doğru izlenmesi ve sistemin sıkı kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu kontrollerin sağlanması için günümüzde online izleme yapabilen teknolojiler mevcuttur. Bu yöntemlerle ozonlama işleminin riskleri bertaraf edilerek güvenli dezenfeksiyon sağlanabilir.

## KAYNAKLAR

1. www.nutech-o3.com, Ozone: Its Properties and Industrial Uses. Jan.12, 2011.
2. www.who.int/water\_sanitation\_health/dwq/gdwq0506\_8.pdf. Jan.12, 2011.
3. Solsona F. Guidelines for drinking water quality standards in developing countries. Lima: PAHO/CEPIS Pub. 2002.
4. Anonymous. Guidance Manuel Alternative Disinfectants and Oxidants. EPA ,1999; (3) 1-52.
5. Gray DM, Germain M. Ozone Measurement Technology in Pure Water Systems. 25th Annual Semiconductor Pure Water & Chemicals Conference. February, 1-8, Santa Clara, CA, 2006.
6. Anonymous. The Chemistry of Disinfectants in Water: Reactions and Products. Safe Drinking Water Committee. Drinking Water and Health, Washington: NRC, 1980 (2): 200-249.
7. Suffet, IH, Anselme C, Mallevalle J. Removal of Tastes and Odors by Ozonation. AWWA Seminar on Ozonation: Recent Advances and Research Needs, Denver, CO 1986.
8. Bollyky LJ. Benefits of Ozone Treatment of Bottled Water. International Ozone Association Proceedingsa Pan American Conference. Inc. Stamford, CT, 2002: 1-14.
9. Fawell JK, Giddings M, Magara, Y, Ohanian, E, Toft, P. Chemical Aspect. Guidelines for drinking-water quality. Third edition, Incorporating First and Second Addenda. Geneva: WHO, 2008; 145-196g.
10. www.spartanwatertreatment.com/disinfection-by-product-control.html. Jan.12, 2011.
11. Hill M. Water Quality and Treatment. A Handbook of Community Water Supplies. Fifth Edition. USA: American Water Works Association. 1999.
12. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/a68673\\_guidelines\\_2.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/a68673_guidelines_2.pdf) WHO, Seminar Pack For Drinking-Water Quality Disinfectants and Disinfection By-Products. Jan.12, 2011.
13. Escobar IC Randall AA. Assimilable organic carbon (AOC) and biodegradable dissolved organic carbon (BDOC): Complementary measurements. Water Research 18, 2001 (35): 18, 4444-54.



TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE

REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI / REFİK SAYDAM NATIONAL PUBLIC HEALTH AGENCY

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

...../...../20...

Makale Türü/Article Type:

(...)Araştırma/Research (..)Derleme/Review (..)Olgu Sunumu/Case Report (..)Editöre Mektup/Letter to Editor

Makale Başlığı/Article Entitled :.....  
.....

Sayın Editör,

Yayınlanması dileğiyle Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;

1. Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orjinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Makalenin; derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
3. Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
4. Yayın haklarının Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here, we affirm and warranty as the author(s) of this manuscript submitted to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology that;

1. The article I / We submitted to the Bulletin is original and responsibilities are belong to us ethically and scientifically,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under the evaluation of this bulletin,
3. The article contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights,
4. The article publishing rights belong to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.

(...)1) ..... İmza/Signature :.....

Yazışma Adresi/Corresponding Address :.....

Tel/Phone :..... Faks/Fax :..... e-posta/e-mail :.....

(...)2) ..... İmza/Signature :.....

Yazışma Adresi/Corresponding Address :.....

Tel/Phone :..... Faks/Fax :..... e-posta/e-mail :.....

(...)3) ..... İmza/Signature :.....

Yazışma Adresi/Corresponding Address :.....

Tel/Phone :..... Faks/Fax :..... e-posta/e-mail :.....

(...)4) ..... İmza/Signature :.....

Yazışma Adresi/Corresponding Address :.....

Tel/Phone :..... Faks/Fax :..... e-posta/e-mail :.....

(...)5) ..... İmza/Signature :.....

Yazışma Adresi/Corresponding Address :.....

Tel/Phone :..... Faks/Fax :..... e-posta/e-mail :.....

Not / Note : 1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)

2. Formu aşağıdaki adrese faks/posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below by faks or mail or deliver personally.

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı / Refik Saydam National Public Health Agency

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

Yayın ve Dokümantasyon Müdürlüğü / Department of Publication and Documentation

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

Tel/Phone : +90 312 458 23 64

Faks/Fax : +90 312 458 24 08

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

