



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ
REPUBLIC OF TURKEY
THE MINISTRY OF HEALTH
GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

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

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 75 ■ Sayı/Number 4 ■ Yıl/Year 2018

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü adına

On behalf of General Directorate of Public Health

Fatih KARA, Genel Müdür (General Director)

EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Hasan IRMAK

EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

Demet CANSARAN-DUMAN

Hülya ŞİMŞEK

Pınar KAYNAR

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Mehmet Kürşat DERİCİ

Fatih BAKIR

Mestan EMEK

Fehminaz TEMEL

Selin NAR-ÖTGÜN

Dilek YAĞCI-ÇAĞLAYIK

Şule ŞENSES-ERGÜL

Arsun ESMER

Sibel KARACA

Gülsen TOPAKTAŞ

TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Utku ERCÖMART

Zeynep KÖSEOĞLU

Selahattin TAŞOĞLU

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

Asitsiz kağıt kullanılmıştır / Acid free paper is used

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü / General Directorate of Public Health
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı /
Administrative and Financial Affairs Department

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

Artı6 MEDYA
Maltepe mah. Özveren Cad. 13/A Demirtepe/Kızılay-ANKARA
Tel: +90 312 299 37 41
e-posta: filmcikis@yahoo.com

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

2018

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç

Anna PAPA, Yunanistan

Aziz SANCAR, ABD

Cristina DOMINGO, Almanya

Daniel MOTLHANKA, Botswana

Dwight D. BOWMAN, ABD

Isme HUMOLLI, Kosova

Isuf DEDUSHAJ, Kosova

Iva CHRISTOVA, Bulgaristan

Johan LINDH, İsveç

Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail

Manfred WEIDMANN, İngiltere

Paul HEYMAN, Belçika

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba

Sıraç DİLBER, İsveç

Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya

Takashi AKAMATSU, Japonya

Varalakshmi ELANGO, Hindistan

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Ahmet KART, Ankara

Akçahan GEPEĐREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADILOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Ankara

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Çorum

Banu ÇAKIR, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Ankara

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Çağatay GÜLER, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Emrah RUH, Kıbrıs

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fehminaz TEMEL, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnur TARHAN, Adıyaman

Hakan ABACIOĞLU, İzmir

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

Hasan IRMAK, Ankara

Hasan TEZER, Ankara

Hayrettin AKDENİZ, Bolu

Hilal ÖZDAĞ, Ankara

Hülya ŞİMŞEK, Ankara

Hürrem BODUR, Ankara

Işıl MARAL, İstanbul

İ. Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir

İpek MUMCUOĞLU, Ankara

İrfan EROL, Ankara

İrfan ŞENCAN, Ankara

İsmail CEYHAN, Ankara

Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara

Koray ERGÜNAY, Ankara

Levent AKIN, Ankara

Mahinur AKKAYA, Ankara

Mehmet Ali ONUR, Ankara

Mehmet Kürşat DERİCİ, Çorum

Mestan EMEK, Antalya

Metin KORKMAZ, İzmir

Mithat ŞAHİN, Kars

Muhsin AKBABA, Adana

Murat DİZBAY, Ankara

Mustafa AKSOY, Ankara

Mustafa ERTEK, Ankara

Mustafa Necmi İLHAN, Ankara

Mustafa Kasım KARAHOCAGİL, Kırşehir

Mustafa Kemal BAŞARALI, Ankara

Mustafa KAVUTÇU, Ankara

Mükerrem KAYA, Erzurum

Nazan YARDIM, Ankara

Nazime MERCAN, Denizli

Nazmi ÖZER, Ankara

Nilay ÇÖPLÜ, Ankara

Nur AKSAKAL, Ankara

Nur Münevver PINAR, Ankara

Nuran ESEN, İzmir

Oğuz GÜRSOY, Denizli

Orhan BAYLAN, İstanbul

Orhan YILMAZ, Ankara

Özlem KURT AZAP, Ankara

Pınar KAYNAR, Ankara

Pınar OKYAY, Aydın

Rahmet GÜNER, Ankara

Recep AKDUR, Ankara

Recep KEŞLİ, Afyonkarahisar

Recep ÖZTÜRK, İstanbul

Rıza DURMAZ, Ankara

S. Aykut AYTAÇ, Ankara

Saime ŞAHİNÖZ, Gümüşhane

Sami AYDOĞAN, Kayseri

Sarp ÜNER, Ankara

Seçil ÖZKAN, Ankara

Seda KARASU YALÇIN, Bolu

Seda TEZCAN, Mersin

Selçuk KAYA, Trabzon

Selçuk KILIÇ, Ankara

Selim KILIÇ, Ankara

Selin NAR ÖTGÜN, Ankara

Sema BURGAZ, Ankara

Semra Ayşe GÜREŞER, Çorum

Sercan ULUSOY, İzmir

Sultan ESER, İzmir

Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa

Sümer ARAS, Ankara

Şule SENSES ERGÜL, Ankara

Tevfik PINAR, Kırıkkale

Turan BUZGAN, Ankara

Yeşim ÖZBAŞ, Ankara

Yunus Emre BEYHAN, Van

Zafer ECEVİT, Ankara

Zafer KARAER, Ankara

Zati VATANSEVER, Kars

Zeynep GÜLAY, İzmir

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

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

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallara uyum aranır. Kurallara uymayan yazılar daha ileri bir incelemeye gerek görülmezsin yazılarına iade edilir.

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

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

- Yazının başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.
- Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.
- Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka belirtilmelidir.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. Araştırma yazıları;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

16. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

17. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

Tel : (0312) 565 55 80

Faks : (0312) 565 55 91

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

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. Research Articles;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Congress papevars: 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  . Experimental investigation of the hydraulic characteristics of labyrinth weir. Master Thesis, Science Institute of Firat University, 2005.

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

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

12. Research articles should have up to 40 references.

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

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

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

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

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 80

Fax : +90 312 565 55 91

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

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

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

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

EDITORIAL POLICY

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

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

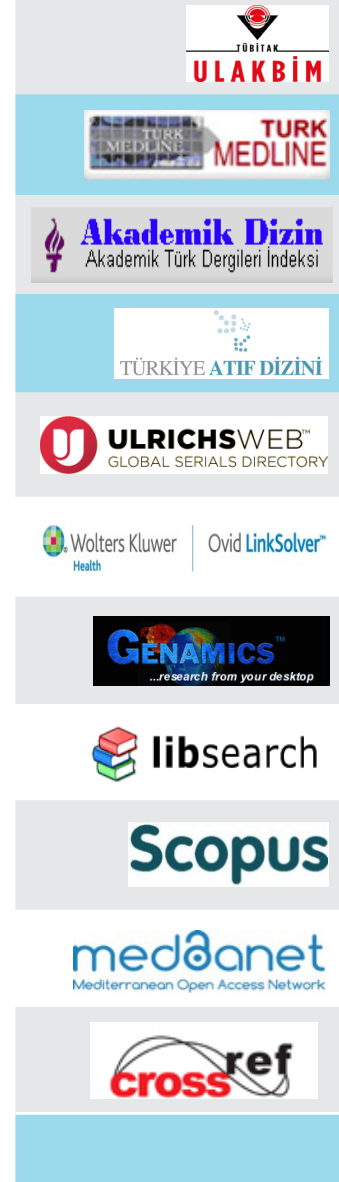
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne
www.turkhijyen.org adresinden online olarak makale gönderilebilir

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



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

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



İLETİŞİM

CORRESPONDENCE

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

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

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

Tel: 0312 565 55 80

Faks: 0312 565 55 91

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

http: www.hsgm.gov.tr

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Nanoteknolojik dezenfektanların heterotrofik biyofilmler üzerine etkisi
The efficacy of nanotechnological disinfectants on heterotrophic biofilms
Gökçe YAVUZ, İrfan TÜRETGEN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.57778 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 323 - 332
2. The first results of national antimicrobial resistance surveillance system in Turkey
Türkiye'de ulusal antimikrobiyal direnç surveyans sisteminin ilk sonuçları
Nilay ÇOPLU, Hüsnüye ŞİMSEK, Deniz GÜR, Aysegül GÖZALAN, Ufuk HASDEMİR, Zeynep GÜLAY, Gülçin BAYRAMOĞLU, Nezahat GÜRLER, Şöhret AYDEMİR, Mete EYİĞÖR, Duygu PERÇİN, Dilber AKTAŞ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.68878 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 333 - 344
3. Hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi
Evaluation of antibiotic susceptibilities of enterococcus strains isolated from clinical samples of hospitalized patients
İlker ÖDEMİŞ, Şükran KÖSE, Gürsel ERSAN, Didem ÇELİK, İlkey AKBULUT
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.70456 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 345 - 352
4. Endüstriyel enzimler üreten *Bacillus* izolatlarının morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu
Morphological, biochemical and molecular characterization of *Bacillus* isolates as a producer of industrial enzymes
Yonca YÜZÜGÜLLÜ-KARAKUŞ, Arzu SERTEL, Yonca DUMAN, Fikriye POLAT
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.87004 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 353 - 364
5. Asymptomatic bacteriuria, urinary tract infection and risk factors in women with type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance
Tip 2 Diyabet hastalığı ve bozulmuş glikoz toleransı olan kadınlarda asemptomatik bakteriüri ve üriner sistem enfeksiyonları
Özlem GENÇ, Evrim AKSU, Türkan PAŞALI-KİLİT, Fatma Emel KOÇAK, Yasemin KORKUT, Kevser ONBAŞI
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.59013 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 365 - 374
6. "Genital Mikoplazma" sıklığının multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması: Klinikte önemli olabilir mi?
Detection of "Genital Mycoplasma" incidence by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction: Could it be clinically important?
Cemile SÖNMEZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.79926 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 375 - 382
7. Ordu ili ilköğretim okulu öğrencilerinde baş biti *Pediculus humanus capitis* yaygınlığının belirlenmesi
Determination of the prevalence of head lice *Pediculus humanus capitis* in primary school students in Ordu province
Ülkü KARAMAN, Özgür ENGİNYURT, Ömer KARAMAN, Cemil ÇOLAK, Gamze KAÇMAZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.72324 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 383 - 390
8. Ankara ve Konya illerine ait suların organoklorlu ve organofosforlu pestisitler yönünden değerlendirilmesi
Evaluation of organochlorine and organophosphate pesticides of waters in Ankara and Konya Figen DEMLİ, Günnur ORHAN, Zahide Esra DURAK, Hüseyin İLTER
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.05025 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 391 - 398
9. Aksaray, Nevşehir ve Niğde illerindeki ilçe okullarında Stafilkokal enterotoksin ve *Bacillus cereus* ilişkili gıda kaynaklı salgın, 2015
Food-borne outbreak associated with Staphylococcal enterotoxin and *Bacillus cereus* in districts schools—Aksaray, Nevşehir and Niğde provinces, 2015
Fatma ÖZARSLAN, Pınar DUMAN, Serap ÇETİN-ÇOBAN, Gülşen BARLAS, Fehminaz TEMEL
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.89847 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 399 - 408
10. Bayburt il merkezinde *Shigella sonnei* gastroenterit salgını, Ekim 2014
A *Shigella sonnei* gastroenteritis outbreak in Bayburt Province, Turkey, October 2014
Burcu ÖZÜDOĞRU, Yavuz KAZIK, Mecit KIZILASLAN, Fehminaz TEMEL
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.37084 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 409 - 420
- Derleme / Review
11. Probiyotiklerin tümör baskılayıcı etkileri
Tumor suppressor effects of probiotics
Münevver KAHRAMAN, Aynur Gül KARAHAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.15428 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 421 - 442
12. Polimerik veziküller ve biyolojik uygulamaları
Polymeric vesicles and biological applications
Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN, Asuman BOZKIR
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.87369 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 443 - 458

Nanoteknolojik dezenfektanların heterotrofik biyofilmler üzerine etkisi

The efficacy of nanotechnological disinfectants on heterotrophic biofilms

Gökçe YAVUZ¹, İrfan TÜRETGEN¹

ÖZET

Amaç: Gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorür mikroorganizmalara karşı etkin olduğu bilinen biyosidal ajanlardır. Planktonik hücreler bu ajanlardan kolay etkilenmelerine rağmen biyofilm içindeki bakteriler aynı kimyasallara karşı daha dayanıklı olmaktadır. Öte yandan, nano tanecikler üzerine fikse edilmiş ajanların ise biyofilm bakterilerine karşı antimikrobiyal etkinliğinin yüksek olduğu bildirilmektedir. Fakat nanoteknolojik dezenfektanların doz ve süresinin biyofilm bakterilerine etkileri değişiklik göstermektedir. Bu dezenfektanların püskürtüldüğü yüzeylerin tipi de etkinliklerini değiştirmektedir. Bu çalışmada, piyasaya sürülecek olan nano partiküllere immobilize edilmiş gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum'un yüzeylere tutunma yeteneklerinin ve biyofilm tabakası üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Paslanmaz çelik kuponlar üzerine üretici firmadan temin edilen nano benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin püskürtülüp 24 saat küreşmesi beklenmiş, ardından kuponlar biyofilm reaktörüne konulmuştur. Birer aylık aralıklarla bu yüzeylerde oluşan biyofilm tabakasındaki bakteri sayıları, dezenfektan ile kaplanmamış kontrol kuponlarıyla kıyaslanarak

ABSTRACT

Objective: Silver sulfadiazine and benzalkonium chloride are biocidal agents known to be effective against microorganisms. Although planktonic cells are easily affected by these agents, bacteria in the biofilm are more resistant to the same chemicals. Agents fixed on nanoparticles are reported to have higher antimicrobial activity against biofilm bacteria. The effects of nanotechnological disinfectants on biofilm bacteria vary with dose and time. The type of surface on which these disinfectants are sprayed also changes their activity. The aim of this study was to investigate the ability of silver sulfadiazine and benzalkonium immobilized on nanoparticles to adhere to surfaces and their effect on biofilm.

Methods: Stainless steel coupons were sprayed with nano benzalkonium chloride and nano silver sulfadiazine were air-dried to cure for 24 hours, then the coupons were placed into the biofilm reactor. Bacterial counts in the biofilm layer formed on these surfaces were compared at monthly intervals with control coupons. Bacterial biofilms allowed to form naturally were analyzed by microbiological culture methods and number of live and dead microorganisms were

¹İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul



İletişim / Corresponding Author : İrfan TÜRETGEN

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Fatih, İstanbul - Türkiye
Tel : +90 535 966 20 77 E-posta / E-mail : turetgen@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 19.12.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 16.05.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.57778

Yavuz G, Türetgen İ. Nanoteknolojik dezenfektanların heterotrofik biyofilmler üzerine etkisi.
Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 323-332

incelenmiştir. Doğal şekilde oluşumuna imkân verilen biyofilm içinde çoğalan bakteriler mikrobiyolojik kültür yöntemleri ile sayılmış, ayrıca ölü ve canlı mikroorganizmaların sayıları DAPI - CTC boyama ile epifloresan mikroskopta sayıları tespit edilmiştir.

Bulgular: Deneş şartları altında mikrobiyal kültür ve DAPI - CTC (ölü-canlı) boyama sonuçlarına göre deneş kuponlarında anlamlı ölçüde düşük oranda biyofilm tabakası oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca nano benzalkonyum klorür, nano gümüş sülfadiazine kıyasla biyofilm bakterilerine karşı anlamlı düzeyde daha etkili bulunmuştur.

Sonuç: Nano benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin bileşiklerinin tutunduğu yüzeylerde biyofilm oluşumunu gözlemek ve bu sayede dezenfektanların antimikrobiyal yüzey oluşturmak amacıyla endüstride ve klinik alanlarda yer alması için sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu dezenfektanlar endüstriyel veya klinik ortamlarda sıkça kullanılmaktadır. Çalışma sonuçları üretici firmaya odaklanması gereken ürün hakkında önemli katkı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Dezenfeksiyon, nanoteknoloji, benzalkonyum klorür, gümüş sülfadiazin, biyofilm

determined by DAPI - CTC staining on epifluorescence microscope.

Results: After the test periods, microbial culture and DAPI - CTC (live / dead) results were found significantly lower on disinfectant covered coupons. Furthermore, nano benzalkonium chloride was found to be significantly more effective against biofilm bacteria than nano silver sulfadiazine.

Conclusion: The results were examined in order to observe biofilm formation on the surfaces covered with nano benzalkonium chloride and nano silver sulfadiazine compounds, to evaluate their use in industrial and clinical fields as effective disinfectants. Because these disinfectants are frequently used in industrial or clinical environments, results have made an important contribution to the manufacturer to focus on final version of the product.

Key Words: Disinfections, nanotechnology, benzalkonium chloride, silver sulfadiazine, biofilm

GİRİŞ

Biyofilm, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan, büyüme oranları ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen mikroorganizmaların, hücre dışı polimerik maddeden oluşmuş matriks içinde gömülü olarak bulunduğu tabaka olarak tanımlanmıştır (1).

Ancak bir yüzeye tutunarak koloniler halinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka biyofilm yapısının özelliklerini taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısında olmayan topluluklar,

buldukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedirler. Bunlar biyofilm içerisindeki bakterilerde gösterilen direnç ve geri dönüşümsüz yapışma gibi özelliklere sahip değildir. Oysa biyofilm içerisindeki bakterilerin zamanla matriksten koparak ayrıldıkları, planktonik formda olmalarına rağmen ayrıldıkları topluluğun direnç karakterlerini taşıdığı bildirilmiştir (2). Biyofilmler canlı veya cansız yüzeyler üzerinde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları ve

doğal akuatik sistemler yer alır. Biyofilm oluşumunda hücrel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri de bulunabilir (3). Biyofilmler endüstriyel su sistemleri ve petrol boru sistemlerinde önemli bir sorun olarak bilinirken, artık tıptaki önemi sadece dişteki plaklardan ibaret olmayıp özellikle yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere, birçok kronik enfeksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir (4). Bu sebeplerden dolayı biyofilm ile etkin şekilde mücadele etmek kaçınılmaz olmuştur.

Gümüş içeren preparatların su dezenfeksiyonunda, yanıkların ve kronik ülserlerin tedavisinde kullanımının milattan önce 1000'li yıllara kadar uzandığı bilinmektedir. 1800'lü yıllarda gümüşün göz damlası olarak kullanıldığı, daha sonra penisilin bulunmasıyla beraber kullanımın azaldığı, ancak 1960'lı yıllarda %0.5'lik gümüş nitrat çözeltisinin yanık tedavisinde tekrar yaygın olarak kullanılmaya başlanıldığından bahsedilmektedir. Bu yıllarda gümüşün *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* gibi bakterilere karşı etkinliği kanıtlanmıştır. 1968 yılında gümüş nitrat sülfonamidle kombine edilerek gümüş sülfadiazin krem elde edilmiştir. Bu krem pek çok mikroorganizmaya karşı etkili olması nedeniyle yanık tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Literatürde gümüş sülfadiazinin *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella* ve *Pseudomonas* gibi bakterilere karşı etkin olduğu ayrıca antifungal ve antiviral etkinliklere de sahip olduğundan bahsedilmektedir (5). %1'lik gümüş nitrat çözeltisi halen yeni doğan bebeklerde çeşitli amaçlarla göz antiseptiği olarak kullanılmaktadır (6). Günümüzde antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı farklı miktarlarda gümüş içeren yara örtüleri kullanılmaktadır (Rai M. ve ark., 2009). Gümüş sülfadiazin gümüş ve sülfadiazinin kombinasyonundan oluşmaktadır ve geniş spektrumlu bir antimikrobiyal maddedir. Gümüş sülfadiazin DNA yapısına zarar vererek mikroorganizmayı öldürmektedir (5).

Kuaterner amonyum bileşikler ise bir grup sürfaktan olup domestik amaçlı, tarımsal alanlarda, klinik ortamlarda ve endüstriyel ürünler gibi

çok geniş alanlarda kullanılmaktadır. Kumaş yumuşatıcıları, kozmetik malzemeleri, gen transfer ajanları, antimikrobiyal ve antikorozyon ajan olarak kullanılmaktadır (7). Kuaterner amonyum bileşikler ilk defa Domagk tarafından 1935 yılında antimikrobiyal ajan olarak sunulmuştur (8). Günümüzde ise dezenfektan ve antiseptik olarak geniş bir kullanım alanına sahip olmakla birlikte göz, burun koruyucu ve inhalasyon ilaçlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Son zamanlarda benzalkonyum klorürün biyosidal aktivitesinin mikroorganizma suşlarının direncini artırdığı ile ilgili sıklıkla raporlar ortaya çıkmaktadır (9, 10) Benzalkonyum klorür kuaterner amonyum bileşiği olan bir ajandır. Evlerde, çiftliklerde ve hastanelerde kullanılan bu ajanın konsantrasyonu %0.005'den %10'a kadar değişmektedir. Düşük konsantrasyonlarda göz ve burun preparatlarında koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Uygun sulandırma ile cilt, mukoz membran, yara ve yanıkların temizliğinde antiseptik olarak kullanılmaktadır (11). Benzalkonyum klorür, birçok farmasötik formülasyonda, kozmetik ürünlerde, ticari dezenfektanlarda, endüstriyel sanitasyon preparatlarında ve gıda koruyucularında aktif madde olarak kullanılmaktadır (12). Temizleyici maddelerle karıştırılarak hem dezenfeksiyon, hem de temizleme yapmak üzere hastanelerde yerlere, duvarlara, mobilyalara, alet yüzeylerine ve tuvaletlere uygulanırlar. Düşük toksisite ve deterjan özellikleri bu kimyasalları çok iyi sanitasyon ajanı yapar (13).

Benzalkonyum klorür gibi katyonik antiseptik bileşikler uygun dozda kullanıldığında farklı türlerdeki bakteri suşlarının oluşturacağı biyofilmi önleyebilmektedir (14). 10 mg/ml'den daha yüksek konsantrasyonda 30 dk süre ile muamele edilen benzalkonyum klorür, biyofilme bulunan hücreleri öldürmek için yeterli olmaktadır (15). Yapılan bir çalışmada, benzalkonyum klorürün %1'lik solüsyonunun, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarına karşı 5. dakikada %100, *P. aeruginosa* suşlarına karşı ise 1. dakikada %40, 5. dakikada %80 etkili olduğu tespit edilmiştir (16).

Başka bir çalışmada benzalkonyum klorürün, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *S. aureus* gibi mikroorganizmalar üzerinde güçlü bir antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiş ve diş tedavisinde restorasyon öncesinde kavitedeki mikroorganizmaların yok edilmesi amacıyla kullanımının uygun olacağı belirtilmiştir (17-19). Ayrıca benzalkonyum klorürün, hem duyarlı hem de dirençli suşlardan oluşan *L. monocytogenes* biyofilm formunu öldürebildiği de gösterilmiştir (20, 21).

Nanoteknoloji, maddenin atomik-moleküler boyutta mühendisliğinin yapılarak yepyeni özelliklerinin açığa çıkarılması; nanometre ölçeğindeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrolü ve üretimi amacıyla, fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesidir (22). Nanoteknolojinin sağladığı olduğu üstün özelliklerden yararlanılarak çeşitli alanlarda (tıp, elektronik, savunma, tekstil vb.) yeni ürünler elde edilebilmektedir (23). Nanoteknoloji uygulamalarıyla günümüzde kullanılan dezenfektanlar da üretilmektedir. Nanoteknoloji ürünü dezenfektanlarda, nanopartiküllerin kullanılmasıyla klasik malzeme üretiminde kullanılan ve çevreye zarar verebilen kimyasalların kullanımı da engellenmektedir. Nanoteknoloji ürünü sabunlar, temel olarak klasik sabunların fonksiyonlarını yerine getirmekle beraber çeşitli antibakteriyel nanopartiküllerin eklenmesi ile mikrop öldürücü, bazı biyokimyasallarla donatılarak hücre yenileyici, yağ ve kiri daha etkin ve sağlıklı temizleme özelliklerinin artırılması ile ön plana çıkmaktadır (24). Benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının antimikrobiyal etkisi bilinmektedir. Fakat nanoteknolojik benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının biyofilm tabakası içinde bulunan bakterilere karşı etkisi bilinmemektedir.

Bu çalışmada nano benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının yüzeylere uygulandığında biyofilm oluşumunu nasıl etkiledikleri

gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, mikrobiyolojik kültür metodu yanında ölü/canlı bakteri boyama ile biyofilm bakterilerinin dezenfektandan ne derece etkilendikleri ölçülerek üretici için ideal dozun doğru tespitine katkı sağlanması amaçlanmıştır. Biyofilm yoğunluğunun varlığı ve kıyası için EPS (ekstrasellüler polimerik matriks) eldesi yapıp kantitatif olarak miktar da hesaplanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyde laminar su akışına ayarlanmış (Reynolds sayısı: 2000) laboratuvar ölçekli biyofilm reaktörü kullanılmıştır. Deney için, hedeflenen sirkülasyonu sağlayacak pompa mevcut olup su sıcaklığını 32°C'de sabit tutacak bir ısıtıcı varlığında dört aylık deney süresince kesintisiz olarak çalıştırılmıştır. Deneyde, biyofilm oluşturulacak yüzey olarak 316 L paslanmaz çelik kuponlar kullanılmıştır. Kuponların sistem içinde herhangi bir yüzeye ve birbirlerine değmeden sabit bir şekilde durabilmeleri için kupon tutucular kullanılmıştır. Deney öncesinde kuponlar %70'lik alkolde 5 dakika bekletilip kurumaya bırakılmıştır. Ardından steril kabin içinde yüzeylere, üreticiden temin edilmiş, piyasaya sürülecek final konsantrasyonlarda nano gümüş sülfadiazin (512 µl/ml) ve nano benzalkonyum klorür (128 µl/ml) püskürtülüp 24 saat bekletilerek dezenfektanların yüzeylerde kürleşmesi sağlanmıştır. Her ay sudan çıkarılan 36 adet kuponda doğal olarak gelişen biyofilm tabakası içindeki bakteri sayıları klasik kültür metodu ve ölü/canlı boyama yöntemi ile kaydedilmiştir. Ayrıca aylık olarak yüzeylerdeki karbohidrat miktarları, pH, çözünmüş oksijen, toplam çözünmüş madde ve sıcaklık değerleri ölçülmüştür. Su sıcaklığı ölçümleri sabit sıcaklığın kontrolü amacıyla yapılmıştır.

Biyofilm örneklerinin bakteriyolojik açıdan incelenmesi amacıyla aylık olarak sistemden çıkarılan kuponlardan steril eküvyonlar kullanılarak toplanan örnekler, içinde 20 ml fosfat tamponu bulunan steril poşetler içine alınarak stomacher cihazı (UIL Instruments, 200 vuruş/d) ile 90 s süre boyunca

homojenize edilmiştir. Her bir sulandırım için iki adet çelik kupondan alınan sürüntüden üç tekrarlı ekimler yapılmıştır. Aerobik heterotrofik bakterilerin sayısının tespit edilmesi amacıyla selektif olmayan R2A agar besiyerine biyofilm süspansiyonlarından hazırlanan sulandırım serilerinden (direk ekimden 10^{-2} 'ye kadar) 100'er µl ekim yapılmış ve 28°C' de 10 gün inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılmıştır.

Çalışmada, aktif olarak solunum yapan bakterileri tespit etmek üzere 100 µl CTC boyası ile 20 ml fosfat tamponu ile hazırlanan süspansiyondan alınan 900 ml biyofilm homojenatı steril koşullarda karıştırılmış ve 28°C'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda karışıma 110 µl DAPI boyası eklenerek 28°C'de 1 saat daha beklenmiştir. Bekleme işleminin ardından reaksiyonu durdurmak ve homojenizasyonu sağlamak amacı ile filtreden geçirilerek steril edilmiş 3 ml bidistile su eklenip karıştırılmış ve örnek 0.2 mm por çaplı siyah polikarbonat filtreden geçirilmiştir. Filtre havada kurutulmuş ve işlemin ardından lam üzerine yerleştirilerek üzerine immersiyon yağı eklenmiştir. Yağın koyulmasının ardından 100'lük objektifte floresan ışık altında inceleme yapılmıştır (25). Bu yöntem ile canlı bakteriler kırmızı, ölü olanlar mavi renkte görünmektedir.

Polikarbonat membran filtre epifloresan mikroskopta incelenip rastgele 10 farklı alandan fotoğraflar çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardan alınan kırmızı (canlı) ve mavi renkli (ölü) sinyaller sayılarak ortalamaları alınmıştır. Daha sonra birim yüzeye ulaşmak amacıyla ortalamalar katsayılarla çarpılarak santimetrekaredeki sinyal sayısı bulunmuştur.

Yüzeylerde oluşan biyofilm tabakasındaki toplam karbonhidrat miktarının tayini fenol-sülfürik asit yöntemine göre yapılmıştır. Fenol sülfürik asit metodu, çok küçük düzeydeki şekerlerin ve ilişkili maddelerin miktarını tanımlayan bir metottur. Oligosakkarit ve polisakkaritler gibi serbest veya kısmen serbest metil grubu içeren şekerler, fenol ve konsantre sülfürik asit içeren çözelti ile muamele edildiğinde sarı portakal

rengi renk vermektedirler. Gerçekleşen bu reaksiyon çok hassastır ve reaksiyon sonucu oluşan renkler kararlıdır (26).

Ölçüm işleminden önce, deney tüplerine 1 ml biyofilm homojenatı konup üzerlerine örnekte bulunan polisakkaritleri monomerlerine ayırmak amacıyla 1 ml %5'lik fenol eklenmiş ve hemen ardından 5 ml konsantre H_2SO_4 ilave edilerek 10 dk süre ile bekletilerek sarı-portakal rengi halinde renk değişimi gözlenmiştir. Süre sonunda tüpler vorteks ile karıştırılmış ve 25-30°C'lik su banyosunda 10-20 dk soğumaya bırakılmıştır. Bu aşamalarda kullanılan tüp ve cam pipetler karbondihidratı arındırılmak amacı ile kullanım öncesi 24 saat süre ile %10'luk HCl içinde bekletilmiştir. Sonuçlar spektrofotometre cihazında (Shimadzu UV 150-02) 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Deneylerin tümü yazarların adres gösterdiği kurumda, 2016-2017 yıllarında yapılmıştır.

Dezenfektan uygulanmayan kontrol kuponları ve dezenfektan uygulanan her iki deney kuponları seti istatistiksel analizler sonrasında 4. ay sonuçları baz alınarak değerlendirilmiştir. Kuponlardaki bakteri sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklı olup olmadığı, parametrik olmayan Kruskal Wallis Testi ile karşılaştırılmıştır. Anlamlı fark bulununca ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi yapılmıştır (SPSS 18, IBM). Değerlendirme sonucunda $p < 0.05$ olduğunda anlamlı bir farktan bahsedilmiştir.

BULGULAR

Mikrobiyolojik kültür sonuçlarına göre heterotrofik bakteri sayımı yapılarak, kontrol kuponları üzerinde biyofilmin kalınlaşma sürecinde zamanla doğru orantılı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 1). DAPI-CTC boyama ile yapılan ölü/canlı ayırımında da kontrol kuponlarında canlı bakteri sayılarının 4 ay boyunca arttığı görülmüştür (Tablo 2). Biyofilm tabakası yoğunluğundaki düzenli artış, fenol-sülfürik asit deneyi yardımıyla kontrol kuponlarında toplam organik karbon miktarının artışı ile de gösterilmiştir (Şekil 1).

Tablo 1. Nano benzalkonyum klorür, nano gümüş sülfadiazin ve kontrol çelik kuponları üzerinde birim alandaki heterotrofik bakteri sayıları.

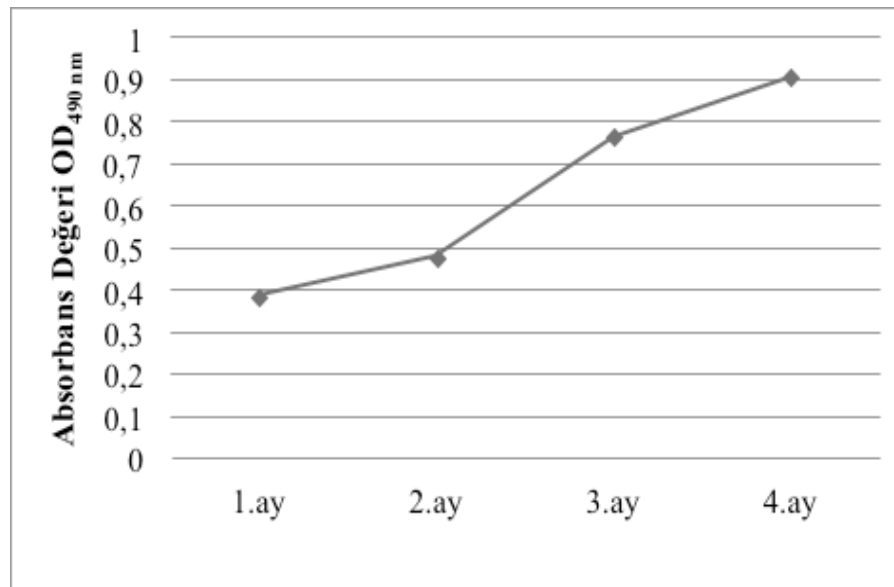
Aylar	Kontrol kuponları	Nano Benzalkonyum Klorür	Nano Gümüş Sülfadiazin
	Heterotrofik Bakteri Sayısı KOB/cm ²	Heterotrofik Bakteri Sayısı KOB/cm ²	Heterotrofik Bakteri Sayısı KOB/cm ²
1	6600 ± 110	2700 ± 90	3900 ± 70
2	14500 ± 240	3000 ± 140	12500 ± 90
3	18900 ± 420	4000 ± 150	16500 ± 140
4	25000 ± 440	6000 ± 180	20500 ± 220

Bakteri sayıları 3 farklı sulandırım serisinden yapılan üçer tekrarlı ekimlerden kaydedilen sayıların ortalaması ve standart sapmasıdır (KOB: Koloni Oluşturan Birim).

Tablo 2. Nano benzalkonyum klorür, nano gümüş sülfadiazin ve kontrol çelik kuponları üzerinde birim alandaki toplam ve canlı sayıları.

Aylar	Kontrol kuponları		Nano Benzalkonyum Klorür		Nano Gümüş Sülfadiazin	
	Toplam Sinyal Sayısı/cm ²	Canlı Sinyal Sayısı/cm ²	Toplam Sinyal Sayısı/cm ²	Canlı Sinyal Sayısı/cm ²	Toplam Sinyal Sayısı/cm ²	Canlı Sinyal Sayısı/cm ²
1	2.79x10 ⁴ ± 399	1.92 x10 ⁴ ± 675	4.19 x10 ⁴ ± 315	1.30 x10 ² ± 123	4.14 x10 ⁴ ± 168	1.41 x10 ³ ± 691
2	2.80x10 ⁵ ± 603	2.90x10 ⁴ ± 183	2.63 x10 ⁵ ± 476	4.67 x10 ³ ± 136	3.70 x10 ⁵ ± 122	9.32 x10 ⁴ ± 399
3	2.10x10 ⁷ ± 126	2.95 x10 ⁷ ± 130	2.11 x10 ⁷ ± 193	1.40 x10 ³ ± 484	3.44 x10 ⁷ ± 159	1.70 x10 ⁵ ± 160
4	3.40 x10 ⁷ ± 230	3.09x10 ⁷ ± 707	1.93 x10 ⁷ ± 152	2.04 x10 ³ ± 169	4.24x10 ⁷ ± 192	1.46 x10 ⁵ ± 112

Sinyal sayıları rasgele seçilmiş 10 farklı alandan alınan sayıların ortalamasıdır.

**Şekil 1.** Kontrol kuponları üzerinde oluşan biyofilm tabakasından fenol-sülfürik asit yöntemi ile karbonhidrat miktarı ölçümleri.

Mikrobiyolojik kültür sonuçları itibariyle dört ay sonunda nano benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin ile kaplanmış kuponlarda kontrol kuponlarına kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük sayılarda heterotrofik bakteri sayısı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Hem kontrol hem de deney kuponlarında aydan aya bakteri sayılarında düzenli artış olsa da, dezenfektan kaplı kuponlarda aktif maddelerden dolayı daha düşük sayıda kolonizasyon gözlenmiştir. İki dezenfektan 4. ayda birbirine karşı kıyaslandığında ise, nano benzalkonyum klorür ile kaplanmış kuponlardaki bakteri sayıları nano gümüş sülfadiazin kaplanmış kuponlardakine oranla anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

Ölü/canlı bakteri sayımı baz alınarak elde edilen epifloresan mikroskopi sonuçlarına göre de dezenfektan ile kaplanmış kuponlarda kontrol kuponlarına kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük sayılarda canlı bakteri sinyali tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 2). Dezenfektan ile kaplanmış kuponların biyofilm tabakasındaki bakteriler üzerinde öldürücü etkisi olduğu açık olarak görülmektedir. Öte yandan, dezenfektan kaplı kuponlardan kaydedilen canlı sinyal sayılarının, toplam sinyal sayısına göre anlamlı ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Oysa kontrol kuponlarındaki ölü/canlı toplam bakteri sinyal sayısı ile canlı bakteri sinyal sayısı aynı üstel büyüklüktedir. 4. ay sonunda nano benzalkonyum klorür kaplı kuponlarda toplam sinyal ile canlı sinyal sayıları arasında 4 log fark tespit edilmiştir. Bu fark dezenfektanın etkinliği lehinedir.

İki dezenfektan dört ay sonunda birbiriyle kıyaslandığında, nano benzalkonyum klorür ile kaplanmış kuponlardaki canlı sinyal sayıları nano gümüş sülfadiazin kaplanmış kuponlardakine oranla anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

Kontrol kuponlarının üzerinde oluşan biyofilm tabakasındaki karbonhidrat miktarlarının, deney periyodu boyunca arttığı belirlenmiştir (Şekil 1). Kuponlar üzerinde mikroorganizma sayılarının artışına

paralel olarak, biyofilm fenotipindeki bakterilerce hücre dışına salınan polimerik maddelerin miktarı da artarak içinde buldukları tabakayı kalınlaştırmıştır.

Su sıcaklığının dört ay boyunca 32°C 'de sabit tutulduğu deney sürecinde reaktör içindeki suyun analiziyle ortalamaları kaydedilen değerler sırasıyla pH 8.1, çözülmüş oksijen miktarı 6.82 mg/l, toplam çözülmüş madde miktarı ise 440 ppm olarak tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Benzalkonyum klorür katyonik sürfaktan olup göz damlası, burun damlası ve spreyi gibi birçok farmasötik formüllerde kullanılmaktadır. Benzalkonyum klorürün dezenfektan olarak çelik yüzeylere iyi tutunduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (27). Aynı çalışmada benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin kaplı kuponlara çamaşır suyu, sıcaklık ve yıkama etkenlerinin uygulanmasına rağmen benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının etkisinin azalmadığı bildirilmiştir. Çetinel (28) yaptığı çalışmada benzalkonyum klorürün gümüş sülfadiazine göre bakterilerin planktonik ve biyofilm hallerine çok düşük konsantrasyonda kısa zamanda etki ettiğini belirtmiştir. Bu açıdan o çalışmadaki verilerle uyumlu sonuçlar alınmıştır. Ülkemizde, hatta dünyada bile dezenfektan etkinlik testleri standardize şekilde planktonik bakterilere karşı süspansiyon testi olarak yapılmaktadır. Oysa bir mikroorganizma biyofilm tabakası içinde bulunabilir ve bu tabakanın ona sağladığı avantajları da kullanıyor olabilir. Bu durumda standart testler dezenfektanların gücünü olduğundan daha yüksek gösteriyor denebilir. Bir de bu testlerin alt pasajları yapılmış olan laboratuvar suşları ile yapıldığı düşünülürse sonuçlar daha da tartışılır hale gelmektedir. Bu sebeple, doğal olarak oluşmasına izin verilmiş heterotrofik biyofilmler ile yapılan testlerin gerçek yaşam ortamlarına daha yakın sonuçlar verdiği düşünülmektedir. O nedenle model sistemler ve reaktörler ile yapılan etkinlik testleri günümüzde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Ne var ki, bilinen

standartlara (ISO, TSE) göre yapılan testler için bu tip alternatifler henüz hak ettiği yerini bulamamıştır.

Yapılan önceki çalışmalar, biyofilm tabakasının model sistemlerde veya reaktörlerde 120-150 gün sonra yarı durağan faza ulaştığını belirtmektedir. (29-31). Yarı-durağan olarak nitelendirilmesinin nedeni ise biyofilm tabakasının sürekli bir dinamiğe sahip oluşudur. Su fazına erozyon ya da dökülme ile sürekli bakteri geçişi olmaktadır. Aynı zamanda üreme devam eder ve bu denge sayıca korunur. Çalışmanın 4 ay süre ile devam ettirilmesinin amacı sonuçların olgun biyofilm tabakasına göre değerlendirilebilmesi olmuştur. Biyofilm disiplinde yapılan çok kısa süreli tutunma ve dezenfektan etkinliği testleri olgun biyofilm tabakalarının verdiği cevabı karşılamamaktadır.

Bu çalışma ile dezenfektanların yüzeylere tutunabilme etkisi araştırılmış olup sonuçlar,

nanoteknolojik benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının endüstriyel ve klinik ortamlardaki çeşitli yüzeylerde kullanılabilmesi amacıyla değerlendirilmiştir. Özellikle endüstriyel tesisler ve cihazlarda biyofilm birikimine bağlı olarak meydana gelebilecek hijyenik ve endüstriyel sıkıntıların kısa veya uzun vadede çözümünde özellikle nano benzalkonyum klorürün etkin olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Çetinol (28), yaptığı çalışmada nanoteknolojik benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının minimum bakterisidal konsantrasyonlarını belirlemiştir. Bu değerler baz alınarak Türkiye’de üretilen ve piyasaya sürülmüş dezenfektanlar içinde etkinliği heterotrofik biyofilme karşı hem klasik mikrobiyolojik kültür hem de ölü/canlı sayımı metodu ile sağlaması yapılarak test edilmiş dezenfektanla ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

TEŞEKKÜR

Çalışmayı destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğine teşekkür ederiz (Proje No: 36337).

KAYNAKLAR

1. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 2002; 15 (2): 167 - 93.
2. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*, 2001; 33: 1387 - 92.
3. Donlan RM. Biofilm and device associated infections. *Emerg Infect Dis*, 2001; 7(2): 277 - 81.
4. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 1995; 49: 711- 45.
5. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*, 2009; 27: 76-83.
6. Çetin ET. Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon, İstanbul Tıp Fakültesi Yayını, İstanbul, 1982.
7. Brycki B, Matecka I, Koziróg A, Otlewska A. Synthesis, structure and antimicrobial properties of novel benzalkonium chloride analogues with pyridine rings. *Molecules*, 2017; 22(1): doi:10.3390/molecules22010130.
8. Domagk G. Eine neue klasse von desinfektionsmitteln. *Dtsch Med Wochenschr*, 1935; 61: 829 - 32.
9. Keen PL, Montforts MM. Antimicrobial resistance in the environment. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA. 2012.
10. Tezel U, Pavlostathis SG. Quaternary ammonium disinfectants: Microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr Opin Biotechnol* 2015; 33: 296 - 304.
11. Hardwicke J, Azad S. Temporary henna tattooing in sibling an unusual chemical burn. *Burns*, 2006; 32:1064 - 65.
12. Bilgin M. Çeşitli dezenfektan maddelerin atık sularından izole edilen mikroorganizmalar tarafından parçalanmasının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011.
13. Özbakkaloğlu B. Hastane Ortamında Kullanılacak Yüzey Dezenfektanları, 3. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon Kongresi, Samsun. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2003,131-8.
14. Houari A, Di Martino P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Lett Appl Microbiol*, 2007; 45(6):652-6.
15. Romanova NA, Gawande PV, Brovko LY, Griffiths M W. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. *J Microbiol Meth*, 2007; 71: 231-37.
16. Erbay A, Ergönül Ö, Esener H, Colpan A, Dokuzoğuz B. Hastane kökenli metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli dezenfektanlara karşı direnci. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, 2002; 6: 191- 4.
17. Gultz J, Do L, Boylan R, Kaim J, Scherer W. Antimicrobial activity of cavity disinfectants. *Gen Dent*, 1999; 47(2): 187-90.
18. Özel E, Yurdağülen H, Say EC, Kocagöz S. Fosforik asit ve dezenfektan solüsyonların *Streptococcus mutans*'a karşı antibakteriyel etkisinin saptanması, *Hacettepe Diş Hek Fak Derg*, 2005; 29(4): 8-14.
19. Türkün M, Türkün LS, Ateş M. Antibacterial activity of cavity disinfectants, *Balk J Stom*, 2004; 8(3): 214-19.
20. Romanova N, Favrin S, Griffiths MW. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry, 2002; *Appl Env Microbiol*, 68: 6405-9.
21. Romanova NA, Wolffs PFG, Brovko LY, Griffiths MW. Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. 2006; *Appl Env Microbiol*, 72: 3498-3503.
22. Kut D, Güneşoğlu C. Nanoteknoloji ve tekstil sektöründeki uygulamaları. *Tekstil & Teknik*, 2005; 1: 224-30.

23. Ersan I, 2007. Sigorta sektörü nanoteknoloji devrimine hazır mı? 1 Mart 2017. http://nano.bilkent.edu.tr/docs/Best_dergisi.pdf.
24. Şam M, Denkbaş B. Temizlik konusunda nanoteknolojik yaklaşımlar. Standart Dergisi, 2010; 49(580): 53-57.
25. Lebaron P, Trousselier M. Got Accuracy of epifluorescence microscopy for direct estimates of bacterial numbers. J Microbiol Meth, 1994; 19: 89-94.
26. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem, 1956; 28; 350-6.
27. Gökçe Y. Nanoteknolojik dezenfektanların etkinliği ve biyofilm üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2017.
28. Çetinel B, Türetgen İ. Nano gümüş sülfadiazin ve nano benzalkonyum klorür dezenfektanlarının planktonik bakterilere ve biyofilm tabakasına etkinliğinin incelenmesi. Iğdır Üni Fen Bil Enst Der, 2017; 7: 79-85.
29. Boe-Hansen R, Albrechtsen HJ, Arvin E, Jorgensen C. Dynamics of biofilm formation in a model drinking water distribution system. J Wat Supply, 2002; 51: 399-406.
30. Türetgen İ. Reduction of microbial biofilm formation using hydrophobic nano-silica coating on cooling tower fill material. Water SA, 2015; 41, 295-9.
31. Boe-Hansen R, Albrechtsen HJ, Arvin E. Biofilm in medicine, industry and environmental biotechnology. IWA Publishing, USA, 2003.

The first results of national antimicrobial resistance surveillance system in Turkey

Türkiye’de ulusal antimikrobiyal direnç surveyans sisteminin ilk sonuçları

Nilay ÇÖPLÜ¹, Hüsnüye ŞİMŞEK², Deniz GÜR³, Ayşegül GÖZALAN⁴, Ufuk HASDEMİR⁵,
Zeynep GÜLAY⁶, Gülçin BAYRAMOĞLU⁷, Nezahat GÜRLER⁸, Şöhret AYDEMİR⁹,
Mete EYİGÖR¹⁰, Duygu PERÇİN¹¹, Dilber AKTAŞ²

ABSTRACT

Objective: In order to combat with antimicrobial resistance, some measures should be taken and determination of the current status is one of them. National antimicrobial resistance surveillance system (NAMRSS) was established for this purpose in Turkey. It was targeted to be useful for guidance of ampirical therapy, create antimicrobial usage policies, provide data to the guidebooks, and supply initial information to evaluate the efficacy of the measures taken.

Methods: Data of resistance was collected from 55 hospital, from blood and cerebrospinal fluid isolates, which were *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. faecium*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. The antimicrobials and test methods were chosen in accordance with international surveillance systems. The collected data was analysed by WHONET software.

Results: *S. aureus* (1437); meticillin resistance was 31.5%, rifampin, linezolid and vancomycin resistance

ÖZET

Amaç: Antimikrobiyal direnç ile mücadele için bazı önlemler alınmalıdır, mevcut durumun saptanması da bunlardan biridir. Türkiye’de ulusal antimikrobiyal direnç surveyans sistemi bu hedefle kurulmuştur. Ampirik tedaviyi desteklemek, antimikrobiyal kullanım politikaları oluşturmak, rehber kitaplara veri sağlamak, alınmış olan önlemlerin etkinliğini değerlendirmek için başlangıç bilgilerini sağlamak amaçlanmıştır.

Yöntem: Elli beş hastaneden, kan ve beyin omurilik sıvısından izole edilen *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının direnç verileri toplanmıştır. Antimikrobiyaller ve test yöntemleri uluslararası surveyans sistemleri ile uyumlu olacak şekilde seçilmiştir. Toplanan veriler WHONET program ile analiz edilmiştir.

Bulgular: *S. aureus* (n=1437); metisilin direnci %31,5, rifampin, linezolid ve vankomisin direnci sırası

¹Kastamonu University, Kastamonu Medical School, Microbiology Department, Kastamonu

²Turkish Public Health Institute, Microbiology Reference Laboratories Directorate, Ankara

³Hacettepe University, School of Medicine, Department of Microbiology, Ankara

⁴Ankara Atatürk Training and Research Hospital, Department of Microbiology, Ankara

⁵Marmara University, School of Medicine, Department of Microbiology, İstanbul

⁶Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Microbiology, İzmir

⁷Karadeniz Technical University, School of Medicine, Department of Microbiology, Trabzon

⁸İstanbul University, İstanbul School of Medicine, Department of Microbiology, İstanbul

⁹Egean University, School of Medicine, Department of Microbiology, İzmir

¹⁰Akdeniz University, School of Medicine, Department of Microbiology, Antalya

¹¹Erciyes University, School of Medicine, Department of Microbiology, Kayseri



İletişim / Corresponding Author : Nilay ÇÖPLÜ

Kastamonu Üni. Kastamonu Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD 37150 Kastamonu - Türkiye
Tel : +90 532 546 16 11 E-posta / E-mail : nilaycoplu@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 21.08.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 17.11.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.68878

Çöplü N, Şimşek H, Gür D, Gözalan A, Hasdemir U, Gülay Z, Bayramoğlu G, Gürler N, Aydemir Ş, Eyiğör M, Perçin D, Aktaş D. The first results of national antimicrobial resistance surveillance system in Turkey. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 333-344

were 65.3%, 2.3%, and 0.0%, respectively. *E. faecalis* (n=760) resistance of ampicillin was 9.7%, linezolid, vancomycin, teicoplanin were lower than 1%, high level (HL) aminoglycoside was around 30%. *E. faecium* (n=756) resistance of ampicillin was 88.1%, linezolid, teicoplanin were lower than 1%, vancomycin 17%, HL aminoglycoside was around 50%. *S. pneumoniae* (n=128) with non-meningitis breakpoints; resistance were lower than 5.2% for all antimicrobials other than erythromycin (32%), with meningitis breakpoints: resistance increased to 14,3-44,8%. *E. coli* (2280) and *K. pneumoniae* (1307), extended spectrum beta-lactamase (ESBL) was 51.6% and 54.0%, respectively. *P. aeruginosa* (825) resistance were changed in between 8.4% (amikacin) and 36.4% (piperacillin).

Conclusion: The resistance was higher among the countries in close geographical region and increased in time, indicating the need for developing policies to combat with it. Besides, the results will also be valuable to monitor the usefulness of the measures taken.

Key Words: Drug resistance, microbial, surveillance, Turkey

ile %65,3; %2,3 ve %0,0, bulunmuştur. *E. faecalis* (n=760) ampisilin direnci %9,7, linezolid, vankomisin, teikoplanin direnci %1'in altında, yüksek düzey (YD) aminoglikozid %30 civarında bulunmuştur. *E. faecium* (n=756) ampisilin direnci %88,1; linezolid ve teikoplanin %1'den az, vankomisin %17, YD aminoglikozid %50 civarında bulunmuştur. *S. pneumoniae* (n=128) non-menenjit sınır değerler için eritromisin (%32) dışında tüm antimikrobialler için direnç %5,2'den düşüktür, menenjit sınır değerler için direnç %14,3-44,8'a yükselmiştir. *E. coli* (2280) ve *K. pneumoniae* (1307) için genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) direnci sırası ile %51,6 ve %54,0 bulunmuştur. *P. aeruginosa* (825) direnci %8,4 (amikacin) ve %36,4 (piperacillin) arasında değişmektedir.

Sonuç: Direnç Türkiye'ye yakın coğrafyadaki ülkelerden yüksek bulunmuş ve zaman içinde artış göstermiş olup bununla mücadele için politikalar geliştirmek gerektiğine işaret etmektedir. Ayrıca, alınan önlemlerin yararlılığını izlemek için de sonuçlar değerli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal direnç, surveyans, Türkiye

INTRODUCTION

Antimicrobial drug resistance is a growing problem worldwide. To combat this problem, policies for the use of the rational antimicrobial drugs should be developed. Determination and monitoring of the current situation is one of the steps to be taken for this purpose (1,2). NAMRSS was established for determination of the current status, and it will be possible to follow the efficiency of the measures taken, as well (3). Establishment of NAMRSS was based on the regulations published in the official gazete. The activities of the establishment phase were carried out with the contributions of the scientific advisory committee (SAC) consisting of 17

senior scientist (3). The clinical material, bacteria, antimicrobial agents and test methods were chosen to be in accordance with international surveillance systems like European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) because to be included in these systems in the future was targeted (4). As a matter of fact, it was included in the network of Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) in 2014 (5). During establishment, the choice of the laboratories was made regarding distribution to 12 Statistical Region Units in Turkey determined by Turkish Statistical Institute, distribution to university, training and

research and governmental hospitals, and capability of performing blood culture and antimicrobial susceptibility tests (AST). For this purpose, a questionnaire study was conducted nationwide, and 78 laboratories have been selected to participate the system (6,7). By the contribution of the SAC, the standard operating procedures (SOP) and the software program were determined and published as a book (3,8,9). Serial courses have been organised for the participating laboratories, in addition to external quality assurance, laboratory proficiency assesment and on-site observation studies, and the data of the system was observed to be reliable (10,11).

The aim of this study was to analyse the resistance data of NAMRSS, those belong to the bacteria isolated from blood and cerebrospinal fluid (CSF), against the selected antimicrobial agents. This analysis will not only be useful for guidance of ampirical therapy, but also to create antimicrobial usage policies, to provide data to the guidebooks written for this purpose, supply initial information so that the efficacy of the measures taken can be evaluated in the long run.

MATERIAL and METHOD

Data was requested from 78 selected hospitals those were distributed to 12 regions according to Statistical Classification of Regional Units of Turkish Statistical Institute and expected to be sent quarterly.(6) Among these 55 hospital sent data, and distribution of them to the regions and institutions are shown in Figure 1. Distribution according to institutions for university, education and research and state hospital were 28, 13 and 14, respectively (Figure 1). This is a sentinel study and does not represent the regions. Data were collected by either Excel or Backlink interface programme, and analysed by WHONET (3,9).

The collected resistance data of the selected bacterial species, clinical samples, antimicrobials and test methods were: *Staphylococcus aureus* (blood):

cefoxitin disk diffusion or oxacillin minimum inhibitory concentration (MIC), if not susceptible confirmation tests (PCR *mecA* gen or PBP2a agglutination or MIC of oxacillin), vancomycin MIC, linezolid, rifampin; *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* (blood): amoxicillin and/or ampicillin, HL gentamicin ve streptomycin, vankomycin MIC and teicoplanin MIC and if resistant confirmation by PCR, linezolid; *Streptococcus pneumoniae* (blood and CSF): oxacillin disk (1 µg), if not susceptible penicillin MIC, cefotaxime/ceftriaxone MIC, erythromycin, norfloxacin screening, if not susceptible: ciprofloxacin and/or ofloxacin and/or levofloxacin MIC; *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (blood and CSF): amino-penicillin (amoxicillin and/or ampicillin), aminoglycoside (gentamicin and/or tobramycin and/or amikacin), fluoroquinolone (ciprofloxacin and/or ofloxacin and/or levofloxacin and nalidixic acid), 3rd generation cephalosporins (cefotaxime or ceftriaxone and ceftazidim), if 3rd generation cephalosporins are not susceptible ESBL detection, if tested: imipenem/meropenem, piperacillin-tazobactam, co-trimoxazole (TMP/SXT); *Pseudomonas aeruginosa* (blood and CSF): piperacillin and/or piperacillin-tazobactam, ceftazidim, imipenem and meropenem, ciprofloxacin and/or levofloxacin, gentamicin and/or tobramycin and/or amikacin (3,8).

Tests have been studied by the microbiology laboratories of the selected hospitals. Blood culture were inoculated to automatize systems (Bactec Becton Dickinson; Bact/alert BioMerieux), the signaling blood cultures were passaged and CSF were inoculated to routine media, for identification the automatize systems which were Phoenix (Becton Dickinson), Vitek MS (BioMerieux), Microscan Diagnostic (Siemens) or the conventional tests those were commented in SOP documentation were studied (3). Antimicrobial susceptibility tests were studied and evaluated according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standards and tests were done by Kirby Bauer disk diffusion, antibiotic

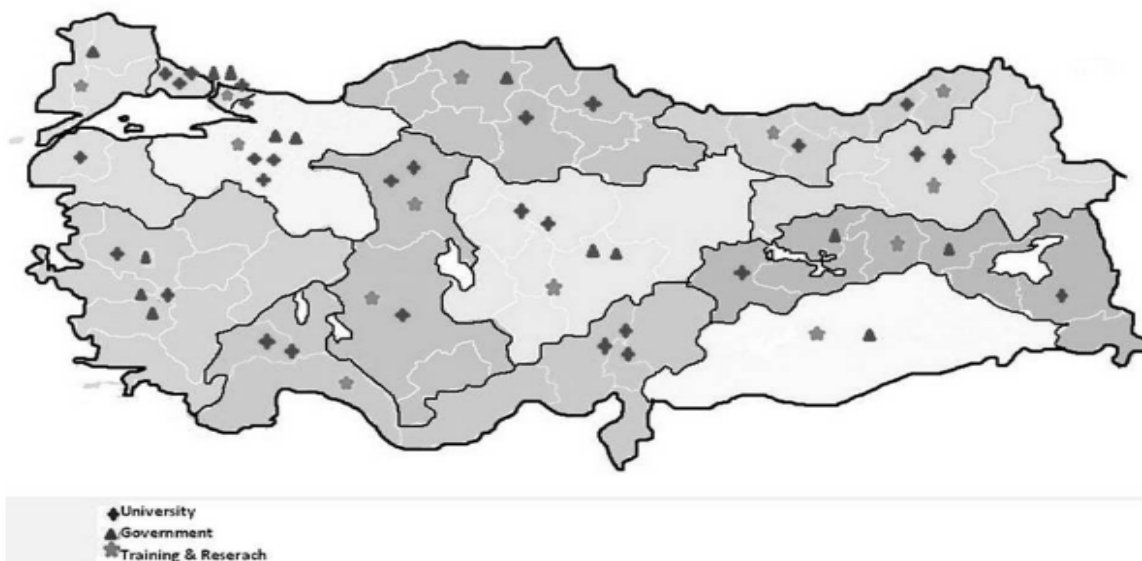


Figure 1. Distribution of the participating laboratories of university, government, and training and research hospitals those sent data to NAMDSS from 12 NUTS region of Turkey

gradient strip test and/or automatize systems afore mentioned.

RESULTS

The distribution of the resistance percentages of the isolates according to clinical material, and the patients gender, age group and service were shown in Table 1. For *S. pneumoniae* 85.6% and for the others more than 95% were isolated from blood cultures. When distribution of isolates to the patients regarded, women/men were very close to each other where more than 75.4% were adults according to age groups. Higher percentages were isolated from intensive care unit (ICU), and internal services showed higher percentages than surgical services. Paediatrics and emergency services had lower percentages than surgical services (Table 1).

The resistance percentages of *S. aureus* (1437) strains were presented in Table 2. MIC of oxacillin could be studied in 887 of the strains and 31.5% (n=280) of them were meticillin resistant *S. aureus*

(MRSA). Among these rifampin, linezolid and vancomycin resistance percentages were 65.3%, 2.3%, and 0.0%, respectively, and it was observed that except vancomycin, the resistance percentages of the other antimicrobials have been increased. When the services was regarded, it was seen that MRSA and rifampin resistance percentages were the highest in ICU and surgical services, and on the contrary, the number of the isolates were the highest in internal services which was followed by ICU and surgical services.

The resistance percentages of *E. faecalis* (n=760) and *E. faecium* (n=756) isolates were presented in Table 3. For *E. faecalis* isolates resistance of linezolid, vancomycin and teicoplanin were lower than 1%, but high level (HL) aminoglycoside resistance was present almost in one over three isolates. On the other hand, resistance of ampicillin and vancomycin for *E. faecium* were 88.1% and 17%, respectively, and the other antimicrobials had higher resistance percentages than *E. faecalis*. Among vancomycin resistant *E. faecium* (n= 107) the resistance percentages of ampicillin, HL- gentamicin,

Table 1. Distribution of the resistance percentage of the isolates according to clinical material, gender, age group and the services

Bacteria (n)	<i>S.aureus</i> n=1437		<i>E.faecalis</i> n=760		<i>E.faecium</i> n=756		<i>S.pneumoniae</i> n=128	<i>E.coli</i> n=2280		<i>K.pneumoniae</i> n=1307		<i>P.aeruginosa</i> n=825
		MRSA		VRE		VRE			GSBL		GSBL	
Clinical material												
Blood	97.7	99.1	98.4	100.0	98.0	95.0	85.6	99.4	99.3	98.7	98.2	97.1
CSF*	2.3	0.9	16	0.0	2.0	5.0	14.4	0.6	0.7	1.3	1.8	2.9
Gender												
Female	43.8	39.2	49.7	57.1	44.7	46.0	40.5	48.2	46.2	42.8	43.6	47.6
Male	56.2	61.8	50.3	42.9	55.3	54.0	59.5	51.8	53.8	57.2	56.4	52.4
Age Group												
New born	4.3	1.8	1.8	0.0	1.6	1.8	1.6	1.5	1.0	5.6	8.6	1.1
Children	11.6	8.0	11.2	14.3	17.5	21.4	20.3	9.3	9.7	19.0	25.5	11.5
Adult	84.1	90.2	87.0	85.7	80.9	76.8	78.1	89.2	89.3	75.4	65.9	87.4
Service												
ICU †	26.8	54.7	40.7	42.9	38.1	48.4	15.2	16.7	18.4	32.4	34.2	42.2
Internal services	45.5	25.6	30.8	42.9	33.6	20.2	45.5	50.7	48.8	33.5	24.0	31.5
Surgical services	9.1	9.4	15.7	0.0	11.8	12.9	3.8	15.7	18.9	10.0	8.8	14.1
Pediatrics	8.2	6.0	5.2	0.0	11.2	12.1	13.6	5.8	6.7	13.0	19.3	6.6
Emergency	5.6	2.6	2.6	0.0	1.8	0.0	18.2	8.7	6.6	4.3	3.8	3.7
Others	4.8	1.7	5.0	14.3	3.4	6.5	3.8	2.4	0.6	6.8	9.9	1.9

*cerebro spinal fluid

† Intensive care unit

Table 2. Antimicrobial resistance percentage of *S. aureus* (n= 1437) isolates

Antimicrobial	Isolate (n)	R%	I%	S%	R 95% - C.I.%
Rifampin	930	17.9	0.4	81.8	15.4-20.4
Linezolid	1050	1.0	0.0	99.0	0.5-1.9
Vancomycin	881	0.0	0.0	100.0	0.0-0.0

Table 3. Antimicrobial resistance percentages of *E. faecalis* (n=760) and *E. faecium* (n=756) isolates

Antimicrobial	Enterococcus spp.	Isolate(n)	R%	I%	S%	R 95% - C.I.%
Ampicillin	<i>E. faecalis</i>	626	9.7	0.0	90.3	7.6-12.4
	<i>E. faecium</i>	589	88.1	0.0	11.9	85.1-90.5
Gentamicin-HL*	<i>E. faecalis</i>	476	29.2	0.6*	70.2	25.2-33.5
	<i>E. faecium</i>	486	52.3	0.0	47.7	47.8-56.8
Streptomycin-HL	<i>E. faecalis</i>	219	31.1	1.8*	67.1	25.1-37.7
	<i>E. faecium</i>	253	49.0	2.0*	49.0	42.7-55.3
Linezolid	<i>E. faecalis</i>	528	0.4	1.1	98.5	0.1-1.5
	<i>E. faecium</i>	495	0.6	2.8	96.6	0.2-1.9
Vancomycin	<i>E. faecalis</i>	666	0.9	0.6	98.5	0.4-2.1
	<i>E. faecium</i>	630	17.0	0.8	82.2	14.2-20.2
Teicoplanin	<i>E. faecalis</i>	457	0.3	0.6	99.1	0-1.4
	<i>E. faecium</i>	457	0.3	0.6	99.1	0-1.4

*High Level

HL-streptomycin, linezolid, and teicoplanin were 98.5%; 75.6%; 46.7%; 2.8%; and 95.3%, respectively and resistance percentages were increased in this group. Regarding the services, for *E. faecalis* / *E. faecium* the highest resistance for vancomycin and teicoplanin were observed in neonatology, and for ampicillin in hematology and oncology.

The antimicrobial resistance percentages for *S. pneumoniae* (n=128) were presented in Table 4. Blood isolates were 85.6% of the total, however, for penicillin G, ceftriaxone and cefotaxime, the breakpoint of both meningitis and non meningitis were evaluated for all of the isolates. When evaluated with non-meningitis breakpoints, the resistance percentages were lower than 5.2% for all of the antimicrobials other than erythromycin, and when evaluated with meningitis breakpoints it was observed that the resistance percentages increased to 14.3-44.8% (Table 4). Among the penicillin resistant isolates, 20 of them have been studied for the other antimicrobials, and for cefotaxime for meningitis, resistance and intermediate increased to 26.7% and 33.3%, respectively. Similarly, erythromycin

resistance was observed in 13 isolates those were penicillin resistant.

The antimicrobial resistance percentages for *E. coli* (2280) and *K. pneumoniae* (1307) were presented in Table 5, where the resistance percentages for the same antimicrobials among ESBL positive 927 *E. coli* (51.6%) and 506 *K. pneumoniae* (54.0%) isolates were presented, as well. In this table intermediate strains were added to resistant group, and susceptible group was not presented. The resistance percentages of the extended spectrum beta-lactamase (ESBL) positive group is higher than the total for all of the antimicrobials including those which does not have beta-lactam ring and effective with other mechanisms, as expected. On the other hand, when *K. pneumoniae* isolates compared to *E. coli* isolates, beta-lactam antimicrobials and amikacin showed higher resistance, trimethoprim/sulfamethoxazole nearly the same, and the others showed lower resistance for *K. pneumoniae*. However the difference was low, mostly in fluoroquinolones with 24.9% difference which is the highest (Table 5).

The antimicrobial resistance percentages for *P.*

Table 4. Antimicrobial resistance percentages of *S. pneumoniae* (n=128) isolates

Antimicrobial	Site of Infection	Isolate(n)	R%	I%	S%	R 95% - C.I.%
Penicillin G*	Non meningitis †	58	5.2	6.9	87.9	0.0-40.2
Penicillin G	Meningitis †	58	44.8	0.0	55.2	31.9-58.3
Ceftriaxone *	Non meningitis †	14	0.0	21.4	78.6	0.0-26.8
Ceftriaxone	Meningitis †	14	21.4	21.4	57.2	5.7-51.2
Cefotaxime*	Non meningitis †	41	0.0	14.6	85.4	0.0-69.0
Cefotaxime	Meningitis †	41	14.3	23.8	61.9	6.0-29.2
Levofloxacin		78	2.6	0.0	97.4	0.5-9.9
Erythromycin		100	32.0	2.0	66.0	23.2-42.2

*Penicillin G, ceftriaxone, cefotaxim, have been studied by determination of MIC values, others either disk diffusion or MIC determination.
 †The breakpoint of the antimicrobial is changed by the site of infection which cause difference in the percentage of resistance.

Table 5. Antimicrobial resistance percentage of *E. coli* (n= 2280); ESBL positive *E. coli* (n= 927) and *K. pneumoniae* (n=1307); ESBL positive *K.pneumoniae* (n=506) isolates. (Intermediate have been added to resistant.)

Antimicrobial	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	Isolate (n)	R%	Isolate (n)	%R
Ampicillin	1073	77.5		
Ampicillin (ESBL +)	458	98.0		
Ceftazidime*	1536	37.8	850	49.3
Ceftazidime (ESBL +)	607	76.0	313	84.3
Ceftriaxone*	581	55.7	272	58.7
Ceftriaxone * (ESBL +)	263	96.0	101	97.0
Cefotaxime*	1306	49.2	794	57.6
Cefotaxime* (ESBL +)	493	91.0	284	95.1
Amikacin	1701	5.3	980	9.1
Amikacin (ESBL +)	666	7.0	365	14.4
Gentamicin	1712	30.8	957	27.7
Gentamicin (ESBL +)	640	51.0	343	45.1
Tobramycin	105	42.9	69	31.9
Tobramycin (ESBL +)	54	65.0		
Ciprofloxacin	1249	47.2	772	35.7
Ciprofloxacin (ESBL +)	410	72.0	269	52.2
Levofloxacin	1088	49.7	573	31.2
Levofloxacin (ESBL +)	458	72.0	218	47.1
TMP/SXT	688	58.0	498	54.8
TMP/SXT (ESBL +)	229	75.0	177	78.0

*For *E. coli* 149 isolate, for *K. pneumoniae* 69 isolate have been studied for both of the cephalosporins. Other isolates have been studied either one of the cephalosporin .

Table 6. Antimicrobial resistance percentages of *P. aeruginosa* (n= 825) isolates

Antimicrobial	Isolate (n)	R%	I%	S%	R 95% - C.I.%
Piperacillin	236	36.4	0.0	63.6	29.9-42.5
Piperacillin/tazobactam	533	22.7	0.7	76.6	18.9-26.1
Ceftazidime	701	30.2	10.4	59.4	26.8-33.7
İmipenem	675	28.9	4.4	66.7	25.5-32.5
Meropenem	584	21.2	5.9	72.9	18.0-24.8
Amikacin	630	8.4	2.7	88.9	6.3-10.8
Gentamicin	625	15.0	3.0	82.0	12.3-18.1
Tobramycin	95	16.8	0.0	83.2	10.2-26.2
Ciprofloxacin	552	16.8	1.8	81.4	13.8-20.2
Levofloxacin	480	22.0	9.0	69.0	18.5-26.1

aeruginosa (825) were presented in Table 6, where the resistance percentages were changed in between 8.4% (for amikacin) and 36.4% (for piperacillin).

DISCUSSION

Rational usage of antimicrobial agents is a must to struggle with resistance development. For this purpose, appropriate policies should be developed, like prevention of sale of antimicrobials on the counter, training of public, for clinicians writing guidebooks for logical usage of antimicrobials, etc. On the other hand, precautions for reducing the infection burden should be taken as well, such as following evidence-based guidelines for preventing healthcare-associated infections, training of the health-care workers or for community acquired by vaccinations and some other measures. (9,12,13) Determination of the current situation is one of the steps that should be taken and NAMRSS was established for this purpose. The results showed that, the bacteria those were followed up were isolated mostly from blood samples, adults, ICU and internal services which are found reasonable.

NAMRSS released first report for the data of 2011. (14) For *S. aureus*, our data shows that 31.5% is MRSA, which makes it impossible to use beta-lactam antimicrobials which are first line drugs suggested by CLSI standards, with these isolates. According to CLSI, there is grouping of the antimicrobials in order to combat with antimicrobial resistance by encouragement of usage of primary drugs and limiting the usage of secondary drugs, and nearly one of every three isolates need second group drugs by this data (8). When it was compared to the older data of our country which is presented in Figure 2 (15), the percentages of MRSA was decreased from 43% to 31.5%, and it may be due to improvement in hospital infection control measures (12,15,16). Another study from our country emphasized similar decrease in MRSA in blood cultures (17). However, it is still higher than many of the European countries and this is a finding that should be emphasized. According to EARS-Net 2011 report, MRSA percentages from 28 countries from Europe were changing in between 0.3%- 54.6%, and only six of them were higher than our data (18). In the contrary, Mediterranean region showed higher MRSA percentages in five of nine countries than our results (19). A surveillance study

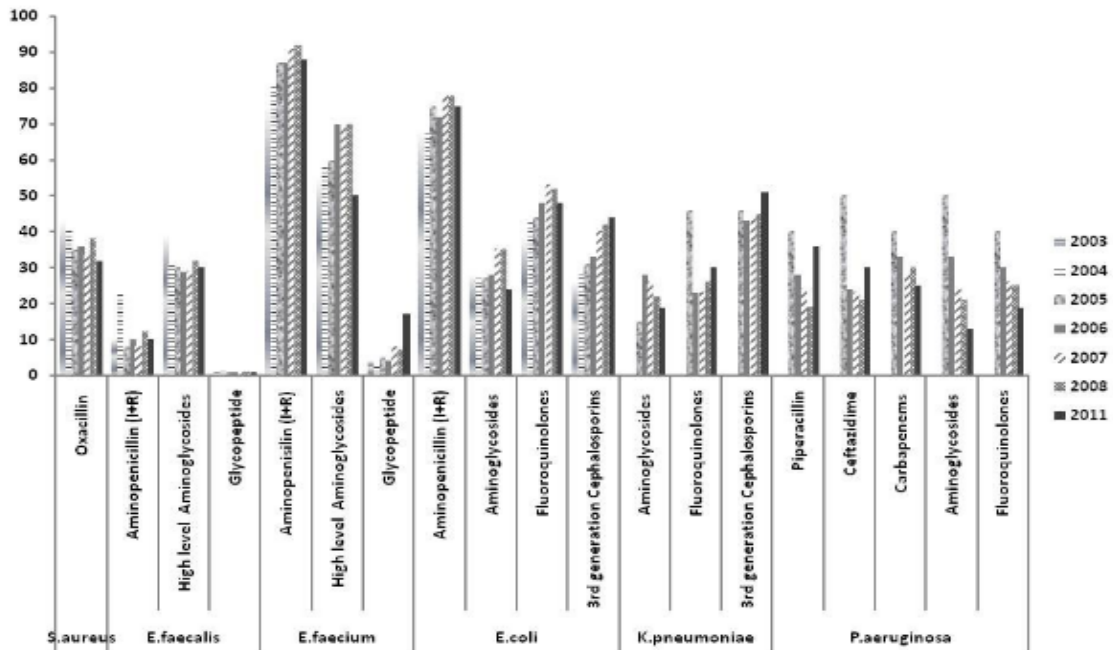


Figure 2. The comparison of data of the selected bacteria and resistance of the selected antimicrobials of NAMRSS in 2011, and the data of Turkey in between 2003-2008 those were sent to EARSS.

from China MRSA was 26.6%, lower than ours (20). The resistance of the second group antimicrobials according to CLSI those were followed were rifampin, linezolid and vancomycin and they were found to be effective (8,14). On the other hand, when focused on MRSA strains, it was observed that the resistance percentage increases for the antimicrobials other than vancomycin. Linezolid resistance was also higher in our country with 1%, which was 0.06 in EARS-Net 2011, that may be due to extensive usage in our country. Rifampin resistance was totally 1.1% in 27 country and only Poland (27.4%) had a higher percentage than our country (18). Rifampin is used in surgery services for surgical wound treatment extensively, and precautions are required. These findings point out that usage policies need to be developed especially for *S. aureus* with linezolid and rifampin.

For *E. faecalis*, other than high level (HL) aminoglycoside, the resistance percentage is

lower than 1-10%, which means the antimicrobials mentioned are effective including first line drug ampicillin. Besides, our resistance percentages for HL aminoglycoside are lower than EARS-Net (2011) for 12/20 of the countries (18). Another study from our country has similar results with 3% resistance for ampicillin, teicoplanin and vancomycin, and HL resistance was 16.9% and 32.4% for gentamicin and streptomycin, respectively, which are similar to our data (21). On the other hand for *E. faecium* ampicillin have no use, and HL aminoglycosides are resistant for nearly one of every two strains. However, the other three antimicrobials are found to be effective, but vancomycin resistant isolates are resistant for teicoplanin (95.3%) and the only option is linezolid for these strains. Most of the European countries have lower resistance levels than ours for vancomycin (18). According to the other study from Turkey, the resistance percentages were slightly higher than NAMRSS except vancomycin (21). When the difference of resistance against time

was evaluated, nearly all of the antimicrobials showed similar resistance percentages with NAMRSS results for both of the species except *E. faecium* vancomycin resistance, which was changing in between 3-7% in European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) 2008 report but 17% in NAMRSS (15). This may be due to extensive usage of vancomycin, especially in empirical therapy, which is an issue to discuss with clinicians. However, there was no statistically important difference for the resistance percentages for the other antimicrobials in time.

S. pneumoniae causes local infections and blood stream infections as well as meningitis, which have different breakpoints so that higher resistance percentages are present for the latter (8). Penicillin is a primary drug for *S. pneumoniae* and by 87.9% susceptibility, it is still the first choice for non-meningitis infections (8). Erythromycin is a primary drug as well, but it has no use in treatment unless it is found susceptible in AST, and regarding the dual resistance with penicillin that was observed in this study, it cannot be an alternative drug for penicillin resistant *S. pneumoniae*. Levofloxacin has a higher susceptibility percentage than the other second line antimicrobials, suggesting that it is a valid option when there is need to use other than beta-lactam antimicrobials. On the other hand, when the infection is meningitis, none of the beta lactams can be used for empirical treatment. In 2007-2008 data of EARSS those belong to Turkey, penicillin non-susceptible percentages were 26% and 47% for blood and CSF, respectively, which were higher for blood and lower for CSF than NAMRSS findings (15). The difference may be due to the smaller sampling of that project or due to usage during the time period in between. When compared with European countries, our findings are within the range but higher than most of the countries (11). When compared with ARMed Project in between 2003-2005, the resistance percentages of penicillin,

erythromycin and dual resistance were lower in Turkey than most of the Mediterranean countries, but NAMRSS data shows higher resistance frequency than data of Turkey in ARMed Project, which may be due to extensive usage in time (22). Another study from China showed penicillin resistance 25.7%, and cefuroxime resistance increase to 38.2% and 35.3% for penicillin resistant group, where it was 1.9% and 1.1%, respectively in penicillin susceptible group, indicating dual resistance (20).

E. coli and *K. pneumoniae* strains showed similar resistance percentages, and other than amikacin, none of the antimicrobials seem to be useful for empirical treatment. Besides ESBL is positive nearly in one of every two strains, those show higher resistance percentages for the other antimicrobials and makes therapy more difficult. According to the finding of another project from our country, the ESBL frequency was 39.7% and 38.8% for *E. coli* and *K. pneumoniae*, respectively, in 2007, which indicates the increase in the percentage in time (24). A Chinese surveillance study found 56.2% and 42.7%, respectively for the same bacteria, which were similar to our data (20). On the other hand, ampicillin susceptibility in ESBL negative group is found nearly one in every five isolates, so that it is possible to use this first group drug after AST results are available. This fact should be taken into account especially for automated systems, where there is limited opportunity for antimicrobials so that selection of the antimicrobials is of consideration. On the other hand, according to EARSS 2008 report, it was observed that resistance was increasing for aminopenicillins, aminoglycosides, fluoroquinolones and 3rd generation cephalosporins in between 2003 and 2008 in our country (Figure 2) (15). Besides, it was found that resistance percentages were slightly lower in NAMRSS than EARSS 2008, with exception of fluoroquinolones and 3rd generation cephalosporines for *K. pneumoniae*, that may be due to sampling differences as well as usage differences in time. On

the other hand, in ARMed Project which was covering 2003-2005, *E. coli* resistance findings were lower for aminoglycosides, 3rd generation cephalosporins and fluoroquinolones, but similar for aminopenicillins, indicating the increase in resistance in time (23). This increase is valid for European countries, too, even though the percentages are lower than our country. (16) According to EARS-Net 2011, the resistance percentages were lower than ours in most of the countries for most of the antimicrobials. (18) It is necessary to think over these findings and measures should be taken to reduce resistance.

P. aeruginosa results shows that if aminoglycosides and fluoroquinolones are selected for empirical therapy, the chance of success in treatment will increase. On the other hand first group antimicrobials like ceftazidime and piperacillin cannot be used for empirical treatment, but second group drugs like amikacin and ciprofloxacin can. The

comparison of data according to time in our country, the resistance percentages seems to get lower, except for piperacillin and ceftazidime for NAMRSS (15). This may be due to the sample differences. Like other bacteria, *P.aeruginosa* have higher resistance percentages than most of the countries in Europe (18).

CONCLUSION

The results of all of the antimicrobial agents point out that there is increase in resistance in time, and among the countries in close geographical region, the resistance is higher in our country in most cases. These findings indicate that there is need for developing policies to combat with resistance. This first surveillance results will be a milestone for discussing about these policies and also be useful to compare the results of following NAMRSS in the future to evaluate the benefit of the measures taken.

REFERENCES

1. Antimicrobial resistance, Global action plan on antimicrobial resistance, <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>.
2. Global action plan on antimicrobial resistance, <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
3. Aktaş D, Aydemir Ş, Bayram M, Bayramoğlu G, Ceyhan İ, Çöplü N ve ark. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Suveyans Sistemi laboratuvar testleri, kalite kontrolü ve kalite güvencesi standart uygulama prosedürleri ve WHONET yazılım programı. Ankara. Şubat 2011 (National Antimicrobial Resistance Surveillance System Laboratory Tests, Quality Control and Quality Assurance Standard Operating Procedures and WHONET software, Ankara, February 2011) ISBN: 978-975-590-347-7. www.uamdss.thsk.gov.tr.
4. SURVEILLANCE REPORT. Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2010. http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=502.
5. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance, Annual Report 2014. World Health Organization, Regional Office for Europe, 2015. http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0006/285405/CEASER-Surveillance-Antimicrobial-Resistance2014.pdf?ua=1.
6. Gözalan A, Çöplü N, Aktaş D, Şimşek H, Bahar Erdem G, I Mumcuoğlu. Performance evaluation of the microbiology laboratories in Turkey for culture and antibiotic susceptibility tests and the selection of laboratories to provide data for National Antimicrobial Resistance Surveillance System: Questionary application. *Turk Hij Den Biyol Derg*: 2015; 72(3): 175 - 182.

7. Antimicrobial Resistance Surveillance Questionnaire for Assessment of National Networks WHO/CDS/CSR/RMD/2003.1. World Health Organization. <http://www.who.int/drugresistance/whocdscsrrmd20031.pdf?ua=1>.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100S21 Vol.31 No 1, January 2011.
9. WHO Collaborating Centre for Surveillance of Antimicrobial Resistance www.whonet.org.
10. Akbas E, Cöplü N, Simsek H, Esen B, Sezgin B. Laboratory evaluation of susceptibility tests for National Antimicrobial Resistance Surveillance System (NAMRSS) in Turkey. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2018; 75(1): 1-12. DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.89166.
11. Çöplü N, Gülay Z, Temel F, Şimşek H, Göl N, Aktaş D. The First External Quality Assurance Laboratory Proficiency Assessment Study of National Antimicrobial Resistance Surveillance System in Turkey. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2018; 75(2): 117 - 126 doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.10437.
12. Loveday HP, Wilson JA, Pratt RJ, Golsorkhi M, Tingle A, Bak A, et. al. epic 3: National Evidence-Based Guidelines for Preventing Healthcare-Associated Infections in NHS Hospitals in England. *J Hosp Infect*, 2014, 86 (Supp 1), 1-70. [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-6701\(13\)60012-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-6701(13)60012-2).
13. Winsor G, Patel M. Combined infection training-should we be concerned about its impact on infection prevention and control training of microbiologists in the UK? *J Hosp Infect* 2015, 91 (4), 302-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2015.09.003>.
14. National Antimicrobial Resistance Surveillance System 2011 Annual Report. file:///C:/Documents%20and%20Settings/hst/Belgelerim/Downloads/UAMDSS_2011_Raporu.pdf.
15. European Antimicrobial Resistance Surveillance System, Annual Report 2008 On-going surveillance of *S.pneumoniae*, *S. aureus*, *E.coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption/antimicrobial_resistance/publications-documents/Documents/2008_EARSS_Annual_Report.pdf.
16. Gagliotti C, Balode A, Baquero F, Degener J, Grundmann H, Gür D, et.al. The EARS-Net Participants (Disease Specific Contact Points for AMR). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Euro Surveill*. 2011;16(11):pii=19819. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19819>.
17. Kızılarslanoğlu MC, Sancak B, Yağcı S, Hasçelik G, Ünal S. Evaluation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and comparison of prognosis according to vancomycin MIC values: Experience of the Last Ten Years. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(2): 199-210.
18. Surveillance Report Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011 http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=719.
19. Borg MA, de Kraker M, Scicluna E, van de Sande-Bruinsma N, Tiemersma E, Monen J et. al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother* 2007, 60, 1310-1315. doi:10.1093/jac/dkm365.
20. Yang Q, Xu Y, Xie X, Wang H, Hu Y, Ni Y, et.al. Antimicrobial resistance surveillance on hospital- and community-acquired pathogens in 10 teaching hospitals in China. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2009, 09 http://en.cnki.com.cn/Journal_en/E-E055-ZHYY-2009-09.html.
21. Gülmez D, Hasçelik G. Comparison of microdilution method and phoenix automated system for testing antimicrobial susceptibilities of *Enterococcus* Strains. *Mikrobiyol Bul*, 2011;45(1):21-27.
22. Borg MA, Tiemersma E, Scicluna E, van de Sande-Bruinsma N, de Kraker M, Monen J, et al. Prevalence of penicillin and erythromycin resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates reported by laboratories in the southern and eastern Mediterranean region. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 232-7.
23. Borg MA, van de Sande-Bruinsma N, Scicluna E, de Kraker M, Tiemersma E, Monen J, et al. Antimicrobial resistance in invasive strains of *Escherichia coli* from southern and eastern Mediterranean laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 789-796.

Hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi

Evaluation of antibiotic susceptibilities of enterococcus strains isolated from clinical samples of hospitalized patients

İlker ÖDEMİŞ¹, Şükran KÖSE², Gürsel ERSAN², Didem ÇELİK², İlkey AKBULUT²

ÖZET

Amaç: Enterokoklar idraryolu yara yeri enfeksiyonları ile bakteriyemiye neden olabilmektedir. Hastane kökenli enfeksiyonlarda en sık saptanan etkenlerden birisidir. Enterokoklarda son yıllarda antibiyotiklere karşı artan oranda direnç gözlenmektedir. Kültürlerden izole edilen enterokokların dağılımı ve antibiyotik direncinin sağlık bakım merkezleri arasında değişebildiği, bu nedenle de merkezin kendi sonuçlarını belli aralıklarla değerlendirmesinin faydalı olacağı düşünülmüştür. Bu çalışmanın amacı hastanemizde yatan hastaların idrar, kan, yara, balgam ve beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının ampisilin, gentamisin, streptomisin, siprofloksasin, vankomisin, teikoplanin ve linezolid gibi antibiyotiklere direnç oranlarını belirlemektir.

Yöntem: Ocak 2010 - Ocak 2015 arasında İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 390 enterokok suşu retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Suşların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıkları; tam otomatize bakteri tanımlama sistemi VITEK-2

ABSTRACT

Objective: Enterococci can cause urinary tract infection, wound infection and bacteremia. It is one of the most commonly detected agents in hospital-acquired infections. Increasing resistance to antibiotics has been observed in enterococci in recent years. The distribution of enterococci isolated from cultures and antibiotic resistance may vary between health care centers, so it would be beneficial for each center to evaluate its own results at certain intervals. The aim of this study is to determine the antibiotic resistance rates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from urine, blood, wound, sputum and cerebrospinal fluid (CSF) specimens of patients hospitalized in our hospital, such as ampicillin, gentamicin, streptomycin, ciprofloxacin, vancomycin, teicoplanin and linezolid.

Methods: Between January 2010 and January 2015, 390 Enterococcus strains isolated from various clinical specimens of patients in İzmir Tepecik Training and Research Hospital were evaluated retrospectively. Identification and antibiotic susceptibility testing of the enterococci strains were performed by fully

¹Ömer Halisdemir Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Niğde
²Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İzmir



İletişim / Corresponding Author : İlker ÖDEMİŞ

Aşağı Kayabaşı Mah., Ömer Halisdemir EAH İntaniye Dr. Odası 51000 Niğde - Türkiye
Tel : +90 505 416 30 35 E-posta / E-mail : begumevrano@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 05.05.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

(bioMerieux, Fransa) ile çalışılmıştır. Vankomisin, teikoplanin ve linezolid duyarlılıkları E-test (bioMerieux, Fransa) ile de test edilmiştir. Duyarlılık sonuçları ise Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) kriterleri esas alınarak belirlenmiştir.

Bulgular: İdentifiye edilen toplam 390 suşun 154 (%40)'ü *E. faecalis*, 236 (%60)'sı *E. faecium* olarak tanımlandı. *E. faecium* suşlarının izole edildikleri klinik örnekler sırasıyla; 126 (%53)'sı idrar, 65 (%27)'i kan, 39 (%17)'u yara yeri, 4 (%2)'ü balgam ve 2 (%1)'si BOS'dur. *E. faecalis* suşlarının izole edildikleri klinik örnekler ise 77 (%50)'si idrar, 50 (%33)'si kan, 22 (%14)'si yara yeri, 3 (%2)'ü balgam ve 2 (%1)'si ise BOS'dur. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının her ikisi için en duyarlı bulunan antibiyotik linezolid'dir. Hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* için en dirençli antibiyotiğin ampisilin olduğu saptandı.

Sonuç: Çalışmamızda hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* suşlarında ampisilin, vankomisin ve teikoplanin direncinin yüksek saptanması, bu suşlara yönelik ampirik antibiyotik seçiminde dikkate alınması gereken bir veri olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, enterokok antibiyotik duyarlılığı, enterokok enfeksiyonu

automated bacterial identification system VITEK-2 (bioMerieux, France). Vancomycin, teicoplanin and linezolid resistance was also tested by the E-test method (bioMerieux, Fransa). Susceptibility results were evaluated according to the guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Results: A total of 390 strains were identified as follows; 154 (%40) were *E. faecalis*, 236 (%60) were *E. faecium*. Clinical specimens from which *E. faecium* strains were isolated were; 126 (53%) urine, 65 (27%) blood, 39 (17%) wound, 4 (2%) sputum and 2 (1%) CSF. Clinical specimens from which *E. faecalis* strains were isolated were; 77 (50%) urine, 50 (33%) blood, 22 (14%) wound, 3 (2%) sputum and 2 (1%) CSF. Linezolid was the most sensitive antibiotic against both *E. faecalis* and *E. faecium* strains, Ampicillin was the most resistant antibiotic for both *E. faecalis* and *E. faecium* strains.

Conclusion: In our study; the detection of high ampicillin, vancomycin and teicoplanin resistance in both *E. faecalis* and *E. faecium* strains is considered to be a data that should be taken into consideration in the selection of empirical antibiotics for these strains.

Key Words: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, enterococcus antibiotic resistance, enterococcal infection

GİRİŞ

Enterokoklar; insan barsağında, genital bölgesinde, orofarinksinde, üretrasında ayrıca çeşitli sıcak kanlı hayvanlarda floranın üyesidir (1, 2). Uygunsuz çevre koşullarına oldukça dayanıklıdırlar. Dış ortam koşullarına dayanıklılığı ve bazı antibiyotiklere dirençli olmaları nedeniyle toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilirler (1, 3). Enterokoklar idrar yolu enfeksiyonuna, intraabdominal apseye, bakteriyemiye, endokardite, cerrahi alan enfeksiyonuna ve daha az sıklıkla menenjitte, yumuşak doku enfeksiyonuna ve osteoartiküler enfeksiyonlara neden olurlar (2, 3).

Enterokoklar; hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonları ve yara yeri enfeksiyonlarında ikinci, bakteriyemilerde ise üçüncü sıklıkta izole edilen etken olarak bildirilmektedir (1).

Yaklaşık olarak yirmi kadar enterokok türü bulunmaktadır. Toplum kaynaklı enterokok enfeksiyonlarında izole edilen etkenlerin %80-90'ını *Enterococcus faecalis*, %10-20'sini ise *Enterococcus faecium* oluşturmaktadır (1). Enterokok türleri penisilinlere, sefalosporinlere, linkozamidlere, trimetoprim-sulfametoksazole (TMP-SXT) ve

aminoglikozidlere karşı kalıtsal olarak dirençlidirler (3, 4). Ampisilin, siprofloksasin, vankomisin, teikoplanin ve linezolid gibi antibiyotiklere karşı gelişen direnç klinisyenlerin enterokok enfeksiyonlarının tedavisinin seçiminde zorluklar yaşamasına sebep olabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı hastanemizde yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının kullanımda olan antibiyotiklere direnç oranlarını belirlemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2010 - Ocak 2015 arasında İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesinde farklı servislerde yatarak tedavi gören hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 390 Enterokok suşunun antibiyotik duyarlılıkları retrospektif değerlendirilmiştir. Örneklerin 224 (%57)'ü yoğun bakım ünitesinde, 166 (%43)'sı dahili ve cerrahi birim servislerinde yatmakta olan hastalardan alınmıştır. Yeterli sayıda kültürde identifiye edilememeleri nedeniyle *E. faecalis* ve *E. faecium* dışındaki enterokok suşları çalışmaya dahil edilmemiştir. En az 48 saattir hastanede yatan hastaların örnekleri çalışma kapsamına alınmıştır.

Suşların identifikasyonu ve antibiyogramları; tam otomatize bakteri tanımlama sistemi VITEK-2 (bioMerieux, Fransa) ile çalışılmıştır. Vankomisin, teikoplanin ve linezolid duyarlılıkları E-test

(bioMerieux, Fransa) ile de analiz edilmiştir. Duyarlılık sonuçları ise; Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) kriterleri esas alınarak belirlenmiştir (5). Vankomisin ve teikoplanin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri $\geq 32 \mu\text{g/mL}$, linezolid için MİK değeri $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ olan suşlar dirençli kabul edilmiştir. Orta derecede duyarlılık gösteren suşlar dirençli kabul edilmiştir. Veriler retrospektif olarak otomasyon sistemleri taranarak elde edilmiştir.

BULGULAR

izole edilen toplam 390 suşun 154 (%40)'ü *E. faecalis*, 236 (%60)'sı *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan suşların elde edildiği hastaların 223 (%57)'ü kadındır. Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerde üreyen Enterokokların dağılımı tablo-1'de belirtilmiştir. Üreme saptanan örnekler farklı servislerden elde edilmiştir (Tablo-2).

Çalışma kapsamında değerlendirilen suşların ampisilin, streptomisin, gentamisin, siprofloksasin, vankomisin, teikoplanin ve linezolid duyarlılık oranları incelenmiştir.

Hem *E. faecalis* hemde *E. faecium* suşlarında linezolid en duyarlı, ampisilin ise suşların en dirençli olduğu antibiyotik olarak saptanmıştır. Enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Tablo 3 ve 4'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 1. İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde izole edilen enterokok suşlarının ürediği örnekler, 2010-2015

Örnek	<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>	
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
Kan	65	27	50	33
İdrar	126	53	77	50
Doku	39	17	22	14
Derin Trakeal Aspirasyon	4	2	3	2
BOS	2	1	2	1
Toplam	236	100	154	100

Tablo 2. İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde izole edilen enterokok suşlarının üreme saptandığı klinikler, 2010-2015

Örneğin Gönderildiği Klinik	<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>	
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
Yoğun Bakım Ünitesi	141	59	83	54
Dahili Birimler	44	19	29	18
Cerrahi Birimler	51	22	42	28
Toplam	236	100	154	100

Tablo 3. İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde izole edilen *E. faecium* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, 2010-2015

Antibiyotikler	Duyarlı suşların	
	Sayı (n)	Yüzde (%)
Linezolid	224	94
Teikoplanin	200	84
Vankomisin	198	83
Siprofloksasin	34	14
Gentamisin	78	33
Streptomisin	58	24
Ampisilin	16	6
Çalışılan suş sayısı / yüzdesi	236	100

Tablo 4. İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde izole edilen *E. faecalis* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, 2010-2015

Antibiyotikler	Duyarlı suşların	
	Sayı (n)	Yüzde (%)
Linezolid	153	99
Teikoplanin	150	97
Vankomisin	151	98
Siprofloksasin	100	64
Gentamisin	90	58
Streptomisin	98	63
Ampisilin	78	50
Çalışılan suş sayısı / yüzdesi	154	100

TARTIŞMA

Enterokoklar, hastane enfeksiyonlarına sebep olan gram pozitif etkenler arasında en sık görülen etkenlerden birisi olarak dikkat çekmektedir (6). Enterokok suşları kendi aralarında görülme sıklığı, antibiyotik direnci ve sebep oldukları enfeksiyonların yeri açısından farklılıklar göstermektedir.

Ulusal çalışmaların sonuçlarında izole edilen enterokok türleri arasında sıklık sırasına göre ilk sırada *E. faecalis*, ikinci sırada *E. faecium* bulunmuştur (1, 3). Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak *E. faecium* oranı daha fazla saptanmıştır. Bu farklılığa; çalışmaya alınan hastaların %57'sinin yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan yatağa bağımlı hastalar olması, uzun süre hastanede tedavi almaları ve bu süre içerisinde uzun süreli antibiyotik kullanımının neden olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda hem *E. faecalis* hemde *E. faecium* en sık idrar kültürlerinden izole edilmiştir. Sonuçlarımızla uyumlu olarak ülkemizde yapılan araştırmalarda enterokoklar en sık idrar örneklerinden izole edilmişlerdir (6, 7).

Ampisilin enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde duyarlılık saptanması halinde öncelikle tercih edilmesi gereken antimikrobiyal ajanlardan birisidir ancak artan direnç oranı nedeniyle ampirik tedavide kullanımında tedavi başarısızlıkları görülebilmektedir. Ülkemizden yapılan bildirimlerde enterokoklarda ampisilin direncinin *E. faecalis* için %3-74, *E. faecium* için %89-96 arasında dağılım gösterdiği gözlenmektedir (8, 9). Çin'de Jia ve ark. yaptığı çalışmada *E. faecalis* için %5, *E. faecium* için %82 ampisilin direnci saptanmıştır (10). Çalışmamızdaki ampisilin direnci bazı merkezlerden bildirilen sonuçlara yakın bulunurken, bir kısmından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu farklılığın; kültür örnekleri alınan hastaların çoğunluğunun yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar olması, bu hastalarda üreyen etkenlerin hastane kaynaklı enterokoklar olması ve toplum kaynaklı duyarlı etkenlerin sık görüldüğü poliklinik hastalarının çalışmaya alınmamasından

kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kinolonlar; enterokok enfeksiyonları içerisinde sadece üriner sistem enfeksiyonlarında A grubu ilaçların kullanılmadığı durumlarda önerilmektedir ve B grubu ilaçlar içerisinde yer almaktadır (3, 11). Ülkemizde yapılan çalışmalarda siprofloksasine *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında sırasıyla %47-72, %84-92 direnç bildirilmiştir (6, 12). Güney Kore'de Lee ve ark. yaptıkları çalışmada *E. faecalis* ve *E. faecium* için sırasıyla %35, %95 kinolon direnci olduğu saptanmıştır (13). Çalışmamızda siprofloksasin direnci diğer çalışmalarla benzer bulunmuştur. Kinolonların toplumda ve hastanelerde sık kullanılmasının bir sonucu olarak kinolon direnç oranlarının yüksek bulunduğu tahmin edilmektedir. *E. faecium*'da doğal ve kazanılmış direncin *E. faecalis*'e göre daha sık gözlenmesine bağlı olarak siprofloksasin direncinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

Enterokoklar hücre duvarından geçememesi sebebiyle aminoglikozidlere doğal dirençlidirler. Enterokoklarda aminoglikozidler tedavide ilk seçenek antibiyotikler içinde değildir. Ancak ilk seçenek antimikrobiyal ajanlara dirençli, yüksek düzey aminoglikozid direncinin saptanmadığı enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde sinerjistik etkinliklerinden faydalanılmak amacıyla aminoglikozidler kombinasyon tedavisinde kullanılmaktadır. "Avrupa Vankomisine Dirençli Enterokok Çalışma" grubunun yaptığı çalışmada Türkiye'de yüksek düzey aminoglikozid direncinin %48.1 oranında görüldüğü bildirilmiştir (14). "Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance"(CAESAR) raporunda ülkemizdeki *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında, yüksek düzey gentamisin direnci sırasıyla %22 ve %43 olarak bildirilmiştir (15). Ulusal bildirimlerde yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direnç oranları; sırasıyla *E. faecalis* suşları için %13-42 ve %42-44, *E. faecium* suşları için %58-69 ve %74-79 arasında saptanmıştır (9, 12, 16). Çalışmamızda yüksek düzey aminoglikozid direncinin ülkemizdeki diğer çalışmalarla benzer olduğu saptanmıştır.

Hastanemizdeki direnç oranının diğer merkezlerle benzer saptanmasında; aminoglikozidleri sadece dirençli etkenlerin kombinasyon tedavisinde tercih etmemize bağlı olarak aminoglikozidlerin kısıtlı sayıda hastada kullanılmasının etkili olduğu düşünülmektedir.

Glikopeptidler özellikle beta laktam ve aminoglikozid dirençli enfeksiyonların tedavisinde sık tercih edilmektedir. Yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere vankomisin'in sık kullanımı direnç oranlarının artışına neden olmaktadır. "Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı" verilerine ve diğer çalışmalara göre ülkemizdeki vankomisin direnci; *E. faecalis*'te %0-4, *E. faecium*'da ise %0-23 belirtilmektedir (1, 12, 16, 17). Küba'da Medell ve ark. *E. faecalis* suşlarında vankomisin ve teikoplanin direncini sırasıyla %50 ve %30, *E. faecium* suşlarında ise %50 ve %40 saptamıştır (18). Çalışmamızda glikopeptid direnci önceki yıllarda yapılan çalışmalardan yüksek, yakın zamanda yapılan çalışmalarla benzer bulunmuştur. Bu durum son yıllarda enterokoklarda artan antibiyotik direnci nedeniyle glikopeptidlerin tedavide daha sık kullanılmasıyla, çalışmaya alınan hasta grubunun büyük oranda yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar gibi glikopeptid kullanımının sık olduğu ve uzun süreli hasta yatışının olduğu hasta grubunda yapılmış olmasıyla ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir.

Linezolid; vankomisin dirençli enterokoklar da dahil olmak üzere tüm gram pozitif mikroorganizmalara etkili, oksazolidinon grubu bir antimikrobiktir. CAESAR verilerine göre ülkemizde *E. faecalis*'te %3, *E. faecium*'da ise %4 linezolid direnci bildirilmiştir ancak yayınlanan bazı çalışmalarda ise enterokok suşlarında linezolid direncine rastlanmamıştır (3, 8, 15, 19). Hindistan'da Deshpande ve ark. çalışmalarında *E. faecalis* suşlarının %0.5'ini, *E. faecium* suşlarının %6.9'unu dirençli bulunmuş (20). Küba'da Medell ve ark. çalışmalarında ise *E. faecalis* suşlarında linezolid direnci saptanmazken, *E. faecium* suşlarının %20'sinde linezolid direnci saptanmıştır (18). Çalışmamızda direnç oranı diğer çalışmalarla

benzer saptanmıştır. Bu benzerlikte linezolid'in sadece glikopeptid antibiyotiklere dirençli gram pozitif etkenlere bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılmasının ve diğer antibiyotiklere göre daha kısa zamandır kullanımda olmasının etkili olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmalarda enterokoklar arasında en sık saptanan tür olan *E. faecalis*' in ampirik tedavisinde ampisilin kullanılabileceği belirtilmektedir (9, 16). Ancak çalışmamızdaki *E. faecalis* suşlarında ampisiline yüksek direnç saptanması nedeniyle hastanede yatan hastaların ampirik tedavilerinin planlanmasında dikkatli olunmalıdır. Vankomisin, teikoplanin ve linezolid direnci *E. faecalis* suşlarında nadiren görülmesi nedeniyle ampirik tedavide bu antibiyotikler klinisyenler için uygun seçenekler olarak görülmektedir (1, 3).

Enterokoklar arasında ikinci sıklıkta görülen *E. faecium*, hastanede izlenen hastalarda topluma göre daha sık görülmektedir ve *E. faecalis*'e göre antibiyotiklere daha dirençli bulunmaktadır (2, 3). Çalışmamızda ve daha birçok çalışmada *E. faecium* suşlarında ampisiline, streptomisine, gentamisine ve siprofloksasine yüksek oranda direnç saptanması nedeniyle bu antibiyotiklerin ampirik tedavide kullanımı sonucunda tedavi başarısızlıkları görülmektedir (9, 16). Glikopeptidlere artan direnç oranı ampirik tedavi seçiminde göz önünde bulundurulmalıdır (12, 16, 20). Linezolid direnci az görülmesi sebebiyle ampirik tedavi seçiminde linezolid uygun bir ajan konumundadır (3, 6, 12).

Enterokok üremesi saptandığında antibiyotik kısıtlı bildirim kurallarına uygun antibiyogram sonucu verilmesi ve ampirik geniş spektrumlu başlanan tedavilerin, kültür sonucuna göre de-eskalasyon yapılarak düzenlenmesi gelecekte vankomisin, teikoplanin ve linezolid dirençli suşların artışının önüne geçilmesinde faydalı bir strateji olacaktır (11).

Çalışmamızda *E. faecium* ve *E. faecalis* dışı enterokok suşlarının sayısının az olması nedeniyle çalışmaya dahil edilememesi çalışmamızda kısıtlılık oluşturmaktadır.

SONUÇ

Çalışmamızda glikopeptid dirençli suşlarla beraber linezolid direncinin de görülmesi dikkat çekici bir sonuç olmuştur. Çalışmamızın hastanemizdeki enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını göstermesi, kültür sonucu elde edilemediği

durumlarda klinisyenlere ampirik tedavi seçiminde yol gösterici olacağını düşünmekteyiz. Her merkezin kendi duyarlılık profilini belirlemesi, belirli aralıklarla takip etmesi; enterokok enfeksiyonlarının erken ve etkili ampirik tedavisinde faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Cömert F, Külah C, Eroğlu Ö, Aktaş E. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen enterokok izolatlarının üç yıllık değerlendirilmesi. *Flora Derg*, 2007; 12: 98-102.
2. Atalay S, Ece G, Şamlıoğlu P, Maraş G, Köse I, Köse Ş. İzmir’de üçüncü basamak bir hastanede görülen vankomisine dirençli enterokok olgularının değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 2012; 46(4): 553-9.
3. Aktepe OC, Aşık G, Çiftçi İH, Çetinkaya Z. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnç oranları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2011; 41(2): 86-90.
4. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Surveyans Sistemi Bakteri Tanımlama ve ADT Standart Uygulama Prosedürleri. 2014 p23-24. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu: Ankara. (<http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/uamdss.html>) (Erişim Tarihi:10.10.2017).
5. Watts JL, Clinical and LS Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard. 2008: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
6. Özseven AG, Çetin E, Arıdoğan B, Çiftçi E, Özseven L. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, 2011; 25(4): 256-62.
7. Aral M, Paköz NİP, Aral İ, Doğan S. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının antibiyotik direnci. *Türk Hij Den Biyol Derg*: 2011; 68 (2): 85-92.
8. Dinç BM, Arca EA, 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): 117-22.
9. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. İdrar kültüründen izole edilen enterokok türlerinin antibiyotik direnç profillerinin değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2014; 44(3): 107-13.
10. Jia W, Li G, Wang W. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: a hospital-based study in China. *Int J Environ Res Public Health* 2014, 11(3): 3424-42.

11. Gür D, Antibiyotik Duyarlılık Testleri, EUCAST: Uygulama, Yorum ve Uzman Kurallar. Cilt 46, Ek sayı 2016. Basım yeri: Logos Yayıncılık Tic. A.Ş., Basım yılı:2016. (http://tmc.dergisi.org/pdf/tmc_supplement_2016.pdf).
12. Iraz M, Ceylan A, Akkoyunlu Y. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg, 2012; 26(4): 176-80.
13. Lee DS, Choe HS, Lee SJ, Bae WJ, Cho HJ, Han CH et al. Antimicrobial susceptibility pattern and epidemiology of female urinary tract infections in South Korea, 2010-2011. Antimicrob, Agents and Chemother, 2013; 57: 5384-93.
14. Schouten MA, Hoogkamp-Korstance JAA, Meis JFG, Voss A and European VRE Study Group. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis ,2001; 19: 816-22.
15. World Health Organization: Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2016 p80. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2016/central-asian-and-eastern-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2016>. (Erişim Tarihi: 15.10.2018).
16. Butcu M, Akcay SS, Inan AS, Aksaray S, Engin DO, Calisici G. In vitro susceptibility of enterococci strains isolated from urine samples to fosfomycin and other antibiotics. J Infect Chemother, 2011; 17(4): 575-8.
17. T.C.Sağlık Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Sağlık Hizmet Standartları Dairesi Başkanlığı Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) Raporu, Özet Veri 2015; 42.
18. Medell M, Hart M, Batista ML. Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* obtenidos de pacientes hospitalizados. Biomédica 2014; 34(Supl.1): 50-7.
19. Şamlıoğlu P, Ece G, Atalay S, Köse Ş. Yoğun bakım birimlerinden izole edilen Gram pozitif koklarda daptomisin duyarlılığı, ANKEM Derg, 2011; 25(3): 173-7.
20. Deshpande VR, Karmarkar MG, Mehta PR. Prevalence of multidrug-resistant enterococci in a tertiary care hospital in Mumbai, India. J Infect Dev Ctries, 2013; 7(2): 155-8.

Endüstriyel enzimler üreten *Bacillus* izolatlarının morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu

Morphological, biochemical and molecular characterization of *Bacillus* isolates as a producer of industrial enzymes

Yonca YÜZÜGÜLLÜ-KARAKUŞ¹, Arzu SERTEL², Yonca DUMAN³, Fikriye POLAT⁴

ÖZET

Amaç: *Bacillus* cinsine ait türlerin tanımlanmasında türler arasındaki moleküler benzerliklerin fazla olması nedeniyle ayırım zorlaşmaktadır. Bu çalışma kapsamında, özellikle birbirine yakın akraba olan gruplar arasında karşılaştırma yaparak türlerin karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Moleküler tanımlama yapılan ve fenotipik özellikleri belirlenen izolatların endüstriyel kullanımları da ayrıca irdelenmiştir.

Yöntem: Kocaeli ilinin farklı bölgelerinden (Kocaeli Üniversitesi Kampüsü Kent Ormanı, Yuvacık Baraj Yolu üzerindeki tarlalar ve dere kenarı) alınan toprak örnekleri pastörizasyon işleminden sonra seri seyreltmeler hazırlanarak nutrient agar plaklara yayma ekim yapılmıştır. *Bacillus* benzeri koloniler morfolojik karakterlerine göre tek tek seçilip tekrar yayma ekimle saflaştırılmış ve numaralandırılmıştır. *Bacillus* cinsine ait olanlarda önce korunmuş bir gen bölgesi olan ve sınıflandırmada yaygın olarak kullanılan 16S ribozomal RNA (16S rRNA) gen dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Yakın akraba olanları birbirinden ayırmak için ilave moleküler (*gyrB* gen bölgesinin *Sau3AI* enzimi ile muamele edilmesi) ve biyokimyasal (seçici besiyerlerinde gelişme) analizler yapılmıştır. Filogenetik analizler NJ (neighbour joining)

ABSTRACT

Objective: The identification of *Bacillus* strains which are genetically related have become difficult. The aim of this study was to characterize the closely related groups of species by making comparisons. The industrial use of isolates that have been identified by molecular methods and their phenotypic properties documented have also been examined.

Methods: Soil samples were collected from different locations in Kocaeli town (Kocaeli University Campus, fields and creeks on Yuvacık Dam Road, Kent Forest), spread onto nutrient agar plates after pasteurization process followed by serial dilutions. Bacilli-like colonies were isolated according to their morphological characters. Individual colonies from each site were picked up, purified by re-streaking and numbered. Among a number of isolates, the ones belonging to *Bacillus* genus were subjected to 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene sequencing which is widely practiced technique due to the slow rates of evolution of this region of the gene. To discriminate the members of closely related taxa, additional molecular (restriction digestion of *gyrB* gene with *Sau3AI* enzyme) and biochemical analyses (growth in selective media) were performed. Phylogenetic trees

¹Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kocaeli

²Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Kocaeli

³Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Kocaeli

⁴Kocaeli Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Kocaeli



İletişim / Corresponding Author : Yonca YÜZÜGÜLLÜ-KARAKUŞ

Kocaeli Üni., Fen Edebiyat Fak. Dekanlık Binası, Biyoloji Böl., Kat: 1 No: 116 Kocaeli - Türkiye

Tel : +90 262 303 21 42

E-posta / E-mail : yonca.yuzugullu@kocaeli.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 10.11.2016

Kabul Tarihi / Accepted : 10.11.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.87004

Yüzügüllü-Karakuş Y, Sertel A, Duman Y, Polat F. Endüstriyel enzimler üreten *Bacillus* izolatlarının morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 353-364

metodu ile gerçekleştirilmiştir. İzolatlar ayrıca fizyolojik özellikleri açısından karşılaştırılmıştır.

Bulgular: İzolatlara ait yedi farklı *Bacillus* türü (Y1: *B. cereus*, Y7: *B. pumilus*, Y12: *B. megaterium*, Y13: *B. methylotrophicus*, Y15: *B. subtilis*, Y35: *B. licheniformis* ve Y38: *B. sonorensis*) tanımlanmış ve her bir izolatın fizyolojik özellikleri kaydedilmiştir. Buna göre tüm izolatlar 30 ila 45 °C sıcaklık aralığında ve pH'sı 9 olan besi ortamında gelişme göstermiştir. Diğer yandan Y7, Y15, Y35 ve Y38 numaralı izolatlar 50 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda büyüme yeteneklerini korumuşlardır. Aralarında tuza en fazla tolerans gösterenin *B. licheniformis* olarak tanımlanmış olan Y35 numaralı izolat olduğu gözlenmiştir. Bu izolat yaklaşık %12 (w/v) oranında tuz içeren ortamda gelişebilmektedir. Tuza karşı duyarlılığı en fazla olan izolatlar ise *B. cereus* ve *B. megaterium* olarak tanımlanan Y1 ve Y12 numaralı izolatlar olup büyümelerinin %5'lik (w/v) NaCl'da durduğu kaydedilmiştir.

Sonuç: Yapılan bu çalışmada izolatların tür tanımlanması için seçilen 16S rRNA ve gyrB gen bölgelerinin, *Bacillus*'ların moleküler düzeyde ayırımında kullanılabileceği gösterilmiştir. Gerçekleştirilen biyokimyasal testler, moleküler analiz bulgularını desteklemiştir. İzolatların sıcaklık, pH ve tuz toleransları endüstride hali hazırda kullanılan *Bacillus*'larla karşılaştırılmış ve birçoğunun benzer fizyolojik koşullarda gelişme gösterdiği gözlenmiştir. Diğer yandan, izolatlardan Y1'in literatürde rapor edilen *B. cereus* suşlarından daha geniş bir pH aralığında gelişme gösterdiği bulunmuştur. *B. licheniformis* olarak tanımlanmış Y35 izolatında gözlenen yüksek tuz konsantrasyonu (%12, w/v) içeren ortamlarda gelişebilme yeteneği ise toprak *Bacillus*'larında ilk defa bu çalışmada sunulmuştur. Sonuç olarak, Y1 ve Y35 başta olmak üzere tür tanımlaması yapılan tüm izolatların endüstriyel biyoteknoloji alanında özgün enzim ya da toksin üretimi, ilaç hammadde sentezi gibi veya benzeri çalışmaların yapılmasına olanak sağlayabilecekleri düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, tanımlama, endüstri, filogeni, fizyoloji

were constructed using the neighbor-joining method. The isolated were also analyzed in terms of their tolerance against different physiological conditions and the biochemical characteristics of them were compared with reference strains.

Results: 7 different isolates (Y1; *B. cereus*, Y7; *B. pumilus*, Y12; *B. megaterium*; Y13; *B. methylotrophicus*, Y15; *B. subtilis*, Y35; *B. licheniformis*, Y38; *B. sonorensis*) have been identified to species level and physiological characteristics of each have been documented. Accordingly, all isolates were able to grow at temperatures from 30 to 45 °C and pH 9. The isolates numbered as Y7, Y15, Y35 and Y38 were observed to tolerate temperatures up to 50 °C. Among all, *B. licheniformis* numbered as Y35 presented the highest tolerance to salt concentration of 12% (w/v). The most sensitive ones to salt were *B. cereus* and *B. megaterium* numbered as Y1 and Y12, respectively. Those isolates did not grow in the presence of 5% (w/v) NaCl concentration.

Conclusion: The 16S rRNA and gyrB genes, selected to identify the isolates, have been proven to be used for classification of *Bacillus* at molecular level. Biochemical tests confirmed the molecular analysis outcomes. Temperature, pH and salt tolerance of the isolates were compared with the *Bacillus* species already used in industry. Many of them presented similar growth potential against to the physiological conditions tested. On the other hand, the isolate Y1 was found to show ability to grow broad pH range than those reported for *B. cereus*. The capability of a soil *B. licheniformis*, isolate Y35, to grow in medium with high salt (12%, w/v) was presented for the first time. In summary, the isolated and identified *Bacillus* species here are believed to promote many studies including novel enzyme, toxin and pharmaceutically important compound production in industrial biotechnology field.

Key Words: *Bacillus*, identification, industry, phylogeny, physiology

GİRİŞ

Bacillaceae familyası içerisinde yer alan *Bacillus* cinsi, genelde Gram pozitif, çubuk şekilli, endosporlu, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur (1). Bugüne kadar izole edilmiş ve tanımlanmış 88 *Bacillus* türü bulunmaktadır (2). Bütün türler Nutrient Agar (NA) ve Kanlı Agar (KA) başta olmak üzere Trypticase Soy Agar (TSA) ve Brain Heart Infusion (BHI) gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürerler (3). *Bacillus*'lar antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilebilmeleri sebebiyle dikkat çeken mikroorganizmalardır. Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizma faaliyetlerinin çeşitliliği geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır (1). Endüstriyel enzim üretiminde kullanılan *Bacillus* türleri arasında *B. licheniformis* (proteaz) (4), *B. subtilis* (α -amilaz, proteaz, hidroksilaz, alkol dehidrojenaz, vb) (5-6), *B. pumilus* (lipaz) (7) ve *B. megaterium* (kazeinaz ve keratinaz) (8) yer almaktadır. *Bacillus* cinsi bakterilerin birçoğu çeşitli böcek larvalarına patojenik etki gösterdiklerinden biyolojik kontrol ajanı olarak da kullanılmaktadır (9).

Bacillus'ların tanımlanması ve sınıflandırılmasında spor morfolojisi başta olmak üzere klasik biyokimyasal ve fizyolojik testler (karbohidrat kullanımı, gaz oluşumu, enzim üretimi, oksijen kullanımı, gram boyama, vb) kullanılmaktadır. Bu testlerin yanısıra bakterilerden DNA izolasyonu yapılarak 16S ribozomal RNA (16S rRNA) gibi gen bölgelerinin nükleotid dizileri belirlenip moleküler analiz yapılarak tür teşhisine gidilebilmektedir (10).

Bu çalışmada, topraktan izole edilen farklı *Bacillus*'ların morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması amaçlanmıştır. Teşhisi yapılan izolatların optimum büyüme sıcaklıkları, NaCl toleransı ve gelişme gösterdikleri pH aralıkları belirlenerek endüstriyel kullanımlarının uygunluğu irdelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Toprak örnekleri, toprağın üst yüzey materyalleri süpürüldükten sonra steril bir spatula ile yüzeyin yaklaşık 2-5 cm aşağısından 10 gram alınarak steril tüplere konulmuştur. Alınan örnekler kullanılabilecek kadar +4°C'de saklanmıştır (11).

Toprak örneklerinden *Bacillus* cinsine ait bakterileri izole etmek için her toprak örneğinden (Kocaeli ilinin farklı bölgelerinden alınan) 1'er gram tartılarak, içinde 9 ml steril saf su bulunan deney tüplerine aktarılmış ve karıştırıcıda 5 dakika kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Ardından 80°C'de 10 dakika (pastörizasyon) bekletilmiştir. Bir dizi seri seyreltme ile hazırlanan örnekler (10⁻¹'den 10⁻⁶'ya kadar) NA besiyerine 0.1 ml ekimler yapılarak 37°C'de bir gece inkübe edilmiş ve morfolojik olarak *Bacillus*'a benzeyen kolonilerden rastgele seçim yapılmıştır. Seçilen kolonilerden NA besiyerine çizgi ekim yapılarak elde edilen saf kültürler Y1, Y2, Y3 vb. şeklinde numaralandırılmış ve Nutrient Broth (NB) besiyerine inoküle edilip daha sonra kullanılmak üzere %20'lik (w/v, son konsantrasyon) steril gliserol içerisinde -80°C'de saklanmıştır.

Saflaştırılan kültürlerden Gram pozitif çubuk şekilli olanlar deney materyali olarak seçilmiştir. Şüpheli izolatların *Bacillus* cinsine ait olup olmadığının değerlendirilmesi ise VITEK-MS cihazı (bioMérieux, Fransa) ile yapılmıştır.

Bacillus bakterilerinin moleküler düzeyde tespiti için peqGOLD Bacterial DNA Mini Kit kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından 16S rRNA ve gyrB gen bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. 16S rRNA gen bölgesi için F5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve R5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' primerleri (12), gyrB gen bölgesi için ise F5'-GTTTCTGGTGGTTTACATGG-3' ve R5'-CAACGTATGATTAATCCACC-3' primerleri kullanılmıştır (13). PZR reaksiyonu her iki gen için de 50 µl olacak şekilde; 8 µl DNA, 5 µl 10x KOD Hot Start DNA polimeraz tamponu, 3 µl 25 mM MgSO₄,

1 µl KOD Hot Start DNA polimeraz (1 U/µl), 5 µl 2 mM dNTP karışımı, 1,5'er µl 10 µM ileri (forward) ve geri (reverse) primerler alınarak hazırlanmıştır. 16S rRNA gen bölgesi için PZR koşulları; 95°C'de 2 dk. başlangıç denatürasyonu takiben 30 döngü 95°C'de 30 sn. denatürasyon, 52°C'de 30 sn. primer bağlama ve 72°C'de 90 sn. uzama basamakları, ardından 72°C'de 10 dk. son uzama basamağı ile gerçekleştirilmiştir. GyrB gen bölgesi için PZR koşulları; başlangıç denatürasyonu 95°C'de 2 dk. olacak şekilde 95°C'de 30 sn. 58°C'de 30 sn., 68°C'de 90 sn.'de 30 döngü olmak üzere 68°C'de 10 dk. son uzama basamağı ile gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %1'lik (w/v) agaroz jelde 100 V'da 60 dakika yürütülmüş ve UV cihazı altında görüntülenmiştir. 352 bç'lik gyrB geni PZR ürünleri ayrıca Sau3AI enzimi (NEB, İngiltere) ile 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Restriksiyon kesim ürünleri %2,5'luk (w/v) agaroz jelde 100 V'da 60 dakika yürütülmüş ve bantlar DNA görüntüleme cihazında (UVP-GelDoc-It 310) UV ışık altında görüntülenmiştir. Jellerin fotoğrafları dijital olarak bilgisayar ortamında çekilmiştir. Her iki gene ait PZR ürünleri için DNA dizi analizi yaptırılmıştır (Medsantek-İstanbul). Elde edilen diziler Gen Bankasındaki mevcut dizilerle BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Bacillus izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyonu için örneklerden koloni alınıp, 5-7 ml'lik metabolik testlere özgü besiyerlerine inoküle edildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İzolatlar hücre şekli, koloni görünümü (büyüklüğü, şekli, kenarlarının ve yüzeyinin düzgün olup olmadığı, mat ve parlaklık durumu, kokusu, kıvamı, vb), endospor oluşumu ve pigmentleşme yönünden analiz edilmiştir. İzolatlara IMVIC, jelatin ve nişasta hidrolizi ile üç şekerli demir (TSI) agar testleri uygulanmıştır (14). Ayrıca mikroorganizma gelişimini etkileyen fiziksel etkenlerden sıcaklık (30-55°C), pH (5-12) ve tuzun (%3-14, w/v) etkilerini araştırmak için koloniler ayrı ayrı 5 ml'lik NB besiyerlerine inoküle edilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sıcaklık etkisinin test edilmesi hariç diğer tüm büyüme

analizleri 37°C'de gerçekleştirilmiştir.

16S rRNA dizileri yüksek oranda benzerlik gösteren *Bacillus* türlerinin ayrımı için özel biyokimyasal testler kullanılmıştır. *B. sonorensis* ve *B. licheniformis* türlerini ayırt etmek amacıyla izolatların tirozin ve pH 5.6 agar besiyerlerine ekimleri yapılmış ve 30°C'de 15 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (15). *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. mycoides*'in ayrımı için ise izolatlar MYP (Mannitol-egg-yolk-polymyxine) Agar besiyerine yayma ekim yapılmış ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (16).

İzolatların filogenetik ağaçları, MEGA6 (17) filogenetik analiz programı kullanılarak neighbor-joining (NJ) metodu ile oluşturulmuştur.

BULGULAR

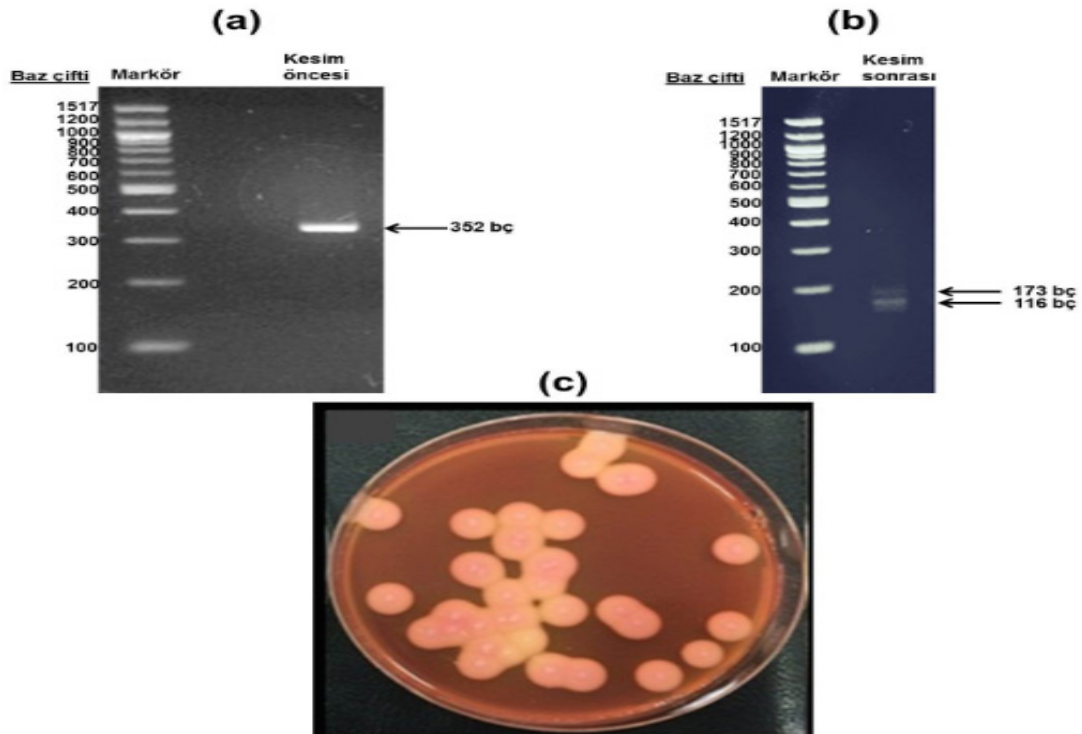
Bu çalışmada, topraktan izole edilen 45 izolatın Gram boyama ve takip eden VITEK-MS analizleri sonucunda 20 tanesinin *Bacillus* cinsine ait olmadığı gözlenmiştir. Koloni morfolojilerinin karşılaştırılması (18) sonucu geriye kalan 25 izolattan birbirine benzer (Tablo 1) olanlar çıkartılarak çalışmaya 7 izolat ile devam edilmiştir.

PZR ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgeleri yaklaşık 1500 bç uzunluğunda elde edilmiştir. Belirlenen nükleotid dizileri NCBI gen bankasına yüklenerek her biri için GenBank numarası alınmıştır (GenBank Erişim Numaraları: Y1, KX549260; Y7, KX592605; Y12, KX592602; Y13, KX588227; Y15, KX592604; Y35, KX592606 ve Y38, KX592603). NCBI genom veri bankasının BLAST programı kullanılarak örneklere ait DNA dizileri GenBank'ta kayıtlı mevcut dizilerle karşılaştırılarak benzerlikleri bulunmuştur (Tablo 2).

Y1 için 16S rRNA dizisi veri bankasında farklı tür *Bacillus* bakterileri ile yüksek oranda benzer çıktığından tür tanımlaması için ilave olarak gyrB gen bölgesi de çalışılmıştır (Tablo 2). Yaklaşık 352 bç uzunluğunda elde edilen gyrB gen dizisi Gen Bankasına kaydedilmiştir (KX592164). Şekil 1b'de görüldüğü üzere kesim sonrası iki adet bant (yaklaşık 173 bç ve 116 bç'lik) elde edilmiştir. Y1 izolatının MYP agarda

Tablo 1. *Bacillus* izolatlarının koloni morfolojilerinin karşılaştırılması, Kocaeli

İzolat Numarası	Koloni formu	Kenar	Yükseklik	Pigmentasyon	Doku	Optik yapısı	Büyüklik (cm)
Y1, Y3, Y5, Y6, Y8, Y9, Y17, Y19, Y23, Y49, Y50	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0.6-0.8
Y7, Y11, Y14, Y18, Y22	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Sarı	Yağsı	Opak	0.3-0.4
Y12	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0.4
Y13, Y37, Y44	Yuvarlak	Dalgalı	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0.9-1
Y15	Düzensiz	Dalgalı	Kraterimsi	Krem	Yapışkan	Opak	0.4
Y35	Düzensiz	Dalgalı	Düz	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0.4
Y38, Y47, Y48	Düzensiz	Dalgalı	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0.6-0.8



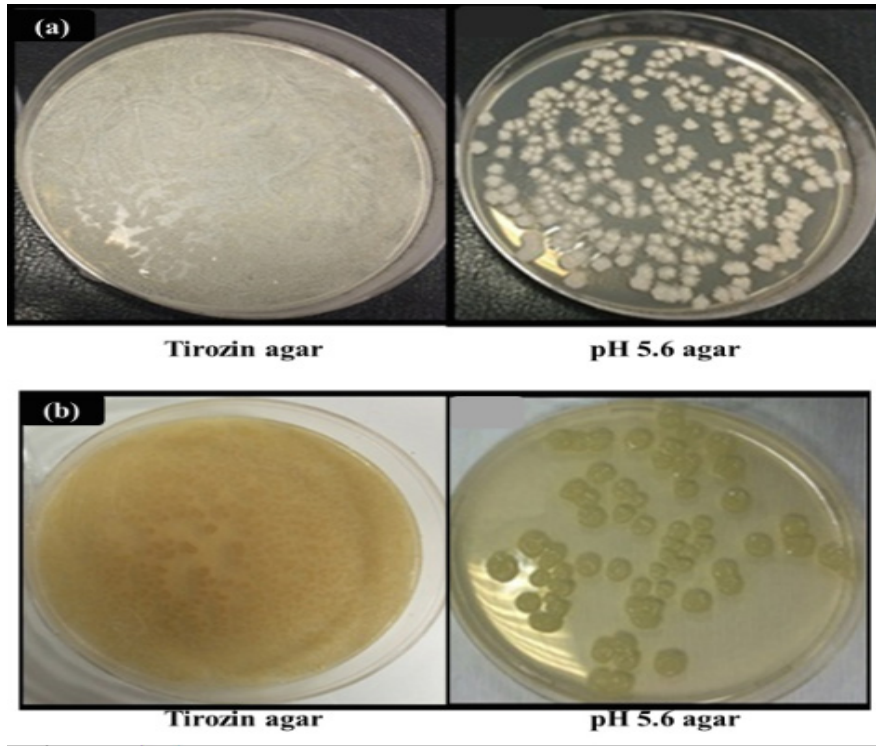
Şekil 1. Y1 *Bacillus* izolatına ait kısmi gyrB geninin Sau3AI enzimi ile kesim öncesi (a) ve sonrası (b) % 2,5 (w/v)'luk agaroz jel görüntüsü. Oklar; DNA fragmanlarına ait bantları göstermektedir. (c) Y1 izolatına ait MYP Agar besiyerindeki koloni görüntüleri.

Tablo 2. Y1, Y7, Y12, Y13, Y15, Y35 ve Y38 izolatlarının 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanması

İzolat numarası	Bakteri örnekleri	Erişim numarası	% Benzerlik	Agaroz jel görüntüsü
Y1	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	NR_074540.1	99	
	<i>B. anthracis</i> str. Ames	NR_074453.1	99	
	<i>B. toyonensis</i> BCT-7112	NR_121761.1	99	
	<i>B. pseudomycooides</i> NBRC 101232	NR_113991.1	99	
	<i>B. thuringiensis</i> ATCC 10792	NR_114581.1	99	
Y7	<i>B. pumilus</i> SAFR-032	NR_074977.1	100	
	<i>B. safensis</i> NBRC 100820	NR_113945.1	99	
	<i>B. stratosphericus</i> 41KF2a	NR_118441.1	99	
	<i>B. aerius</i> 24K	NR_118439.1	99	
	<i>B. altitudinis</i> 41KF2b	NR_042337.1	99	
Y12	<i>B. megaterium</i> ATCC 14581	NR_116873.1	100	
	<i>B. aryabhatai</i> B8W22	NR_118442.1	99	
	<i>B. simplex</i> DSM 1321	NR_115603.1	99	
	<i>B. flexus</i> SBMP3	NR_118382.1	99	
Y13	<i>B. methylotrophicus</i> CBMB205	NR_116240.1	100	
	<i>B. amyloliquefaciens</i> MPA 1034	NR_117946.1	99	
	<i>B. subtilis</i> 168	NR_102783.1	99	
	<i>B. siamensis</i> PD-A10	NR_117274.1	99	
	<i>B. vallismortis</i> DSM 11031	NR_024696.1	99	
Y15	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	NR_118486.1	100	
	<i>B. subtilis</i> JCM 1465	NR_113265.1	100	
Y35	<i>B. licheniformis</i> DSM 13	NR_118996.1	99	
	<i>B. sonorensis</i> NBRC 101234	NR_113993.1	98	
	<i>B. aerius</i> 24K	NR_042338.1	98	
	<i>B. atropheus</i> NBRC 15539	NR_112723.1	97	
Y38	<i>B. sonorensis</i> NRRL B-23154	NR_025130.1	99	
	<i>B. licheniformis</i> DSM 13	NR_118996.1	99	
	<i>B. aerius</i> 24K	NR_042338.1	98	
	<i>B. atropheus</i> 1942	NR_075016.1	97	

Tablo 3. Y7, Y13 ve Y15 izolatlarının fenotipik özelliklerinin karşılaştırılması

	Y7	Y13	Y15
İndol oluşumu	+	+	-
Metil Kırmızısı	+	-	-
Asetoin üretimi	-	+	+
Sitrat kullanımı	-	+	+
Nişasta hidrolizi	+	+	+
Jelatinaz üretimi	+	+	+
Glukozdan asit üretimi	+	+	+
Laktozdan asit üretimi	+	-	-
H ₂ S üretimi	-	-	-

**Şekil 2.** Y35 (a) ve Y38 (b) izolatlarının Tirozin ve pH5.6 agar besiyerlerindeki görüntüleri.

inkübasyonu ile etrafında çökelti şeklinde gözlenen pembe renkli koloniler oluşmuştur (Şekil 1c).

Y7, Y13 ve Y15 izolatlarının tanımlanması için Tablo 3’de verilen biyokimyasal testler uygulanmıştır. Y35 ve Y38 izolatlarının biyokimyasal analizleri için

Tirozin agar ile pH 5.6 agar besiyerlerinde büyütme denemeleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 2a’da görüldüğü üzere Y35 izolatı her iki besiyerinde krem renkli kolonilerin oluşmasını desteklemiştir. Y38 ise tirozin agarda kahverengi, pH 5.6 agarda ise parlak sarı

renkte koloniler şeklinde gelişmiştir (Şekil 2b).

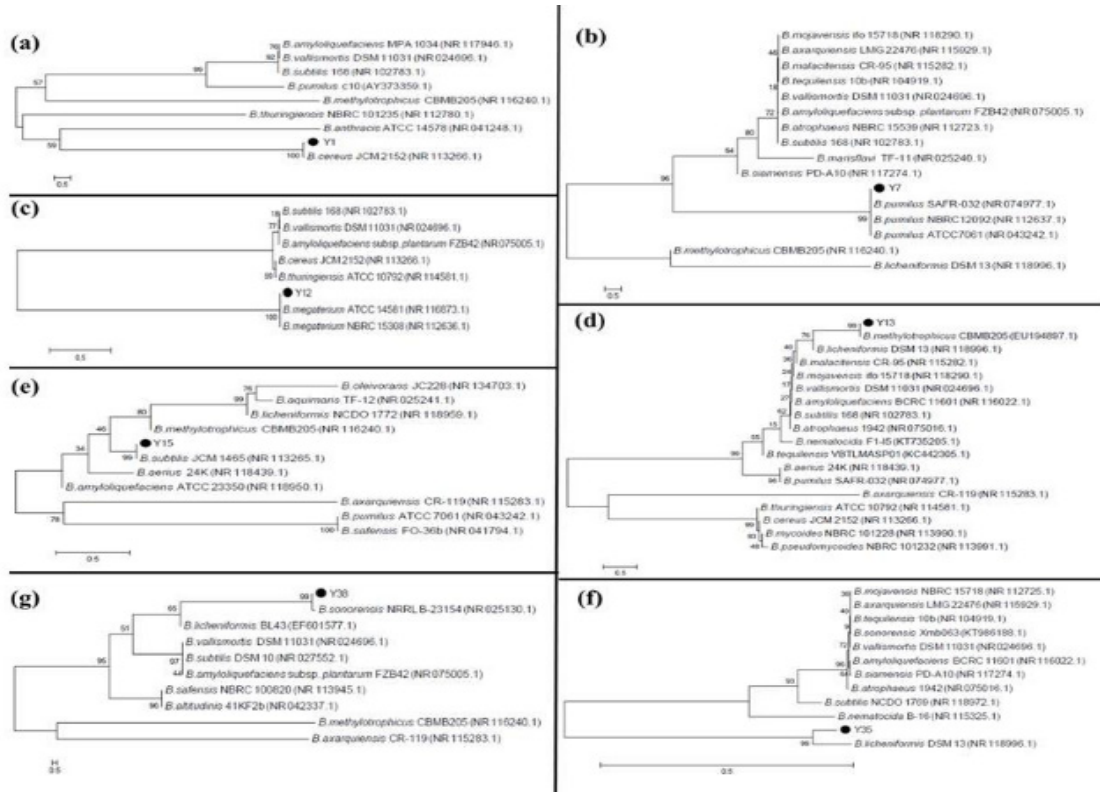
Fizyolojik koşulların etkisine bakıldığında (Tablo 4), izolatların hiçbiri 55°C sıcaklık, pH 11-12 aralığında ve %14 NaCl (w/v) konsantrasyonunda gelişmemiştir.

Filogenetik analiz sonucunda, Y1 izolatının *B. cereus* JM2152 ile %100, Y7'nin *B. pumilus* SAFR-032

ile %99, Y12 izolatının *B. megaterium* ATCC 14581 ile %100, Y13'ün *B. methylotrophicus* CBMB205 ile %99, Y15 izolatının *B. subtilis* JCM 1465 ile %99, Y35'in *B. licheniformis* DSM13 ile %99 ve Y38 izolatının *B. sonorensis* NRRLB-23154 ile %99 oranında benzer oldukları gözlenmiştir (Şekil 3).

Tablo 4. Y1, Y7, Y12, Y13, Y15, Y35 ve Y38 izolatlarının sıcaklık, pH ve NaCl toleranslarının karşılaştırılması

	Y1	Y7	Y12	Y13	Y15	Y35	Y38
Büyüme sıcaklığı (°C)							
30	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+
50	-	+	-	-	+	+	+
55	-	-	-	-	-	-	-
pH							
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
NaCl miktarı (%w/v)							
3	+	+	+	+	+	+	+
5	-	+	-	+	+	+	+
8	-	-	-	+	+	+	-
10	-	-	-	+	-	+	-
12	-	-	-	-	-	+	-
14	-	-	-	-	-	-	-



Şekil 2. Y1 (a), Y7 (b), Y12 (c), Y13 (d), Y15 (e), Y35 (f) ve Y38 (g) izolatlarının 16S rRNA gen bölgelerine ait NJ metodu ile oluşturulan filogenetik ağaçlar.

TARTIŞMA

Bacillus cinsi bakteriler kolay üretilebilen, endüstriyel öneme sahip antibiyotik, enzim, toksin ve biyoplastik gibi sekonder metabolitleri sentezleyebilen ve patojenite özellikleri olan mikroorganizmalardır (9).

Bacillus sınıflandırmasının temeli Gordon ve meslektaşları (19) tarafından ortaya atılmıştır. Tür tanımlaması öncelikle endospor şekline ve ana hücredeki pozisyonuna göre yapılmış ve gruplar oluşturulmuştur. İlk olarak bir izolat bu gruplardan birinin içine dahil edilip ikinci olarak fizyolojik ve biyokimyasal testler kullanılarak tür seviyesinde tanımlaması yapılmıştır (19). Biyokimyasal analizler üzerine zamandan kazanç sağlamak amacıyla günümüzde yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bunların başında çalışılan numunenin protein spektrumunun cihazın veritabanında bulunan referans spektrumları ile karşılaştırılması esasına dayanan VITEK Kütle spektroskopisi gelmektedir (20). Bu yöntem standart

immünojenik ve biyokimyasal yöntemlerden daha güvenilir ve ucuzdur (20). Morfolojik ve biyokimyasal analizlere ek olarak tür düzeyinde tespit yapabilmek için çeşitli moleküler yöntemler (kromozomal DNA bileşimi, DNA-DNA sıvı hibridizasyon, 16S rRNA dizi analizi, *gyrA* ve/veya *gyrB* dizi analizleri vb.) de geliştirilmiştir (9-10).

Bu çalışmada Kocaeli ilinin farklı bölgelerinden toplanan toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* cinsine ait izolatların tanımlanması ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Buna göre öncelikle saf haldeki izolatlar koloni morfolojilerine göre kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Tablo 1’de verilen bulgularda koloni morfolojileri birbirine benzeyen izolatlar aynı grup içinde toplanmıştır.

Yedi izolata ait kısmi 16S rRNA gen bölgesi analizlerine göre Y7 izolatu *B. pumilus*’a, Y12 izolatu *B. megaterium*’a, Y13 izolatu *B. methylotrophicus*’a ve Y15 ise *B. subtilis*’e %100 oranında homoloji göstermiştir

(Tablo 2). Benzer şekilde Y35 ve Y38 izolatlarının sırasıyla *B. licheniformis*'e ve *B. sonorensis*'e %99 oranında benzerlik gösterdikleri bulunmuştur (Tablo 2, Şekil 3). Elde edilen bulgular, seçilen gen bölgesinin bu altı izolat için uygun olduğuna işaret etmektedir. Diğer yandan Y1 için durum daha karmaşık olup beş farklı *Bacillus* türüne aynı oranda homoloji tespit edilmiştir. Bu durum 16S rRNA dizi analizinin bu izolatın moleküler tanımlanmasında tek başına yeterli olmadığını ve ilave yöntemlerin gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bunun üzerine diğer bir korunmuş gen bölgesi olan *gyrB* geni çoğaltılmıştır. Bu gen DNA replikasyonunda rol oynayan DNA giraz enziminin B alt ünitesini kodlamakta ve 16S rRNA gen dizileri birbirine çok yakın olan türlerin ayrımında sıklıkla tercih edilmektedir (21). İzolata ait *gyrB* geninin BLAST sonucuna göre Y1'in benzerlik gösterdiği *Bacillus* tür sayısı ikiye (*B. cereus* ve *B. thuringiensis*) inmiştir (data gösterilmemiştir). Y1'in bu iki *Bacillus*'tan hangisi olduğuna dair moleküler kanıtlar elde etmek için *gyrB* geni bu sefer Sau3AI enzimi ile muamele edilmiştir. Eğer izolat, *B. thuringiensis* ise Sau3AI enzimi bir yerden, *B. cereus* ise iki yerden kesmesi beklenmektedir (13). Nitekim Şekil 1b'de gözlenen sonuç Y1'in *B. cereus* olabileceğine işaret etmiştir. Bu izolat için ayrıca *cry* genlerin varlığına da bakılmış ancak herhangi bir ürün gözlenmemiştir (data gösterilmemiştir). Bu sonuç izolatın büyük doğruluk ile *B. thuringiensis* (*cry* gene sahip) olmadığını doğrular niteliktedir.

Moleküler testleri desteklemek amacıyla her bir izolata biyokimyasal analizler de uygulanmıştır. Bu çalışmada Y1 izolatının seçici bir besiyeri olan MYP agarda *B. cereus* ile benzer koloni morfolojileri gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1c). Sonuçlarımız moleküler testleri doğrular niteliktedir. Nitekim *B. cereus* genel olarak mannitolü kullanmadığı için agar üzerinde pembe koloniler oluştururken, mannitol pozitif olanların koloni rengi sarıdır. Besiyeri bileşimindeki yumurta sarısı ise *B. cereus* 'un lesitinaz aktivitesi ile belirlenmesini sağlar. *B. cereus* lesitinaz pozitif olduğu için kolonileri etrafında beyaz bir çökelti meydana gelir (16).

Y7 izolatı VITEK MS (bioMérieux, Fransa) yöntemiyle analiz edilmiş ve izolatın *B. pumilus*'a %100 benzediği bulunmuştur. Y13 ve Y15 izolatları için

gerçekleştirilen biyokimyasal test sonuçları literatürde rapor edilen benzer suşlar ile karşılaştırılmıştır. Y13'de gerçekleştirilen indol, metil kırmızı, VP ve sitrat testi, glukozdan asit üretimi, H₂S oluşumu, jelatin ve nişasta hidroliz testi sonuçları *B. methylotrophicus* DSM28326 (22) ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Y15'de yapılan biyokimyasal analiz sonuçlarının ise farklı kaynaklardan izole edilen *B. subtilis* örnekleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Örneğin, IMVIC testi, jelatin ve nişasta hidroliz testi sonuçları *B. subtilis* F-2-01 ile benzerdir (23). Ayrıca Zheng ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada topraktan izole edilen nitril çözücü *B. subtilis* ZJB-063'ün Y15'te gözlemediği gibi H₂S üretmediği ancak glukozdan asit oluşturduğu rapor edilmiştir (24). Laktozdan asit üretim sonucunun da *B. subtilis* NCDO 1769T türü ile benzerlik gösterdiği (25) tespit edilmiştir.

Y35 ve Y38 izolatları arasında net ayrım oldukça basit olan bir biyokimyasal testle mümkün olmaktadır. Buna göre *B. sonorensis*'in pH 5.6 agarda koloni renkleri parlak sarı iken tirozin agar'da kahverengi, *B. licheniformis*'in kolonileri ise; pH 5.6 ve tirozin agar'da kremdir (15). Şekil 2'de gözlenen koloni oluşum renkleri Y35'in *B. licheniformis*, Y38'in ise *B. sonorensis* olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak gerçekleştirilen morfolojik, moleküler ve biyokimyasal analizler çalışmada kullandığımız yedi izolat için tür tanımlaması yapmamızı sağlamıştır. Buna göre Y1: *B. cereus*, Y7: *B. pumilus*, Y12: *B. megaterium*, Y13: *B. methylotrophicus*, Y15: *B. subtilis*, Y35: *B. licheniformis* ve Y38: *B. sonorensis* olarak belirlenmiştir. Tanımlanan bu izolatlar arasında farklı uygulama alanlarında uzun zamandır kullanılan ve/veya özellikleri yeni keşfedilen *Bacillus*'lar da bulunmaktadır (4, 5, 7). Bu nedenle sunulan bu çalışmada son olarak tür tanımlanmaları yapılan *Bacillus*'ların farklı koşullarda büyüme yeteneklerini inceleyerek endüstride hali hazırda kullanılan benzer türlere alternatif olarak kullanılabilirlikleri irdelenmiştir.

Yedi izolatın sıcaklık, pH ve tuza karşı toleransları ölçülmüştür. Buna göre Y1'in 30°C ve 45°C sıcaklıklarda, pH 5-10 aralığında ve %3 (w/v) NaCl'da büyüme gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4). Y1 izolatının büyüme potansiyeli endüstriyel *B. cereus*

suşları ile karşılaştırıldığında gelişme gösterdiği sıcaklık aralığının diğer suşlarla uyumlu olduğu görülmüştür (26-27). Diğer yandan literatürde rapor edilen suşlardan daha geniş bir pH aralığında büyüebilmesi bu izolatın alkali enzimlerin üretilmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir (26-27). Y7'ye ait büyüme sıcaklık değerlerinin (30-50°C) Hindistan'ın kıyı çevresinden izole edilen *B. pumilus*'un sıcaklık potansiyeli ile benzer olduğu görülmüştür (28). Y12 izolatı ise 30°C ve 45°C sıcaklıkta, pH 5-9 aralığında ve %3 (w/v) NaCl'de büyüme göstermektedir (Tablo 4). Literatürde alkali koşullarda gelişen *B. megaterium*'un biyoplastik üreticisi olarak kullanılabileceği öngörülmektedir (29). Y12 izolatının da alkali koşullarda gelişme göstermesi endüstriyel uygulama alanlarının araştırılması açısından umut vadetmektedir.

Endüstriyel *Bacillus*'lar arasında en sık kullanılanlar *B. subtilis* ve *B. licheniformis*'tir. Literatürde rapor edilen *B. subtilis* suşları (30-31), Y15 izolatı ile özellikleri açısından karşılaştırıldığında sıcaklık, pH ve tuz profilleri uyumlu olmakla birlikte Y15'in %8 (w/v) NaCl içeren ortamda gelişebilmesinin tuz içeriği yüksek işlemlerde avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir. Diğer bir *Bacillus* türü olan *B. licheniformis*, deterjan endüstrisi başta olmak üzere biyoyakıt üretimi, pestisit yıkımı ve antibiyotik üretimi gibi uygulamalarda tercih edilmektedir (4,32). Ayrıca son yıllarda keratinaz

enzim üretme yeteneklerini kullanarak doğada yaygın bulunan kuş tüylerinin besin değeri yüksek gıdalara dönüştürülmesi konusunda araştırmalar da bulunmaktadır (33). Endüstride hali hazırda kullanılan *B. licheniformis* suşları ile Y35 izolatının farklı fizyolojik koşullardaki büyüme yetenekleri karşılaştırıldığında sıcaklık ve pH profillerinin benzer olduğu göze çarpmaktadır. Diğer yandan, sadece Y35'de gözlenen yüksek tuz konsantrasyonu (%12 w/v) içeren ortamlarda gelişebilme durumu çalışmada adı geçen hiçbir toprak *Bacillus*'unda henüz rapor edilmemiştir. Tuzlu ortamlarda gelişen mikroorganizmalar proteaz ve lipaz gibi enzimlerin üretimi, biyosülfektan sentezi ve pigment (karotenoidler) üretimi gibi endüstriyel uygulama alanlarına sahip olmaları açısından önemlidirler (34). Y35 izolatı da ılımlı halofilik mikroorganizmalar (%7-15 w/v oranında NaCl'e gereksinim duyan) grubuna girmesi (35) açısından dikkat çekmektedir.

Genelde endüstride yüksek sıcaklık, pH veya tuz gibi zor koşullara dayanıklı olan enzimler/enzim üreticileri tercih edilmektedir (22). Y35 başta olmak üzere tür tanımlaması yapılan tüm izolatlarda gözlenen sıcaklık, pH ve tuz tolerans yeteneklerinin endüstriyel açıdan izolatların kullanım alanlarını arttıracığına inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

- Öztürk F. Ankara'daki topraklardan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması, moleküler düzeyde tiplendirilmesi ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
- Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, Staley JT. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer US, 2005: 1105-40.
- Kalaylı E, Beyatlı Y. *Bacillus* cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, PHB üretimleri ve plazmid DNA'ları. *Orlab On-Line Mikrobiyol Derg*, 2003; 1 (12): 24-35.
- Hanlon GW, Hodges NA. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *J Bacteriol*, 1981; 147 (2): 427-31.
- Parthipan P, Preetham E, Machuca LL, Rahman PK, Murugan K, Rajasekar A. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Front Microbiol*, 2017; 8: 193.
- Palomba R, Formisano G, Arrichiello A, Auriemma G, Sarubbi F. Development of a laboratory technique for the evaluation of protease enzymes activity in goat and sheep milk. *Food Chem*, 2017; 221: 1637-41.
- Saranya P, Sukanya Kumari H, Prasad Rao B, Sekaran G. Lipase production from a novel thermotolerant and extreme acidophile *Bacillus pumilus* using palm oil as the substrate and treatment of palm oil-containing wastewater. *Environ Sci Pollut Res*, 2014; 21: 3907-19.

8. Aghari S, Wadhwa N. Isolation and characterization of feather degrading enzymes from *Bacillus megaterium* SN1 isolated from Ghazipur poultry waste site. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012; 48 (2): 175-81.
9. Rosovitz MJ, Voskuil MI, Chambliss GH. *Bacillus*, systematic bacteriology. In: Collier L, Balows A, Susman M, eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Oxford University Press, 1998: 5-730.
10. Chang YH, Shangkuan YH, Lin HC, Liu HW. PCR assay of the GroEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69 (8): 4502-10.
11. Kim HS, Lee DW, Woo SD, Yu MY, Kang KS. Distribution, serological identification, and PCR analysis *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. *Curr Microbiol*, 1998; 37 (3): 195-200.
12. Singh S, Moholkar VS, Goyal A. Isolation, identification and characterization of a cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain SS35 from rhinoceros dung. *ISRN Microbiol*, 2013; 728134: 7.
13. Manzano M, Cocolin L, Cantoni C, Comi G. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. *Int J Food Microbiol*, 2003; 81 (3): 249-54.
14. Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham JO. *Collins and Lyne's Microbiological Methods*, 8th ed. London: Arnold, 2004.
15. Palmisano M, Nakamura L, Duncan K, Istock C, Cohan, F. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001; 51 (5): 1671-79.
16. Kalkan S, Halkman K. *Bacillus cereus*'un standart analiz yöntemi. *Orlab On-Line Mikrobiyol Derg*, 2006; 4 (3): 31-6.
17. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 2013; 30 (12): 2725-29.
18. Akşit F, Akgün Y, Kiraz N. Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. 8. baskı, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 2006.
19. Gordon RE, Haynes WC, Pang CHN. The Genus *Bacillus*. In: *Agriculture Handbook No.427*, D.C. United States Department of Agriculture, Washington, DC. 1973: 98-9.
20. Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Fen Müh Derg*, 2012; 2 (1): 53-62.
21. Wang L-T, Lee F-L, Tai C-J, Kasai H. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007; 57: 1846-50.
22. Duman Y, Yüzügüllü YK, Sertel A, Polat F. Production, purification and characterization of a thermo-alkali stable and metal-tolerant carboxymethylcellulase from newly isolated *Bacillus methylotrophicus* Y37. *Turk J Chem*, 2016; 40 (5): 802-15.
23. Kubota H, Matsunobu T, Uotani K, Takebe H, Satoh A, Tanaka T, Taniguchi M. Production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993; 57 (7): 1212-13.
24. Zheng YG, Chen J, Liu ZQ, Wu MH, Xing LY, Shen YC. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* ZJB-063, a versatile nitrile-converting bacterium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008; 77 (5): 985-93.
25. Huang XW, Niu QH, Zhou W, Zhang KQ. *Bacillus nematocida* sp. nov., a novel bacterial strain with nematotoxic activity isolated from soil in Yunnan, China. *Syst Appl Microbiol*, 2005; 28 (4): 323-7.
26. Mohandass R, Rout P, Jiwai S, Sasikala C. Biodegradation of benzo[a]pyrene by the mixed culture of *Bacillus cereus* and *Bacillus vireti* isolated from the petrochemical industry. *J Environ Biol*, 2012; 33 (6): 985-9.
27. Martinez S, Borrajo R, Franco I, Carballo J. Effect of environmental parameters on growth kinetics of *Bacillus cereus* (ATCC 7004) after mild heat treatment. *Int J Food Microbiol*, 2007; 117 (2): 223-7.
28. Parvathi A, Krishna K, Jose J, Joseph N, Nair S. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Braz J Microbiol*, 2009; 40 (2): 269-75.
29. Salgaonkar BB, Mani K, Braganca JM. Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic salt pan isolate *Bacillus megaterium* strain H16. *J Appl Microbiol*, 2013; 114: 1347-56.
30. Singh G, Kumari A, Mittal A, Yadav A, Aggarwal NK. Poly -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* NG220 using sugar industry waste water. *Biomed Res Int*, 2013; 2013: 952641.
31. Tang B, Xu H, Xu Z, Xu C, Xu Z, Lei P, Qiu Y, Liang J, Feng X. Conversion of agroindustrial residues for high poly(γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2 via solid-state fermentation. *Bioresour Technol*, 2015: 351-4.
32. Kazeem MO, Md Shah UK, Baharuddin AS, AbdulRahman NA. Prospecting agro-waste cocktail: supplementation for cellulase production by a newly isolated thermophilic *B. licheniformis* 2D55. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017; 182 (4): 1318-40.
33. Laba W, Rodziewicz A. Biodegradation of hard keratins by two *Bacillus* strains. *Jundishapur J Microbiol*, 2014; 7 (2): e8896
34. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Sci Technol*, 2010, 31: 825-834.
35. Madigan MT, Brock T.D. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. London: Pearson, 2012.

Asymptomatic bacteriuria, urinary tract infection and risk factors in women with type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance

Tip 2 Diyabet hastalığı ve bozulmuş glikoz toleransı olan kadınlarda asemptomatik bakteriyüri ve üriner sistem enfeksiyonları

Özlem GENÇ¹, Evrim AKSU², Türkan PAŞALI-KİLİT³, Fatma Emel KOÇAK⁴
Yasemin KORKUT⁵, Kevser ONBAŞI⁶

ABSTRACT

Objective: We aimed to compare a type 2 diabetic women groups with a women group with impaired glucose tolerance (IGT) for the presence of urinary tract infection (UTI) and/or asymptomatic bacteriuria (ASB) and related risk factors [age, body mass index (BMI), serum HbA1c and creatinine levels, glomerular filtration rate (GFR), and urine microalbumin, urine leukocyte and glucose levels] associated therewith.

Methods: The study population consisted of 416 female patients and divided into two groups as the type 2 diabetes mellitus (DM, n=208) and the IGT (n=208) group. Serum HbA1c and creatinine levels and leukocyte counts, glucose level and microalbumin level in the urine, were measured in the biochemistry laboratory. GFR was calculated using the Cockcroft-Gault formula. Urine samples were inoculated on blood agar and Eosin-Methylene Blue agar medium and incubated for 24-48 hour at 37°C.

Results: ASB was determined in 5 patients (2%) in the DM group and in 15 patients (7%) in the IGT group. UTI was detected in 9 patients (4%) in the diabetic group and in 7 patients (3%) in the IGT group (p>0.05).

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda; tip 2 diabetes mellitusu (DM) olan ve bozulmuş glikoz toleransı (BGT) olan iki kadın hasta grubunun üriner sistem enfeksiyonu (ÜSİ) ve asemptomatik bakteriyüri (ASB) varlığı ve ilişkili risk faktörleri açısından karşılaştırılması amaçlandı. Risk faktörleri olarak; yaş, vücut kitle indeksi (VKİ), serum HbA1c ve kreatinin seviyeleri, glomerüler filtrasyon oranı (GFR), idrardaki lökosit sayısı, glikoz miktarı ve mikroalbumin düzeyi seçildi.

Yöntem: Diyabetli 208 kadın hasta ve BGT'si olan 208 kadın hasta çalışmaya dahil edildi. Serum HbA1c ve kreatinin seviyeleri ve idrardaki lökosit sayısı, glikoz miktarı ve mikroalbumin düzeyi biyokimya laboratuvarında ölçüldü. GFR, Cockcroft-Gault formula kullanılarak hesaplandı. Hastalardan alınan orta akım idrarı mikrobiyoloji laboratuvarında kanlı agar ve EMB agara ekildi.

Bulgular: Diyabetli hasta grubunda beş (%2) hastada, BGT hasta grubunda 15 (%7) hastada ASB saptandı. ÜSİ; diyabetik grupta dokuz (%4) hastada, BGT hasta grubunda yedi (%3) hastada belirlendi (p>0.05). Piyüri; her iki hasta grubunda ASB ile ilişkili risk faktörü idi

¹Dumlupınar University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kütahya

²Evllya Celebi Research And Education Hospital, Microbiology Laboratory, Kütahya

³Dumlupınar University, Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Kütahya

⁴Dumlupınar University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Kütahya

⁵Dumlupınar University, Faculty of Medicine, Department of Family Medicine, Kütahya

⁶Dumlupınar University, Faculty of Medicine, Department of Endocrinology, Kütahya



İletişim / Corresponding Author : Özlem GENÇ

Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD. 43100 Kütahya - Türkiye
Tel : +90 505 474 25 37 E-posta / E-mail : drozlemg@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 03.01.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.59013

Genç Ö, Aksu E, Paşalı-Kilit T, Koçak FE, Korkut Y, Onbaşı K. Asymptomatic bacteriuria, urinary tract infection and risk factors in women with type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 365-374

Pyuria was found as an ASB-related risk factor in both groups ($p<0.05$). BMI ($p=0.041$), creatinine ($p=0.045$) and GFR ($p=0.035$) were determined as UTI-related risk factors in the diabetic group. In addition, pyuria was found as UTI-related risk factors in IGT group ($p=0.019$). *Escherichia coli* was the most prevalent pathogen (89%).

Conclusion: We suggest that high BMI and creatinine levels and low GFR are risk factors for UTI in patients with type 2 DM. Additionally this is a first study to detect that UTI and ASB may develop in patients with IGT, just as in diabetic patients. Considering a similar frequency of UTI and ASB in patients with IGT and with type 2 DM, urine culture may be performed in IGT patients with pyuria.

Key Words: diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, urinary tract infection, asymptomatic bacteriuria

($p<0.05$). Diyabetli grupta; VKİ ($p=0.041$), kreatinin ($p=0.045$) ve GFR ($p=0.035$) ÜSİ ilişkili risk faktörü olarak saptandı. BGT hasta grubunda ise sadece piyüri; ÜSİ ile ilişkili ($p=0.019$) risk faktörü olarak belirlendi. Hem ASB'si olan hem de ÜSİ olan hastalarda en fazla *Escherichia coli* izole edildi (%89).

Sonuç: Yüksek VKİ ve serum kreatinin seviyesi ve düşük GFR'nin tip 2 diyabetes mellitusu olan hastalarda ÜSİ gelişimi açısından risk faktörü olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca bu çalışma; BGT olan hastalarda da hem ASB hem de ÜSİ gelişme riskinin diyabetli hastalar ile aynı olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Her iki hasta grubunda ASB ve ÜSİ oranının benzer olduğu düşünülürse, özellikle piyüri saptanan BGT'si olan hastalarda da idrar kültürü yapılmasını önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, bozulmuş glikoz toleransı, üriner sistem infeksiyonu, asemptomatik bakteriyüri

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease, which is quite common in our country and around the world. DM affects the immune system of the patient, rendering the individual susceptible to many infections such as urinary tract infection (UTI). Decrease of polymorphonuclear leukocytes migration, phagocytosis and chemotaxis capabilities, increase in endothelial adhesion, diabetic nephropathy and neuropathic complications, reduction of bladder emptying and high glucose concentration of urine as a medium for bacterial proliferation cause urinary tract infections in diabetic patients (1-3).

There is also an intermediate group of individuals whose glucose levels do not meet the criteria for diabetes, but yet, the levels are higher than that considered normal. These individuals are defined as having impaired fasting glucose (IFG) [fasting

plasma glucose (FPG) levels 100 mg/dl to 125 mg/dl] or impaired glucose tolerance (IGT) with impaired response to oral glucose intake [2-h values in the oral glucose tolerance test of 140 mg/dl to 199 mg/dl]. Patients with IFG and/or IGT have been referred to as having pre-diabetes, indicating the relatively high risk for the future development of diabetes and its complications like cardiovascular disease (4,5).

Asymptomatic bacteriuria (ASB) is the presence of bacteria higher than 105 CFU/ml in two urine cultures within 24 hours without urinary complaints. This condition demonstrates colonization of the lower urinary tract with microorganisms. In a meta-analysis that examined 22 different studies, the prevalence of ASB in diabetic patients was reported to be more than that in healthy controls. In addition to this, the incidence of microalbuminuria and

urinary tract infections is higher in diabetic patients with asymptomatic bacteriuria (6). In several studies (7,8), treatment of ASB has not been recommended in healthy people and in diabetic patients with metabolic control, but it has been recommended in diabetic patients without metabolic control. Detection of ASB is very important, especially in patients without metabolic control.

UTI and ASB in diabetic patients have been the subject of numerous studies, but there are no studies in the literature in patients with IGT. In this study, we aimed to compare the diabetic patient group and the patient group with IGT in terms of the presence of uncomplicated lower UTI, ASB and the related risk factors. The risk factors were determined as age, gender, body mass index (BMI), serum HbA1c and creatinine levels, glomerular filtration rate (GFR), and urine microalbumin, leukocyte and glucose levels. Therewith, antibiotic susceptibility tests were performed and the empirical treatment options were discussed.

MATERIAL and METHOD

Study design

This prospective study was carried out in X Hospital, Turkey, between April 2013 and July 2016. The study was in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Ethical approval was received from the local Human Research Ethics Committee (No: 2013/3). Written informed consent was obtained from all patients. The study population consisted of 416 female patients. The patients were diagnosed as type 2 DM and IGT according to the American Diabetes Association (ADA) criteria (4). The study population was divided into two groups as the DM (208 patients, mean age 56.5) and the IGT (208 patients, mean age 47) group. Children, pregnant women, patients who had recently undergone surgery, patients who had used antibiotics in the last 14 days, patients with urinary tract abnormalities, patients with urinary catheters, those with suppressed immune system,

dialysis patients, and cancer patients were excluded from the study.

Sample collection and laboratory analysis

After an overnight fasting, venous blood samples were collected into an evacuated serum separator clot activator tube (Vacurette® Z Serum Sep Clot Activator, GreinerBio-One, Kremsmunster, Austria) for glucose and creatinine analyses between 9 and 10 a.m. The blood samples were centrifuged at 1500 × g for 10 min within 1 hour after collection. For HbA1C measurements, venous blood samples were collected into 2.0 mL dipotassium (K2) ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) vacuum tubes (BD Vacueteiner® BD-Plymouth, UK). After collecting the blood samples, HbA1C measurement was immediately performed without delay. Measurement of HbA1C was performed on the Roche Cobas 6000's module C501 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) based on the turbidimetric inhibition immunological method using original reagents. The levels of serum fasting glucose and creatinine, and the levels of spot urine microalbumin were analyzed on the Roche Cobas 6000's module C501 using original reagents. The serum glucose levels were analyzed based on the hexokinase method, the creatinine levels were analyzed based on the Jaffe kinetic colorimetric method, and the spot urine microalbumin levels were analyzed based on the turbidimetric method. Corrected microalbumin was calculated using urinary the microalbumin-to-creatinine ratio. GFR was calculated using the Cockcroft-Gault formula (9).

Mid-stream urine samples were obtained using the midstream clean-catch technique. Either the evacuated sterile plastic containers for urine culture or the non-sterile plastic containers (Firat Med, Ankara, Turkey) for rapid urinalysis and microalbumin were used for collection of the urine samples. Contaminated specimens were excluded from the study. All urine samples were collected on the morning of the examination, processed within 2 hours after collection, and within 30 minutes after

their submission to the laboratory. Automated urine analysis and quantitative culture were applied to all specimens. Urinalysis was performed by a trained technician in the biochemistry laboratory. Urine culture was performed in a microbiology laboratory, and bacterial concentrations were determined by a single microbiologist. A 5-milliliter sample was applied for rapid urinalysis. Urine glucose levels were analyzed on the Dirui FUS-200/H-800 automatic urinalysis system (Changchun Dirui Industry, Jilin, China) using the URISTIK H-11 Reagent Strips (Changchun Dirui Industry, Jilin, China). Microscopic examination of leukocytes was performed on the Dirui FUS-200/H-800 automatic urinalysis system. Leukocytes were counted per high-power field (hpf, 400 x magnification). The counts in every hpf correspond to particle/ $\mu\text{L} \times 6.25$. A leukocyte count of $> 5/\mu\text{L}$ was considered pyuria (10).

Urine samples were inoculated on blood agar (RTA, Nazar Tip, Izmir, Turkey) and Eosin-Methylene Blue (RTA) agar medium and incubated for 24-48 hour at 37°C. Identification and antibiotic susceptibility tests were performed on the automated BD Phoenix system (BD Diagnostics, Sparks, MD) and evaluated according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Document M100-S24 (11). ASB was defined as the presence of $>10^5$ CFU/mL of one or two microorganism in two subsequent cultures of urine from patients without fever or urinary complaints. Uncomplicated lower urinary tract infection was defined as acute symptoms such as dysuria, urgency, pollakuria or suprapubic tenderness, and in the presence of a positive urine culture ($> 10^4$ CFU/ml of a urinary pathogen) (7,8).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. The continuous variables were presented as median and interquartile ranges (IQR) or mean \pm standard deviation (SD) according to

the normality of the data. The categorical variables were expressed as percentages. The comparisons of the continuous variables between the study groups were made using the Mann Whitney-U or unpaired t test according to the normality of the data. The comparisons of categorical data were made using the Chi-square test. The risk factors that were effective on ASB and UTI were assessed by binary logistic regression analysis using the backward wald with the likelihood ratio method. The power of risk factors was expressed as the odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI). In the binary logistic analysis, the following parameters were included as risk factors: gender, age, body mass index (BMI), HbA1c, creatinine, GFR, microalbumin, glucosuria and pyuria. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The study population consisted of 416 female patients who were diagnosed as type 2 DM (208 patients, mean age 56.5) and IGT (62 patient, mean age 47). The demographic data and the results of laboratory test parameters of the patients have been presented in Table 1. There was a difference between two groups for age ($p<0.001$, Table 1). The levels of HbA1c, GFR, microalbumin and glucosuria were different in DM group compared to the IGT group ($p<0.001$, $p=0.008$, $p<0.001$, $p<0.001$ respectively, Table 1). No difference was determined between the study groups with regard to the other parameters (Table 1).

ASB was determined in five (2%) patients in the DM group and in 15 (7%) patients in the IGT group. UTI was detected in nine (4%) patients in the DM group and in seven (3%) patients in IGT group ($p > 0.05$, Table 1).

In the logistic regression analysis, pyuria was found as an ASB-related risk factor in the DM and the IGT groups (OR: 1.043; 95% CI: 0.994 to 1.828; $p=0.014$, OR: 0.997; 95% CI: 0.814 to 1.688; $p=0.020$, respectively, Table 2). BMI (OR: 1.460; 95% CI: 1.016

Table 1. Comparison of demographic data and laboratory test parameters of patients between DM and IGT group

Parameters	DMgroup (N = 208)	IGTgroup (N = 208)	Statistical Analysis P
Age (years)	56.5 (49.3 - 63.0)	47.0 (40.0 - 53.0)	< 0.001*
BMI (kg/m ²)	32.2 ± 5.7	32.9 ± 5.3	0.230
HbA1c (%)	7.8 (6.4 - 9.8)	5.7 (5.5 - 6.1)	< 0.001*
Creatinine (mg/dL)	0.79 (0.69 - 0.91)	0.77 (0.69 - 0.87)	0.247
GFR (mL/min)	107.0 (82.6 - 126.3)	113.8 (100.1 - 142.2)	< 0.001*
Microalbumin (mg/g crea)	12.0 (5.3 - 27.0)	6.0 (3.0 - 13.8)	< 0.001*
Glucosuria (mg/dL), N (%)			
Negative (< 50 mg/dL)	194 (93)	208 (100)	
+ (> 50 - < 150 mg/dL)	2 (1)	0	< 0.001*
++ (> 150 - < 500 mg/dL)	2 (1)	0	
+++ (> 500 mg/dL)	10 (5)	0	
Pyuria (WBC/μL)*			
≤ 5/μL	182 (88)	169 (81)	0.09
> 5/μL	26 (12)	39 (19)	0.684
ASB, N (%)	5 (2)	15 (7)	0.488
UTI, N (%)	9 (4)	7 (3)	0.210

Abbreviations: IQRs: Interquartile ranges, DM: Diabetes mellitus, IGT: Impaired glucose tolerance, BMI: Body mass index, GFR: Glomerular filtration rate, WBC: White blood cell, ASB: Asymptomatic bacteriuria, UTI: Urinary tract infection. Data were presented as median and interquartile ranges (IQR) or mean ± standart deviation (SD) according to the normality of data. The comparisons of continuous variables between study groups were analyzed with Mann Whitney-U or unpaired t test according to the normality of data. For categorical data, Chi-square test was used. A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

*Cut-off value for leukocyte in microscopy is > 5 WBC/μL[10]

to 2.099; $p = 0.041$, Table 2), creatinine (OR: 1.341; 95% CI: 0.925 to 1.918; $p = 0.045$, Table 3), and GFR (OR: 1.907; 95% CI: 1.129 to 2.493; $p = 0.035$, Table 3) were determined as UTI-related risk factors in the DM group. Furthermore, pyuria was found to be a UTI-related risk factors in the IGT group (OR: 2.103; 95% CI: 1.010 to 3.943; $p = 0.019$, Table 3).

Thirty-seven bacterial strains were isolated from 36 urine samples (Table 4). Each bacterium was found to more than 105 CFU/ml. Two different gram-negative bacilli (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) were isolated in one diabetic patient with UTI. *E. coli* was the most prevalent pathogen (34/37, 91%) in diabetic subjects and in patients with IGT. *Streptococcus*

agalactiae was isolated in one patient with IGT. *K. pneumoniae* was isolated in one woman with UTI in IGT group. Trimethoprim/Sulfamethoxazole (TMP/SXT) resistance was determined in Enterobacteriaceae as 24% (9/37), respectively, the ampicillin and amoxicillin/clavulanate resistance was determined as 16% (6/37), and the nitrofurantoin resistance as 5% (2/37). Extended spectrum beta lactamase (ESBL) production was found only in one of *E. coli* strain isolated from the IGT group with ASB. This strain was resistant to ampicillin, AMC, ciprofloxacin, ceftriaxone, ceftazidime, aztreonam, cefepime, and cefixime. *S. agalactiae* was resistant only to TMP/SXT.

Table 2. Binary logistic regression analysis of ASB-related risk factors in the DM and the IGT groups

Risk factors	DM (N = 208)				IGT (N = 208)			
	OR	95% CI for OR		Logit P	OR	95% CI for OR		Logit P
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Pyuria (WBC/ μ L)	1.043	0.994	1.828	0.014*	0.997	0.814	1.688	0.020*

Abbreviations: DM: Diabetes mellitus, IGT: Impaired glucose tolerance, OR: Odds ratio, CI: Confidence interval. Data were analyzed with logistic regression analysis using backward wald with likelihood ratio method. A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

Table 3. Binary logistic regression analysis of ASB-related risk factors in the DM and the IGT groups

Risk factors	DM (N = 208)				IGT (N = 208)			
	OR	95% CI for OR		P (Logit)	OR	95% CI for OR		P (Logit)
		Lower	Upper			Lower	Upper	
BMI (kg/m ²)	1.460	1.016	2.099	0.041*	0.0	0.0	0.0	0.995
Creatinine (mg/dL)	1.341	0.925	1.918	0.045*	0.971	0.822	1.213	0.078
GFR (mL/min)	1.907	1.129	2.493	0.035*	0.738	0.501	1.088	0.125
Pyuria (WBC/ μ L)	0.0	0.0	0.0	0.998	2.103	1.010	3.943	0.019*

Abbreviations: DM: Diabetes mellitus, IGT: Impaired glucose tolerance, OR: Odds ratio, CI: Confidence interval, BMI: Body mass index, GFR: Glomerular filtration rate. The data were analyzed with logistic regression analysis using the backward wald with the likelihood ratio method. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Table 4. Bacterial strains isolated in DM and IGT groups

Bacteria	DM (n=208)		IGT (n=208)	
	UTI (N=9)	ASB (N=5)	UTI (n=7)	ASB (n=15)
<i>E. coli</i>	9	5	5	15
<i>K. pneumoniae</i> *	1	0	1	0
<i>S. agalactiae</i>	0	0	1	0

Abbreviations: DM: Diabetes mellitus, IGT: Impaired glucose tolerance, ASB: Asymptomatic bacteriuria, UTI: Urinary tract infection.

*Two different gram-negative bacilli (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) were isolated in one diabetic patient with UTI.

DISCUSSION

The prevalence of ASB and UTI and the related risk factors in diabetic patients have been investigated in several studies. Our study has focused on the ASB and UTI in patients with DM and IGT.

Considering the demographic data, a significant difference was determined between the two groups in terms of age. The risk of developing diabetes mellitus in later life is greater in individuals with IGT, also referred to as prediabetes (5). Therefore, a higher number of young individuals in the IGT group are an expected result. In this study, the patients who were selected were those who gave written informed consents regardless of gender. For this reason the number of women may have been higher in the IGT group.

The levels of HbA1c, GFR, microalbumin and glucosuria were different in the DM compared to the IGT group ($p<0.05$). This is an expected result and these values will be naturally higher in the DM group than the IGT group.

In the present study, we found ASB in five of 208 (2%) type 2 DM women, and in 15 of 208 (7%) patients with IGT. There was no significant difference in the ASB ratio between the two groups in our study ($p>0.05$). According to a meta-analysis, ASB was

higher in diabetic individuals than the control groups (6). Furthermore, ASB was reported to be a risk factor for the development of UTI (12,13). There are also studies showing that there is no difference between DM patients and healthy control groups with regard to the ASB ratio (14-16). The frequency of ASB varied between 6% and 28% in previous studies (6,12,14). Our ASB frequency was lower than the rates reported in diabetic patients. To the best of our knowledge there is no study about this subject previously and for this reason, we could not compare the ASB frequency in patients with IGT. Due to the presence of similar results in ASB rates in the DM and the IGT groups, we believe that ASB in diabetic patients may occur in patients with IGT, and that this should be paid attention to.

It is a well known fact that the UTI frequency in diabetic patients is higher than that in healthy individuals (3,15,16). The UTI incidence in diabetic patients is approximately twice that of non-diabetic patients (14). In our study, the UTI frequencies were 4% (9/208) and 3% (7/208) in the DM group and the IGT group, respectively. Due to the statistically similar results ($p>0.05$), we consider that the risk of developing UTI in patients with IGT should not be underestimated.

In our study, the risk factors for ASB and UTI were determined as age, body mass index (BMI), serum HbA1c and creatinine levels, glomerular filtration rate (GFR), and urine microalbumin, leukocyte and glucose levels in the DM and the IGT groups. Pyuria, BMI, GFR, and creatinine levels were determined to be associated with UTI in the DM group. Only pyuria was found as an ASB-related risk factor in the IGT group.

Pyuria is a universal component accompanying symptomatic urinary tract infection. Turan et al. and Boroumond et al. demonstrated a positive relationship between pyuria and bacteriuria (17,18). However, pyuria is also present in other infectious diseases (*Chlamydia* and *Trichomonas* infections, etc), as well as in vaginal, bladder or renal conditions (stones, etc). There are several laboratory methods to test for the presence of pyuria, with variable sensitivity and specificity. These include a dipstick test to screen for leukocyte esterase, manual microscopy, and automated microscopy. The reported sensitivities of automated methods for detection of UTI range from 71 to 98%, with specificities of 55 to 92% (19). The latest guidelines agree that pyuria is consistent with, but not diagnostic for, acute uncomplicated UTI (20). In several studies, it has been reported that the presence of pyuria is not useful for differentiating between symptomatic or asymptomatic UTI (14,21,22). In the present study, pyuria was determined to be a significant risk factor for UTI in diabetic patients, as well as for ASB in the IGT group. Despite the numerous studies that have been carried out, the relationship between urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria with pyuria and is still unclear.

Multiple potential mechanisms typical to diabetes may contribute to the increased risk of UTI in diabetic patients. A paper from Saudi Arabia found the following factors to be associated with an increased risk of UTI among patients with diabetes: female sex, hypertension, insulin therapy, BMI and nephropathy (microalbuminuria) (23). Wilke et al. determined

that older age, the female gender, high HbA1c and low GFR levels increased the risk of UTI (24). In the present study, the BMI, GFR, and the creatinine levels were determined to be associated with UTI in diabetic patients. In particular, the determination of low GFR and high creatinine levels in the diabetic group explains that microvascular complications such as nephropathy lead to urinary tract infection.

Various risk factors associated with ASB in diabetic patients, especially in women, have been the subject of many studies. Although HbA1c appears to be the most frequent risk factor for ASB in diabetic women (17,25,26); serum creatinine levels, microalbuminuria (27), glycosuria (17,18), the female gender and older age are the other risk factors (27). In our study, only pyuria was determined as an ASB-related risk factor in the IGT group. The relationship between ASB/UTI and pyuria has been discussed above.

In our study, *E. coli* was the most frequently (89%) isolated bacteria. *E. coli* is still the most commonly isolated bacteria in DM and non-diabetic patients with ASB and UTI (23,28-30). In our study, there was no significant antibiotic resistance profile in the DM and the IGT groups. While Bonadio et al. did not find any difference in the resistance profile in DM and non-DM patients with ASB (31). Ravvat et al. determined antibiotic resistance mechanisms such as ESBL and AmpC in bacteria isolated from various clinical specimens in diabetic patients (28). Due to the small number of ASB and UTI in patients participating in our study, we cannot comment on the antibiotic therapy options. We just consider the detecting of ESBL in an *E. coli* isolate in the IGT group with ASB remarkable.

In diabetic patients with metabolic control, ASB does not require treatment, but it should be treated in diabetic patients without metabolic control (7,8). Certain other studies have found that diabetic women with ASB do not have an increased risk for a faster decline in renal function, and the treatment of ASB is unnecessary in diabetic women (32-34). It appears that there is yet no consensus on the treatment of diabetic patients with ASB. Based on our results, the

risk of developing ASB in patients with IGT should not be neglected as in diabetic patients.

This publication is the first study reporting that patients with impaired glucose tolerance may develop urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria, just as in diabetic patients. A similar frequency of UTI and ASB was determined in patients with impaired glucose tolerance and those with type 2 diabetes. We suggest that high BMI and creatinine levels and low GFR are risk factors for UTI in patients with type 2 diabetes mellitus. *E. coli* is the most frequently isolated bacteria in patients with IGT and

in diabetic patients with both ASB and UTI. Routine urine culture can be recommended in patients with diabetes mellitus, even when there is no urinary symptom, but when there is one or more of the risk factors such pyuria identified in this study. Despite no detection of risk factors other than pyuria, considering a similar frequency of UTI and ASB in patients with impaired glucose tolerance and with type 2 diabetes, in order to monitor the condition, urine culture may be performed in patients with impaired glucose tolerance when pyuria is detected.

REFERENCES

1. Galkina E, Ley K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2006; 17: 368-77.
2. Van Oostrom AJ, Van Wijk JP, Sijmonsma TP, Rabelink TJ, Castro Cabezas M. Increased expression of activation markers on monocytes and neutrophils in type 2 diabetes. *Neth J Med*, 2004; 62(9): 320-5.
3. Boyko EJ, Fihn SD, Scholes D, Abraham L, Monsey B. Risk of urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria among diabetic and nondiabetic postmenopausal women. *Am J Epidemiol*, 2005; 161(6): 557-64.
4. American Diabetes Association, et al. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33(suppl 1): S62-S69.
5. Siu AL, Screening for abnormal blood glucose and type 2 diabetes mellitus: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*, 2015; 163: 861-8.
6. Renko M, Tapanainen P, Tossavainen P, Pokka T, Uhari M. Meta-analysis of the significance of asymptomatic bacteriuria in diabetes. *Diabetes Care*, 2011; 34(1): 230-5.
7. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis*, 2013; 57 (4): e22-e121.
8. McCarter YS, Burd EM, Hall GS, Zervos M (eds). *Cumitech 2C: Laboratory diagnosis of urinary tract infections*. Washington, DC: ASM Press, 2009.
9. Botev R, Mallié JP, Couchoud C, Schüch O, Fauvel JP, Wetzels JF, et al. Estimating glomerular filtration rate: Cockcroft-Gault and modification of diet in renal disease formulas compared to renal inulin clearance. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009; 4: 899-906.
10. Yuksel H, Kilic E, Ekinci A, Evliyaoglu O. Comparison of fully automated urine sediment analyzers H800-FUS100 and LabUMat-UriSed with manual microscopy. *J Clin Lab Anal*, 2013; 27: 312-318.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement: Document M100-S24. CLSI, Wayne, PA, USA. 2014.
12. Geerlings SE, Stolk RP, Camps MJL, Netten MN, Collet TJ, Hoepelman IM and on behalf of the diabetes women asymptomatic bacteriuria Utrecht study group. Risk factors for symptomatic urinary tract infection in women with diabetes. *Diabetes Care*, 2000; 23:1737-41.
13. Ribera MC, Pascual R, Orozco D, Perez Barba C, Pedrera V, Gil V. Incidence and risk factors associated with urinary tract infection in diabetic patients with and without asymptomatic bacteriuria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006; 25: 389-93.

14. Nitzan O, Elias M, Chazan B, Saliba W. Urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus: review of prevalence, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2015; 26(8): 129-36.
15. Muller LMAJ, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AIM, et al. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis*, 2005; 41:281-8.
16. Hoepelman AI, Meiland R, Geerlings SE. Pathogenesis and management of bacterial urinary tract infections in adult patients with diabetes mellitus. *Int J Antimicrob Agents*, 2003; 22 (Suppl 2):35-43.
17. Turan H, Serefhanoglu K, Torun AN, Kulaksizoglu S, Kulaksizoglu M, Pamuk B, et al. Frequency, risk factors, and responsible pathogenic microorganism of asymptomatic bacteriuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Jpn J Infect Dis*, 2008; 61: 236-8.
18. Boroumand MA, Sam L, Abbasi SH, Salarifar M, Kassaian E, Forghani S. Asymptomatic bacteriuria in type 2 Iranian diabetic women: a cross sectional study. *BMC Womens Health*, 2006; 6:4 doi:10.1186/1472-6874-6-4.
19. Burd EM, Kehl KS. A critical appraisal of the role of the clinical microbiology laboratory in the diagnosis of urinary tract infections. *J Clin Microbiol*, 2011; 49 (suppl 9): S34-8.
20. National Guideline Clearinghouse 2008. Guideline synthesis: diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infection. <http://www.guideline.gov> Accessed November 2010.
21. Raz R. Asymptomatic bacteriuria. Clinical significance and management. *Int J Antimicrob Agents*, 2003; 22(suppl 2): 45-7.
22. Fünfstück R, Nicolle LE, Hanefeld M, Naber KG. Urinary tract infection in patients with diabetes mellitus. *Clin Nephrol*, 2012; 77(1):40-8.
23. Al-Rubeaan KA, Moharram O, Al-Naqeb D, Hassan A, Rafiullah MR. Prevalence of urinary tract infection and risk factors among Saudi patients with diabetes. *World J Urol*, 2013; 31(3): 573-8.
24. Wilke T, Boettger B, Berg B, Groth A, Mueller S, Botteman M, et al. Epidemiology of urinary tract infections in type 2 diabetes mellitus patients: An analysis based on a large sample of 456,586 German T2D patients. *J Diabetes Complications*, 2015; 29(8):1015-23
25. Bonadio M, Boldrini E, Forotti G, Matteucci E, Vigna A, Mori S, et al. Asymptomatic bacteriuria in women with diabetes: influence of metabolic control. *Clin Infect Dis*, 2004; 38(6): e41-5.
26. Hiamanshu D, Singhal S, Vaish AK, Singh M, Rana H, Agrawal A. A study of asymptomatic bacteriuria in North Indian type 2 diabetic patients. *Int J Dev Ctries*, 2015; 6(11): 620. doi:10.4172/2155-6156.1000620.
27. Ishay A, Lavi I, Luboshitzky R. Prevalence and risk factors for asymptomatic bacteriuria in women with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*, 2006; 23(2): 185-8.
28. Rawat V, Singhai M, Kumar A, Jha PK, Goyal R. Bacteriological resistance profile in isolate from diabetic patients. *N Am J Med Sci*, 2012; 4(11): 563-8.
29. Dalal S, Nicolle L, Marss CF, Zahnag L, Harding G, Foxman B. Long-term *Escherichia coli* asymptomatic bacteriuria among woman with diabetes mellitus. *Clin Infect Dis*, 2009; 49: 491-7.
30. Stoeckle M, Kaec C, Trampuz A, Zimmerli W. The role of diabetes mellitus in patients with bloodstream infections. *Swiss Med Wkly* 2008; 138(35-36): 512-9.
31. Bonadio M, Costarelli S, Morelli G, Tartaglia T. The influence of diabetes mellitus on the spectrum of uropathogens and the antimicrobial resistance in elderly adult patients with urinary tract infection. *BMC Infect Dis*, 2006; 6:54 doi:10.1186/1471-2334-6-54.
32. Meiland R, Geerlings SE, Stolk RP, Netten PM, Schneeberger PM, Hoepelman AI. Asymptomatic bacteriuria in women with diabetes mellitus: effect on renal function after 6 years of follow-up. *Arch Intern Med*, 2006; 166(20): 2222-7.
33. Nicolle LE, Zhanel GG, Harding GK. Microbiological outcomes in women with diabetes and untreated asymptomatic bacteriuria. *World J Urol*, 2006; 24(1): 61-5.
34. Harding GK, Zhanel GG, Nicolle LE, Cheang M. Manitoba Diabetes Urinary Tract Infection Study Group. Antimicrobial treatment in diabetic women with asymptomatic bacteriuria. *N Engl J Med*, 2002; 347(20):1576-83.

"Genital Mikoplazma" sıklığının multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması: Klinikte önemli olabilir mi?

Detection of "Genital Mycoplasma" incidence by multiplex real-time polymerase chain reaction: Could it be clinically important?

Cemile SÖNMEZ¹

ÖZET

Amaç: Genital mikoplazma etkenleri, erişkin ve infantlarda birçok enfeksiyon ile ilişkilidir. Bu nedenle etkenlerin doğru ve hızlı tanısı önemlidir. Kültür yöntemlerinde karşılaşılan sorunlar ve mikoplazmaların fastidiyöz özellik taşıması nedeniyle, günümüzde enfeksiyöz ajanların tanısında yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler genital mikoplazma enfeksiyonlarının tanısında da kullanılabilir. Bu çalışmada merkezimize rutin tanı amacıyla gönderilen semptomatik hastalarda Multipleks Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile genital mikoplazma sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Ocak 2016-Aralık 2017 tarihleri arasında Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Referans Laboratuvarı'na tanı amacıyla gönderilen, 0-72 yaş olguları içeren 359 semptomatik hastaya (179 kadın, 180 erkek) ait ürogenital örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Toplam 359 hastaya ait akıntı veya idrar örneğinden *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* ticari Gerçek Zamanlı PZR testi ile çalışılmıştır.

Bulgular: Toplam 359 hastanın %25,62'sinin

ABSTRACT

Objective: Genital mycoplasma agents are associated with many infections in adults and infants. Therefore rapid and accurate diagnosis of the agents is important. Molecular methods commonly used in the diagnosis of infectious agents can also be used to diagnose genital mycoplasma infections because of the problems encountered in culture methods and the fastidious characteristic of mycoplasmas. In this study, it was aimed to investigate the frequency of genital mycoplasma with multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction in symptomatic patients sent to our center for routine diagnosis.

Methods: Urogenital samples of 359 symptomatic patients (179 women, 180 men) aged 0-72 years, sent to the Public Health General Directorate, Sexually Transmitted Diseases Reference Laboratories for diagnosis between January 2016 and December 2017 were included in the study. *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* were investigated by commercially available Real-Time PCR test from urine or discharge samples of 359 patients.

Results: It was determined that 25.62% (92/359) of

¹Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Cemile SÖNMEZ

Sağlık Bakanlığı, HSGM, Adnan Saygun Cad No: 55 Sıhhiye Ankara - Türkiye

Tel : +90 532 352 03 39

E-posta / E-mail : cemilesonmez2004@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 26.03.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 24.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.79926

Sönmez C. "Genital Mikoplazma" Sıklığının Multipleks Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması: Klinikte önemli olabilir mi?
Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 375-382

(92/359) tek ve çoklu etken ile kolonize olduğu tespit edilmiştir. Çoklu etken pozitifliği 18 (%5) hastada saptanmıştır. Ureaplazma pozitif örneklerin %52,70 (39/74)'i *U. parvum*, %47,3 (35/74)'i *U. urealyticum*; Mikoplazma pozitif hastaların ise %81,08 (30/37)'i *M. hominis* ve %18,92 (7/37)'si *M. genitalium* olarak tespit edilmiştir. Kadınlarda *U. parvum* ve erkeklerde *U. urealyticum* sıklığının diğer etkenlere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. parvum* en fazla 30-34 yaş grubunda görülürken, *U. urealyticum* 18-24 yaş grubunda görülmüştür.

Sonuç: Genital mikoplazmaların patojenik rolünün gittikçe arttığı kabul edildiğinden, semptomatik olgularda enfeksiyon etkenleri araştırılırken genital mikoplazmaların akılda tutulması gerektiği düşünülmüştür. Ayrıca, erken tedavi ve komplikasyonların zamanında önlenmesi için duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan tanı metodlarının kullanılarak etkenlerin ayırımının yapılması gerektiği düşüncesine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Genital mikoplazma, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*

359 patients were colonized with single and multiple agents. Multiple agents positivity was detected in 18 patients (5%). Among *Ureaplasma* positive patients 52.70% (39/74) of them were detected as *U. Parvum* and % 47, 3 (35/74) of them as *U. urealyticum*. Among mycoplasma positive patients 81.08% (30/37) of them were detected as *M. hominis* and 18.92% (7/37) of them were detected as *M. genitalium*. *U. parvum* and *U. urealyticum* were found to be the most frequent agents in females and males respectively. *M. hominis*, *M. genitalium* and *U. parvum* were most commonly present in the 30-34 ages group, while *U. urealyticum* was mostly detected in the 18-24 ages group.

Conclusion: In conclusion, since the pathogenic role of genital mycoplasma agents is increasingly accepted, it is considered that genital mycoplasmas should be kept in mind while investigating the infection agents during symptomatic cases. It has been thought that for early treatment and for the prevention of complications in a timely manner, it is necessary to differentiate the agents by using highly sensitive and specific methods.

Key Words: Genital mycoplasma, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*

GİRİŞ

Mikoplazma (*Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*) ve ureaplazma türlerini (*Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*) içeren “genital mikoplazmalar”, erişkin ve infantlarda birçok enfeksiyon ile ilişkilidir (1). Bununla birlikte genital florada %80 oranında kommensal olarak bulunabilmeleri nedeniyle cinsel yolla bulaşan hastalıklar açısından rolleri tartışmalıdır (2).

Ureaplasma spp. nongokoksik üretrit ve akut prostatitin ana nedenidir. Gebelikte koryoamniyonit ve preterm doğuma neden olabilir. *M. genitalium* ise

üretrit ve akut endometrit ile ilişkili olup diğer bir mikoplazma türü *M. hominis*'in piyelonefrit, pelvik hastalık ve postpartum sepsis ile ilişkili olduğu rapor edilmektedir (3). Ureaplazma türlerinin kadınlarda mikoplazma türlerinden daha yaygın görüldüğü ve ek olarak *U. parvum*'un *U. urealyticum*'dan daha sık görüldüğü rapor edilmektedir. *U. urealyticum*'un ürogenital sistem enfeksiyonlarındaki rolü yaygın olarak bilinmesine rağmen, *U. parvum*'un rolü henüz tam olarak bilinmemektedir (4). Son zamanlarda *U. parvum*'un amnion sıvısını kolonize ettiği ve

uterusta inflamasyona neden olduğu ve özellikle hamilelerde ihmal edilmemesi gereken bir etken olduğu belirtilmektedir (5). Cinsel yolla bulaşan hastalıklarda bulaş ve komplikasyonların önlenmesi için etkenlerin hızlı tanısı önemlidir. Günümüzde, kültür yöntemlerinde karşılaşılan sorunlar ve mikoplazmaların güç üremesi nedeniyle, duyarlı ve hızlı moleküler multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) testleri avantajlı görünmektedir (6).

Bu çalışmada merkezimize rutin tanı amacıyla gönderilen semptomatik hastalara ait genital akıntı veya idrar örneklerinde flora elemanı olarak kabul edilen ancak birçok enfeksiyon ile ilişkisi saptanan genital mikoplazma sıklığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda *M. hominis* ve *U. urealyticum* sıklığı dışında *U. parvum* ve *M. genitalium* sıklığının da tespit edilmesi planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ocak 2016-Aralık 2017 tarihleri arasında Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Referans Laboratuvarı'na tanı amacıyla gönderilen, 0-72 yaş olguları içeren 359 semptomatik hastaya (179 kadın, 180 erkek) ait ürogenital akıntı/idrar örneklerine ait sonuçlar değerlendirilmiştir. Laboratuvar istem formları incelendiği zaman akıntı şikayetleri olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Klinisyen tarafından hastaların belirgin bir akıntı özelliği bulunmadığı belirtilmiştir. Akıntı örnekleri steril eküvyon (Copan Technologies, Italy) ile klinisyen tarafından alındıktan sonra Stuart taşıma besiyeri (Copan Technologies, Italy) ile idrar örnekleri ise steril idrar kabına alınarak oda sıcaklığında gönderilmiştir. Multipleks Gerçek Zamanlı PZR testi, Allplex™ STI Essential Assay (Seegene, Kore Cumhuriyeti) kullanılarak laboratuvar tanısı konmuştur. Test üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılarak yorumlanmıştır. İstatistiksel analiz için SPSS versiyon 23.0 paket programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı analiz olarak ortalama, sayı ve yüzde dağılımları hesaplanmıştır.

Cinsiyete göre fark ki-kare testi ile hesaplanmıştır. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Multipleks Gerçek Zamanlı PZR (Allplex™ STI Essential Assay):

Bu çalışmada, cinsel yolla bulaşan yedi farklı enfeksiyon etkenini eş zamanlı olarak saptayan Multipleks Gerçek Zamanlı PZR kiti, Allplex™ STI Essential Assay (Allplex, Seegene, Kore) kullanılmıştır. Allplex™ STI Essential Assay (Seegene, Kore) kiti *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* ve *U. parvum* etkenlerini DPO™ ve MuDT™ teknolojilerine dayalı olarak saptar. Bu teknolojide gerçek zamanlı PZR cihazlarında, erime eğrisi analizi yapmadan, tek bir floresan kanalda çoklu-Ct (eşik döngüsü) değerleri belirlenebilmektedir. Test sırasında nükleik asit izolasyonu klasik spin kolon yöntemine dayalı Ribospin™ vRD (GeneAll Biyoteknoloji, Kore) kiti ile manuel olarak yapılmıştır. Nükleik asit izolasyonu sonrası enfeksiyon etkenlerinin tanısı için Multipleks Gerçek Zamanlı PZR tabanlı Allplex™ STI Essential Assay (Allplex, Seegene, Kore) ticari kiti kullanılmıştır. Termal döngü ve saptama basamakları CFX96 Real-Time PCR cihazı (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen toplam 359 hastanın 179'u kadın ve 180'i erkek olup, kadınların yaş ortalaması $36,37 \pm 10,05$ ve erkeklerin yaş ortalaması $34,53 \pm 12,54$ olarak tespit edilmiştir. Pozitif saptanan hastaların yaş ortalaması $34,86 \pm 10,24$, negatif hastaların ise $35,52 \pm 11,71$ olarak bulunmuştur. Hastaların %25,62'sinin (92/359) tek ve çoklu etken ile kolonize olduğu tespit edilmiştir. Çoklu etken pozitifliği 18 hastada (%5) görülmüştür.

Ureaplazma pozitif örneklerin %52,70 (39/74)'i *U. parvum*, %47,3 (35/74)'i *U. urealyticum*; Mikoplazma pozitif hastaların ise %81,08'i (30/37)'i *M. hominis* ve %18,92 (7/37)'si *M. genitalium* olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde M.

hominis, *M. genitalium*, *U. urealyticum* ve *U. parvum*'un görülme sıklığı sırasıyla %8,35 (30/359), %1,94 (7/359), %9,74 (35/359), %10,86 (39/359) olarak saptanmıştır (Tablo 1). Şekil 1'de genital mikoplazma etkenlerinin cinsiyete göre dağılımı verilmiştir.

Cinsiyete göre etkenler değerlendirildiğinde *M. hominis* ($p=0,123$), *M. genitalium* ($p=0,255$) ve *U. urealyticum* için ($p=0,113$) her iki cinsiyet

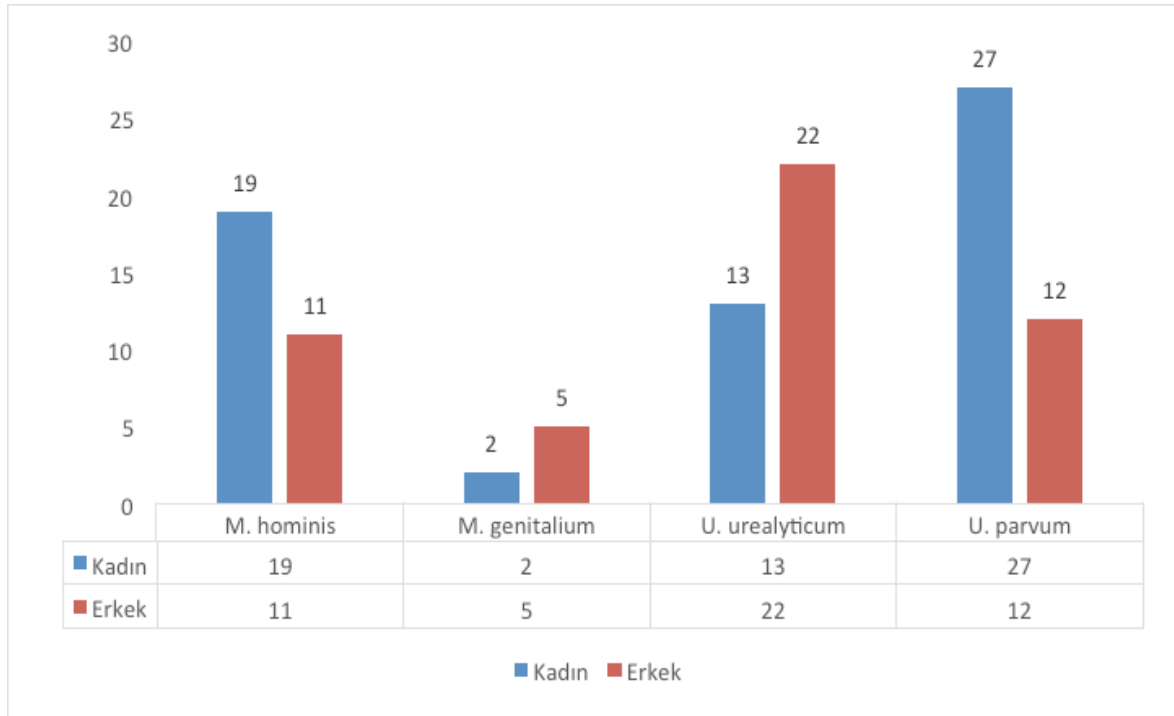
arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamakla birlikte *U. parvum* ($p=0,01$) için her iki cinsiyet arasında anlamlı bir fark olduğu ve kadınlarda daha sık görüldüğü tespit edilmiştir.

M. hominis, *M. genitalium* ve *U. parvum* en fazla 30-34 yaş grubunda görülürken, *U. urealyticum* 18-24 yaş grubunda görülmüştür (Tablo 2).

Tablo 1. Genital mikoplazma etkenlerinin mikroorganizmaların görülme sıklığı, Ocak 2016 - Aralık 2017

Mikroorganizma	N (sayı)*	% (yüzde)
<i>M. hominis</i>	30	8,35
<i>M. genitalium</i>	7	1,94
<i>U. urealyticum</i>	35	9,74
<i>U. parvum</i>	39	10,86

*Tek veya çoklu etken pozitifliğini göstermektedir.



Şekil 1. Genital mikoplazma etkenlerinin cinsiyete göre dağılımı, Ocak 2016 - Aralık 2017

Tablo 2. Genital mikoplazma etkenlerinin yaş gruplarına göre dağılımı, Ocak 2016 - Aralık 2017

Yaş grupları (yıl)	Mikroorganizma türü			
	<i>M. hominis</i> (n=30)*	<i>U. urealyticum</i> (n=35)*	<i>M. genitalium</i> (n=7)*	<i>U. parvum</i> (n=39)*
0-18	0	0	0	0
18-24	4	12	1	4
25-29	1	5	1	2
30-34	8	5	2	17
35-39	4	6	1	3
40-44	5	3	1	3
45-49	4	2	1	6
50-54	1	1	0	1
55-59	2	1	0	2
≥60	1	0	0	1

*Tek veya çoklu etken pozitifliğini göstermektedir.

TARTIŞMA

Ureaplazma ve mikoplazma türleri popülasyon özelliklerinden bağımsız olarak ürogenital örneklerden sıklıkla izole edilmektedir (7). Ulusal ve uluslararası çalışmalar semptomatik hastalarda genital mikoplazma sıklığının %30-40 oranında olduğunu göstermektedir (8,9). Çalışma popülasyonumuzda benzer olarak genital mikoplazma sıklığı %25,62 olarak saptanmıştır. Bir çalışmada bu oran %43,5 (10) olarak tespit edilirken diğer bir çalışmada %18,6 (11) olarak bulunmuştur. Bayraktar ve ark. tarafından semptomatik ve asemptomatik kontrollerde yapılan bir çalışmada genital mikoplazma sıklığının %29 olduğu tespit edilmiştir (2). Araştırmalar arasındaki farklı sonuçların, örneklem, çalışma tasarımı, çalışma popülasyonu, kullanılan yöntem gibi bazı faktörlere bağlı olabileceği düşünülmüştür. Cinsel yolla bulaşan hastalıklarda koenfeksiyon HIV dahil benzer yolla bulaş riski bulunan diğer etkenlerin de artışına neden olabilmektedir. Genital enfeksiyon etkenleri arasında koenfeksiyon sıklıkla rapor edilmektedir (12). Çalışmamızda altı olguda koenfeksiyon varlığı tespit edilmiş olup, bunlarının iki'sinin HIV pozitif olgular olduğu saptanmıştır.

Uluslararası çalışmalar son 10 yılda genital mikoplazma enfeksiyonlarında artış olduğunu göstermektedir (13). Elde ettiğimiz veriler incelendiğinde *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* ve *U. parvum*'un görülme sıklığının sırasıyla %8,35 (30/359), %1,94 (7/359), %9,74 (35/359), %10,86 (39/359) olduğu saptanmıştır. İto ve ark. tarafından 40 yaş altı olgularda gerçekleştirilen çalışmada sonuçlarımıza benzer olarak *M. genitalium* %8,9, *M. hominis* %10,7, *U. parvum* %10,7 ve *U. urealyticum* %8,9 olarak tespit edilmiştir (12). *M. genitalium* sıklığı çalışmamızda İto ve ark.'nın çalışmasına göre daha düşük sıklıkta tespit edilmiştir. *M. genitalium* sıklığının nongonokoksik üretritli hastalarda %13 ile %42 arasında olduğu rapor edilmektedir (14). Görülme sıklığındaki farklılıkların çalışma kapsamına alınan hastaların sosyoekonomik düzeyleri ile cinsel tutum ve davranışlarındaki farklılıklardan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda saptanan etkenler sıklık açısından değerlendirildiğinde *U. parvum* en yüksek sıklıkta saptanmış olup, bunu sırasıyla *U. urealyticum*, *M. hominis* ve *M. genitalium* izlemiştir. Mclver ve ark.'nın

çalışmasında da benzer olarak en sık *U. parvum*, en düşük sıklıkta ise *M. genitalium* saptanmıştır (15). Önceden yapılan diğer araştırmalarla da uyumlu olarak genital mikoplazma etkenleri arasında *U. parvum*'un en yaygın görülen etken olduğu tespit edilmiştir (3,16,17). Bulgularımızla birlikte diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, *U. parvum*'un cinsel yolla bulaşan hastalık etkeni olarak muhtemel bir rolü olabileceği düşünülmüştür (18).

Çalışma popülasyonumuzda *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. parvum* en fazla 30-34 yaş grubunda görülürken, *U. urealyticum* 18-24 yaş grubunda görülmüştür. Maleki ve ark.'nın (19) çalışmasında verilerimiz ile benzer olarak *M. hominis* en fazla 30-34 yaş grubunda ve *U. urealyticum* 35-39 yaş grubunda tespit edilirken, *M. genitalium* sıklığı ise Yeganeh ve ark.'nın (20) çalışmasında en yüksek 30-39 yaş grubunda saptanmıştır. Sıklık cinsiyet, cinsel alışkanlıklar ve hormon profiline göre değişebilir, bu nedenle saptama oranı farklı yaş gruplarında ve toplumlarda farklılık gösterebilir (21).

Çalışmamızda *M. hominis* ve *U. parvum* kadınlarda daha sık görülmesine rağmen, *M. genitalium* ve *U. urealyticum* erkeklerde daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Benzer olarak Esen ve ark. (22) tarafından *M. genitalium* ve *U. urealyticum* erkeklerde daha sık rapor edilirken, *M. hominis* sıklığı her iki cinsiyette eşit bulunmuştur. Bulgularımızla benzer olarak Patel ve ark. (23) ureaplazma türlerinin özellikle *U. parvum*'un kadın genital sisteminde daha sıklıkla görüldüğünü rapor etmiştir. Çalışmamızda semptomatik olgularda tespit edilen *U. parvum* için her iki cinsiyet arasında anlamlı bir fark olduğu ve kadınlarda daha sık görüldüğü tespit edilmiştir.

Genital mikoplazma enfeksiyonlarında erken tedavi başlanması ve komplikasyonların zamanında önlenmesi için uygun tanı yöntemlerinin kullanılması önemlidir. Tanıda kültür yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir. Ayrıca antibiyotik

duyarlılık profillerinin izlenmesi için kültür yöntemi gereklidir. Bununla birlikte moleküler yöntemler altın standart ile karşılaştırıldığında duyarlılık ve spesifitesinin daha yüksek olduğu ve *M. genitalium*'un saptanması ve ayrıca *U. urealyticum* ve *U. parvum* ayırımı için kullanılabilir tek yöntem olduğu bilinmektedir (1). *U. parvum* özellikle hamilelerde korioamnionit, fetal morbidite ve mortalite ile ilişkili bulunmuştur bu nedenle *U. urealyticum* ve *U. parvum* ayırımının yapılması gerekmektedir (24). Çalışmamızda sadece *M. hominis* ve *U. urealyticum* sıklığı dışında *U. parvum* ve *M. genitalium* sıklığının da tespit edilebilmesi açısından Gerçek Zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır. Diğer yandan bakteriyel kültürle sadece canlı bakteriler tespit edilirken, PZR gibi nükleik asit amplifikasyon testleri hem canlı hem de cansız bakteriyi tespit edebilmektedir (6).

Genital mikoplazma etkenlerinin normal flora elemanı olabilecekleri göz önüne alındığı zaman çalışmanın kontrol grubu içermemesi ve detaylı klinik bilgiye ulaşamaması en önemli sınırlamalarından biridir. Bununla birlikte ülkemizde *M. genitalium* ve *U. parvum* etkenlerinin de ayırımının yapıldığı genital mikoplazma etkenleri ile yapılmış ilk çalışma olması nedeniyle elde edilen veriler önemlidir. Genital sistem mikrobiyotasının kompleks olması ve ürogenital hastalıklarla ilgili sınırlı bilgiye sahip olmamız nedeniyle bu bakterilerin rollerini açıklayabilmek için semptomu bulunmayan hastaların da dahil edildiği daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak genital mikoplazma etkenlerinin patojenik rolü gittikçe artan bir şekilde kabul edildiğinden, semptomatik olgularda enfeksiyon etkenleri araştırılırken genital mikoplazma etkenlerinin de akılda tutulması gerektiği, ayrıca erken tedavi başlanması ve komplikasyonların zamanında önlenmesi için duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan tanı metodlarının kullanılarak etkenlerin ayırımının yapılması gerektiği düşüncesine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. D'Inzeo T, Angelis GD, Fiori B, Menchinelli G, Liotti FM, Morandotti GA, et al. Comparison of Mycoplasma IES, Mycofast Revolution and Mycoplasma IST2 to detect genital mycoplasmas in clinical samples. *J Infect Dev Ctries*, 2017; 11(1): 98-101.
2. Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, Celik O. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *J Int Dis*, 2010; 14: 90-5.
3. Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(4): 1528-33.
4. Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Lombaard HA, Kock MM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma species* and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *BMC Infect Dis*, 2014; 14: 171.
5. Strauss M, Colodner R, Sagas D, Adawi A, Edelstein H, Chazan B. Detection of *Ureaplasma* Species by a Semi-Quantitative PCR Test in Urine Samples: Can It Predict Clinical Significance? *Isr Med Assoc J*, 2018; 1(20): 9-13.
6. Vica ML, Junie LM, Tataru A, Grad AI, Matei HV. Simultaneous PCR-based detection of six pathogens inducing sexually transmitted diseases. *J Clin Lab Invest*, 2015; 3: 11-6.
7. Foschi C, Salvo M, Galli S, Moroni A, Cevenini R, Marangoni A. Prevalence and antimicrobial resistance of genital mollicutes in Italy over a two-year period. *New Microbiol* 2018; 41(1) (Basım aşamasında).
8. VGovender S, Theron GB, Odendaal HJ, Chalkley LJ. Prevalence of genital mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydia in pregnancy. *J Obstet Gynaecol*, 2009; 29: 698-701.
9. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* from Chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev*, 2011; 24: 498-514.
10. Leli C, Mencacci A, Bombaci JC, D'Alò F, Farinelli S, Vitali M et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in a population of Italian and immigrant outpatients. *Infez Med*, 2012; 20: 82-7.
11. De Francesco MA, Caracciolo S, Bonfanti C, Manca N. Incidence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* isolated in Brescia, Italy, over 7 years. *J Infect Chemother*, 2013; 19: 621-7.
12. Ito S, Tsuchiya T, Yasuda M, Yokoi S, Nakano M, Deguchi T. Prevalence of genital mycoplasmas and ureaplasmas in men younger than 40 years-of-age with acute epididymitis. *Int J Urol*, 2012; 19: 234-8.
13. Saigal K, Dhawan B, Rawre J, Khanna N, Chaudhry R.. Genital *Mycoplasma* and *Chlamydia trachomatis* infections in patients with genital tract infections attending a tertiary care hospital of North India. *Indian J Pathol Microbiol*, 2016; 59(2): 194-6.
14. Ishihara S, Yasuda M, Ito S, Maeda S, Deguchi T. *Mycoplasma genitalium* urethritis in men. *Int J Antimicrob Agents*, 2004; 24 (1): 23-7.
15. McIver CJ, Rismanto N, Smith C, Naing ZW, Rayner B, Lusk MJ et al. Multiplex PCR testing detection of higher-than-expected rates of cervical mycoplasma, ureaplasma, and trichomonas and viral agent infections in sexually active Australian women. *J Clin Microbiol*, 2009; 47(5): 1358-63.
16. Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M et al. Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. *J Clin Microbiol*, 2006; 44: 51-5.
17. Schlicht MJ, Lovrich SD, Sartin JS, Karpinsky P, Callister SM, Agger WA. High prevalence of genital mycoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. *J Clin Microbiol*, 2004; 42: 4636-40.
18. Jensen JS, Uldum SA, Søndergård-Andersen J, Vuust J, Lind K. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol*, 1991; 29: 46-50.
19. Maleki S, Motamedi H, Moosavian SM, Shahbaziyan N. Frequency of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in females with urogenital infections and habitual abortion history in Ahvaz Iran: Using Multiplex PCR. *Jundishapur J Microbiol*, 2013; 6(6): e10088.
20. Yeganeh O, Jeddi-Tehrani M, Yaghmaie F, Kamali K, Heidari-Vala H, Zeraati H et al. Genitalium infections in symptomatic and asymptomatic men referring to Urology Clinic of Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. *Iran Red Crescent Med J*, 2013; 15(4): 340-4.

21. Kotrotsiou T, Exindari M, Diza E, Gioula G, Melidou A, Kaplanis K et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* in asymptomatic women in Northern Greece. Hippokratia, 2013; 17: 319-21.
22. Esen B, Gozalan A, Sevindi DF, Demirbas A, Onde U, Erkayran U et al. *Ureaplasma urealyticum*: Presence among Sexually Transmitted Diseases. Jpn J Infect Dis, 2017; 70: 75-9.
23. Patel MA, Nyirjesy P: Role of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* species in female lower genital tract infections. Curr Infect Dis Rep, 2010; 12(6): 417-22.
24. Choe HS, Lee DS, Lee SJ, Hong SH, Park DC, Lee MK et al. Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. Int J Infect Dis, 2013; 17(12): e1134-40.

Ordu ili ilköğretim okulu öğrencilerinde baş biti *Pediculus humanus capitis* yaygınlığının belirlenmesi

Determination of the prevalence of head lice *Pediculus humanus capitis* in primary school students in Ordu province

Ülkü KARAMAN¹, Özgür ENGİNYURT², Ömer KARAMAN³, Cemil ÇOLAK⁴, Gamze KAÇMAZ⁵

ÖZET

Amaç: Anoplura takımında yer alan ve kozmopolit yayılım gösteren *Pediculus humanus capitis* tüm hayat evrelerini insanların saç derisinde geçiren bir ektoparazitir. Bu çalışmada Ordu ili ilköğretim okulu öğrencilerinde parazitin epidemiyolojisinin belirlenmesi, tedavisi ve koruma yolları ile ilgili halk sağlığı eğitimi verilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada, *P. h. capitis* açısından Ordu ilinde bulunan 11 anaokulu, 8 ilkokul ve 7 ortaokul taranmıştır. Baş muayenesine alınarak özellikle başın ense ve kulak arkası bölgeleri *P. h. capitis*'in yumurta, nimf ya da erişkin formları açısından incelenmiştir. Tarama uygulaması ile ilgili koruyucu ruh sağlığı açısından bir strateji belirlenmiştir. Bu doğrultuda okul müdürlüğü tarafından tahsis edilen odaya öğrenciler tek tek alınmış ve muayene sonucu öğrenciye herhangi bir bilgi verilmemiştir. Sonuçlar toplu halde okul müdürlüğüne teslim edilmiş ve gerekli tedavilerinin yapılması sağlanmıştır. Tarama sürecinde öğrencilerin duyu durumlarını bozucu davranışlardan kaçınılmaya yönelik gerekli önlemler alınmıştır. Veriler, ortalama ve standart sapma ya da ortanca ve çeyrek sapma

ABSTRACT

Objective: Within the anoplura suborder with cosmopolitan distribution, *Pediculus capitis* is an ectoparasite living all its life stages on the scalp of humans. In this study the aim was to determine the epidemiology of this parasite in primary school students in Ordu province, along with treatment, preventive routes and related public health education.

Methods: In this study it was screened 11 preschools, 8 primary schools and 7 middle schools in Ordu province for *P. capitis*. Head examination included investigation for eggs, nymph and adult forms of *P. capitis* especially in the nape of the neck and behind the ears. A strategy was determined for screening to be protective of mental health. In line with this, students were taken singly to a room provided by the school management and no information was given to students about the examination results. The results were delivered to the school management and necessary treatment was provided. During screening, necessary precautions were taken to avoid behavior that may disrupt the student's mood. Data are given as mean and standard deviation or median and quartile deviation or number/

¹Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu

²Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Ordu

³Ordu Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Eğitim Bilimleri Bölümü, Rehberlik ve Psikolojik Danışmanlık Anabilim Dalı, Ordu

⁴İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı, Malatya

⁵Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Giresun



İletişim / Corresponding Author : Ülkü KARAMAN

Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı 52200 Ordu - Türkiye

Tel : +90 553 618 52 45

E-posta / E-mail : ulkukaraman44@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 30.12.2017

Kabul Tarihi / Accepted : 29.03.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.72324

Karaman Ü, Enginyurt Ö, Karaman Ö, Çolak C, Kaçmaz G. Ordu ili ilköğretim okulu öğrencilerinde baş biti *Pediculus humanus capitis* yaygınlığının belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 383-390

veya sayı/yüzde olarak verilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. İstatistiksel analizlerde verilerin dağılımına göre parametrik ya da parametrik olmayan anlamlılık testleri kullanılmış ve $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular: Çalışmada 6.616 erkek, 6.264 kız olmak üzere 12.880 öğrenci *P. h. capitis* açısından incelenmiştir. 238 (%3,5) erkek, 1368 (%21,8) olmak üzere toplamda 1.606 (%12,4) öğrencide *P.h. capitis* varlığı saptanmıştır. Baş biti görülme yüzdesi açısından kızlar ile erkekler arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,001$). Kızlarda parazit görülme oranı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Sonuç: Çalışma, parazitin epidemiyolojisinin görülme yüzdesinin yüksek olması beklenen ilköğretim çocuklarında yapılmıştır. Ayrıca diğer çalışmalarla benzer olarak kızlarda görülme yüzdesi daha yüksek tespit edilmiştir. Çalışmada parazitin Ordu ili ilköğretim okullarında yaygınlığı belirlenmiş, tedavileri ve tedavi sonrası kontrolleri yapılmıştır. Ayrıca, parazit ile savaşta kontrol programı oluşturularak etkili bir korunma stratejisi oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Baş biti, Ordu, ilköğretim okulu, *Pediculus humanus capitis*, epidemiyoloji

percentage. Compability of data to normal distribution was investigated by the Shapiro Wilk test. According to the distribution of data, parametric or non-parametric significance tests were used for statistical analysis and $p<0.05$ was accepted as significant.

Results: In this study, it was investigated 6616 males and 6264 females for a total 12880 students in terms of *P. capitis*. Of students, positivity was identified in 238 males (3.5%) and 1368 females (21.8%) for a total of 1606 (12.4%) of students. In terms of head lice incidence percentage, there was a significant difference identified between females and males ($p<0.001$). The incidence of parasite in females was found to be significantly high.

Conclusion: The study of parasite epidemiology was completed in primary school children, with expected high percentage of incidence. Additionally, similar to other studies, our study identified a higher incidence percentage in females. The study determined the prevalence of the parasite in primary schools in Ordu province, with treatment and post-treatment check-ups performed. Additionally, a fighting against parasites control program was created to form an effective prevention strategy.

Key Words: Head lice, Ordu, primary school, *Pediculus humanus capitis*, epidemiology

GİRİŞ

Pediculus humanus capitis (baş biti) Anoplura takımından olup kozmopolit yayılım gösterir ve tüm hayat evrelerini insanlarda geçiren bir ektoparazitir (1, 2). Parazit dorso ventral basık olup evrim döngüsünde yumurta, nimf ve erişkin dönemleri bulunmaktadır. Dişileri (2.8-3 mm), erkeklere (2-2.5 mm) oranla daha büyüktür. Yumurtaları ortalama 0.6-1 mm boyunda olup dişiler hayatı boyunca (yaklaşık 3-4 hafta) 100 kadar yumurta üretmektedir. Sirke adı verilen yumurtaları dişi parazit tarafından salgılanan yapışkan bir madde ile konağın saç tellerine ve

kıllarına yapışır. Parazit yumurtaları genelde başın arka kısmında oksipital ve temporal bölgelerde daha sıklıkla bulunmaktadır (1-5).

Enfestasyona maruz kalan hastalarda baş kaşıntısı şikayeti oluşmaktadır. Kaşıntıya bağlı olarak saçlı deride kızarıklıklar ve papüler oluşumlar sonucu deri bütünlüğü bozulabilir ve enfekte kişilerde sekonder bakteri enfeksiyonları oluşabilmektedir. *P. h. capitis*'lerin etken olduğu enfestasyon pediküloz olarak adlandırılır ve özellikle okul çocukları arasında salgınlara yol açabildiği bildirilmiştir (3-5).

Ulaşılan kaynak bilgilerde Ordu ili ilköğretim çocuklarında parazitin epidemiyoloji ile ilgili sadece bir okulda çalışma yapılmış ve %11 pozitiflik bulunmuştur (6). Bu çalışmada Ordu ili ilköğretim okulu öğrencilerinde parazitin epidemiyolojisinin belirlenmesi, tedavisi ve koruma yolları ile ilgili halk sağlığı eğitimi verilmesi, amaçlanmıştır. Ayrıca parazit ile savaşta kontrol programı oluşturularak etkili bir korunma stratejisi oluşturulacaktır. Çalışma sonucunda hastaların tedavileri yapılmış ve tedavi sonrası kontrolleri için gerekli uyarılarda bulunulmuştur. Tarama yapılan okulların sınıflarında parazitten korunma yolları ile ilgili bilgiler de verilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmanın evrenini ilköğretim okulu öğrencileri oluşturmuştur. Çalışmaya başlanılmadan önce Ordu Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınmıştır. Ayrıca Altınordu İlçe Milli Eğitim Müdürlüğü ve Altınordu Kaymakamlığı'ndan izin belgeleri alınmıştır. Çalışma 20 Eylül 2016 -12 Ekim 2017 tarihleri arasında yapılmış olup, *P. h. capitis* açısından Ordu ilinde bulunan 11 anaokul, 8 ilkokul ve 7 ortaokul taranmıştır.

Tarama sürecinde öğrencilerin duyu durumlarını bozucu davranışlardan kaçınmaya yönelik gerekli önlemler alınmıştır. Bu doğrultuda çocukların ruh sağlığını bozucu iş ve işlemleri engellemek için önleyici rehberlik hizmetleri çerçevesinde strateji belirlenmiştir. Buna göre tarama başlatılmadan önce araştırmacılara öğrencilerin gelişimsel özellikleri, okulun yönetsel ve öğrenci psiko-dinamiği ve psikolojik olarak dikkat edilmesi gereken durumlar hizmetiçi eğitim çerçevesinde aktarılmıştır. Daha sonra öğrenciler teker teker okul müdürlüğü tarafından tahsis edilen odaya alınmış ve muayene sonucu ile ilgili bir bilgi verilmemiştir. Sonuçlar toplu halde okul müdürlüğüne teslim edilmiş ve gerekli tedavilerinin yapılması sağlanmıştır.

Baş muayenesinde saçlar bit tarağı ile taranmıştır. Bit tarağı uzun saçlı kız çocuklarının saçlarındaki canlı

nimf ve erişkinleri toparlayacak özellikte olup her çocuk için bir tarak kullanılmıştır. Sınıfın bitiminde taraklar dezenfektan ile yıkanmıştır. Çocuğun özellikle başın ense ve kulak arkası bölgeleri *P. h. capitis*'in yumurta, nimf ya da erişkin formları yönünden incelenmiştir. İnceleme yaklaşık olarak üç-dört dakika sürmüştür. Bazı kız çocuklarının saçlarının çok uzun olması durumunda tarama süresi biraz daha uzamıştır.

Bit yumurtasından şüphe edilen saç tellerinden bir makasla dikkatlice birkaç örnek alınmıştır. Hasta hakkında gerekli bilgiler lamin üzerine yazılmış ve alınan örnek selofanlı bant ile lama tespit edilmiştir. Her örnek Parazitoloji Laboratuvarında ışık mikroskobu altında *P. h. capitis* açısından incelenmiştir. Örnekler laboratuvarında incelenirken yumurtanın canlı olup olmadığına dikkat edilmiştir.

Veriler, ortalama ve standart sapma ya da ortanca ve çeyrek sapma veya sayı/yüzde olarak verilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. İstatistiksel analizlerde verilerin dağılımına göre parametrik ya da parametrik olmayan anlamlılık testleri kullanılmış ve $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmada *P. h. capitis* yönünden Ordu ilinde bulunan 11 anaokul, 8 ilkokul ve 7 ortaokul taranmıştır. Öğrencilerin 6.616 erkek ve 6.264 kız olmak üzere toplamda sayısı 12.880'dir. Öğrencilerden 238 (%3,5) erkekte ve 1.368 (%21,8) kızda olmak üzere toplamda 1.606 (%12,4) kişide pozitiflik saptanmıştır. Taranan okul türlerine göre öğrencilerin dağılımı ve parazitlerin görülme yüzdesinin dağılımı da tablo 1'de verilmiştir. Verilerde her okulun ismine bir kod numarası verilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Baş biti görülme yüzdesi yönünden kızlar ile erkekler arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,001$). Kızlarda parazit görülme oranı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Sınıflara göre baş biti tespit edilme oranı tablo 3'de verilmiştir.

Sınıflar ile pozitif erkek değişkeni arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p=0,82$, $p>0,05$). Ancak sınıflar ile baş biti tespit edilen kızlar arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. ($p<0,001$). Tablo 3 incelendiğinde sınıf arttıkça parazit yüzdesi artmakta ancak 8. sınıfta parazit yüzdesi ortaokul dönemine göre azalmaktadır.

Okul türlerine göre parazit görülme yüzdesinin dağılımı da tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3 incelendiğinde AT1 kodlu okulda diğer okullara göre parazit görülme yüzdesi yüksek bulunmuştur.

TARTIŞMA

Ordu ili ilköğretim çocuklarında yapılan baş biti epidemiyolojisi çalışmasında öğrencilerin 238 (%3,5) erkek, 1.368 (%21,8) olmak üzere toplamda 1.606 (%12,4) öğrencide pozitiflik saptanmıştır. Çocukların saçları tarandığı için büyük bir kısmında nimf ve erişkin tespit edilmiştir. Yumurtaları tespit edilen çocuklardan birkaç örnek alındığı için boş yumurta olsa bile başka bir örneğinde nimf içeren yumurtalar gözlenmiştir. Yumurtanın boş olduğu öğrenciler ise negatif olarak değerlendirilmiş ancak aileye gerekli bilgi verilerek takip edilmesi gerektiği anlatılmıştır.

Pozitif olduğu tespit edilen her öğrencinin tedavisi verilmiş ve ilacı nasıl kullanmaları gerektiği anlatılmıştır. Tedaviden sonra hastalar kontrole çağrılmıştır. Kontrollerinde de yine saçları bit tarağı ile taranmış ve parazit saptananlara tekrar bir doz uygulanmıştır.

Elazığ’da Aksın ve ark (7) 2002 yılında altı merkez ve dokuz köy ilköğretim olmak üzere 2.277 öğrenciyi bit enfestasyonu açısından taramışlardır. Araştırmacılar 1.108 merkez ilköğretim öğrencisinin %11,0’inde ve 1.169 köy ilköğretim okulu öğrencisinin ise %17’sinde pozitiflik tespit etmişlerdir. Yine Yılmaz ve ark (8) 2007 yılında Elazığ ilindeki üç ilköğretim okulundan 448 öğrencide %5 oranında baş biti tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar paraziter enfeksiyonlarının görülmesi ile sosyoekonomik düzey arasında paralel bir ilişki saptamışlardır. Benzer olarak sunulan çalışmada

da sosyoekonomik düzeyi çeşitli olan ve öğrenci sayısı fazla olan okulda parazit görülme yüzdesi yüksek bulunmuştur. AT1 (Tablo 3) kodlu okulda diğer okullara göre parazit görülme yüzdesi yüksek bulunmuştur. Bu durum okulun öğrenci nüfusunun fazlalığından ve okuldaki ekonomik durum çeşitliliğinden kaynaklanmış olabilir.

Atambay ve ark (9) Malatya’da işitme engelliler ilköğretim okulunda 117 öğrencinin %5,1’inde pozitiflik bildirmişlerdir. Dursun ve arkadaşları da (10) Van’ın Erciş ilçesinde 2010 yılında 622 ilköğretim öğrencisinde %9,5 oranında baş biti tespit etmişlerdir. Iğdır’da Akkaş ve Taş Cengiz (11) merkezde dört ilköğretim okulunda 2.222 öğrenciyi baş biti açısından taramışlar %13,1 oranında parazite rastlamışlardır. Benzer çalışmalarda Akisü ve ark (12) 2003 yılında İzmir Narlıdere de 474 öğrencinin %27,4’inde, Karaman ve arkadaşları (13) 1999 yılında Aydın ilinde üç ilköğretim okullunda 2.634 öğrencinin %20,08’inde parazite rastlamışlardır. Yine Paysın (14) 1995 yılında 214 birinci sınıf öğrencisinin %34,1 inde parazite rastlamıştır. Sunulan çalışmada da birinci sınıf öğrencilerinin %12,81’inde baş biti belirlenmiştir. Ayrıca Sivas’ta ilköğretim okulu öğrencilerinde yapılan çalışmalarda 342 çocuğun %10,2’sinde (15) 178 çocuğun %9,49’unda (16) baş biti tespit edilmiştir. Sunulan bu çalışmada ise yukarıdaki çalışmalardan bazılarının (11, 15, 16) sonuçlarına benzer olarak %12,4 oranında *P. h. capitis* saptanmıştır. Bir çalışmada (14) birinci sınıf öğrencilerinde belirlenen baş biti oranının (%34,1) ise sunulan çalışmada saptanılandan (%12,81) yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum çalışmanın yapıldığı bölgeden ve ekonomik durumundan kaynaklanmış olabilir.

Sunulan çalışmaya benzer evrende de Yücel ve ark (17) İstanbul’un altı ilçesinden farklı sosyoekonomik düzeyde 13 ilköğretim okulunda 11.156 öğrencinin %18,5’inde parazite rastladıklarını bildirmişlerdir. Çalışmada da 11 anaokul, 8 ilkokul ve 7 ortaokulu taranmış ve 12.880 öğrencinin %12,4’ünde baş biti tespit edilmiştir. Sunulan çalışma ulaşılan kaynak bilgilere göre evreni en büyük çalışma olup merkez ilköğretim okullarının büyük bir çoğunluğuna ulaşılmıştır.

Tablo 1. Okul türlerine göre bas bitleri görülme yüzdesi, Ordu

KOD	Erkek	Erkek Yüzde	Kız	Kız Yüzde	Parazit Erkek	Parazit Erkek %	Parazit Kız	Parazit Kız %	Toplam Sayı	%
A1	661	50,84	639	49,15	28	4,23	79	12,36	1.300	8,00
KA1	301	51,63	282	48,37	17	5,64	24	8,51	583	3,59
B1	243	52,37	221	47,62	17	6,99	68	30,76	464	2,85
B2	251	52,18	230	47,81	14	5,57	74	32,17	481	2,96
H2	859	51,77	800	48,22	31	3,60	176	22,00	1.659	10,21
AL1	708	53,55	614	46,44	9	1,27	99	16,12	1.322	8,14
DU1	515	49,23	531	50,76	19	3,68	162	30,50	1.046	6,44
DU2	530	49,53	540	50,46	18	3,39	84	15,55	1.070	6,58
UA1	393	52,40	357	47,60	17	4,32	99	27,73	750	4,61
AO2	417	50,48	409	49,51	5	1,19	83	20,29	826	5,08
VB1	365	49,52	372	50,47	13	3,56	69	18,54	737	4,53
VB2	323	52,18	296	47,81	19	5,88	86	29,05	619	3,81
K1	343	50,44	337	49,55	10	2,91	64	18,99	680	4,18
K2	327	54,05	278	45,95	14	4,28	82	29,49	605	3,72
M1	287	49,65	291	50,34	12	4,18	45	15,46	578	3,55
M2	360	51,79	335	48,20	14	3,88	116	34,62	695	4,28
CU1	57	53,27	50	46,72	2	3,50	10	20,00	107	0,65
CU2	174	51,94	161	48,06	7	4,02	42	26,08	335	2,06
HC1	162	50,78	157	49,21	15	9,25	50	31,84	319	1,96
AT1	192	48,98	200	51,02	20	10,41	85	42,50	392	2,41
KO1	47	51,64	44	48,35	1	2,12	8	18,18	91	0,56
KO2	30	42,25	41	57,74	2	6,66	11	26,82	71	0,43
ML1	446	52,04	411	47,95	31	6,95	67	16,30	857	5,27
SDG1	349	53,44	304	46,55	18	5,15	55	18,09	653	4,02

Tablo 2. Sınıflara göre baş biti görülme oranı dağılımı, Ordu

Sınıf Kodu	erkek sayı	erkek yüzde	kız sayı	kız yüzde	parazit erkek	parazit erkek yüzde	parazit kız sayı	Parazit kız %	Toplam Sayı	Toplam %
Anasınıfı	661	50,84	639	49,15	28	4,23	79	12,36	1.300	8,11
1. sınıf	1024	49,85	1.030	50,14	42	4,10	162	15,72	2.054	12,81
2. sınıf	1010	50,95	972	49,04	40	3,96	198	20,37	1.982	12,36
3. sınıf	1064	52,13	977	47,86	51	4,79	219	22,41	2.041	12,73
4. sınıf	1118	52,98	992	47,01	48	4,29	241	24,29	2.110	13,16
5. sınıf	983	48,78	1.032	51,21	43	4,37	252	24,41	2.015	12,57
6. sınıf	788	52,46	714	47,53	27	3,42	191	26,75	1.502	9,37
7. sınıf	766	52,28	699	47,71	35	4,56	204	29,18	1.465	9,14
8. sınıf	812	52,15	745	47,84	35	4,31	172	23,08	1.557	9,71

Tablo 3. Okul türlerine göre bas bitinin görülme yüzdesi, Ordu

KOD	Toplam Parazit Görülme	Toplam Parazit Görülme	Toplam Sayı	Okul Türlerine Göre parazit görülme yüzdesi
A1	107	1.193	1.300	8,23
KA1	41	542	583	7,03
B1	85	379	464	18,31
B2	88	393	481	18,29
H2	207	1.452	1.659	12,47
AL1	108	1.214	1.322	8,16
DU1	181	865	1.046	17,30
DU2	102	968	1.070	9,53
UA1	116	634	750	15,46
AO2	88	738	826	10,65
VB1	82	655	737	11,12
VB2	105	514	619	16,96
K1	74	606	680	10,88
K2	96	509	605	15,86
M1	57	521	578	9,86
M2	130	565	695	18,70
CU1	12	95	107	11,21
CU2	49	286	335	14,62
HC1	65	254	319	20,37
AT1	105	287	392	26,78
KO1	9	82	91	9,89
KO2	13	58	71	18,31
ML1	98	759	857	11,43
SDG1	73	580	653	11,17

Ayrıca Öztürcan ve ark. (18) Sivas yetim yurdunda 6-14 yaş arası çocuklarda %3 oranında *P. h. capitis* infestasyonu tespit etmişlerdir. Oranın düşük oluşunu ise çocukların saçlarının kısa kesilmiş olmasına ve sağlık görevlilerinin zamanında müdahalesine bağlamışlardır. Araştırmalar arasındaki farklı sonuçların elde edilmesi çalışma bölgesinin sosyo ekonomik durumuna, araştırmanın evrenine ve taramanın yapıldığı döneme bağlanabilir.

P. h. capitis'ler hızlı hareket edebilmeleri nedeniyle hapisaneler, esir kampları, çocuk yuvaları, akıl hastaneleri ve taşıtlar gibi kalabalık yerlerde, çabuk yayılırlar. Parazit kaynakları da pediculustu insanlardır (1, 19).

Temizlenmenin daha zor olduğu şartlarda ve günlerde dünyanın her yerinde olduğu gibi Türkiye'de de özellikle okul çocuklarında sık olmak üzere *P. h. capitis* gündeme gelmekte ve kış aylarında güncelliğini

korumaktadır. Ayrıca yapılan araştırmalarda *P. h. capitis*'lerin uzun saçlı kızlarda kısa saçlı erkeklerden daha çok görüldüğü tespit edilmiştir (1, 19). Çalışma okullarda görülme yüzdesinin yüksek olması beklenen ilköğretim çocuklarında yapılmıştır ve oran beklenildiği gibi yüksek çıkmıştır. Ayrıca diğer çalışmalarla benzer olarak kızlarda görülme yüzdesi daha yüksek tespit edilmiştir (1, 9, 11, 20).

Çalışma kapsamında tarama sürecinde öğrencilerin ruh sağlığını bozucu iş ve işlemleri engellemek için

önleyici rehberlik hizmetleri verilmesinin faydalı olduğu görülmüştür.

Çalışma ile parazitin Ordu ili ilköğretim okullarında yaygınlığı belirlenmiş, tedavileri ve tedavi sonrası kontrolleri yapılmıştır. Ayrıca parazit ile savaşta kontrol programı oluşturularak etkili bir korunma stratejisi oluşturulmuştur. Bu amaçla öğrencilere ve çalışanlara parazitin bulaşma ve korunma yolları anlatılmış ve okul temizliğinin nasıl yapılması konusunda öneriler sunulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi, İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları, Yayın No: 15; 1995; p. 170-82, İstanbul.
2. Karaaslan S, Yılmaz H. Van İli Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği İlköğretim Okulu öğrencilerinde *Pediculus humanus capitis*'in yayılışı. Türkiye Parazitol Derg, 2014; 39: 27-32.
3. Frankowski BL, Weiner LB. Head lice. Pediatrics, 2002; 110: 638-43.
4. Başarlan F, Kaya ÖA, İnci M, Motor VK, Kaya S, Şen BB ve ark. Çocuk Nöroloji Polikliniğine başvuran hastalarda *Pediculus Capitis* görülme sıklığı. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 2014; 16 (1): 35-7.
5. Balcıoğlu İC, Kurt Ö, Limoncu ME, Ermiş VÖ, Tabak T, Oyur T, Muslu H ve ark. Okullarda düzenli aralıklarla gerçekleştirilen kontroller saç biti (*Pediculus capitis*) insidansını düşürmekte yeterli olabilir mi?. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2012; 18 (Suppl-A): A151-A154, 2012DOI:10.9775/kvfd.2012.6084.
6. Karaman Ü, Bozok ŞN, Ertürk E, Kaçmaz G, Uysal SC, Bingöl M, ve ark. Ordu İli Kökenli İlköğretim Okulu Öğrencilerinde *Pediculus capitis* yaygınlığının belirlenmesi. İnönü Üniv Sag Bil Derg, 2017; 6 (2): 1-3.
7. Aksın N, İlhan F, Aksın NE, 2000. Elazığ merkez ve köylerindeki ilköğretim okullarında bit enfestasyonunun yaygınlığı. Türkiye Parazitol Derg, 2002; 26(2): 195-8.
8. Yılmaz M, Korkmaz E, Karakoç S, Yaztürk Ş, Kizirgil A, Yakupoğulları Y. Elazığ'daki üç ilköğretim okulu öğrencilerinde ektoparazit ve bağırsak paraziti yaygınlığının araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 2007; 31: 139-41.
9. Atambay M, Karaman Ö, Karaman Ü, Aycan Ö, Yoloğlu S, Daldal N. 2007. Akşemseddin İşitme Engelliler İlköğretim Okulu öğrencilerinde bağırsak parazitleri ve baş biti görülme sıklığı. Türkiye Parazitol Derg, 2007; 31: 62-5.
10. Dursun N, Taş Cengiz Z. 2010. Van'ın Erciş ilçesinde baş bitinin yayılışı. Türkiye Parazitol Derg, 2010; 34: 45-9.
11. Akkaş Ö, Taş Cengiz Z. 2011. Iğdır İlinde bazı ilköğretim okullarında baş bitinin yayılışı. Türkiye Parazitol Derg, 2011; 35: 199-203.
12. Akısü Ç, Sarı B, Aksoy Ü, Özkoç S, Öztürk S. Nartidere'deki bir ilköğretim okulunda *Pediculus capitis* yaygınlığının araştırılması ve önceki sonuçlarla karşılaştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 2003; 27: 45-8.
13. Karaman G, Bozkurt E, Şendur N, Başak O. 1999. Aydın ilinde ilkokul çağındaki çocuklarda Pedikülozis kapitis sıklığı, Türkiye Klinikleri J Dermatol, 1999; 9: 18-21.
14. Payzın F. Sakarya Söğütü Sağlık Ocağı bölgesindeki ilkokul birinci sınıflarda baş biti prevalansı. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 1995; 15: 57-60.
15. Değertli S, Malatyalı E, Mumcuoğlu KY. Sivas'ta iki yatılı okulda baş biti yaygınlığı ve etkileyen faktörlerin belirlenmesi. Türkiye Parazitol Derg. 2013; 37: 32-5.
16. Özçelik S, Değertli S, Aslan A. Sivas Alahacı Köyü İlköğretim Okulu Öğrencilerinde *Pediculus* yaygınlığının araştırılması. Türkiye Parazitol. Derg. 2006;30:184-6.
17. Yücel A, Çalısır B, Polat E, Aslan M, Ünver AC, İstanbul'un 6 ilçesinde ilkokul çocuklarında bitlenme durumunun araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 1994; 18(4):492-7.
18. Öztürkcan S, Özçelik S, Saygı G, Özçelik S. A research on the spread of scabies and pediculus humanus among the children at Sivas Orphanage. Türkiye Parazitol Derg, 1993; 17(2): 42-6.
19. İlhan F, Budak S. İzmir-Karşıyaka'da bir ortaokul ve dört ilkokulun öğrencileri arasında *Pediculus humanus capitis*'in yaygınlığının araştırılması ve iki yıl önce yapılan tarama sonuçları ile karşılaştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 1994; 18(4):485-91.

Ankara ve Konya illerine ait suların organoklorlu ve organofosforlu pestisitler yönünden değerlendirilmesi

Evaluation of organochlorine and organophosphate pesticides of waters in Ankara and Konya

Figen DEMLİ¹, Günnur ORHAN², Zahide Esra DURAK¹, Hüseyin İLTER¹

ÖZET

Amaç: Pestisitler; tarımsal üretimi olumsuz yönde etkileyen böcekler, kemiriciler, funguslar ve yabancı otlar gibi zararlılara karşı kullanılan kimyevi maddelerdir. Suya taşınımı ise püskürtülmeleri esnasında etrafa yayılmaları, uygulandıkları topraktan suya sızma/süzülme, kaza ile yere dökülen kimyasalın topraktan, yağın yağmurun etkisi ile yüzey sularına karışması ile mümkün olduğundan ölçülmesi ve izlenmesi önem taşımaktadır. Son yıllarda, dünya kamuoyunda pestisitlerin çevreye etkileri üzerine yoğun bir ilgi artışı olmuştur. Bunun başlıca sebebi dünyanın birçok ülkesinde kullanımı yasak olan organoklorlu pestisitlerin çevredeki kalıntılarının artması ve bu maddelerin insan ve hayvan sağlığına önemli ölçüde zararlı olduklarının anlaşılmasıdır. Bu nedenle pek çok ülkede pestisitlerin üretim ve kullanımına ilişkin katı yasal denetimler getirilmiştir. Bu çalışmada; Ocak 2012-Aralık 2013 tarihleri arasında Ankara ve Konya illerine ait içme-kullanma, kaynak ve doğal mineralli sulardaki organoklorlu ve organofosforlu pestisitlerin miktarının sıvı-sıvı ekstraksiyon ve gaz kromatografisi (GC) yöntemi ile belirlenmesi ve belirlenen sonuçların İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik ve Doğal Mineralli Sular Hakkında Yönetmelik'te belirtilen

ABSTRACT

Objective: Pesticides are chemicals which used against harmful insects such as insects, rodents, fungi and weeds that affect agricultural production in a negative way. It is important to measure and monitor because of chemicals are transferred to water by spread around during spraying, infiltration/infiltration from the soil from which they are applied, accidentally spilled chemicals into the soil mixed with falling rain. In recent years, there has been a heightened interest in the environmental impact of pesticides in the world public opinion. The main reason for this is the increased residues of organochlorine insecticides, which are prohibited for use in many countries of the world, and that these substances are considerably harmful to human and animal health. For this reason, in many countries strict legal controls on the production and use of pesticides have been introduced. In this study aimed that determination of the amount of organochlorine and organophosphorus pesticides in drinking-use, spring and natural mineral waters of Ankara and Konya provinces between January 2012 and December 2013 by liquid-liquid extraction and gas chromatography (GC) method, and the results are determined according

¹Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Çevre Sağlığı Daire Başkanlığı, Ankara

²Gazi Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Figen DEMLİ

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cd. No: 55 06100 Sıhhiye, Ankara - Türkiye

Tel : +90 532 682 21 24

E-posta / E-mail : figen.demli@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 07.11.2017

Kabul Tarihi / Accepted : 22.09.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.05025

Demli F, Orhan G, Durak ZE, İlter H. Ankara ve Konya illerine ait suların organoklorlu ve organofosforlu pestisitler yönünden değerlendirilmesi.

Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 391-398

mevzuat limitlerine uygunluğu yönünden incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Ankara (625) ve Konya (441) illerine ait toplam 1066 adet su numunesinde sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile organoklorlu ve organofosforlu pestisitlerin miktarları gaz kromatografisi (GC) yöntemi ile belirlenmiştir. GC cihazında elektron yakalayıcı (ECD), azot fosfor (NPD) ve fosforlu ve kükürlü (PFPD) detektörlerinden yararlanılmıştır. Ayrıca kapiler kolon (VF-5ms, 30 m 0,25 mm 0,25µm; optima 5,30 m 0,32 mm 0,25µm) ve taşıyıcı faz olarak helyum kullanılmıştır. Değerlendirmede kullanılan mevzuat ve pestisit limiti ise “İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik” ile “Doğal Mineralli Sular Hakkında Yönetmelik” kapsamında her bir pestisit için olması gereken azami mevzuat sınır değeri 0,1 µg/L olarak ifade edilirken pestisit parametrelerinin toplamı azami mevzuat sınır değeri için belirlenen değer 0.5 µg/L’dir.

Bulgular: Yapılan çalışmada; analizi yapılan su numunelerinde bulunan pestisit konsantrasyon değerleri belirtilen mevzuat sınırının altında tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmada analizi yapılan su numunelerinde bulunan pestisit konsantrasyon değerleri 0,1 µg/L olan mevzuat limit değerinin altında tespit edilmiştir. Sonuç olarak, çalışılan su numunelerinde halk sağlığını tehdit eden miktarlarda pestisit bulunmadığı saptanmıştır. Analiz edilen numunelerde mevzuat değerlerinin altında sonuçların elde edilmesi, belirtilen illerde pestisit kaynaklı kirleticilerin içme-kullanma, kaynak ve doğal mineralli sularına herhangi bir şekilde karışmadığını ve aynı zamanda pestisit uygulamalarının bahsi geçen suları kirletecek seviyede olmadığı anlamını da gösterebilmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda değişik illerden alınan numune çeşitliliği artırılarak hem iller bazında hem de bölgesel olarak içme-kullanma, kaynak ve doğal mineralli sularla pestisit kirliliği veya bulaşması hakkında daha fazla bilgi sahibi olunması sağlanabilir.

Anahtar Kelimeler: su, pestisit, GC-ECD, GC-PFPD, organoklorlu pestisit, organofosforlu pestisit

to Implementing regulation on waters for human consumption and natural mineral waters to investigate compliance with the legislative limits specified.

Methods: Amounts of organochlorine and organophosphorus pesticides were determined by gas chromatography (GC) method with liquid-liquid extraction in total of 1066 water sample belonging to Ankara (625) and Konya (441). Detectors of GC were electron capture (ECD), nitrogen phosphorous (NPD) and phosphorous and sulfur detector (PFPD). Also, capillary column was analysed (VF-5ms, 30m 0,25 mm 0,25µm; optima 5,30 m 0,32 mm 0,25µm). It was used helium as transporter phase. In this legislation and pesticide limit used of assessment; “Regulation on Waters for Human Consumption” and “Regulation on Natural Mineral Waters”. The maximum regulatory limit for each pesticide is 0.1 µg/L; the sum of the pesticide parameters is the value determined for the maximum legislative limit value; 0.5 µg/L.

Results: In the study; the pesticide concentration values in the water samples analyzed were determined to be below the specified regulatory limit.

Conclusion: The pesticide concentration values in the water samples analyzed in the study were below the legislative limit value of 0.1 µg/L. As a result, it has been determined that there are no pesticides in the amounts that threaten public health in the studied water samples. Obtaining results below the legislated values in the analyzed samples can also indicate that the pesticide induced pollutants do not interfere with the drinking-use, spring and natural mineral waters at the same time and that pesticide applications are not at the level to pollute the water. In future studies can be used to increase the diversity of samples taken from different species and to have more knowledge about pesticide pollution or contamination both on a literal basis and locally as drinking and using, spring and natural mineral waters.

Key Words: water, pesticide, GC-ECD, GC-PFPD, organochlorine pesticides, organophosphorous pesticides

GİRİŞ

Organoklorlu pestisitlerin kullanımı (örneğin DDT veya dieldrin) 1956 yılına kadar uzanmaktadır. Ancak özellikle uzun yarılanma ömrüne sahip olması ve canlılarda biyo-birikim yapması nedeniyle kullanımı 1976 yılında dünya çapında yasaklanmıştır (1). Pestisitlerin kullanımı sonrası bu kimyasalların kalıntıları hedef olmayan; toprak, su (içme-kullanma, kaynak ve doğal mineralli sular), bitki, çökelti gibi çevresel bileşenleri kirletebilmektedir (2). Ayrıca güçlkle degrede olabilen pestisitler halk sağlığı için tehdit unsuru oluşturmaktadır. BHC, dieldrin, endrin, heptaklor, endosülfan, DDT ve analogları, aldrin gibi pestisitler yağ dokusunda çözülebilmekte ve canlı organizmalarda uzun sürede birikerek toksik seviyelere çıkabilmektedir (3,4). Organoklorlu pestisitler psödo-hormon olarak etki edip endokrin sisteme zarar vermektedir ve pek çok sağlık problemine sebep olabilmektedir; Parkinson, teratojenik etkiler, davranış değişiklikleri, solunum yolu hastalıkları, erken ergenlik problemleri, kanser ve bağışıklık sistemi fonksiyon bozukluğu (5). Pestisitlerin içme sularındaki varlığı insan sağlığı üzerine artan risk faktörü olmaktadır. Pek çok çevre ile ilgili yasalarda su kalitesi ile ilgili düzenlemeler ve farkındalık oluşturulmuştur (6-10).

Pestisitler, çeşitli tarım ürünlerinin üretimi, taşınması ve depolanması sırasında ürün kaybına neden olabilecek zararlıların yok edilmesi, uzaklaştırılması, ürün verimliliğinin artırılması amacıyla kullanılmaktadır (11).

Dünya nüfusunun hızla artışına paralel olarak kullanılabilir tarım alanlarının gün geçtikçe azalması pestisit kullanımının önemini artırmaktadır. Tarımsal arazilerinin ıslah ve gübreleme gibi çalışmalar yanında, temel besin kaynaklarındaki verim kaybını engellemek amacıyla çeşitli zararlılara karşı açılan savaş da önemli bir yer tutmaktadır. Verim kaybına neden olan zararlılar için yürütülen fiziksel ve

biyolojik savaş uzun, zahmetli ve masraflı olduğu için daha çabuk ve etkin bir yöntem olarak kimyasal savaş ülkemizde de öncelikle uygulanmaktadır (12). Kimyasal savaşta pestisit olarak bilinen tarım ilaçlarının kullanımı önemli bir yer tutmaktadır.

Kısa sürede etki göstermesi ve kullanımının kolay olması nedeniyle, pestisit kullanımı en çok tercih edilen yöntemdir. Hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı farklı zirai mücadele yöntemleri arasında, %95'in üzerinde bir paya sahip olan kimyasal mücadele bugün de geçerliliğini korumaktadır. Pestisitlerin kullanılmadığı durumlarda ürünlerde %60'lara varan oranlarda kalite ve verim düşüklüğü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, ürün kaybına sebep olan zararlı organizmaları kontrol etmek amacıyla tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, ülkemizde de bitki koruma ürünlerinin kullanılması kaçınılmazdır (9).

Zararlılara karşı yapılan ilaçlamalar sonucunda pestisitlerin yağmur suyu ve rüzgârla taşınması nedeniyle su kaynakları (içme-kullanma, kaynak ve doğal mineralli sular) kirlenmektedir. Diğer yandan, pestisitlerin bilinçsizce ve aşırı kullanımı da zaman içinde toprağı çoraklaştırmakta ve yine doğal çevrim ile gerek su kirlenmesi ve gerekse diğer etkileri ile olumsuzluklar yaratmaktadır.

Bu sebepler neticesinde pestisit kaynaklı kirliliklerin ve kalıntı düzeylerinin izlenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu amaçla pestisit miktar tayinine yönelik pek çok yöntem geliştirilmiştir. Birden fazla pestisiti aynı anda analiz edebilen ve eser miktardaki pestisit düzeylerine kadar inebilen kromatografik yöntemler (GC-ECD, GC-PFPD, GC-NPD, GC-MS, LC-MS) özellikle tercih edilmektedir (1,4,6, 13-15).

Bu çalışmada; Ocak 2012-Aralık 2013 tarihleri arasında (1.066 adet su numunesi) Ankara ve

Konya illerine ait içme-kullanma suları, kaynak suları ve doğal mineralli sulardaki organoklorlu ve organofosforlu pestisit düzeyleri sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulanarak ve gaz kromatografisi (GC) yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçların İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik ve Doğal Mineralli Sular Hakkında Yönetmelik'te belirtilen mevzuat limitlere uygunluğu yönünden incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Gereç

Ocak 2012 - Aralık 2013 tarihleri arasında Halk Sağlığı Kurumu'na bağlı laboratuvara gönderilen, Ankara (625 adet) ve Konya (441 adet) illerinden gelen toplam 1.066 adet içme-kullanma suları, kaynak suları ve doğal mineralli su örnekleri organoklorlu ve organofosforlu pestisit miktarlarının belirlenmesi amacıyla çalışılmıştır. Bu çalışmada, aşağıdaki cihaz-ekipman, standart ve kimyasal maddeler kullanılmıştır.

Yöntem

Cihaz ve Kimyasallar

a) GC (Gaz Kromatografisi):

- GC-ECD (Elektron yakalayıcı detektörlü gaz kromatografi cihazı, Varian)
- GC-17A NPD (Azot fosfor detektörlü gaz kromatografi cihazı, Shimadzu)
- GC-PFPD (Fosforlu ve kükürtlü detektör, Varian)

b) Kolon:

- Kapiler Kolon (VF-5ms, 30 m 0,25 mm 0,25µm)
- Kapiler Kolon (Optima 5,30 m 0,32 mm 0,25µm)

c) Kullanılan Gazlar:

- Helyum (Taşıyıcı gaz)
- Azot (Make-up Gazı)
- Hidrojen (Make-up Gazı)
- Kuru hava tüpü (Make-up Gazı)

d) Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller:

- Aseton : CH₃COCH₃ (Gradient grade)
- Diklormetan : CH₂Cl₂ (Gradient grade)
- n-Hegzan : CH₃(CH₂)₄CH₃ (Gradient grade)
- Sodyum klorür: NaCl (saf)
- Sodyum sülfat : Na₂SO₄ (saf susuz)

e) Standart Çözeltisi:

Organoklorlu pestisitler: HCB, Alfa-HCH, Gamma-HCH, heptaklor, aldrin, heptaklorepoksit, dieldrin, Alfa-endosulfan, Beta-endosulfan ve toplam DDT, atrazin ve simazin standartları

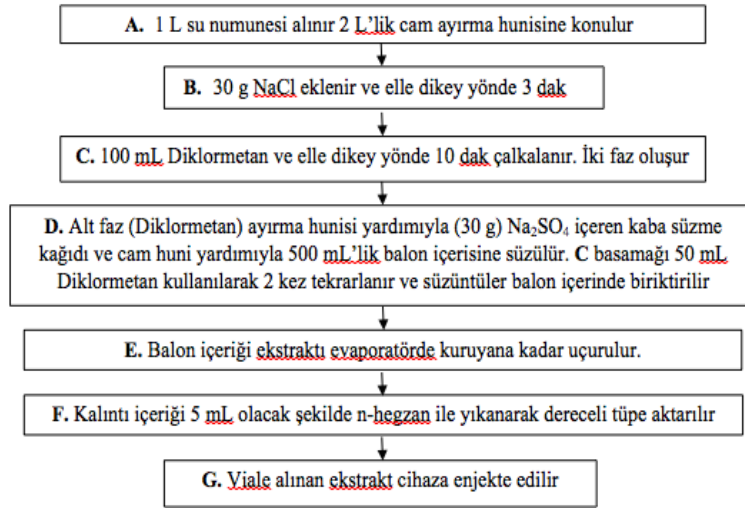
Organofosforlu pestisitler: Azinfos-metil, azinfos-etil, demeton, diazinon, disülfaton, ethion, malathion, parathion-etil, parathion-metil, methamidofos, klorpirifos-etil, klorpirifos-metilden, tebukanazol, dinikanazol ve metalaksil standartları.

Organoklorlu ve organofosforlu pestisit standartları 100 g/ml (ppb)'lik stok standart çözeltisi olarak hazırlanır, ana stok çözeltisi kullanılarak pestisit kalibrasyon standartları; 20, 40, 60, 80 ve 100 ppb (n-hegzan içinde) olacak şekilde hazırlanmıştır. Su numunelerin ekstraksiyon işlemi Şekil 1'de ve 20 ppb'lik organoklorlu pestisit karışımına ait kromatogram Şekil 2'de verilmiştir.

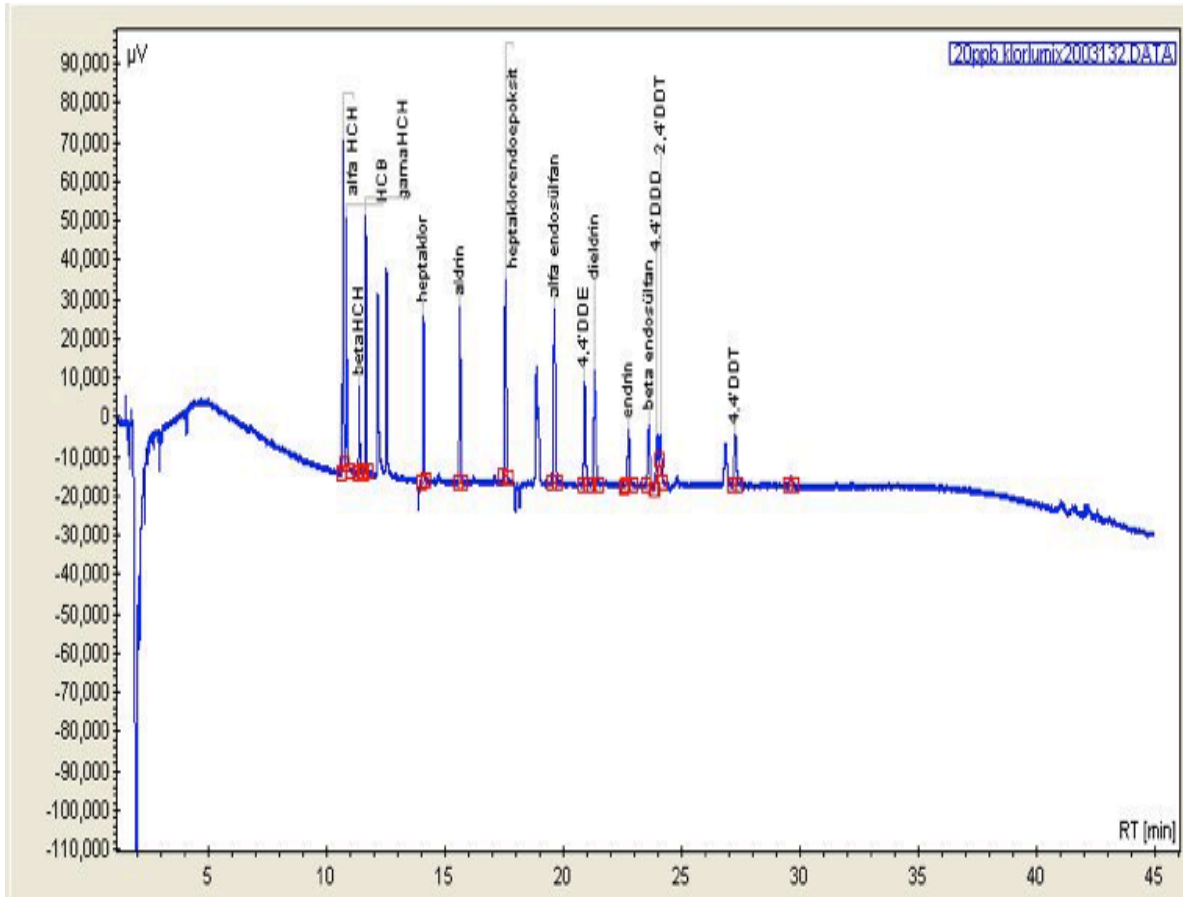
f) Hesaplama:

Kalibrasyon eğrisi 20, 40, 60, 80 ve 100 ppb standart konsantrasyon değerlerine karşı elde edilen eğri altı alan değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile oluşturulmuştur. Konsantrasyonu bilinmeyen analite ait kromatogramından alınan pik eğri altı alan değerinin kalibrasyon eğri denklemi üzerinden konsantrasyonu hesaplanmaktadır.

Her bir kalibrasyon çözeltisi analiz edilir. Kalibrasyon eğrisi (5 nokta, n=3) organoklorlu ve organofosforlu pestisit karışımları için oluşturulur.



Şekil 1. Su numunelerine ait ekstraksiyon işlemi



Şekil 2. 20 ppb'lik organoklorlu pestisit karışımına ait kromatogram

Her bileşik için elde edilen kalibrasyon eğri denklemi oluşturulmuştur:

$$y = a \cdot x + b$$

y = Sinyal değeri (alan)

a = Eğim

x = Kalibrasyon çözeltilisinin konsantrasyonu; x (ppm) µg/mL

b = Kesim noktası

Çalışılan her bir parametre için, standartların minimum en iyi piki verdiği değerlerle cihazın tayin limiti belirlenmiş (LOQ) 0,01 µg/L ve LOD değeri ise 0,003 µg/L (Sinyal/Gürültü=3) olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

Yapılan çalışmada; Ankara (625) ve Konya (441) illerinden toplam 1066 adet su numunesinde organoklorlu ve organofosforlu pestisit düzeyleri incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Çalışılan numunelerin %94'ünün içme-kullanma, %2'sinin doğal mineralli ve %4'ünün ise kaynak suyudur. Her numunede 10 adet organoklorlu ve 12 adet organofosforlu pestisit olmak üzere toplam 22 adet pestisit analizi yapılmıştır. Geri kazanım >%90-102 olarak bulunmuştur. 20 ppb (HCB, Alfa-HCH, Gamma-HCH, heptaklor, aldrin, heptaklorepoisit, dieldrin, Alfa-endosulfan, Beta-endosulfan ve toplam DDT, atrazin ve simazin) organoklorlu pestisit içeren standarda ait kromatogram Şekil 2'de verilmiştir. Ankara ve Konya illerinden gelen numunelerin tamamında, söz konusu pestisit miktarlarının ilgili mevzuatta belirtilen ve 0,1 µg/l olan limit değerlerinin altında kaldığından suların kullanıma uygun olduğu görülmüştür. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik'de toplam Pestisit düzeyi 0.5 µg/l (her bir pestisit için 0.1 µg/l) ve Doğal Mineralli Sular Hakkında Yönetmelik'de ise; sadece her bir pestisit için 0.1 µg/l mevzuat limit değeri olarak belirlenmiştir. Analizi yapılan numunelerin dağılımı 1002 içme-kullanma, 21

doğal mineralli ve 43 kaynak suyu şeklindedir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada; Ocak 2012 - Aralık 2013 tarihleri arasında, Ankara (625 adet) ve Konya (441 adet) illerinden gelen toplam 1.066 adet içme-kullanma, kaynak ve doğal mineralli sulardaki organoklorlu ve organofosforlu pestisit düzey analizleri gerçekleştirilmiştir. Pestisit analizi; sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile gaz kromatografisi (GC-ECD, GC-PFPD, GC-NPD) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada diklorometan ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Literatürde sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemlerinde solvent olarak asetonitril, hegzan, aseton, n-hegzadekan ve metanol kullanımı mevcuttur (1, 2). Genellikle diklorometan organoklorlu ve organofosforlu pestisit ekstraksiyonunda yüksek geri kazanım sağladığı için tercih edilmektedir (Geri kazanım >%90-102 olarak bulunmuştur). Solvent seçiminde önemli olan gereksinimler; yüksek geri kazanım sağlanması, sudan daha büyük yoğunluğa sahip olması, suda düşük çözünürlüğe sahip olması ve ekstrakte edilecek kimyasal ile yüksek zenginleştirme faktörüne (enrichment factor) sahip olması gerekliliğidir (16, 17). Ekstraksiyon işlemi esnasında tuz konulması (NaCl %0-18 aralığında) çözeltildeki iyonik gerilimi etkilemektedir. Suda ekstraksiyon solventinin çözünürlüğünü azaltırken organik ekstrakt hacminin artmasını sağlamaktadır (2). Ekstraksiyon süresi yaklaşık 55 dakika sürmektedir. Literatürde daha kısa süreli ekstraksiyon yöntemleri mevcut olup yapılan çalışmada geri kazanım değerinin diğer yöntemlere göre yüksek olması kullanılan yöntemin seçiminde etkili olmuştur (17). İçme suyu için belirlenen en üst limit değeri endosulfan sülfat ve metoksiklor için WHO'da 20 µg/l olarak belirtilmektedir. Yapılan çalışmada bulunan değerler WHO'da

tanımlanan değerlerin altında saptanmıştır (18). Ek olarak ülkemizde uygulanmakta olan İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik ve Doğal Mineralli Sular Hakkında Yönetmelik'te belirtilen mevzuat limitlerine göre sonuçların değerlendirilmesi yapılmış ve incelenen tüm pestisitler temelinde değerlerin mevzuat limit sınırları dahilinde olduğu

tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, çalışılan su numunelerinde mevzuat değerlerinin altında sonuçların elde edilmesi, sulardaki pestisit uygulamalarının kontrol altında olduğu ve halk sağlığı açısından sakınca teşkil etmediğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Yasser A, Chris MM. Evaluating organochlorine pesticide residues in the aquatic environment of the Lake Naivasha River basin using passive sampling techniques, *Environ Monit Assess*, 2018; 190 (349):1-12.
2. Keating MI. Tick control by chemical ixodocides in Kenya: A review 1912 to 1981, *Tropical Animal Health and Production*, 1983;15(1): 1-6.
3. Galassi S, Viganò L, Sanna M. Bioconcentration of organochlorine pesticides in rainbow trout caged in the River Po., *Chemosph*, 1996; 32(9): 1729-39.
4. Lancas FM, Rissato R, Galhiane MS. HPLC=UV determination of sodium acifluorfen in tropical fish. *J. Liquid Chromatogr, Rel. Tech.* 1997; 20(12): 1945-57.
5. Snedeker SM. Pesticides breast cancer risk: A review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environm, Health Perspect*, 2001;109: 35-47.
6. U. S. Environmental Protection Agency (EPA). Determination of organic compounds in drinking water by liquid-solid extraction and capillary column gas chromatography=mass spectrometry: Method 525.2, 2005; Cincinnati, USA.
7. "İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik"- 17 Şubat 2005 tarih ve 25730 sayılı Resmi Gazete ve "Doğal Mineralli Sular Hakkında Yönetmelik"- 01.12.2004 tarih ve 25657 sayılı Resmi Gazete.
8. Ahmadi F, Assadi Y, Milani Hosseini SMR, Rezaee M. Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector, *Journal of Chromatography A*, 2006; 307-12.
9. Turabi MS. Bitki koruma ürünlerinin ruhsatlandırılması. *Erciyes Üni Fen Bil Enst Derg*, 2010; 26 (2): 154-69.
10. Figueiredo L, Chiavelli L ve Costa W. Determination of concentration levels of organochlorine pesticides in water from the Mandacaru stream in Maringá-Paraná-Brazil employing gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical Letters*, 2013;46: 1597-606.
11. Dolu S. Medya ve Tüketim Çılgınlığı. Ankara: Çağdas Kitabevi, 1993; 7-11.
12. Kışlalıoğlu M, Berkes F. Ekoloji ve Çevre Bilimleri, Ankara: Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayını, 1985.
13. Berijani S, Assadi Y, Anbia M, Hosseini MRM, Aghae E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water, *Journal of Chromatography A*, 2006; 1123: 1-9.

14. Carrera EP, V´ictor ML, Parra AG, Gonz´alez-Mazo E. Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2007; 1170: 82-90.
15. Srivastava N, Kumari S, Nair K, Alam S ve Raza S K. Determination of organophosphorous pesticides in environmental water samples using surface-engineered C18 functionalized silica-coated core-shell magnetic nanoparticles-based extraction coupled with GC-MS/MS Analysis, *Journal of AOAC International*, 2017; 100(3):804-9.
16. Zhao Z, Zhang L, Wu J, Jin M ve Fan C. Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-microelectron capture detection (GC- μ ECD) for the determination of organochlorine pesticides in water samples, *Analytical Sciences*, 2011; (27): 547-53.
17. Berijani S, Sadigh M, Pournamdari E. Homogeneous liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples prior to gas chromatography-flame photometric detection, *Journal of Chromatographic Science*, 2016; 54(6): 1061-67.
18. WHO (2011). WHO guidelines for drinking-water quality. WHO chronicle, (Fourth Edition). [https://doi.org/10.1016/S1462-Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd edition, Addendum to Volume 1 - Recommendations, World Health Organisation, Geneva, 1998, 36 pages, Urban Water, 1999;1\(2\): 183](https://doi.org/10.1016/S1462-Guidelines%20for%20Drinking-Water%20Quality,2nd%20edition,Addendum%20to%20Volume%201-Recommendations,World%20Health%20Organisation, Geneva,1998,36%20pages,Urban%20Water,1999;1(2):183).

Aksaray, Nevşehir ve Niğde illerindeki ilçe okullarında Staflokokal enterotoksin ve *Bacillus cereus* ilişkili gıda kaynaklı salgın, 2015

Food-borne outbreak associated with Staphylococcal enterotoxin and *Bacillus cereus* in districts schools—Aksaray, Nevşehir and Niğde provinces, 2015

Fatma ÖZARSLAN¹, Pınar DUMAN¹, Serap ÇETİN-ÇOBAN¹, Gülşen BARLAS¹, Fehminaz TEMEL¹

ÖZET

Amaç: Aynı yemek firmasında 25 Mayıs 2015'te hazırlanan öğle yemeğinden yeyen 7 ilçeden 872 öğrenci hastanelere bavurmuştur. Hastaneye başvuranların 406'sında bulantı, kusma, baş dönmesi ve titreme şikayetleri olduğu belirlenmiştir. Bu inceleme, hastalığın kaynağının ve bulaş yolunun tespit edilmesi ve kontrol önlemlerinin alınması amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: Bu retrospektif kohort çalışmasında olası vaka tanımı; etkilenen okullarda; 25 Mayıs 2015 tarihinde; "Karın ağrısı ve bulantı ve kusma şikâyetleri olan kişiler" olarak belirlenmiştir. 2.713 öğrenci, 137 öğretmen, 22 okul çalışanı ile yüz yüze görüşülmüştür. Etkeni tespit etmek için okullardan ve yemek firmasından su ve gıda örnekleri, hastalardan ve yemek firması çalışanlarından 37 tane gaita numunesi alınmıştır. Aynı zamanda gıda firması çalışanlarından burun ve boğaz sürüntü örnekleri alınmıştır.

Bulgular: Öğle yemeği yiyen kişiler arasında atak hızı %52'dir (457/872). Vaka sayısı 25 Mayıs 2015 tarihinde pik yapmıştır ve salgın eğrisi salgının tek kaynaklı bir salgın olduğunu düşündürmektedir. İnkübasyon süresi ortalama 3,3±1,5 saattir. Vakalarda başlıca görülen semptomlar karın ağrısı (%84), bulantı (%83), kusma (%59), ateş

ABSTRACT

Objective: On 25th May 2015, 872 students of seven districts who had lunch prepared in the same food factory, applied to hospitals. It was found that 406 of them applied with nausea, vomiting, dizziness and chills. This investigation was conducted to identify the cause and mode of transmission, and to implement control measures.

Methods: It was defined a probable case in this retrospective cohort study as "a person with nausea, vomiting and abdominal pain in schools affected by outbreak onset on 25th May 2015". It was conducted face-to-face interviews of 2713 students, 137 teachers and 22 school workers. In order to identify the agent, it was taken water and food samples from schools and food factory, 37 stool samples from patients and food handlers. It was also collected nasal and throat swabs of food-handlers at the food factory.

Results: The attack rate among people who ate lunch was 52% (457/872). Number of cases peaked on 25th May 2015 and epidemic curve revealed a single-source outbreak. The mean incubation period was 3.3±1.5 hours. Main symptoms of cases were abdominal pain (84%), nausea (83%), vomiting (59%), fever (30%)

¹Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Fatma ÖZARSLAN

Cevizlidere Caddesi 1236 Sokak 4/10 Balgat 06100 Ankara - Türkiye

Tel : +90 505 890 69 33

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

Geliş Tarihi / Received : 06.03.2017

Kabul Tarihi / Accepted : 22.09.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.89847

Özarslan F, Duman P, Çetin-Çoban S, Barlas G, Temel F. Aksaray, Nevşehir, Niğde illerindeki ilçe okullarında Staflokokal enterotoksin ve *Bacillus cereus* ilişkili gıda kaynaklı salgın, 2015. Türk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 399-408

(%30) ve ishaldir (%29). Salçalı makarna yiyen olası vakaların yemeyenlere göre hastalanma riski yaklaşık altı kattır (RR: 5,6 %95 GA: 3,2-9,8). Okullardan alınan salçalı makarna örneklerinde *Staphylococcus aureus* enterotoksini ve *Bacillus cereus*, yemek firmasından alınan salçalı makarnada *Staphylococcus aureus* enterotoksini üremiştir. Gıda işleyicilerinden alınan burun, boğaz ve gaita numunelerinde ve hastalardan alınan gaita numunelerinde *Staphylococcus aureus* tespit edilmemiştir.

Sonuç: Bu salgın kontamine salçalı makarnadan kaynaklanmaktadır. İncelemede kontaminasyon kaynağı bulunamamıştır. Gıda firmasına kontrol ve önleme tedbirleri ve iyi hijyen uygulamalarının yerine getirilmesi önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Salgın, gıda kaynaklı hastalıklar, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, enterotoksin

and diarrhea (29%). Probable cases who ate pasta with sauce developed illness 6 times more than non-exposed. *Staphylococcus aureus* enterotoxin and *Bacillus cereus* was identified at pasta with sauce samples taken from schools and *Staphylococcus aureus* enterotoxin was identified at pasta with sauce samples taken from food factory. *Staphylococcus aureus* wasn't identified from the nose, throat and stool samples of food-handlers and stool samples of patients.

Conclusion: This outbreak was likely due to contaminated pasta with sauce. It wasn't found the contamination source the result of investigations couldn't reveal the contamination source. We recommended the food factory to implement control and prevention measures and good hygiene practices.

Key Words: Outbreaks, food-borne diseases, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, enterotoxin

GİRİŞ

Gıda kaynaklı hastalıklar dünyada büyük bir halk sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) gıda kaynaklı hastalıkları “su ya da gıda tüketimine bağlı bulaşıcı ya da toksik nitelikteki hastalıklar” olarak tanımlamaktadır (1).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde gıda kaynaklı hastalıkların neden olduğu yılda 325 bin hastane yatışı, 5 bin ölüm ve 76 milyon vaka olduğu tahmin edilmektedir (2). İngiltere'de ise gıda kaynaklı hastalıkların neden olduğu yılda 20 bin hastane yatışı, 500 ölüm ve bir milyon vaka olduğu tahmin edilmektedir (3). Bu konuda gelişmiş ülkelerde her yıl on binlerce vaka bildirim olmakla birlikte ülkemizde böyle bir çalışmanın olmadığı bilinmektedir.

Gıda kaynaklı salgınların üçte ikisinin nedeni bakterilerdir. Bunlardan en önemlileri *Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium* türleri, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes*'tir (4). Kontamine yiyecek

tüketiminden kaynaklanan gastroenteritlerin önde gelen nedeni ise *Staphylococcus aureus*'tur (1).

Stafilokokal besin zehirlenmesi (SBZ) dünyada halk sağlığı açısından büyük bir sorundur. ABD'de bildirilen gıda kaynaklı hastalıkların nedenleri arasında da en yaygın olanlarından biridir. Besin zehirlenmesi için enterotoksin üreten *S. aureus* ile kontamine olan gıdanın bakterinin üremesi için elverişli olması, uygun süre ve sıcaklık gereklidir. Gıdaların *S. aureus* ile kontaminasyonu insanlar, hayvanlar ve kullanılan malzemeler ile olur (5).

Bacillus cereus ilişkili besin zehirlenmelerinin bildirim çoğu ülkede yapılmadığı için insidans verileri oldukça sınırlıdır. Hastalığın hafif, kısa süreli ve kendini sınırlayan semptomlarının olması, gaita örneklerinin laboratuvarında nadiren analiz edilmesi bildirimini kısıtlamaktadır (6). *Bacillus cereus*; tahıllar, sebze, et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri gibi hem bitki hem de hayvan kaynaklı gıdaları kolayca

kirleterek insanlarda gıda kaynaklı hastalıklara yol açan ve çevrede yaygın olarak bulunan Gram pozitif bir bakteridir (7,8).

25 Mayıs 2015 tarihinde ilgili Halk Sağlığı müdürlükleri tarafından; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK) Erken Uyarı Cevap Birimi'ne Aksaray, Niğde ve Nevşehir illerinde 7 ilçede bazı okullarda öğle yemeği sonrasında toplam 406 kişinin bulantı, kusma, karın ağrısı ve az bir kısmının ishal şikâyetleri ile aynı gün saat 15.00'den itibaren sağlık kuruluşlarına başvurduğu bilgisi iletilmiştir.

Bu çalışma, aynı yemek firmasının öğle yemeği dağıtımını yaptığı üç ilin yedi ilçesinde bulunan 31 okulda meydana gelen ve 457 kişiyi etkilediği düşünülen gıda zehirlenmesi olayında kaynağın tespit edilmesi, koruma, kontrol önlemlerinin alınması ve bu tür halk sağlığı sorunlarının tekrar yaşanmasının önlenmesi amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Etkilenen kişi sayısı ve olayın toplum sağlığını etkileme riski taşınması nedeniyle THSK Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyolojisi (EUCSE) Daire Başkanlığı tarafından 27 Mayıs 2015 tarihinde olayın

araştırılması kararı alınmıştır. Salgın inceleme çalışmaları 28 Mayıs-2 Haziran 2015 tarihleri arasında EUCSE Daire Başkanlığı'ndan görevlendirilen personel ile üç ilin Halk Sağlığı Müdürlüğü personeli tarafından gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen tanımlayıcı bilgiler doğrultusunda okullarda ortaya çıkan salgın için "Salgın, okullarda öğle yemeğinde tüketilen yemek/yemekler nedeniyle ortaya çıkmıştır." hipotezi geliştirilmiştir.

Araştırmanın evreni okullarda öğle yemeği yiyen tüm kişiler olarak belirlenmiştir. Okullarda öğle yemeğine katılan kişilere ait bir liste olmaması nedeniyle retrospektif kohort çalışması yapılmıştır. Yemek firması aynı öğle yemeğini 60 okula dağıtmış, bunların 29'unda vaka görüldüğü bilgisi alınmıştır. Vakaların görüldüğü Aksaray ili; Güzelyurt ilçesinde iki okulda, Ortaköy ilçesinde beş okulda, Nevşehir ili; Derinkuyu, Acıgöl ve Gülşehir ilçelerinde birer okulda, Niğde ili; Ulukışla ilçesinde 13 okulda, Çiftlik ilçesinde iki okulda yüz yüze anket çalışması yapılmıştır. Zaman ve personel sıkıntısı nedeniyle vakaların görüldüğü 29 okul ve vaka sayısı beşin altında olan altı okul çalışmaya alınmamıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Aksaray, Nevşehir ve Niğde illerinde 25 Mayıs 2015 Tarihinde Şüpheli AGE Vakalarının Görüldüğü Okullar ve Çalışmaya Alınan Okulların Sayıları

		Yemek Dağıtımını Yapılan Okul Sayısı	Vakaların Görüldüğü Okul Sayısı	Çalışmaya Alınan Okul Sayısı
Aksaray	Ortaköy	18	10	5
	Güzelyurt	9	3	2
Nevşehir	Derinkuyu	5	1	1
	Acıgöl	6	1	1
	Gülşehir	7	1	1
Niğde	Ulukışla	13	13	13
	Çiftlik	2	2	2
Toplam		60	31	25

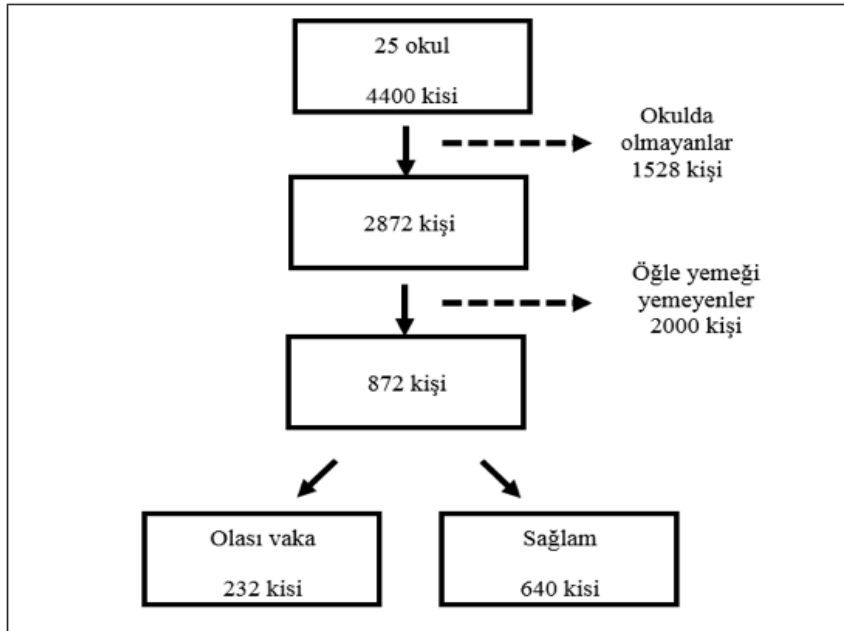
Şüpheli vaka tanımı; etkilenen okullarda; 25-26 Mayıs 2015 tarihlerinde “Bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal veya ateş şikâyetlerinden en az birine sahip olan kişiler”; olası vaka tanımı ise 25 Mayıs 2015 tarihinde; “Karın ağrısı, bulantı ve kusma şikâyetleri olan kişiler” olarak belirlenmiştir. Etkilenen ilçelerdeki Toplum Sağlığı Merkezi çalışanları tarafından 29 Mayıs- 2 Haziran 2015 tarihlerinde demografik özellikler, öğle yemeği yeme durumu, içme suyu tüketimi, şikâyet başlama tarihi, şikâyetler, sağlık kuruluşuna başvuru olup olmadığı bilgilerinin yer aldığı 19 sorudan oluşan bir anket formu uygulanmıştır. Yirmibeş okulda 2.713 öğrenci, 137 öğretmen, 22 okul çalışanı olmak üzere toplam 2.872 kişi ile görüşülmüş ve bu kişilerin 2000’inin yemek yemediği öğrenilmiştir. Kohort grubu “Vakaların görüldüğü okullarda 25 Mayıs 2015 günü öğle yemeği yiyenler” olarak alındığından analizler 872 kişi üzerinden yapılmıştır. Tanımlayıcı ve ileri analizler Epi Info 3.5.4. paket programı kullanılarak yapılmıştır. Veri analizi olası vaka tanımına uyan 232 hasta ile 640 sağlam kişiden oluşan toplam 872 kişi üzerinden yapılmıştır (Şekil 1).

Verilerin değerlendirilmesinde; yüzde dağılımları, atak hızı, olası risk faktörlerini değerlendirmek için %95 güven aralığı (GA), %5 hata payı, rölatif risk (RR), ileri analizlerde lojistik regresyon modeli kullanılmış, düzenlenmiş tahmini rölatif risk (TRR) verilmiştir.

28 Mayıs’ta Aksaray ilinde bulunan yemek firması ziyaret edilmiş ve firma yetkililerinden yemeklerin hazırlandığı yer, hazırlanma şekli, hazırlayan kişiler, yemek dağıtımı ve dağıtım şekli, dağıtımda kullanılan araçlarla ilgili bilgi alınmıştır.

Etkilenen okullardan ve yemek firmasından İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlükleri tarafından kıymalı bezelye, makarna ve ayran numuneleri alınmış, kıymalı bezelye ve makarna için Stafilokokal enterotoksin, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.*, *E. coli* O157; ayran için *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *E. coli* analizleri yapılmıştır.

Yemek firmasında çalışan yemekhane çalışanı ve servis şoförlüğü yapan 18 kişiden gaitada parazit aranması ile gaita, burun, boğaz sürüntü kültürleri yapılmıştır.



Şekil 1. Çalışmaya dâhil edilen vaka ve sağlamların akış şeması, Aksaray-Nevşehir-Niğde, 2015.

Vakalardan alınan on taze gaita örneği THSK Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı'nda çalışılmıştır. Bu numunelerde bakteriyel açıdan *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* 157, *V. cholera* 01-139, *Campylobacter*, *Aeromonas spp.*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia*, *Cryptosporidium* incelenmiştir.

Araştırma gıda kaynaklı salgını incelemek, risk faktörlerini hızla bulmak ve gerekli kontrol ve korunma önlemlerini alarak müdahale etmek amacıyla ve Türkiye Halk Sağlığı Kurumu adına yapıldığından etik kurul izni alınmamıştır. Ancak araştırmaya katılan kişilere çalışmanın amaçlarını açıklayan bir bilgi notu okunarak sözel izinleri alındıktan sonra anket uygulaması yapılmıştır.

BULGULAR

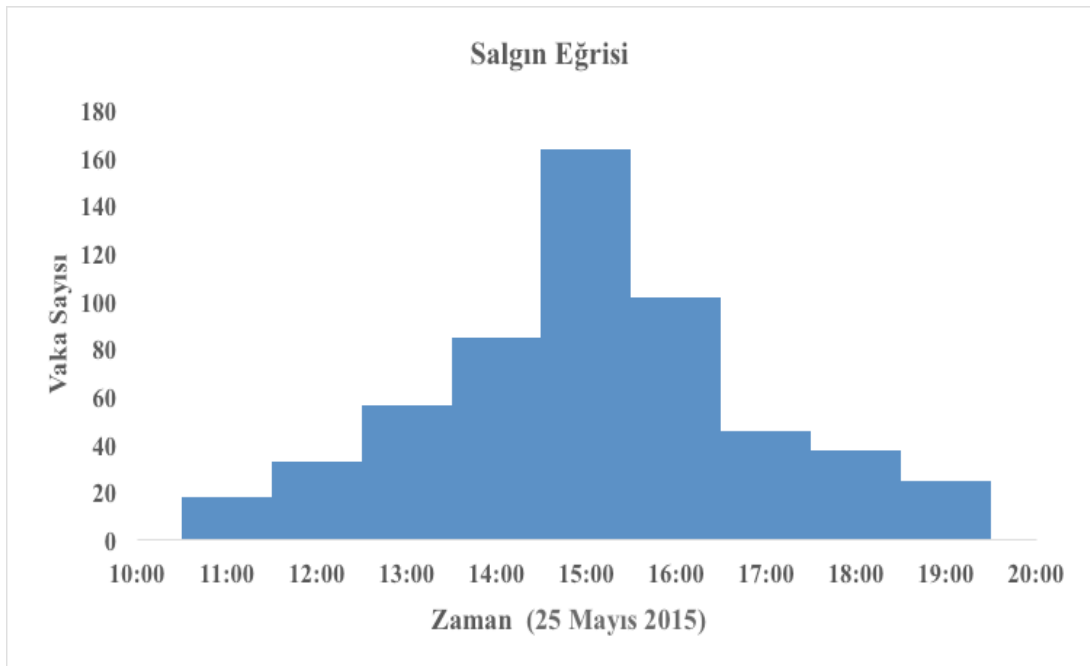
Öğle yemeği yiyenler içinde “herhangi bir şikâyeti olanlar” 457 kişidir. Atak hızı şüpheli vakalar için %52 (457/872), olası vakalar için ise %27 (232/872) olarak bulunmuştur. Atak hızlarının her üç ilde ve okullarda benzer olduğu belirlenmiştir.

Şüpheli vakalarda en sık görülen semptomlar karn ağrısı (%84), bulantı (%83), kusma (%59), ateş (%30) ve ishaldir (%29). Salgın eğrisi, ilk vakanın şikâyetlerinin yemeği yedikten hemen sonra başladığını göstermiştir. Şüpheli vaka sayısı saat 15.00'de pik yapmıştır ve salgın eğrisi salgının tek kaynaklı bir salgın olduğunu düşündürmektedir. İnkübasyon süresi ortalama $3,3 \pm 1,5$ saat, ortanca inkübasyon süresi 3,2 saattir (en az 0 dk.-en çok 7 saat) (Şekil 2).

Olası vakaların %49,6'sı erkek, %50,4'ü kadındır. Ortalama yaş $13,0 \pm 4,2$ yıldır. Ortanca yaş 13 yıldır (En küçük 7 yaş, En büyük 55 yaş). Vakaların %88,8'i 10-19 yaş grubunda yer almaktadır.

Olası vakaların %77,1'i şikâyetleri nedeniyle herhangi bir ikinci basamak sağlık kuruluşuna başvurmuştur. Sağlık kuruluşuna başvuran hastaların %76,5'i müşahede altında tedavi edilmiştir. Geri kalanlar ise ayaktan tedavi edilmiştir. Yatışı yapılan veya ölen vaka olmamıştır.

Yemek firmasının; Aksaray ilinde iki, Nevşehir ilinde üç, Niğde ilinde iki ilçede toplam 60 okula öğle



Şekil 2. Şüpheli vakaların semptom başlama saatine göre dağılımı, Aksaray-Nevşehir-Niğde, 25 Mayıs 2015.

yemeği dağıttığı, 25 Mayıs günü okullara dağıtılan yemeklerin aynı gün saat 03.00'de hazırlanmaya başlandığı ve paketlenme sonrası sabah 07.00-09.30 saatleri arasında okullara soğumasını engelleyen kaplar içinde taşındığı ve yaklaşık 6 saat süreyle 35-40°C sıcaklıkta bekletildiği öğrenilmiştir. Bekletilen yemeklerin 11.30-12.30 saatleri arasında öğrencilere servis edildiği öğrenilmiştir.

Tüm okullara aynı yemeklerin dağıtıldığı, menüde kıymalı bezelye, salçalı makarna ve ayran olduğu, dağıtılan ayranların aynı marka ve parti numaralı olduğu, dağıtım sırasında Ulukışla ilçesindeki üç okula ayran verilmediği fakat bu okullarda da vaka olduğu bilgisine ulaşılmıştır.

Etkilenen okullar ve yemek firmasından alınan gıda numunelerinden kıymalı bezelye, makarna ve ayran Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne uygun bulunmamıştır (Tablo 2). Kıymalı bezelye ve makarna örneklerinde Stafilokokal enterotoksin ve 7x10⁶ kob/g *B. cereus* üremiştir. Ayran örneklerinde ise 23 EMS/g *E. coli* saptanmıştır. Aşçı ve firma çalışanlarından alınan burun ve boğaz sürüntüsünde normal burun ve boğaz florası üremiştir. Gaita numuneleri araştırılan etkenler açısından

negatif bulunmuştur.

Öğle yemeğinde tüketilen yemeklerin yenme durumu ve hastalıkla ilişkisi incelendiğinde salçalı makarna yiyenlerde atak hızı %32,9; yemeyenlerde %5,9; kıymalı bezelye yiyenlerde atak hızı %28,2; yemeyenlerde %22,7; ayran içenlerde atak hızı %34,6; içmeyenlerde %28,4'tür. Salçalı makarna yiyenlerde yemeyenlere göre hastalanma riski yaklaşık altı kattır (RR:5,6 %95 GA:3,2-9,8). Kıymalı bezelye yemek ve ayran tüketmekle hastalık arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır (Tablo 3).

Kıymalı bezelyede de üreme olması ve ayranda bakteri saptanması nedeniyle lojistik modele bu gıdalar da dâhil edilmiştir. Kıymalı bezelye yeme ve ayran içme kontrol edildiğinde; salçalı makarna yeme TRR hastalarda sağlamlara göre yaklaşık sekiz kattır (OR_{adj} =7,9 %95 GA:4,3-14,5) (Tablo 4).

Hiç makarna yememek referans alınarak lojistik regresyonda doz yanıt ilişkisi de değerlendirilmiştir. Hastalarda yarım porsiyon makarna yemek makarna yemeyenlere göre yedi kat (OR_{adj} =7,2 %95 GA:3,7-14,1), bir porsiyon ve daha fazla makarna yemek makarna yemeyenlere göre 13 kattır (OR_{adj} =12,5 %95 GA:6,7-23,3) (Tablo 5).

Tablo 2. Laboratuvar numuneleri

Numune Tipi		Numune Sayısı	Sonuç
Firma Çalışanları	Gaita	18	Parazit görülmedi
			Üreme olmadı
	Burun sürüntüsü	18	Normal burun florası
	Boğaz sürüntüsü	18	Normal boğaz florası
Gıda	Kıymalı Bezelye	10	2: Staphylococcal enterotoksin
			3: <i>Bacillus cereus</i>
	Makarna	9	4: Staphylococcal enterotoksin
4: <i>Bacillus cereus</i>			
Ayran	5	4: <i>E.coli</i>	

Tablo 3. Öğle yemeğinde tüketilen yemeklere özel atak hızı ve hastalanma durumu, Aksaray-Nevşehir-Niğde, 2015

	Hasta		Sağlam		Sayı	RR	(%95GA)
	Sayı	AH%	Sayı	AH%			
Kıymalı Bezelye							
Yiyen	171	28,2	435	71,8	606	1,2	1,0-1,6
Yemeyen	59	22,7	201	77,3	260		
Salçalı Makarna							
Yiyen	218	32,9	444	67,1	662	5,6	3,2-9,8
Yemeyen	12	5,9	193	94,1	205		
Ayran							
İçen	170	34,6	322	65,4	492	1,1	0,9-1,5
İçmeyen	48	28,4	121	71,6	169		

Tablo 4. Hastalıkla ilişkili riskli gıdalar, Aksaray-Nevşehir-Niğde, 2015

	Hasta		Sağlam		OR _{adj}	GA%95	p
	Sayı	AH(%)	Sayı	AH(%)			
Kıymalı Bezelye	171	28,2	435	71,8	1,3	0,9-1,9	0,15
Salçalı Makarna	218	32,9	444	67,1	7,9	4,3-14,5	<0,001
Ayran	178	27,5	470	72,5	1,2	0,8-1,7	0,41

Tablo 5. Tüketilen makarna miktarının hastalanma durumu ile ilişkisi, Aksaray-Nevşehir-Niğde, 2015

Salçalı Makarna Miktarı	Hasta		Sağlam		OR _{adj}	%95 GA	p
	Sayı	AH(%)	Sayı	AH(%)			
Bir porsiyon ve daha fazla	144	43,8	185	56,2	12,5	6,7-23,3	<0,001
Yarım porsiyon	49	30,8	110	69,2	7,2	3,7-14,1	<0,001
Bir iki kaşık/çatal	25	14,4	149	85,6	2,7	1,3-5,6	0,006
Hiç yememiş (Referans)	12	5,9	193	94,1	-	-	-

TARTIŞMA

Niğde, Nevşehir ve Aksaray illerinde 31 okulda 25 Mayıs 2015 tarihinde görülen akut gastroenterit vakalarının sebebi; aynı tarihte ortak bir yemek firmasında hazırlanan ve öğle yemeği olarak sunulan *S. aureus* ve *B. cereus* ile kontamine salçalı makarna tüketimidir.

Birçok ülkede ulusal sağlık otoriteleri gıda kaynaklı salgınları aynı gıdanın tüketilmesinden sonra benzer hastalık bulgularının görüldüğü iki ve daha fazla vaka olarak tanımlamaktadır. Birçok vakanın bildirilmemesi nedeniyle gıda kaynaklı salgınlarının gerçek insidansı bilinmemektedir.

Bildirilen gıda kaynaklı hastalıkların üçte ikisinden bakteriler sorumludur. Gıda zehirlenmelerine neden olan bakteriler sıklık ve/veya hastalığın ciddiyeti açısından farklılık göstermektedir. Semptomlar gastrointestinal bozukluktan felç ve ölüme kadar değişiklik gösterebilir(1).

Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde semptomlar; kişinin toksine duyarlılığı, kontamine gıdada bulunan toksin miktarı, yenen gıdanın miktarı ve kişinin sağlık durumuna bağlı olarak ani başlangıçlıdır (9). Hastalık; toksinle kontamine olmuş gıdaların yenmesinden sonra 1-6 saat içinde ani ortaya çıkan bulantı, kusma, karın ağrısı ve ishal ile karakterizedir. Semptomlar 24-48 saat sürer, tam iyileşme 1-3 günde olur. Hastalık genellikle kendi kendini sınırlar.

B. cereus gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bir diğer bakteridir (10). *B. cereus*'un insanda iki farklı toksiniyle erken başlangıçlı "emetik tip" ve geç başlangıçlı "diyareik tip" olmak üzere iki farklı gastrointestinal hastalığa neden olduğu bilinmektedir. Hastalığın "emetik tipi" genellikle unlu gıdalar ve pişirilmiş pirinç ile ilişkilidir. 6-24 saat süren; hızlı başlangıçlı (1-5 saat) bulantı, kusma, kırgınlık ve bazı vakalarda ishal ile karakterizedir. Diyareik tipin inkübasyon süresi biraz daha uzundur (>6 saat; ortalama 12 saat). Her iki tipin enterotoksinlerin çoğalması ile ortaya çıktığı ve stafilokokal gıda zehirlenmelerine benzerlik gösterdiği bilinmektedir (11). Araştırmamızda ilk vakanın şikayetleri yemeği yedikten hemen sonra başlamıştır. En sık görülen semptomların karın ağrısı, bulantı ve kusma olması, semptom başlangıcının ani

olması ve inkübasyon süresinin $3,3\pm 1,5$ saat olması stafilokokal ve emetik tip *B. cereus* nedenli besin zehirlenmesini desteklemektedir. Öğle yemeğini yer yemez semptomları ortaya çıkan iki öğrencinin yemeği yedikleri saati tam olarak hatırlamadıkları düşünülmüştür.

Holmberg ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hastane başvuruları stafilokokal salgınlarda %10 olmasına rağmen fatalite hızı düşüktür (10). Araştırmamızda vakaların %77,1'i ikinci basamak sağlık kuruluşlarına başvurmuştur. Ölüm ise görülmemiştir. Bu salgında hastane başvurularının benzer stafilokokal salgınlara göre yüksek olmasının nedeni; semptomların ortaya çıktığı saatlerde birinci basamak sağlık kuruluşlarının mesai saatinin dolmak üzere olması, bazı ilçelerde de şikâyeti olanların acil servise başvurması için belediye hoparlörlerinden anons yapılması ve bu nedenle ikinci basamak sağlık kuruluşuna başvuruların artması olabilir.

Ehiri ve Morris gıda kaynaklı hastalıklarla ilgili birçok salgının gıda işlenmesindeki hatalardan kaynaklandığını belirtmiştir. ABD'de yapılan bir çalışmaya göre evlerde ve gıda sektöründeki kuruluşlarda meydana gelen gıda kaynaklı hastalıkların yaklaşık %97'sinin gıda sektöründe çalışanların yanlış uygulamalarından kaynaklandığı belirtilmektedir (12). Gıda sektöründe çalışanların ve kullanılan gereçlerin taşıdıkları mikroorganizmayla gıdayı hazırlanması, paketlenmesi ve dağıtımını sırasında kontamine etmeleri başlıca neden olarak görülmektedir. Stafilokokal gıda zehirlenmesi salgınları daha sonra pişirmeye tabi tutulmayacak gıdaların gıda işleyicilerinin el ve kollarındaki açık yaralar ya da gıda işleyicisinin gıdaların üzerine öksürme ya da hapşırması ile gıdayı *S. aureus* ile kontamine etmesi sonucunda olur (13). Günümüzdeki gıda endüstrisi rehberlerinde gıda işleyicilerinin vücutları veya giysileri ile gıdayı ve gıda hazırlama alanlarını kirletmemeleri gerekliliği belirtilmektedir. Özellikle stafilokokal gıda zehirlenmelerinin önlenmesinde gıda sektöründe çalışanların hijyen kurallarına uyması, gıda işleme uygulamalarının geliştirilmesi ve gıda işleyicilerinin eğitimi hedeflenmektedir (14). Araştırmamızda yemek firması çalışanlarında herhangi bir patojen saptanmamış ve kontaminasyona

neden olabilecek bir risk belirlenememiştir. Yemek firması çalışanlarından ancak 10 gün sonra örnek alınabilmiş, hijyen durumu ve yemek firması koşulları geç değerlendirilmiştir. İncelemede yemeklerin yapım, taşınma ve sunum aşamalarında çevresel örnekler alınamamış, yemek firması tarafından gıdaların pişirilmesi sırasında kullanılan malzemelerin tamamının tükendiği bildirilmiştir. Bu nedenle yemek hazırlama aşamasında kullanılan ve kontaminasyon kaynağı olabilecek gıda maddeleri belirlenememiştir. Yemek firmasında saklanan şahit numunelerden salçalı makarnada stafilocokal enterotoksinin belirlenmesi kontaminasyonun paketlemeden önce bir aşamada olduğunu düşündürürken; okullardan alınan örneklerde *B. cereus*'un da üremiş olması bu kontaminasyonun paketleme ve sonrasındaki bir aşamada olduğunu düşündürmektedir.

İnsan burun delikleri ve parmak uçları enterotoksijenik stafilocoklar için önemli kaynaklardır (15). Araştırmamızda yemek hazırlayan personelin kontaminasyon kaynağı olabileceği düşünülerek yemek firmasında çalışan 18 kişiden de örnek alınmıştır. Bir kişinin örnek alma aşamasından hemen önce işten ayrıldığı bildirilmiştir. Diğer personelin burun ve boğaz kültür sonuçlarında *S. aureus* ürememiştir. Bu nedenle yemekteki kontaminasyona neden olan kişi ya da bulaş yolu saptanamamıştır. Bir kişiden örnek alınamamış olması, bu kişinin kaynak kişi olabileceğini düşündürmektedir.

Ancak yemek firmasından alınan salçalı makarnada enterotoksinin saptanmış olması ve yemeğin dağıtıldığı bütün illerde okullarda vaka görülmesi gıdaların üretim aşamasında bu etkenle kontamine olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle yemek firması çalışanlarının yeniden hijyen eğitimi almaları sağlanmıştır.

Yemeklerin hazırlanması kadar transfer ve servis edilme işlemi de önemlidir. Özellikle teknolojinin ilerlemesi ve mutfakta sıcaklık kontrolünün sağlanması ile salgın oranları azalmaktadır (16, 17). Çalışmamızda yemek firmasında yapılan incelemede yemeklerin hazırlanma ve transferinde değişik kaplara aktarıldığı ve bu kaplarda servis sıcaklığında bekletildiği saptanmıştır. Gıdaların yeterince sıcak (600 °C [1400 °F] ve üstü) ya da yeterince soğuk

(7.20 °C [450 °F] ve altı) ortamda saklanmamasının bazı *S. aureus* suşlarının ürettiği enterotoksin miktarının gıdanın üzerinde artmasına ve bunları tüketen insanlarda gıda zehirlenmesine neden olduğu bilinmektedir (9). *B. cereus*'un ise 10-50°C'de gelişme gösterdiği, optimum gelişme sıcaklığının 28-35°C olduğu bilinmektedir. Emetik *B. cereus* toksini ise 121°C'ye 90 dakika dayanıklıdır (18). Araştırmamızda pişirilmiş yemeğin uygun olmayan koşullarda taşınması ve bekletilmesi kontaminasyona, bakterilerin ürettiği toksinlerin miktarının artmasına ve salgına yol açabileceği bilgisini desteklemektedir. Bu durumun düzeltilmesine yönelik olarak yemek firmasına yemek transferinde ve yemeklerin sabit sıcaklıkta uygun teknoloji ile servis edilmesi işlemi için önerilerde bulunulmuştur.

Amerikan Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi'ne göre, *S. aureus* ilişkili gıda zehirlenmesinin doğrulanması iki ya da daha fazla hastanın dışkı ya da kusmuk örneğinde aynı faj tipindeki organizmanın saptanması veya epidemiyolojik olarak ilişkili gıdalarda enterotoksinin tespiti veya epidemiyolojik olarak uygun alınmış gıdada 10⁵ kob/g bakterinin tespit edilmesiyle sağlanır (19). Araştırmamızda salçalı makarna ve kıymalı bezelye örnekleri stafilocokal enterotoksin parametresi açısından Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne uygun bulunmamıştır. *B. cereus* ile ilişkili gıda zehirlenmesinin doğrulanması ise iki veya daha fazla hastanın dışkı örneğinde patojenin izole edilmesiyle veya epidemiyolojik olarak uygun alınan bir gıda örneğinde 10⁵ kob/g bakterinin tespit edilmesiyle sağlanır. Araştırmamızda salçalı makarna örneklerinde 7x10⁶ kob/g bakteri tespit edilmiştir.

B. cereus ve *S. aureus* normal bağırsak florasında da bulunabileceği için hastalardan alınan gaita örnekleri *B. cereus* ve *S. aureus* açısından incelenmemiştir. Bu nedenle bakterinin sadece dışkıda aranması yanıltıcı sonuç verebilmektedir. Gıda kaynaklı salgınlarda emetik tip *B. cereus*'un etiyolojik ajan olarak teyidi için, hasta kusmuğu ile kontaminasyon şüphesi bulunan gıda aynı zamanda işleme alınmalıdır (19). Çalışmamızda ise vakaların kusmuk örnekleri alınamamıştır.

Sonuç olarak hem laboratuvar hem de epidemiyolojik kanıtlarla stafilocokal enterotoksin ve *B. cereus* ile kontamine salçalı makarna tüketiminin bu salgına sebep olduğu düşünülmüştür. Gıda zehirlenmesi genellikle hafif geçirilmekle birlikte ciddi rahatsızlıklara neden olabilen, oldukça sık karşılaşılan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu tür problemlerin tekrarlanmaması açısından toplu

gıda zehirlenmeleri durumunda; ilgili kurum ve kuruluşlarla işbirliği yapılması, kaynağı bulmaya yönelik çalışmaların hızla başlatılması, bulaşa neden olabilecek kişilerin kısa sürede sağlık kontrolünden geçirilmesi ve klinik örneklerinin alınması, gıda sektöründe çalışan personele yönelik düzenli hijyen eğitimlerinin verilmesinin sağlanması ve denetimlerinin yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Le Loir Y, Baron F, Gautier M, et al. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, 2003;2(1):63-76.
2. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* food-borne disease: An ongoing challenge in public health. *BioMed Res Int*. 2014:e827965.
3. FoodBorne Diseases Strategy [23 Şubat 2017]. <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/fds2015.pdf>.
4. Dorman V, Aslan S, Ceylan A, Küçük SN, Günel A, Sarı H, vd. Aynı fabrikadan yemek alan iki inşaat firması işçilerinde meydana gelen toplu besin zehirlenmesi. *Dicle Tıp Derg*. 2010;37(3). <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/dicletip/article/view/5000104293>.
5. Erdogan H, Arslan H. Nasal and pharyngeal carriage of *Staphylococcus aureus* among hotel staff and risk assessment. *Klimik* 2011;24(2):90-3.
6. Zealand AN. agents of foodborn illness. [kaynak 07 Şubat 2017]; <https://pdfs.semanticscholar.org/d9db/bbaadff43e041e790e3fa540afb94d4cb5d9.pdf>.
7. Larsen HD, Jørgensen K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *Int J Food Microbiol*. 1997;34(2):179-86.
8. Altaf, Musvi, S, Iqbal, Asif, Ahmad, Manzoor, Hussain, Syed Arshid, Ahmad, Rayaz. Study of enterotoxigenicity of *B. cereus* emetic strain by skin vasopermeability reaction in rabbits and poultry. 2012 [kaynak 07 Şubat 2017]; <http://ijpbs.net/vol-3/issue-2/bio/18.pdf>.
9. Labbé RG, García S. Guide to Foodborne Pathogens. John Wiley & Sons; 2001. 398 s.
10. Holmberg SD, Blake PA. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *JAMA*, 1984;251(4):487-9.
11. Doyle M. Foodborne Bacterial Pathogens. CRC Press; 1989. 818 s.
12. Clayton D, Griffith C, Price P, Peters A. Food handlers' beliefs and self-reported practices. *Int J Environ Health Res*, 2002;12(1):25-39.
13. NSW Food Authority. Health and hygiene for food handlers. 2012, 16 Şubat 2017. http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/retailfactsheets/health_hygiene_of_food_handlers.pdf.
14. Çakıcı N, Demirel Zorba NN, Akçalı A. Food industry employees and staphylococcal food poisoning. *Turk Bull Hyg Exp Biol*, 2015;72(4):337-50.
15. Mossel D a. A, Netten P van. *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. *J Appl Bacteriol*, 1990;69:1235-1455.
16. Todd EC. Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. *World Health Stat Q Rapp Trimest Stat Sanit Mond*, 1997;50(1-2):30-50.
17. Ageing AGD of H and. An outbreak of *Clostridium perfringens* and the enforcement of food safety standards. Australian Government Department of Health and Ageing; [07 Şubat 2017]. <http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/cda-cdi3204j.htm>.
18. Mikroorganizma Dnyasından. [23 Şubat 2017]. http://www.kalitesistem.com/ebulten/ocak2012/Mikroorganizma_Dnyasından.htm.
19. Guide to confirming an etiology in foodborne disease outbreak | Foodborne Outbreaks | Food Safety | CDC. [20 Şubat 2017]. https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/investigating-outbreaks/confirming_diagnosis.html.

Bayburt il merkezinde *Shigella sonnei* gastroenterit salgını, Ekim 2014

A *Shigella sonnei* gastroenteritis outbreak in Bayburt province, Turkey, October 2014

Burcu ÖZÜDOĞRU¹, Yavuz KAZIK², Mecit KIZILASLAN², Fehminaz TEMEL³

ÖZET

Amaç: Bayburt Halk Sağlık Müdürlüğü 03-11 Ekim 2014 tarihleri arasında 23 kişinin hastaneye yatırıldığını, 794 kişinin etkilendiği gastroenterit vakalarında hızlı bir artış olduğunu bildirmiştir. Bu inceleme, hastalığın kaynağının ve bulaş yolunun tespit edilmesi ve kontrol önlemlerinin alınması amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: Bu vaka-kontrol çalışmasında hastane kayıtları incelenmiştir. Şüpheli vaka 3-11 Ekim tarihleri arasında gastroenterit ilişkili ICD-10 kodu ile (K-52) tanı almış Bayburt ilinde yaşayan kişilerdir. Olası vaka günde üçten fazla ishali olan şüpheli vakalardır. Rastgele seçilmiş olası vakalar ve bunların komşuları olan kontrol grubu karşılaştırılmıştır (n=247/247). Düzenlenmiş tahmini rölatif risk (TRR_{adj}) su tüketimi ve hijyen alışkanlıklarını içeren lojistik regresyon modeli kullanılarak elde edilmiştir. Etkeni tespit etmek için 32 su numunesi ve 10 gaita numunesinden kültür yapılmıştır. Su depoları ve mahalle çeşmeleri incelenmiştir.

Bulgular: Atak hızı %13,0'tür (794/60980). En sık görülen semptomlar ishal (%100,0), karın ağrısı (%93,9), ateş (%81,0) ve bulantı'dır (%74,5). Sadece mahalledeki çeşme suyunun içme referans alındığında ve hijyen alışkanlıkları kontrol edildiğinde sadece

ABSTRACT

Objective: During 03-11 October 2014, Bayburt Provincial Health Directorate reported a sharp increase in gastroenteritis cases affecting 794 people, 23 hospitalized. This investigation was conducted to identify cause and mode of transmission and to implement control measures.

Methods: In this case-control investigation; ospital records were reviewed. A suspected case was a Bayburt resident diagnosed with a gastroenteritis-related ICD-10 code (K52) during 3-11 October. A probable case was a suspected case with diarrhea (≥ 3 /day). Exposures of randomly selected probable case-patients with neighborhood control-persons were compared (247: 247). Adjusted odd ratios (OR_{adj}) were obtained through logistic regression model including hygiene habits and water consumption. Culture methods to identify pathogens in ten clinical specimens and 32 water samples were used. Water storage tanks and neighborhood fountains were examined.

Results: Attack rate was %13 (794/60980). Main symptoms were diarrhea (%100), abdominal pain (%93,9), fever (%81,0) and nausea (%74,5). When drinking only fountain-water was taken as reference,

¹Halk Sağlığı Müdürlüğü, Samsun

²Halk Sağlığı Müdürlüğü, Bayburt

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Burcu ÖZÜDOĞRU

Adalet Mah. 100. Yıl Bulvarı No: 232 (Eski Doğum Evi Binası) 55060 Samsun - Türkiye

Tel : +90 506 471 88 04

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

Geliş Tarihi / Received : 13.03.2017

Kabul Tarihi / Accepted : 03.08.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.89847

Özüdoğru B, Kazık Y, Kızılaslan M, Temel F. Bayburt il merkezinde *Shigella sonnei* gastroenterit salgını, Ekim 2014. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 409-420

musluk suyu içme (73/247), vakalarda kontrollere göre 2,3 kat fazladır (TRR_{adj} 2,3,%95 GA 1,4-3,6). Üç gaita örneğinde *S. sonnei* tespit edilmiştir. Su deposundan alınan 6 su örneği Coliform (4-13 CFU/100ml), *Escherichia coli* (*E. coli*) (1-2 CFU/100ml), *Enterococcus* (2-5 CFU/100 ml) açısından pozitif bulunmuştur. Tüm örneklerde serbest klor seviyesi 0 (sıfır) ppm tespit edilmiştir. Çevresel incelemeler su depolarının fiziksel şartlarının (klorlama cihazı bulunmaması, paslanmış boru mevcudiyeti gibi) uygunsuz olduğunu göstermiştir.

Sonuç: Bu *S. sonnei* salgınının kontamine şebeke suyu kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Su depolarının onarımı ve tüm depolarda klorlama cihazı bulundurulması önerilmiştir. Halk Sağlığı eylemi olarak hijyen uygulamaları ve kaynatılmış su tüketimi konusunda halk bilgilendirmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Shigella sonnei*, salgın, vaka kontrol çalışması, halk sağlığı, içme suyu, gastroenterit

and after controlling for hygiene habits, drinking only tap water (73/247) was 2,3 times higher in case-patients (OR_{adj}=2,3, 95%CI: 1,4-3,6) compared with the control-persons (55/247). *S. sonnei* was detected in three stool specimens. Six water samples taken from water storage tanks were tested positive for total Coliform (4-13 CFU/100ml), *E. coli* (1-2 CFU/100ml), *Enterococcus* (2-5 CFU/100 ml). Free chlorine levels were 0 (zero) ppm in all samples. Environmental investigation showed that water storage tanks were in a bad condition (none water chlorination device, rusted infrastructure). *S. sonnei* was identified in three of ten clinical specimens.

Conclusion: This *S. sonnei* outbreak was likely due to drinking contaminated tap water. We recommended rehabilitation of the water storage tanks and providing chlorination devices for all tanks. As public health action, public were educated on hygiene practices and consumption of boiled water.

Key Words: *Shigella sonnei*, outbreak, case control studies, public health, drinking water, gastroenteritis

GİRİŞ

Akut Barsak Enfeksiyonları (ABE) viral, bakteriyel, paraziter patojenlerle birlikte toksinler, kimyasallar ve diğer enfeksiyöz olmayan etkenler nedeniyle meydana gelebilir (1). Tüm dünyada ve ülkemizde ABE'ler, hem çocukluk hem de erişkin dönemde ciddi morbidite ve mortaliteye neden olabilen, sağlık ve sosyal yönden maliyeti ağır olabilen bir halk sağlığı sorunudur (2). Dünyanın pek çok ülkesinde en fazla iki yaş altında olmak üzere çocuklar arasında hastaneye yatışın en önemli nedeni ishaldir (3).

Akut Barsak Enfeksiyonu salgınları Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde önde gelen sağlık sorunları arasında yer almaktadır (4). Önemli bir halk sağlığı sorunu olması sebebiyle ABD'de 50 eyaleti içeren bir sürveyans ağı ile izlenmektedir. Bu sistem NORS (Milli Salgın Raporlama Sistemi) olarak adlandırılmaktadır. Her yıl yaklaşık olarak 179 milyon kişi ABE'lerden

etkilenmektedir (5).

Ülkemizde de ABE ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır; bir-beş yaş grubundaki ölümlerin pnömoniden sonraki ikinci önemli nedeni ishallerdir (6).

Ülkemizde bakteriyel ishaller, akut enfeksiyöz ishallerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Sporadik ya da salgınlar şeklinde ortaya çıkarlar (3). Erken tespit edilmesi ve koruma ve kontrol önlemlerinin alınması önemlidir. Bu nedendir ki ülkemizde 'Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliği' gereğince ABE Sürveyansı kapsamında izlenmektedir (7).

Türkiye'de ABE ve ABE nedeniyle meydana gelen salgınlara ilgili faaliyetler Sağlık Bakanlığı'na bağlı merkez teşkilatlardan olan Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK) Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Programları

Başkan Yardımcılığı tarafından yürütülmektedir. Bu faaliyetler içerisinde vaka sayısı takibi, Hızlı Sinyal Tespit Sistemi (HSTS) ve salgınlara müdahale yer almaktadır.

THSK; Erken Uyarı-Cevap Birimi'nin olay bazlı sürveyans kapsamında basından aldığı bilgiye göre; 3 Ekim 2014 Çarşamba günü Bayburt ili Halk Sağlığı Müdürlüğü (HSM) Erken Uyarı-Cevap Birimi ile iletişime geçilmiş ve Bayburt Devlet Hastanesi'ne karın ağrısı, bulantı-kusma ve ishal şikâyetleri ile başvuruların sayısında artış olduğu doğrulanmıştır.

Salgının boyutunu belirlemek, salgının kaynağını ya da olası nedenlerini saptamak, gerekli koruma-kontrol önlemlerinin alınmasına katkıda bulunmak, gelecekte ortaya çıkabilecek salgınları önleyebilmek, Bayburt HSM çalışmalarına destek amacıyla salgın incelemesi yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmanın Hipotezi

Salgına neden olabilecek muhtemel kaynakların incelenmesi sonucunda ilde devam eden su-kanalizasyon çalışmaları ve uzun süreli su kesintileri, salgının il merkezinde yaygın olması nedeniyle "Bayburt il Merkezi'nde 3-11 Ekim 2014 tarihinde gerçekleşen salgının nedeni su kaynaklıdır." hipotezi geliştirilmiştir. Salgınla ilgili hipotezin test edilmesi için analitik epidemiyolojik çalışma yapılmasına karar verilmiştir.

Araştırmanın Yeri, Tarihi ve Tipi

Araştırmanın saha incelemesi, Bayburt ili merkez ilçesi'nde 19-24 Ekim 2014 tarihleri arasında yapılmıştır. Araştırma yaş grubuna göre eşleştirilmiş vaka-kontrol tipi epidemiyolojik bir araştırmadır.

Vaka ve Kontrollerin Tanımı

İlde görülen salgının, il merkezi genelinde yaygın olması ve vakalarla ilgili semptomların sık

görülen semptomlar olması nedeniyle vaka-kontrol çalışmasındaki vaka ve kontrolleri seçebilmek amacıyla bir şüpheli vaka tanımı yapılmıştır.

Şüpheli Vaka Tanımı "Bayburt il Merkezi'nde 3-11 Ekim tarihleri arasında ishal, bulantı, kusma, karın ağrısı şikâyetlerinden herhangi birisi olan ve 3-11 Ekim tarihlerinde Bayburt Devlet Hastanesi'ne başvuranlar" olarak belirlenmiştir (n=254). Olası Vaka Tanımı "Şüpheli vakalar içinden günde 3 veya daha fazla sulu dışkılama şikâyeti olanlar" olarak belirlenmiştir (n=247). Kontrol Tanımı "Bayburt il Merkezi'nde seçilen vakaların oturduğu evin sağ tarafında yer alan evde oturan ve 3-11 Ekim tarihlerinde ishal, bulantı, kusma, karın ağrısı şikâyetleri olmayanlar" olarak tanımlanmıştır. Kontrol seçimi yapılırken salgın incelemesinin ilk tanımlayıcı bilgileri değerlendirildiğinde yaş grubuna göre atak hızlarının farklı olduğu belirlendiğinden 1-4, 5-14, 15-34, >35 yaş eşleştirmesi yapılmıştır.

Veri Toplama Araçları ve Veri Toplama Yöntemi

Araştırma sırasında kullanılmak üzere; demografik bilgiler, klinik bilgiler (semptomlar, semptom başlama tarihi, hastane başvuruları), içme ve kullanma suyu tüketimi (içme, sebze-meyve yıkamak, genel temizlik için kullanılan su, su kesinti durumu, su kesintisinde kullanılan su, su kaynatma durumu), hijyen değerlendirmesi (dışarıdan eve gelince el yıkama, yemek yemeden önce ve sonra el yıkama, tuvaletten sonra el yıkama, sabun kullanımı) ile ilgili bilgilerinin ve risk faktörlerine yönelik bilgilerin yer aldığı 13 sorudan oluşan bir anket formu hazırlanmıştır.

Anketler, Toplum Sağlığı Merkezi (TSM) ve HSM'de çalışan bulaşıcı hastalıklar birimi çalışanlarından ikişer kişilik yedi ekip halinde toplam 14 kişi tarafından yüz yüze uygulanmıştır. Ekiplere sahaya çıkmadan önce anket ile ilgili eğitim verilmiştir. Saha ekipleri vakalar ve kontrollerden sözlü onam aldıktan sonra yüz yüze anket uygulamıştır.

Veri Temizliği, Girişi ve Veri Analizi

Anket formlarındaki veriler Office Excel programına girildikten sonra, önce veri temizliği yapılarak kontrol edilip belirlenen veri eksikliklerin tamamlanması için tekrar HSM ile görüşülmüş, eksikliklerin tamamlanması sağlanmıştır. Analizler EpiInfo3.5.4. ve SPSS 22 paket programları kullanılarak yapılmıştır. Veri analizlerinde olası vaka tanımı kullanılmıştır.

Örnek büyüklüğünün hesaplanmasında OpenEpi yazılımı (www.openepi.com) kullanılmıştır. Güven aralığı %95, Güç %80, vaka:kontrol oranı 1 olarak seçilmiş, kontrollerdeki maruziyet en az %80 olarak kabul edilmiş ve tahmini Rölatif Risk'de en az 2 katlık bir fark bekleyerek örneklem büyüklüğü 254 olarak hesaplanmıştır.

Verilerin değerlendirilmesinde; yüzde dağılımları, atak hızı, olası risk faktörlerini değerlendirmek için %95 güven aralığı (GA), %5 hata payı, t testi, tahmini rölatif risk (TRR) hesaplamaları, ileri analizlerde lojistik regresyon modeli kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi %5 olarak kabul edilmiştir.

Analizlerde incelenen değişkenler açısından yaş grupları benzer özellikler taşıdığından eşleştirilmiş analiz yapılmamıştır.

Alınan Laboratuvar Örnekleri ve Laboratuvar Analiz Yöntemleri

Gaita örnekleri THSK Ulusal Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları'nda Enterik Patojenler ve Parazitoloji Laboratuvarı'nda çalışılmıştır. Gaita örnekleri için Cary Blair besiyeri, incelemelerinde ise kültür ve real-time multiplex PCR Yöntemleri kullanılmıştır. Amip, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Dientamoeba* multiplex real time PCR; *Entamoeba histolytica* adezin antijen ELİSA; *Cryptosporidium* (DFA/ELISA), *Giardia* (DFA/ELISA) ; *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *E. coli* (O157), *Campylobacter* spp, bakteriyel kültür analizleri yapılmıştır.

Ana depolar, ana depoların dağıtım yaptığı su depoları, mahalle çeşmeleri ve şebeke suyundan

salgın sırasında ve sonrasında alınan örnekler Bayburt Halk Sağlığı Laboratuvarında Koliform ve *Escherichia coli* Membran Filtrasyon Metodu (TS EN ISO 9308-1) ve Enterococcus Membran Filtrasyon Metodu (TS EN ISO-7899-2) ile analizleri yapılmış ayrıca serbest klor ölçümlerine bakılmıştır. Araştırma ABE salgınına incelemek, hızla gerekli kontrol önlemlerini alarak müdahale etmek amaçlı ve THSK adına yapıldığından etik kurul izni alınmamıştır.

BULGULAR

Bayburt ilinde 3-11 Ekim 2014 tarihleri arasında ABE tanısı alan 993 hasta bildirilmiştir. Mükerrer kayıtlar çıkarıldıktan sonra, ilden 3-11 Ekim 2014 tarihleri arasında ABE şikâyetleri (karın ağrısı, bulantı-kusma ve ishal) ile sağlık kuruluşlarına 971 kişinin başvuru yaptığı ve sonrasında da yeni başvuruların azalarak devam ettiği öğrenilmiştir. Bu 971 kişinin 117'sinin çevre il ve ilçelerden olması ve merkez ilçede atak hızının %13 (794/60980) olması sebebiyle vaka-kontrol çalışması merkez ilçede ikamet eden ve hastane başvurusu olan 794 kişi arasından basit rastgele örnekleme yöntemiyle (254 şüpheli vaka), tüm mahallelerden seçilmiştir. Ulaşılan 254 şüpheli vakaya ve kontrolüne anket uygulanmış, Olası vaka tanımına uymayan altı kişi ve kontrolleri, kontrol tanımına uymayan bir kontrol ve vakası analizlerden çıkarılmıştır ve analizler, 247 vaka ile 1:1 oranında seçilmiş kontrolleri üzerinden yapılmıştır.

Vakaların %100'ünde ishal, %93,9'unda karın ağrısı, %81,0'ında ateş, %74,5'inde bulantı, %63,6'sında kusma, %2,8'inde baş dönmesi, halsizlik, iştahsızlık gibi bulguların olduğu görülmüştür (Tablo 1). Vakaların %91,5'inde sulu ishal, %47,4'ünde sarı-yeşil ishal, %28,3'ünde mukuslu ishal, %10,9'unda kanlı ishal görülmüştür.

Cinsiyete göre atak hızları benzerlik göstermektedir. Vakaların %55,9'unun, kontrollerin ise %52,6'sının kadın olduğu belirlenmiştir.

Vakalar tüm yaş gruplarında görülmüştür. Vakaların atak hızlarının 0-14 yaş grubunda (%3,0) ve 90 yaş

Tablo 1. Vakaların semptom dağılımı, Bayburt, 3-11 Ekim 2014

Semptomlar	Vaka	%
İshal	247	100,0
Karın ağrısı	232	93,9
Ateş	200	81,0
Bulantı	184	74,5
Kusma	157	63,6
Diğer*	7	2,8

*Baş dönmesi, halsizlik, iştahsızlık

üzeri kişilerde (%3,3) diğer yaş gruplarına göre biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Vakalar ve kontroller yaşa göre eşleştirilmiş olarak seçildiğinden benzer dağılıma sahip oldukları tespit edilmiştir. Vakaların %68,0'ı, kontrollerin ise %67,0'ı 14 yaş altı kişilerden oluşmaktadır.

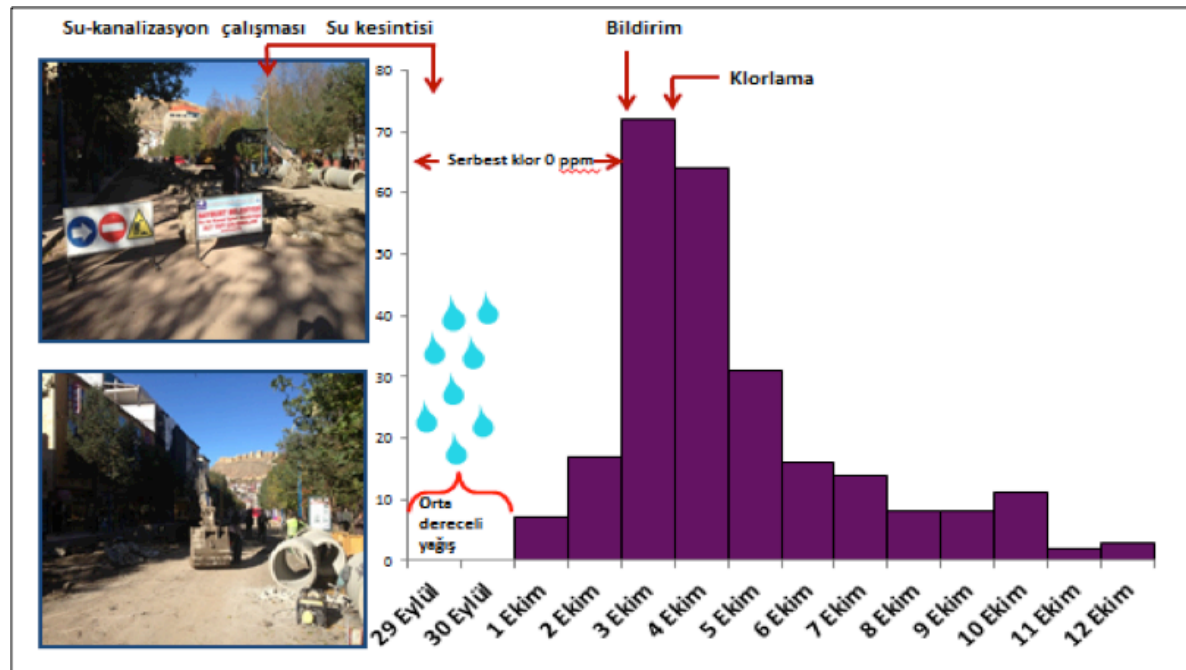
Hanede yaşayan ortalama kişi sayısı vakalarda $4,83 \pm 1,55$ (En Az-En Çok: 1-12) ve kontrollerde $4,51 \pm 1,39$ (En Az-En Çok: 1-8)'dur (t-testi: 2,37 p=

0,02).

Vakaların %97,6'sı meyve ve sebze yıkamak için musluk suyu kullanmaktadır. Bu düzey kontrollerde %96,0'dır (Ki-kare: 1,033 p=0,311). Vakaların ve kontrollerin %99,6'sı genel temizlikte musluk suyu kullanmaktadır.

Vakalarda, ilk semptomun 1 Ekim 2014 tarihinde başladığı belirlenmiştir. Vakaların Kurban Bayramı'nın ilk günü olan 3 Ekim 2014 tarihinde pik yaptığı saptanmıştır. Bayburt il Merkezi'nde 29 Eylül ve daha öncesi dönemde su ve kanalizasyon çalışmaları sırasında aralıklı su kesintileri olduğu tespit edilmiştir (Grafik 1).

Meteoroloji yetkililerinden alınan bilgiye göre 29-30 Eylül tarihlerinde ilde orta dereceli yağış olmuştur. Su analizi raporlarında 29 Eylül-3 Ekim tarihleri arasında içme sularında serbest klor seviyesinin sıfır olduğu tespit edilmiştir. Bildirimin yapıldığı 3 Ekim tarihinde HSM, Belediye ile iletişime geçerek suların klorlanmasını sağlamıştır (Grafik 1).



Grafik 1. Bayburt Devlet Hastanesi'ne Başvuran Olası Vakaların Şikâyet Başlama Tarihine Göre Dağılımı, Bayburt, 3-11 Ekim 2014

İçme suyu olarak sadece musluk suyu kullanımı, vakalarda kontrollere göre 1,5 kat fazladır (%95 GA: 1,0-2,2). Hijyen alışkanlıklarını değerlendirmek için sorulan dört sorudan herhangi bir tanesine olumsuz cevap verenlerin hijyen düzeyi düşük olarak diğerleri ise iyi hijyen alışkanlığına sahip olarak değerlendirilmiştir. Düşük hijyen vakalarda kontrollere göre 2,0 kattır (%95 GA:1,3-3,0) (Tablo 2).

Mahalle çeşme suyu içmek referans alındığında ve düşük hijyene sahip olmak kontrol edildiğinde sadece musluk suyu içmek vakalarda kontrollere göre 2,3 kattır (%95 GA:1,4-3,6) (Tablo 2).

Bayburt Belediyesi Su ve Kanalizasyon İşleri Müdürü ile yapılan görüşme sonucunda ilde kanalizasyon çalışmalarının 2014 yılı Mayıs ayından 2015 yılı sonuna kadar devam edeceği, kanalizasyon çalışmaları sırasında su kesintilerinin olduğu öğrenilmiştir.

Bayburt il Merkezi'nde içme ve kullanma suyu ihtiyacını karşılamak üzere üç kaynaktan beslenen bir toplama merkezi bulunmaktadır. Bu toplama merkezinin il merkezine uzaklığı yaklaşık 40 km'dir. Merkez ilçede mevcut bulunan üç derin su kaynağından 1. Kaynak, 2. Kaynak ve 3. Kaynak'tan gelen sular toplama merkezinde toplanmakta ve gaz klorlama sistemi ile klorlanmakta ve üç ayrı ana

depoya yönlendirilmektedir. Bu üç depoda klorlama yapılmamaktadır ve mahallelere dağılım bu depolar aracılığı ile yapılmaktadır. Klorlamanın toplama merkezi yakınında yaşayan bir kişi tarafından yapıldığı ve bu kişinin konuyla ilgili herhangi bir eğitiminin olmadığı ve düzenli olarak klorlama yapılmadığı öğrenilmiştir.

Bayburt il merkezinde mahallelere göre atak hızlarına bakıldığında atak hızlarının tümünde benzer olduğu ve vakaların tüm mahallelerde dağıldığı görülmüştür.

Salgın öncesi dönemde 14.01-21.07.2014 tarihleri arasında alınan 22 kontrol ve denetim izlem örneklerinin 16'sında farklı tarihlerde koliform bakteri, *Escherichia coli* tespit edilmiş, 4 örnekte de serbest klor seviyesi 0 (sıfır) ppm olarak bulunmuştur. Salgın sırasında 4-7.10.2014 tarihleri arasında 12 mahalle çeşme suyundan örnek alınmıştır. Alınan örneklerin yedisinde Koliform bakteri, iki'sinde *Escherichia coli* tespit edilmiş ve 12'sinde de serbest klor seviyesinin 0 (sıfır) ppm olarak bulunmuştur. Aynı tarihler arasında 14 farklı noktadan şebeke suyu örneği de alınmıştır. Alınan örneklerin beş'inde koliform bakteri tespit edilmiştir. Salgın incelemesi sırasında (Bayburt ilinde Merkez ilçede, 23.10.2014

Tablo 2. Vaka ve kontrollerde olası risk faktörleri, Bayburt, 3-11 Ekim 2014

	Vaka	%	Kontrol	%	OR (%95 GA)	OR _{ADJ} (%95 GA)
Mahalle Çeşmesi	68	27,5	100	40,5	0,6 (0,4-0,8)	Ref.
Şebeke suyu dışında herhangi bir su	49	19,8	51	0,6	1,0 (0,6-1,5)	1,4 (0,9-2,4)
Şebeke suyu ve herhangi bir su	57	23,1	41	16,6	1,5 (1,0-2,4)	2,0 (1,2-3,3)
Sadece şebeke suyu	73	29,6	55	22,3	1,5 (1,0-2,2)	2,3 (1,4-3,6)
Düşük hijyen	83	33,6	49	9,8	2,0 (1,3-3,0)	2,2 (1,5-3,4)

tarihinde) içme ve kullanma suyu için kullanılan üç ana depodan ve bu depolardan dağılımın yapıldığı üç su deposundan ve farklı izlem noktalarından su örnekleri alınmıştır. Bu örnekler Bayburt Halk Sağlığı Laboratuvarı tarafından değerlendirilmiştir. İl ziyareti sırasında alınan bu üç ana depo ve üç su deposu örneğinin altısında da Koliform bakteri, *Escherichia coli*, Enterococcus tespit edilmiş ve altısının da serbest klor seviyesinin sıfır olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 3).

İlde kaynakları belli olmayan 19 adet mahalle çeşmesi mevcuttur. Bu mahalle çeşmeleri il genelinde dağılım göstermektedir. Vaka artışının olduğu 4-7.10.2014 tarihleri arasında (Kurban Bayramı döneminde) Bayburt Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından 12 mahalle çeşmesinden örnek alınmış ve Bayburt Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda mikrobiyolojik inceleme yapılmıştır. Sonuçlar çalışılan analizler yönünden 17.02.2005 tarihli ve 25730 sayılı Resmi

Gazete'de yayımlanan İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik'e göre uygunsuz olarak gelmiştir. Kanalizasyon çalışmalarının uzun süredir devam etmesi ve uzun süreli su kesintisi olması sebebiyle; halk rutinde de kullandığı mahalle çeşmelerini daha sık kullanmaya başlamıştır. Aynı dönemde çeşme sularının kullanılmaması, suların kaynatılarak tüketilmesi yönünde halka duyuru yapılmış, belediye tarafından çeşmelerin üzerlerine 'Kirlidir, içilmez' şeklinde uyarı yazıları yazılmıştır.

Alınan 10 gaita örneği THSK Ulusal Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları'nda Enterik Patojenler ve Parazitoloji Laboratuvarı'nda amip, Giardia, *Cryptosporidium*, *Dientamoeba*, multiplex real time PCR; *Entamoeba histolytica* adezin antijen ELISA; *Cryptosporidium* (DFA/ELISA), *Giardia* (DFA/ELISA); *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *E. coli* (O157), *Campylobacter* spp bakteriyel kültür analizleri yapılmış üç tanesinde *S. sonnei* tespit edilmiştir

Tablo 3. Su ve gaita örnek sonuçları, Bayburt, Ekim 2014

Örnek Tipi	Zaman	Tarih	Örnek (n)	Test Sonuçları
Klinik örnekler				
Gaita*	Salgın Sırası	3-9 Ekim 2014	10	3: <i>Shigella sonnei</i>
Su Örnekleri				
Şebeke suyu	Salgın Öncesi	14 Ocak 2014 21 Temmuz 2014	22	16: Koliform bakteri (2-50 CFU/100ml) 16: <i>Escherichia coli</i> (1-6 CFU/100ml)
			4	4: 0 (sıfır) ppm Serbest klor
Mahalle Çeşme Suyu	Salgın Sırası	4-7 Ekim 2014	12	7: Koliform bakteri (2-30 CFU/100ml) 2: <i>Escherichia coli</i> (1-4CFU/100ml)
				12: 0 (sıfır) ppm Serbest klor
Şebeke suyu	Salgın Sırası	4-7 Ekim 2014	14	5: Koliform bakteri (1-40 CFU/100ml)
3 Ana Su Deposu 3 Su Deposu (Dağıtım yapılan)	Salgın Sonrası	23 Ekim 2014	6	6: Koliform bakteri (4-13 CFU/100ml) 6: <i>Escherichia coli</i> (1-2 CFU/100ml) 6: <i>Enterococcus</i> (2-3 CFU/100ml)
			6	6: 0 (sıfır) ppm Serbest klor

*Amip, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Dientamoeba* multiplex real time PCR; *Entamoeba histolytica* adezin antijen ELISA; *Cryptosporidium* (DFA/ELISA), *Giardia* (DFA/ELISA); *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *E. coli* (O157), *Campylobacter* spp, bakteriyel kültür

(Tablo 3).

TARTIŞMA

Bayburt il Merkezi'nde ortaya çıkan ABE salgını musluk suyu içme ve düşük hijyen alışkanlığı ile ilişkili bulunmuştur. Klinik örneklerden elde edilen laboratuvar analiz sonuçları, salgının *S. sonnei* salgını olduğunu düşündürmektedir. Su örneklerinde *S. sonnei* tespitine yönelik çalışma salgına geç gidilmiş olması ve salgın döneminden hemen sonra suların klorlanmasından dolayı yapılamamıştır. Daha sonra şebeke suyundan alınan su örneklerinin bir kısmında mikrobiyolojik kirlilik ve yetersiz klor seviyesi tespit edilmiştir.

Türkiye'de haftalık ABE sürveyansı 2005 yılında Mayıs-Ekim ayları arasında başlatılmış; 2010 yılında tüm yıl, tüm Türkiye'de, günlük sürveyansa geçilmiştir. TSİM (Temel Sağlık İstatistikleri Modülü) üzerinden verilerin günlük takibi yapılmaktadır (7). Bu sürveyans ABE'leri izlemek, olabilecek salgınları erken tespit etmek için kullanılmaktadır. Bu sürveyans kapsamında A09, K52, R11 ICD-10 tanı kodlarını alan hastalar değerlendirilmektedir. Bu değerlendirmeler sırasında ve sonrasında salgın incelemesi, etken tespiti, salgının kaynağı, gerekli kontrol ve korunma önlemleri alınması için çalışmalar yapılmaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri'nde takip edilen NORS sistemindeki ABE salgınlarının haftalık raporunda 2009-2010 yılları arasında salgın oluşturan enfeksiyon etkenleri sırasıyla Norovirüs, *Salmonella* ve *Shigella*'dır (4). Bununla birlikte Amerika'da 1971'den 2006 yılına kadar içme suyu kaynaklı salgınların nedenleri incelendiğinde %44'ünün *Shigella* kaynaklı olduğu ve tek patojen olarak izlendiği görülmüştür ve bu *Shigella* salgınlarının %34'üne *S. sonnei*'nin neden olduğu belirlenmiştir (8).

'İçme Suyu ile İlişkili Su Kaynaklı Hastalık Salgınları Sürveyansı' CDC (ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri) tarafından haftalık olarak yayınlanmaktadır. Bu raporunun 2011-2012 yılında yayınlanan kısmında içme suyu ilişkili salgınların su kaynaklarının ve sistemlerinin eksikliklerine bağlı

olarak ortaya çıktığı belirtilmektedir (9).

Yunanistan'da ABE sürveyans sistemi gelişmemiş olmasına rağmen farklı yıllarda tespit edilmiş dört su kaynaklı salgının nedeni *Shigella* olarak tespit edilmiştir (10). Su kaynaklı salgınlarda *Shigella* sık olarak tespit edilen etkenler arasında yer almaktadır.

Sağlık Bakanlığı Referans Laboratuvarlarında Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvarı Sürveyans Ağı (UEPLA)'na gönderilen örneklerin 2007-2011 yılında yapılan incelemelerine göre bakteriyel etkenler arasında en sık *Salmonella* bulunmaktadır, bunu *Shigella* ve *Campylobacter* izlemektedir. *Shigella* izolatları ise *S. sonnei* (%68,3), *S. flexneri* (%26,1), *S. boydii* (%3,1) ve *S. dysenteriae* (%1,6) olarak sero gruplandırılmıştır ve yılda 200-400 arasında vaka kaydedildiği görülmektedir (11). Bu veri, laboratuvarlara gönderilen örnekler üzerinden verilmektedir. Bu nedenle bütün ABE vakalarını kapsamıyor olabilir.

Shigella organizmaları için insanlar ve diğer primatlar doğal konakçısıdır. Bulaş kişiden kişiye temas yoluyla veya fekal-oral yol ile olmaktadır, ayrıca kontamine yiyecek, kontamine su ya da cinsel temas ile oluşabilir (12). Enfeksiyona 10'dan daha az organizma neden olabilir. *Shigella* kolaylıkla bulaşır ve kısa süreli seyahat sırasında da görülebilmektedir (12). Az sayıda organizmanın enfeksiyona neden olması hastalığın yayılımını artırmış olabilir. Salgının il genelinde görülmesi ve çok sayıda kişinin etkilenmiş olması kontamine olmuş su tüketimine işaret etmekle birlikte kişiden kişiye bulaş olabileceğini de düşündürmektedir.

Enfeksiyonun virülansının yüksek olması, o dönemdeki kalabalık koşullar ilde görülen bu salgında vaka sayısının bu kadar yüksek olmasını açıklayabilir. Ayrıca yine bu bulgu olayın su kaynaklı olduğu tezini de desteklemektedir.

Kalabalık koşullarda yaşayan kişiler, 5 yaş altı çocuklar ve daha genç çocuklar enfeksiyon gerçekleşmesi için 10'dan daha az organizmanın yutulmasının yeterli olması nedeniyle yüksek risk

altındadır (13) . Bu salgında da vakaların yarısından fazlası küçük yaş grubundadır. Beş yaş altı çocuklarda enfeksiyona yakalanma riskinin daha fazla olduğu 2012 yılında yayınlanmış olan 'Bulaşıcı Hastalıklar Raporu'nda (Red Book) da yer almaktadır (13).

Vakaların hanesinde yaşayan ve hastalanan kişi sayısı kontrollere göre daha fazladır, bu da kişiden kişiye bulaşın daha kolay olabileceğine de işaret etmektedir. Aynı hanede yaşayan kişilerin alışkanlıklarının benzer olması sebebiyle aynı tip su kullanıyor olma ihtimali yüksektir. Ayrıca salgının görüldüğü dönemin Kurban Bayramı tatiline denk gelmesi; bu dönemde ailelerin daha çok bir araya gelmesi, kalabalık ev içi ortamın bulunması gibi nedenlerle salgının boyutu artmış da olabilir.

Shigella'nın klinik belirtileri arasında ishal, yüksek ateş, karın krampları veya hassasiyet, idrar zorluğu veya mukoid dışkı (kan olabilir ya da olmadan) bulunmaktadır (14). Bayburt ilinde görülen bu salgında da vakaların çoğunda ishal görülmüştür; bu semptomu karın ağrısı ve ateş takip etmiştir. Vakalarda görülen ishal, karın ağrısı, ateş, bulantı semptomları genel şigelloz belirtileri ile benzerlik göstermektedir (12-14).

Shigella türleri kalın bağırsak tutulumu yaparak sulu veya gevşek dışkı ile seyreder (14). Bu salgındaki vakaların çoğunda sulu ishal görülmesi bu salgındaki etkenin *Shigella* olduğunu destekler niteliktedir.

Yunanistan'da 1971, 1988, 1990, 1996 yıllarında görülen dört *S. sonnei* kaynaklı su salgını birbiriyle karşılaştırılmış ve bu salgınlarda da vakalarda ishal, abdominal kramplar, ateş ve kusma görülmüştür. Kanlı ishal vakaların küçük bir bölümünde görülmüştür (10). Bayburt ilinde görülen ABE salgınında da vakalarda kanlı ishal yaklaşık olarak benzer düzeydedir, vakaların çoğunda sulu ishal vardır.

Ülkemizde 1989 yılında 10 ilin 13 merkezinde ishali çocuklarla yapılan bir çalışmanın sonucunda etken olarak %51 *S. flexneri*, %34 *S. sonnei* tespit edilmiştir. Ankara Üniversitesi Çocuk Hastalıkları Kliniği'nin 1995 yılında yapılan çalışmasında akut

ishal etkeni olarak %78 *S. sonnei*, %22 *S. flexneri* bulunmuştur (8). Sağlık Bakanlığı 2007-2011 yılı verilerine göre ise bu etken ishali hastalıklarda ikinci sırada yer almaktadır (11) .

Bizim çalışmamız ile benzer şekilde İspanya'nın Santa Maria de Palautordera şehrinde *S. sonnei*'nin neden olduğu bir salgınla ilgili olarak yapılan vaka-kontrol araştırmasında atak hızı 15 yaş altında diğer yaş gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur (14). Yine benzer şekilde Yunanistan'da G. Samonis ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptığı bir vaka kontrol çalışmasında etkilenen yaş grubu 5-12 yaş aralığındadır ve etkilenen yaş grupları bu salgındakine benzer özellik göstermektedir (15).

Bayburt ilinde görülen salgında ABE vakalarının cinsiyet dağılımı benzer bulunmuştur. Yunanistan'da 2000 yılında görülen *S. sonnei* kaynaklı su salgınında, yapılan tanımlayıcı bir çalışmada da benzer şekilde kadın, erkek cinsiyet arasında fark görülmemektedir (16). İspanya'nın Santa Maria de Palautordera şehrinde yapılan vaka-kontrol araştırmasında cinsiyete göre atak hızlarında anlamlı bir fark bulunmamıştır (14). Yine Yunanistan'da 1971, 1988, 1990, 1996 yıllarında görülen dört *S. sonnei* kaynaklı su salgını birbiriyle karşılaştırılmış ve bu salgınlarda da cinsiyet dağılımlarının benzer olduğu görülmüştür (10).

Shigella'nın inkübasyon süresi 1-7 gün arasında değişmektedir (13). THSK'nın yayınladığı Ulusal Mikrobiyoloji Standartları rehberinde inkübasyon süresi 2-6 gün olarak belirtilmiştir (11). Bu salgının 6 günden fazla sürmesi, klorlamanın vakaların pik yaptığı gün uygulanması nedeniyle olabilir. Klorlamanın yapıldığı tarih olan 3 Ekim'den sonra vaka sayısı hızla azalmasına rağmen, vaka görülmeye devam etmiştir. Bu, devam eden alt yapı çalışmaları nedeniyle etkene maruziyetin devam ettiğinin bir göstergesi olabilir.

Siirt ilinde 2008 yılında Sezen ve arkadaşlarının incelediği ishal salgınında ilde meydana gelen ABE salgınının, ildeki kanalizasyonun şebeke sistemine karışması sonucu meydana geldiği ve etkenin *Shigella*

olduğu sonucuna varılmıştır (17). Benzer şekilde Bayburt ilinde de görülen alt yapı çalışmaları şebeke sisteminde bir kontaminasyona neden olmuş olabilir.

Yunanistan'da Samonis ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptığı bir vaka kontrol çalışmasında birincil ve ikincil vakalar ayrı ayrı değerlendirilmiş, kişiden kişiye bulaş değerlendirilmiş ve salgın eğrisine bakıldığında ikincil vakaların suların klorlanmasıyla sonra da devam ettiği görüşmüştür (15). Bayburt ilinde yapılan bu çalışma sırasında ikincil vakalar değerlendirilmemiştir ancak, benzer şekilde klorlama işlemi sonrası vaka çıkmaya devam ettiği saptanmıştır. Bu durum kişiden kişiye bulaşa işaret edebileceği gibi suda devam eden kontaminasyonun da bir göstergesi olabilir.

Pons ve arkadaşları ABD'de ve Kanada'da görülen salgınları karşılaştırmışlar ve yarısının şebeke sistemi dışında kişilerin kendi hanelerinde kullandıkları su sistemleri (tank, kuyu gibi) ile ilişkili olduğunu görmüşlerdir. Aynı çalışmada 1970-2014 yılında raporlanan salgınların yarısından fazlasında etken saptanamadığı, etken saptananların da sırasıyla *Giardia*, norovirüs, *Salmonella* spp., *E. coli* olarak devam ettiği, *Shigella*'nın *Camphylobacter*'den sonra 5. sırada olduğu belirtilmiştir (18). Bayburt ilinde görülen salgında gaitada *S. sonnei* tespit edilmiş olması salgının etkeninin *Shigella* olduğunu desteklemektedir.

Akut ishalin gelişiminde çevresel faktörlerin de etkisi olduğu bilinmektedir. Bu çevresel etkenler arasında evlerdeki hijyenik koşulların kötü olması ve kişisel hijyen koşullarının kötü olması, mevsimsel özellikler, sosyoekonomik düzeyin kötü olması, alt yapı yetersizliği gibi nedenler bulunmaktadır (19). Bu salgında da hastalık gelişiminde kötü hijyenik koşulların etkili olduğu epidemiyolojik olarak kanıtlanmıştır. Hijyen konusunda halk sağlığı eğitimleri düzenlenerek salgının tekrarlanması önlenmeye çalışılmıştır.

Freeman ve arkadaşları 1990-2013 yılları arasında ishalleri hastalıklarla hijyen ilişkisini değerlendirmek

için yapılmış yayınları değerlendirmiş ve el yıkama alışkanlığının ishalleri hastalıkları azalttığı sonucuna ulaşmışlardır. Hijyen alışkanlıklarının kazanılmış olması yaş grubu fark etmeksizin ishalleri hastalık oluşmasını azaltmaktadır (20). Önsüz ve arkadaşlarının İstanbul ilinde yaptığı bir çalışmada 7. ve 8. sınıf öğrencilerinde iki okulda hijyen alışkanlıkları değerlendirilmiş ve her iki okul öğrencilerinin kişisel hijyen konusundaki bilgilerinin istenilen düzeyde olmadığı saptanmıştır (19). Çocukluk döneminde kazanılması gereken hijyen alışkanlıklarının istenen düzeyde olmaması kişiden kişiye hastalık bulaşını artırmaktadır. Bu salgında da kişilerin hijyen durumu değerlendirilmiş ve her iki grupta da her üç kişiden yaklaşık birinin hijyen alışkanlığı kötü olarak saptanmıştır. Bu nedenle bu salgında da hijyenin hastalık için önemli bir risk faktörü olduğu söylenebilir.

Yunanistan'da G. Samonis ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptığı bir çalışmada, şehirde alt yapı çalışmaları sırasında kontamine olduğu düşünülen su kaynaklı salgında sudan *S. sonnei* izole edilememiştir ancak benzer şekilde epidemiyolojik inceleme sonucu su kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır (15). *S. sonnei* enfeksiyonlarının önlenmesinde su sanitasyonu, güvenli su temini, klorlama, gibi yöntemler kullanılmaktadır (13). Çetinkaya ve arkadaşlarının Bursa ilinde içme sularında *Salmonella* ve *Shigella* varlığını tespit etmek için yaptıkları çalışmada inceledikleri su örneklerinin hiçbirisinde ne *Salmonella* ne de *Shigella* üretilmemiştir (21). Hasde ve arkadaşlarının askeriyedeki artezyen kuyu sularında yaptıkları analiz çalışmalarında *Shigella* etkeni saptanamamıştır (22). Bu yapılan çalışmalar *Shigella*'nın genellikle klinik örneklerde tespit edilebildiğini ancak sudan tespit edilmesinin daha nadir olduğunu göstermektedir. Bu incelemede vakalardan alınan gaita örneklerinde tespit edilen *S. sonnei*, içme suyunda izole edilememiştir ancak epidemiyolojik inceleme sonucunda salgın nedeninin içme suyu ve hijyen eksikliğine bağlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmada THSK Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyolojisi ve Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlıklarıyla birlikte; salgın incelemesinde görev alan Bayburt Halk Sağlığı Müdürlüğü ve Bayburt Toplum Sağlığı Merkezi personeline teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Scallan E, Griffin PM, Angulo FJ, Tauxe RV, Hoekstra RM. Foodborne illness acquired in the United States—Unspecified Agents. *Emerg Infect Dis*, 2011; 17 (1): 16-22.
2. Bingöl R, Bakteriyel enterik enfeksiyonlar: Sınıflandırma ve patogenezi ANKEM Derg, 1994; 8 (3): 229-38.
3. Turhan Ö, Yalçın A, Akut ishaller hastaya yaklaşım, *Türkiye Tıp Dergisi*, 2004; 11(4): 182-93.
4. Hall AJ, Wikswo ME, Karunya M, Roberts WA, Yoder JS, Gould LH. Acute gastroenteritis surveillance through the national outbreak reporting system, United States. *Emerg Infect Dis*; 2013; 19(8).
5. Wikswo ME, Kambhampati A, Shioda K, Walsh KA, Bowen A, Hall AJ, Outbreaks of acute gastroenteritis transmitted by person-to-person contact, environmental contamination, and unknown modes of transmission – United States, 2009-2013- *MMWR Surveill Summ*, 2015 Dec 11;64(12):1-16. doi: 10.15585/mmwr.mm6412a1.
6. Öztürk R, Akut enfeksiyöz ishaller, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi No:31; Kasım 2002; 195-224.
7. Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları yönetmeliği; 30.05.2007, Resmi Gazete Sayısı: 26537.
8. Craun GF, Brunkard JM, Yoder JS, Roberts VA, Carpenter J, Wade T. et al. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006, *Clin Microbiol Rev*, 2010 Jul, 23(3) 507-28.
9. Yoder JS, Hlavsa MC, Craun GF, Hill V, Roberts V, Yu PA et al. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events - United States, 2005-2006, *MMWR Surveill Summ*, 2008 Sep 12;57(9):1-29.
10. Koutsotoli AD, Papassava ME, Maipa VE, Alamanos YP. Comparing *Shigella* waterborne outbreaks in four different areas in Greece: common features and differences. *Epidemiol Infect* 2006;134(1): 157-162.
11. Adiloğlu AK, Akbaş E, Albayrak N, Altaş AB, Akarsu GA, Atabek E ve ark. *Shigella* Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı, Editör Akbaş E, Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Cilt 1, Sürüm No:1.1, Basım yeri: Ankara, 2014, B-MT-09, 1-20.
12. Bowen A. Shigellosis, in Brunette GW, *Yellowbook Chapter 3- Infectious Diseases Related to Travel* (81).
13. Bocchini JA, Brady MT, Bradley JS, Byington CL, Davies HD, Edwards KM at all. *Shigella* Infections, in Pickering LK, *Redbook*, 29th Edition, Policy of the American Academy of Pediatrics, 645-7.

14. Arias C, Sala MR, Domínguez A, Bartolomé R, Benavente A, Veciana P, et al. Waterborne epidemic outbreak of *Shigella sonnei* gastroenteritis in Santa Maria de Palautordera, Catalonia, Spain. *Epidemiol Infect*, 2006; 134(3), 598-604.
15. Samonis G, Elting L, Skoulika E, Maraki S, Tselentis Y. An outbreak of diarrhoeal disease attributed to *Shigella sonnei*, *Epidemiol Infect*, 1994. 112(2); 235-45.
16. Alamanos Y, Maipa V, Levidiotou S, Gessouli E, A community waterborne outbreak of gastroenteritis attributed to *Shigella sonnei*, *Epidemiol Infect*, 2000; 125(03):499-503.
17. Sezen F, Buyurgan V, Küçük SN, Kayalı RG, Erdemir R. Siirt ili ishal vakalarındaki artışın değerlendirilmesi, *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2009; 66(2); 17-20.
18. Pons W, Young I, Truong J, Jones-Bitton A, McEwen S, Pintar K, et al. A systematic review of waterborne disease outbreaks associated with small non-community drinking water systems in Canada and the United States. *Send to PLoS One*. 2015 Oct 29;10(10):e0141646. doi: 10.1371/journal.pone.0141646. eCollection 2015.
19. Önsüz MF, Hıdıroğlu S. İstanbul'da farklı iki ilköğretim okulundaki öğrencilerin kişisel hijyen alışkanlıklarının belirlenmesi. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2008; 9(1); 9-17.
20. Freeman MC, Stocks ME, Cumming O, Jeandron A, Higgins JPT, Wolf J, et al. Hygiene and health: systematic review of handwashing practices worldwide and update of health effects, *Trop Med Int Health*. 2014; 19(8): 906-16.
21. Çetinkaya F, Çıbık R, Soyutemiz E. Bursa'da içme maksatlı kullanılan artezyen kuyu sularında *Salmonella* ve *Shigella* varlığının araştırılması, *Vet Bil Derg*. 2007; 23(1); 79 -82.
22. Hasde M, Oğur R, Tekbaş ÖF, Gata HS, Gata ÇS, Ankara İl merkezinde bulunan askeri birliklerdeki kuyu sularının polimeraz zincir reaksiyon sistemi ile mikrobiyolojik analizlerinin yapılması. *Gülhane Tıp Dergisi*, 2002;44(4) 373-7.

Probiyotiklerin tümör baskılayıcı etkileri

Tumor suppressor effects of probiotics

Münevver KAHRAMAN¹, Aynur Gül KARAHAN²

ÖZET

Hipokrat'ın "Tüm hastalıklar bağırsakta başlar." yaklaşımından sonra günümüzde de bağırsaklar "ikinci beyin" olarak adlandırılmakta ve bağırsaktaki mikrobiyal denge-sağlık ilişkisi yoğun araştırmaların konusu olmaktadır. Bağırsaklarda çeşitli nedenlerle bozulan mikrobiyal dengenin yeniden oluşturulmasında ise probiyotiklerden yararlanılmaktadır. Özellikle son 20 yılda probiyotiklerin sağlık üzerine etkilerine yönelik pek çok bilimsel bulgu elde edilmiştir. Bunlar arasında modern çağın vebası olarak da kabul edilen kanser üzerine probiyotiklerin etkisini incelemeye yönelik çalışmalar son derece ilginçtir ve bu konu aydınlatılması gereken pek çok bilinmeyeni içermektedir. Probiyotiklerin kanseri önleme ve tedavi etmesinde çeşitli mekanizmalar geçerlidir. Örneğin kanser öncül maddelerini üreten patojenleri inhibe ederek bağırsak mikroflorasının düzenlenmesinde ve böylece bu zararlı bileşiklerin oluşumunun önlenmesinde etkili olmaktadır. Probiyotiklerin, antimikrobiyal ürünlerin üretimi yoluyla patojen bakterileri engelleyici ve immunomodülatör hücreleri uyarıcı özellikleri gibi kanser oluşumunu önleyici olumlu etkilerine ait de birçok bulgu elde edilmiştir. Kanserli tetikleyen etkenler oldukça karmaşık olmakla birlikte, beslenme yoluyla alındığında probiyotiklerin

ABSTRACT

After the approach of Hippocrates, "All diseases start in the intestine", now the intestines are called "second brain" and microbial balance-health relation intestines is the subject of intensive researches. Probiotics are used for the reconstitution of microbial balance which is destroyed by various reasons in the intestines. Especially in the last 20 years, many scientific findings have been obtained about the health effects of probiotics. It is interesting to study the effects of probiotics on cancer, which is also accepted as a modern age plague, and this subject contains many unknowns that need to be elucidated. There are various mechanisms in the effects of probiotics in cancer prevention and treatment. For example, they inhibit pathogens that produce cancer precursors, thereby regulating intestinal microflora and thus inhibiting the formation of these deleterious compounds. There are also many findings of the positive effects of inhibiting cancer formation, such as the ability of pathogens to inhibit pathogenic bacteria and stimulate immunomodulatory cells through the production of antimicrobial products. While the cancer-causing agents are quite complex, it has been observed that probiotics prevent DNA damage caused by compounds that reason mutation and tumor formation when

¹Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi, Antalya
²Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta



İletişim / Corresponding Author : Münevver KAHRAMAN

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi B Blok Kat 1 SBAUM Lab. 3 07050 Antalya - Türkiye
Tel : +90 506 380 57 85 E-posta / E-mail : munevverkahraman@msn.com

Geliş Tarihi / Received : 19.10.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.15428

Kahraman M, Karahan AG. Probiyotiklerin tümör baskılayıcı etkileri.
Türk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 421-442

mutasyona ve tümör oluşumuna yol açan bileşiklerin neden olduğu DNA hasarını önlediği gözlenmiştir. Ayrıca probiyotikler kısa zincirli yağ asitleri gibi kanserden korunmada yararlı olan metabolitleri üretmektedir. Probiyotiklerin kanseri önleyici etkilerini, tümör oluşumunu engelleme, tekrar etme olasılığını azaltma ve oluşmuş kanser hücrelerini ve dokularını yıkıma uğratma şeklinde gerçekleştirebildiklerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Probiyotiklerin yerleşim alanı olan kalın bağırsak dışında, mesane, meme ve karaciğer gibi yerleşim alanı olmayan organ ve dokularda da tümör oluşumu ve gelişimini engelleyici etkisi olduğu gösterilmiştir. Probiyotiklerin sağlık üzerine etkilerinin toplum tarafından anlaşılması ticari preparatların kullanımını dünyada ve ülkemizde yaygınlaştırmıştır. Ancak probiyotiklerin kanserin önlenmesi ve tedavisinde kullanılabilmesi için etki mekanizmalarını somut şekilde açıklayan ve olumlu sonuçları klinik denemelerle ispatlanmış birçok çalışmanın yapılması gerekmektedir. Bu derlemede, probiyotiklerin farklı kanser tiplerine etkilerini ispatlamak amacıyla *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yapılmış öncü niteliğinde çeşitli çalışmalar bu alana ilgi duyan araştırmacılar için irdelenmiş ve tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: probiyotikler, kanser, tümör, laktik asit bakterileri

intake via nutrition. In addition, probiotics produce metabolites, such as short-chain fatty acids, that are useful for cancer protection. There are studies showing that probiotics can inhibit cancer, effects by inhibiting tumor formation, reducing the chance of recurrence, and destroying cancer cells and tissues. It has been shown to inhibit tumor growth and development in organs and tissues other than the colon where the probiotics are located such as bladder, breast, and liver. The public understanding of the health effects of probiotics has made the use of commercial preparations widespread in the world and in our country. However, in order to use probiotics in prevention and treatment of cancer, clinical studies which will demonstrate the mechanisms of action probiotics, must be conducted. In this review, several pioneering studies on *in vitro* and *in vivo* to elucidate the effects of probiotics on different cancer types have been emphasized and discussed for researchers interested in this field.

Key Words: probiotics, cancer, tumor, lactic acid bacteria

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımlamasına göre probiyotikler, yeterli miktarda alındığında konağa sağlık açısından yarar sağlayan canlı mikroorganizmalardır (1). Probiyotik olarak en sık kullanılan mikroorganizmalar laktik asit bakterileridir (LAB). Bunlar insanların ve sıcakkanlı hayvanların bağırsak florasında bulunur. Probiyotik özellik

gösteren LAB'lerin dışında *Bacillus* spp., mayalar (*Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces boulardii*) ve filamentöz mantarlar da (*Aspergillus oryzae*) probiyotik preparatlarında kullanılmaktadır (2). Bir probiyotik ürün bu mikroorganizmalardan birini ya da birkaçını içerebilir. İçerdiği mikroorganizma sayısı arttıkça probiyotiğin kullanım

alanı genişlemektedir.

Son yıllarda mikrobiyota terimi sıklıkla kullanılmaktadır. Mikrobiyota terimini ilk kez, 1958'de Nobel Tıp Ödülü'nü kazanan ABD'li Joshua Lederberg kullanmıştır. Mikrobiyota; vücudumuzda yaşayan mikroorganizmalar sistemini, milyarlarca mantar, bakteri ve tek hücrelilerden oluşan, hayati öneme sahip, çok hassas bir süper organı tanımlamaktadır (3). Probiyotiklerin kökeni ise fermente gıdalar ve süt ürünlerinin kullanımı çok eski tarihlere kadar uzanır. Bununla birlikte, 20. yüzyılın başlangıcına, yani Metchnikoff'a kadar insan ömrünün ve sağlığın laktik asit bakterilerinin tüketimi ile ilişkili olduğu bilinmiyordu. O zamandan beri, yetişkinlerde ve çocuklarda probiyotik kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Günümüzde ise nörobilimciler "İnsanın karnında yer alan ikinci bir beyni vardır ve bu beynin hayatımızda birbirinden önemli işlevleri vardır." sözüyle bağırsaklar ve mikrobiyotanın önemini tekrar vurgulamaktadırlar (4,5). Nörobilimcilere göre, düşünen, hisseden, hatırlayan ve karar verebilen ikinci beyin korku, sevinç ve üzüntü gibi şiddetli duygularda daha çok kendini gösterebilmektedir. Bazı sinir sistemi maddelerinin iletimi, uyarıcı hormonların ve koruyucu salgıların dengelenmesi de bu hücrelerin görevleri arasında yer almaktadır. Bağırsaklardaki bakterilerin bozulmuş dengesinin düzenlenmesi için kullanılan probiyotikler ve beyin işlevlerini düzeltme amacıyla kullanılan psikobiyotikler tüm dünyanın dikkatini çeken yeni bir tedavi alanı haline gelmiştir (6).

Probiyotiklerin sağlık üzerindeki yararlı etkisinin üç şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunlar, patojen ve zararlı bakterilerin sayılarını azaltmak, mikrobiyal metabolizmayı (enzimatik aktiviteyi) değiştirmek ve bağışıklık sistemini iyileştirmek şeklinde sayılabilir (7). Bu mekanizmalar yoluyla probiyotiklerin, bağırsak sistemini düzenleyici etkisi başta olmak üzere bağışıklık sistemini desteklemek, gıdaların, vitamin ve minerallerin sindirimini ve emilimini sağlamak, patojenik bakteri ve virüsleri inhibe etmek, tümör

ve diyare oluşumunu engellemek, laktoz intoleransını azaltmak, kalsiyum absorpsiyonunu geliştirmek, idrar yolu enfeksiyonlarını önlemek, alerji oluşumunu engellemek, B-galaktozidaz gibi sindirim enzimlerini ve vitaminleri üretmek, sinir sistemini rahatlatıcı etki göstermek, yaşlanmayı geciktirmek, serum kolesterol seviyesini düşürmek gibi pek çok önemli yararı bulunmaktadır (8). Bunların yanı sıra son yıllarda yapılan araştırmalar probiyotiklerin kanser üzerine etkisine de odaklanmıştır (9-11).

Gelişmiş ülke insanların en önemli sağlık sorunlarının başında kanser ve kanserin tedavisi gelmektedir. Örneğin, ABD halkının yaklaşık % 25'inin yaşamları boyunca bir kez herhangi bir kanser tanısıyla karşılaşacakları düşünülmektedir. Dünyada her yıl bir milyon yeni kanser hastası teşhis edilmektedir. Bu hastaların %25'den azı tek başına cerrahi ve/veya radyoterapi (RT) ile tedavi edilebilmektedir. Geriye kalan hastaların büyük bir bölümüne hastalığın herhangi bir evresinde kemoterapi (KT) uygulanmaktadır. Ancak bütün bu gelişmelere karşın, kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra kanser, hala ölümlerin en sık ikinci nedenidir (12).

Kanser beraberinde taşıdığı fiziksel rahatsızlıkların yanı sıra sosyal, maddi ve manevi yönleri ile mücadelesi zor bir hastalıktır. Dünya genelinde kanser hastalığının yükü her geçen gün artış göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2016 yılı verilerine göre 14 milyon kişinin yakalandığı ve 8,2 milyon kişinin ölümüne sebep olan kanser; benzer seyirde devam ettiği takdirde 2030 yılında 22 milyon yeni vaka ortaya çıkması beklenmektedir (13). Ülkemizde de ölüm nedeni istatistikleri incelendiğinde, kanser 2016 yılında tüm ölümlerin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. 2015-2016 yılları arasında 80.577 kişinin ölümüne neden olmuştur. Türkiye İstatistik Kurumu, verilerine göre; 2016 yılında da tüm ölüm sebepleri arasında dolaşım sistemi hastalıklarından sonra 2. sırada yer almaya devam etmiştir (14).

Probiyotiklerin sağlık üzerine olumlu pek çok etkisinin yanı sıra kanseri önleyici, tümör baskılayıcı

ve tedavi edici etkileri de bulunmaktadır. Probiyotik-kanser etkileşimlerinin incelendiği araştırmalarda elde edilen bulgular probiyotiklerin kanseri engelleyici etkilerinin konağın immün yanıtının güçlendirilmesi, potansiyel karsinojen bileşiklerin yapılarının bozulması, intestinal floradaki nitel ve/veya nicel değişimler, kolonda antimutajenik ve antikarsinojenik bileşiklerin üretimi, intestinal mikrofloradaki prekarsinojenlerin karsinojenlere dönüşümünün engellenmesi gibi metabolik aktivitelerin değişimi, toksin emiliminin önlenmesi ya da gecikmesi, güçlendirilmiş intestinal engel mekanizmaları gibi fizyokimyasal koşulların değişimi ve konak fizyolojisi üzerindeki olumlu etkileri yoluyla olduğunu göstermiştir (10).

Bu derlemede probiyotiklerin kanseri engelleyici etkilerinin açıklanabilmesi açısından öncelikle kanser oluşum mekanizmaları hakkında bilgi verilip, probiyotiklerin kanser üzerinde etkileri vurgulanmaya çalışılmıştır.

1. TÜMÖR OLUŞUMU VE KANSER

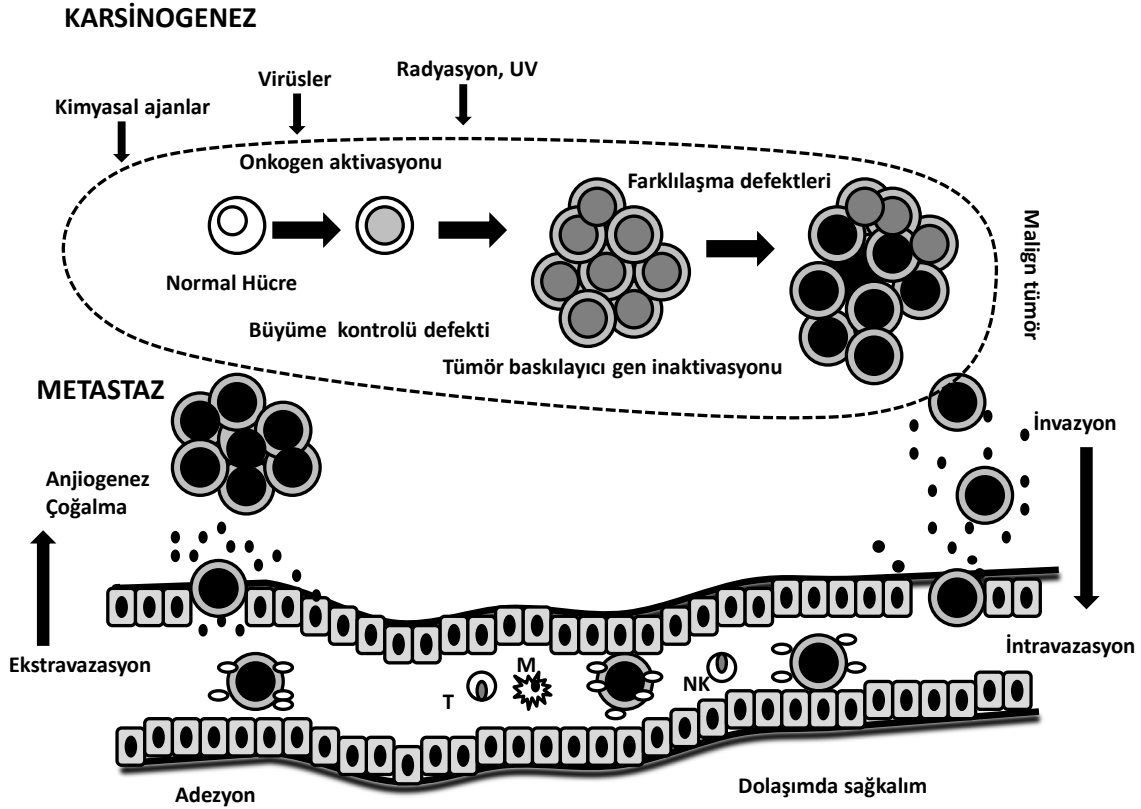
Aşırı hücre üremesinin dizginlenememesine, yani yıkımdan çok yapım olmasına kanser denir (15). Yaşam süresini dolduran hücreler vücuttan atılırken yerlerine yenilerinin gelmesi genlerin işleyişi sayesinde olmaktadır. Bazı genler hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlarken, bazıları da aşırı hücre üremesini önlerler (14). Çocukluk çağı dışında yaşanan hücrelerle yeni yapılanlar hemen hemen birbirine eşittir (17). Özetle; kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen, sonucu bazı türler için ölüme biten ve bu nedenle de tedavisi için en çok araştırma yapılan ve çok çeşitli yöntemler denenilen bir hastalıktır (14).

Çevresel faktörlerin çok basamaklı bir süreç içinde, hücre DNA'sında ve kromozomların fonksiyonel birimleri olan genlerde oluşturduğu değişiklikler neticesinde kontrolsüz olarak bölünmesiyle meydana gelen oluşum, komşu dokulara ve uzak organlara yayılabilir. Kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için

yalnızca kontrolsüz çoğalma yeterli değildir. Hücrenin invazyon (diğer sağlıklı dokuları istila etme) ve metastaz (dolaşıma geçerek sağlıklı başka dokulara yayılma) gibi diğer malign (kötü huylu) özellikleri de kazanması gerekmektedir (16) (Şekil 1).

Bu etkilerin önemli bir kısmı hücrenin mutasyonlara karşı hassas olduğu hücre döngüsü (Şekil 2) esnasında gerçekleşir. Hücre döngüsü, DNA sentezinin gerçekleştiği S evresi, mitoz bölünmenin izlendiği M evresi ve bu iki temel süreç arasında kalan geçici duraklama evreleri G1 ve G2 olmak üzere, başlıca dört evrede gerçekleşir. Vücuttaki hücrelerin büyük çoğunluğu G0 olarak adlandırılan dinlenme evresindedir. Bu hücreler normalde bölünmeyip ancak uygun bir uyarı geldiğinde hücre döngüsüne girer. Bu grup hücrelere örnek olarak kemik iliğindeki kök hücreleri ve karaciğer hücrelerinin çoğu gösterilebilir. İleri evredeki solid tümör kitlesindeki hücrelerin çoğunluğu da bu gruptandır. Hücre döngüsü kontrol noktalarında değişimler, kanser dokusunu büyüme ve çoğalmaya yönelttikleri gibi bazen de hücrelerin ölümüne yol açabilmektedir (16).

Mitoz; profaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamalarından oluşmaktadır. Hücre döngüsünde bir evre tamamlanmadan sonraki evreye geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir. Hücre döngüsünde G-S geçişinde, G-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır (16). Bu kontrol noktalarında hücrenin döngüye devam edip etmeyeceği kararı verilir (Şekil 2). Hücre döngüsündeki kontrol noktaları bir sonraki evreye geçmeden önceki evrelerin bir çeşit kontrolü olarak da düşünülebilir ve hücre döngüsünün ilerlemesini durdurabildiği gibi, gerekli olan durumlarda apoptozisi (programlı hücre ölümü) de aktive edebilir. G1 kontrol noktası sırasında, hücre döngüsü boyunca ilerleme için gereken hücresel koşullar değerlendirilir. Bir hücre uygun bir boyutta, yeterli enerjiye sahipse ve hasar görmüş DNA içermiyorsa, genellikle G1 kontrol noktasından geçer. G2 kontrol noktasının temel işlevi,



Şekil 1. Karsinogenezin oluşumu ve Metastaz. NK: doğal killer hücre, M: mekanik faktörler, T: trombosit

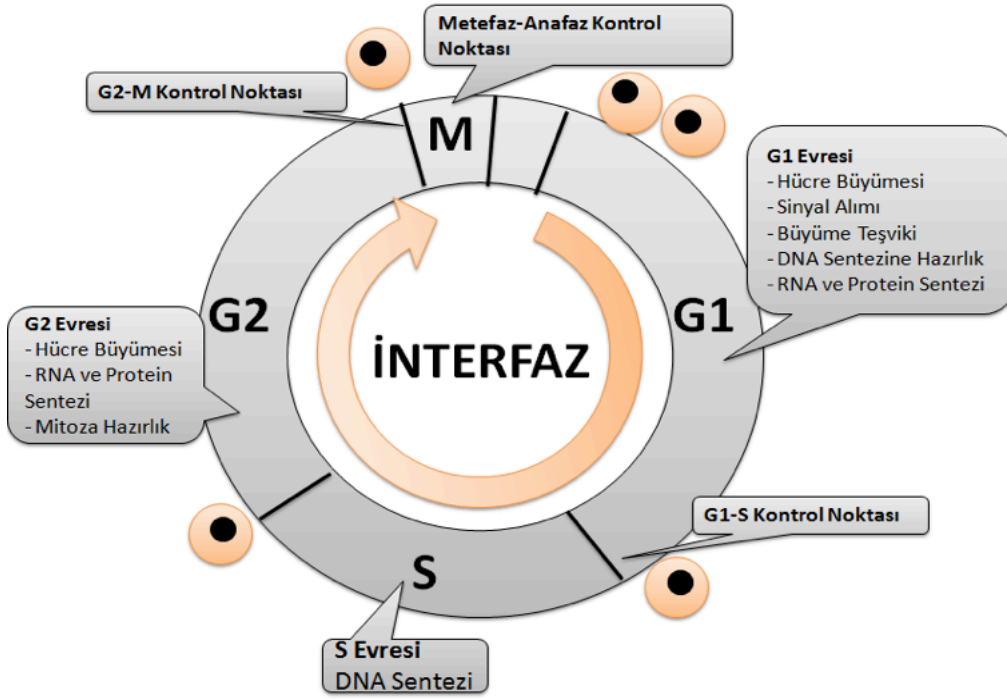
tüm kromozomların replikasyonu tam olduğunun ve mutasyon başlangıcı olmadan veya onarılamayan DNA hasarı olmadan yapıldığının kontrolüdür. Buna ek olarak, uygun hücre boyutu ve protein rezervleri de bu kontrol noktası sırasında değerlendirilir. M kontrol noktası, tüm kardeş kromatitlerinin iç mikrotübüllerine doğru şekilde bağlanmasını ve her hücrenin doğru sayıda kromozom bulundurmasını sağlar (18). Bu kontrol mekanizması ile ya tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş ya da yanlış, eksik veya gereksiz olarak fazla tekrarlanmış DNA'dan anormal DNA'lı hücreler tanımlanır. Apoptozis ile ise yaşlanmış ve yararsız hale gelen normal hücrelerin ortamdaki yok edilmeleri sağlanır. Böylece, DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak kopyalamış hücrelerin

mitoza girmesi sağlanır. Tümör baskılayıcı genler, özellikle hücre döngüsü denetim noktalarında görev alanlar ve DNA tamir genleri, döngü esnasında ortaya çıkabilecek genetik hasarları ortadan kaldırarak veya hasara uğrayan hücrelerin apoptozisini sağlayarak kanserli hücrelerin ortaya çıkmasını önlemektedir (16, 18).

2. PROBİYOTİKLERİN ANTİKARSİNOJEN VE ANTİGENOTOKSİSİTE MEKANİZMALARI

2.1 Karsinojenlerin Adsorbsiyonu

İnce bağırsaktaki LAB'ler ve diğer bakterilerin bazı karsinojenlerin adsorbsiyonunda etkili olduğu kanıtlayan çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin



Şekil 2. Hücre döngüsü

Bolognani ve ark. (1997) yaptığı çalışmada, gıda kaynaklı çeşitli karsinojenlerin, LAB'leri ve diğer bağırsak bakterileri tarafından *in vitro* ve *in vivo* olarak, adsorbsiyonu açıklamaya çalışmışlardır. Bu çalışmada kullanılan karsinojenler, insan diyetinde bulunan benzo[a]pyrene (B(a)P), aflatoxin B1 (AFB1) ve pişmiş gıda karsinojenleri olan 2-amino-3-methyl-3H-imidazo quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo quinoline (MeIQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo-quinoline (MeIQx), 5-phenyl-2-amino-1-methylimidazo pyridine (PhIP) ve 3-amino-1-methyl-5H-pyrido indole (Trp-P-2)'dir. Test edilen karsinojenlerden B(a)P ve Trp-P-2'nin, *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus acidophilus* olmak üzere iki LAB suşuyla en etkili şekilde bağlandığı gözlenmiştir. AFB1 ile zayıf, MeIQx, MeIQ, PhIP ve IQ orta derecede bağlandığı saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, LAB'nin karsinojenleri *in vitro* bağlayabilmesine rağmen, vücuttaki karsinojenlerin emiliminde ve

dağılımında veya karaciğerdeki genotoksik aktivitede büyük değişikliğe yol açmadığını belirtmektedir (19).

Başka bir çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 ve *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. suşu ile yapılan *in vitro* denemelerde AFB1'in bağırsak lümenindeki konsantrasyonunun probiyotiklerin kullanımına bağlı olarak azaldığı ortaya koyulmaktadır. *Lactobacillus rhamnosus* GG suşunun, 1 dakika içinde lümen sıvısının çözünebilir fraksiyonunda AFB1 konsantrasyonunu %54 düşürdüğü, benzer koşullar altında *L. rhamnosus* LC-705'in ise %44 ile daha az etkili olduğu görülmüştür. *L. rhamnosus* GG varlığında bağırsak dokusu tarafından AFB1 adsorbsiyonunda %74 azalma varken, *P. freudenreichii* ssp. *Shermanii* JS %63 ve *L. rhamnosus* LC-705 suşunda ise %37 azalma belirlenmiştir (20). Bu iki çalışmanın sonuçlarını karşılaştırdığımızda AFB1 ve karsinojenlere karşı probiyotik bakterilerin adsorbsiyon etkisinin farklı oluşu, bu etkinin suşa

özgü olmasından kaynaklandığı görülmektedir.

Mevcut başka bir araştırma ise *L. rhamnosus* GG ve *Lactobacillus casei* Shirota içeren fermente sütün hepatoprotektif etkisini değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla AFB1 tatbik edilen erkek Wistar sıçanların bir antioksidan etken olan klorofilin ile kombinasyon halinde veya sadece fermente süt verilerek oluşturulan gruplarında biyokimyasal ve hepatopatolojik değerlendirmeler elde edilmiştir. Bu gruplar fermente süt alan 1. grup, AFB1 alan 2. grup, fermente süt ve AFB1'i birlikte alan 3. grup, klorofilin ve AFB1'i birlikte alan 4. grup ve son olarak AFB1, klorofilin ve fermente sütü birlikte alan 5. grup olarak tasarlanmıştır. Fermente sütün tek başına veya klorofilin ile kombinasyon halinde iken Tiobarbitürik asit-reaktif madde (TBARS) düzeylerini düşürerek ve glutatyon peroksidad, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon-S-transferaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırarak önemli bir hepatoprotektif etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç da fermente sütün tek başına veya klorofilin ile kombinasyon halinde AFB1'in yol açtığı hepatik hasara karşı güçlü bir koruyucu etkisi olduğu yönünde değerlendirilmiştir (21).

2.2 Kanseri Teşvik Eden Enzimlere ve Prokarsinojenlere Etki

Bağırsak florasında bulunan zararlı bakterilerin enzim aktivitesi veya probiyotik bakterilerin metabolit konsantrasyonunun, probiyotik ve prebiyotik verilerek tedavi edilen sıçanlarda görülen tümör oluşma riski yüksek lezyon veya tümörlerin seviyesinde azalmadan sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. β -glukuronidaz ve nitroredüktaz prokarsinojenleri karsinojenlere çevirerek kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu zararlı bakteriler β -glukuronidaz, nitroredüktaz, azoredüktaz ve karsinojenik sürecin oluşumuna aracılık eden 7- α -dehidrosiklaz gibi pek çok zararlı enzimler ve bunun yanında heterosiklik aminler ve toksin ikincil safra asitlerini içeren karsinojen ve tümör arttırıcı maddeler üretirken,

probiyotikler gibi yararlı bakteriler ise kısa zincirli yağ asitleri gibi kanserden koruyucu metabolitler üretmektedir (22). Kısa zincirli yağ asitleri başta bütirat olmak üzere anti-inflamatuvar ve anti-proliferatif etkisiyle kolonda anti-tümör aktivitesini sağlayarak koruyucu bir mekanizma oluştururlar (23). Ayrıca, probiyotik metabolizma ürünleri ile (esas olarak kısa zincirli yağ asitlerinin de kolorektal kanser (KRK) tedavisinde olumlu etkiye sahip olabileceği ileri sürülmüştür (24). Kısa zincirli yağ asitlerinin (asetat, propiyonat, bütirat) oluşumu pH'yı düşürmektedir. Bu yağ asitlerinin kolon pH'sında yarattığı düşme sonucu ikincil safra asitlerinin çözünürlüğünün artması ile toksik etkilerinin azaldığı belirlenmiştir. Özellikle bütiratın farklı hücre çoğalmasını önleyici etkisi vardır ve bütirat kanserli hücrelerin çoğalmasını baskılayarak kolon karsinogenezini etkilemektedir (25). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, yoğurt tüketimiyle yoğurtta bulunan başlatıcı kültürlerin zararlı enzim aktivitesini azalttığını göstermiştir. Benzer şekilde, probiyotiklerin de KRK'yi önleyebilmesinin mümkün olduğu ortaya konmuştur. İnsan çalışmaları ise bakteriyel enzim aktivitesini azaltma yeteneğinin suşa özgü olduğu belirlenmiştir. Zararlı enzim aktivitesini azaltabilen suşların yanı sıra bu aktivite üzerinde etkisi olmayan probiyotik suşlar da vardır. *L. plantarum* 299V, *L. rhamnosus* DR20 ve *L. acidophilus* A1 sağlıklı kişilerde β -glukuronidaz faaliyetini azaltmamıştır. Ancak farklı çalışmalar *L. casei* Shirota ve *L. acidophilus*'un bazı suşlarının zararlı enzim aktivitesini ve buna bağlı potansiyel karsinojen üretimini azalttığını, böylece KRK olasılığını azaltabileceğini göstermektedir (26).

Lidbeck ve ark. (1991), 14 kalın bağırsak kanseri hastasını bir fermente süt ürünü olarak *L. acidophilus* diyeti ile altı hafta beslenmesi desteklemiş ve dışkı mikroflorasında, dışkı safra asitlerinin ve β -glukuronidaz aktivitesi ölçülmüştür. Mikroflora değişikliklerinden etkilenen β -glukuronidaz aktivitesinde %14, toplam safra asitlerinde, %15 ve deoksikolik asit miktarında %18 azalma gözlenmiştir (27).

2.3 İmmün Yanıtta Artış

Probiyotiklerin immün sistem üzerindeki olumlu etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Özellikle LAB'ların immün sistemi aktive etmesine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Schiffrin ve ark. (1996) ile Marteau ve ark. (1997) probiyotiklerin bağışıklık sisteminin modülasyonuna etkilerini insanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarla açıklamıştır. Görülen değişiklikler monosit ve granülosit ve antikor salgılayan hücrelerin düzeyleri ile fagositik aktivite artışı şeklinde olmuştur (28, 29).

Yerli mikroflora konakçı mukozasının yapısını, fonksiyonunu ve tüm bağışıklık sisteminin gelişimini etkilemektedir. Koruyucu mikroflora, patojenlerin substratlar ve yapışma yerleri için rekabet yoluyla yapışmasını önler ve aynı anda antibakteriyel maddeler üretmektedir. Bağırsağın canlı mikroorganizmalarla erken kolonizasyonunu sağlamak bağışıklık ve epitel hücrelerinin sayısı arttırmaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar bağırsak mikroflorasının bileşimini olumlu yönde etkilemekte, salgılanan IgA üretimini uyarmakta ve IFN- γ üretimini arttırmaktadır. LAB'lar bağırsak mikro ortamındaki hasarları ortadan kaldırmaktadır, ayrıca lokal ve sistemik bağışıklık tepkilerini uyarır ve bağırsak duvarının bütünlüğünü sağlar (30).

Bağışıklık sistemi hücrelerindeki sayısal ve fonksiyonel artış, tümör büyümesini olumsuz yönde etkilemektedir. IgA, tümör hücreleri üzerinde antiinflamatuvar işlev ve doğrudan sitotoksik etki gösterme özelliklerine sahiptir. Bu açıdan bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir. Mukozal yüzeylerde immunoglobulin A (IgA), patojen mikroorganizmaların invazyonuna karşı spesifik bağışıklığın önemli bir bileşenidir. Hayvan çalışmaları, laktobasiller gibi bazı probiyotik suşların, mukozal yüzeylerde antijen spesifik IgA yanıtları ortaya çıkardığını ortaya koymuştur. İnsanlarda probiyotik tedavisinin hem serum hem fekal IgA düzeylerini yükselttiği gösterilmiştir (10).

L. casei YIT-0003 cilt altı aşı olarak uygulandığında

dolaşımdaki immunoglobulin M (IgM) antikorlarını arttırarak, *Pseudomonas* antijenlerine karşı spesifik antikor üretimini teşvik etmektedir. Böylece bağışıklık sistemi aktif hale geçmektedir. LAB iki olası yol aracılığıyla sitokin üretimine neden olabilir. Sitokinler yabancı antijen ile karşılaşma sonrasında gerçekleşen antijen sunumunun ardından T lenfositlerinden serbest bırakılabilir. İkincisinde ise LAB ve immunokompetent hücreler arasındaki doğrudan etkileşim sonucu sitokin üretimi olabilir (30). Peptidoglikan bakteri hücre duvarı, monositleri uyarak bağışıklık sistemi sitokinleri olan IL-1, IL-6 ve Tümör Nekrozis Faktör α (TNF- α)'nın salınmasını sağlamaktadır (31).

Bağışıklık sisteminin bir diğer üyesi olan dendritik hücreler (DH), probiyotikler tarafından modifiye edilebilen bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde merkezi rol oynayan hücrelerdir. DH'lerin, NK hücrelerinin çalışmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. NK hücrelerinin de anti-tümör etkili hücreler olduğu hayvan denemeleri ile gösterilmiştir. Bu nedenle, DH'lerin probiyotikler ile modifiye edildiği ve sonrasında NK hücrelerini aktive ederek tümör baskılama yönünde aracı hücre oldukları düşünülmektedir (32).

Majör doku uygunluk kompleksi (MHC) T hücrelerine antijen sunup onları aktive eden ve T hücre aracılı immün yanıtına neden olurlar. T yardımcı lenfositleri uyarırlar, makrofajları aktive ederler ve aşılardan immünojenitesini ayarlarlar. IL-1, T ve B hücre çoğalmasını, IL-6 ise B hücresinin plazma hücrelerine farklılaşmasını uyarır. TNF- α ise tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahiptir. *L. casei* Shirota kullanımı ile NK aktivitesini geliştirmenin mümkün olduğu ve bu etkinliğin IL-12 üretimi ile paralel gözlemlendiği gösterilmiştir (33). Bu çalışmalar, probiyotiklerin NK hücrelerinin bağışıklığı arttırmada önemli bir rol oynayabileceğini ve böylelikle kötü huylu tümörlerin gelişimini önlemeye yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

Perdigon ve ark. (1998)' na göre yoğurt tüketimi,

inflamatuvar immün yanıtı azaltmaktadır. İnflamatuvar immün yanıt tümör önleyici aktivite sonrasında ortaya çıkmaktadır. Çalışmada, yoğurt tüketiminin farelerde DMH (1,2-dimethylhydrazine) ile teşvik edilen tümör büyümesi üzerindeki etkiler incelenmiştir. Yoğurt tüketimi ile CD4+ T lenfositleri ve IgA salgılayan hücrelerde inflamatuvar immün yanıtın baskılandığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, tümör oluşumunda belirgin bir azalma görülmüştür (34). Yine Perdigon ve ark. (2003)'nın yaptığı diğer bir çalışmada ise yoğurt ile beslenen Balb-C farelerde, inflamatuvar immün yanıt ve tümör büyümesinde azalma olduğu belirlenmiştir. CD8+ T hücrelerde, DMH verilmesinden kaynaklanan artışın baskılandığını ve lökosit sayısının arttığı da gösterilmiştir (24). Başka bir çalışmada *L. acidophilus*'un immün modülatör etkileri değerlendirilmiştir. Geleneksel ev yapımı yoğurttan ve yeni doğan gaitasından izole edilen *L. acidophilus*, farelere siklofosamid ile birlikte 15 gün boyunca verildikten sonra *L. acidophilus* ile tedavi edilen hayvanlarda, IFN- γ , IL-4 ve TGF- β üretiminde ve lenfositlerde belirgin artış olduğu rapor edilmiştir (35). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* ve ısıl işlem görmüş *L. plantarum* içeren yoğurt tüketiminin bağımsızlık fonksiyonu üzerinde etkisi araştırılmıştır. 200 diyabetik olmayan olgu üzerinde randomize, açık etiketli, plasebo kontrollü bir çalışma planlanmıştır. On iki haftalık bir sürede, test grubu her gün probiyotik içeren yoğurdu tüketirken, plasebo grubu süt tüketmiştir. NK hücre aktivitesi, IL-12 ve IgG1 düzeyleri, başlangıç grubuna kıyasla test grubunda belirgin olarak artmıştır. Buna ek olarak, test grubunun serum NK hücresi aktivitesinde ve IFN ve IgG1 düzeylerinde plasebo grubuna göre anlamlı olarak daha fazla artış gözlenmiştir. Sonuç olarak, *L. paracasei*, *B. lactis* ve ısıl işlem görmüş *L. plantarum* içeren günlük yoğurdu, NK hücre fonksiyonunu ve IFN konsantrasyonunu arttırarak bağımsızlık fonksiyonunu geliştirmiştir (36).

KRK tedavisinde veya önlenmesinde inflamasyon

ve tümör önleyici olarak probiyotiklerin etkisini vurgulayan çok sayıda çalışma yapılmıştır. Örneğin; *Lactococcus lactis* LL-mL10 suşunun, genetiği, anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 üretecek şekilde değiştirilmiştir. Bu suşun dekstran sülfat sodyum modeliyle kolit oluşturulmuş farelere gavajla verilmesi sonucunda inflamasyonu %50 oranında azalttığı belirlenmiştir (37). Genetik olarak yapılandırılabilen diğer bir sitokin olan transforming growth factor beta (TGF- β)'nın, *E. coli* BM2710/pGB2Oinv-hly suşu kullanılarak epitel büyümesini engellediği ve apoptozisini teşvik ettiği gösterilmiştir. Bu tür tedavinin zamanlamasının yakından izlenmesi gereklidir, ancak tümör bir kez oluşursa, TGF- β tümör baskılayıcı etkileri azalmış olur, böylece metastaz ve işgal artışı ile tümör ilerlemesi hızlanabilir (25).

2.4 DNA Hasarı ve Genotoksisitenin Azaltılması

Kumar ve ark. (2012)'nin yaptığı çalışmada sıçanlarda DMH kullanılarak oluşturulan kolon karsinogenezinin, probiyotik mikroorganizmalar ile önlenemediği belirtilmiştir. Probiyotik olarak *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota ve *L. lactis* biovar. *diacetylactis* DRC-1 kullanılmıştır. Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında deney gruplarının daha düşük DNA hasarı gösterdiği bildirilmiştir (20).

Benzer şekilde sıçanlarda genotoksik bir madde olarak DMH kullanılan iki çalışmada da çeşitli LAB (Laktobasiller, bifidobakteriler ve *Streptococcus thermophilus*)'lerin kolon DNA hasarını azaltabildikleri bildirilmiştir (37). Başka bir çalışmada *Lactobacillus bulgaricus* 291, *Streptococcus thermophilus* F4, *S. thermophilus* V3 ve *Bifidobacterium longum* BB536 içeren LAB karışımı kullanılmıştır. Bir grup heterosiklik aromatik aminlerin bulunduğu sığır eti karışımı ile beslenen sıçanlarda, bu aminlerin neden olduğu DNA hasarının önlenmesi gözlemlenmiş, fakat aynı içeriğe sahip tavuk eti karışımında çok az etki görülmüştür. Bu çalışmalarla probiyotik tüketimi ile pişmiş etlerde bulunan karsinojen bileşiklerin zararlarını azaltmanın

mümkün olduğu ileri sürülmüştür (38). Benzer şekilde Pool-Zobel ve ark. (1996)'nın yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus confusus* (DSM20196), *Streptococcus thermophilus* (NCIM 50083), *Bifidobacterium breve* ve *B. longum* (insan bebek dışkısından) *L. acidophilus* (piyasada bulunan bir yoğurttan), *Lactobacillus gasseri* (P79)'un sıçanlarda 1,2-dimetilhidrazine bağlı DNA hasarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (37).

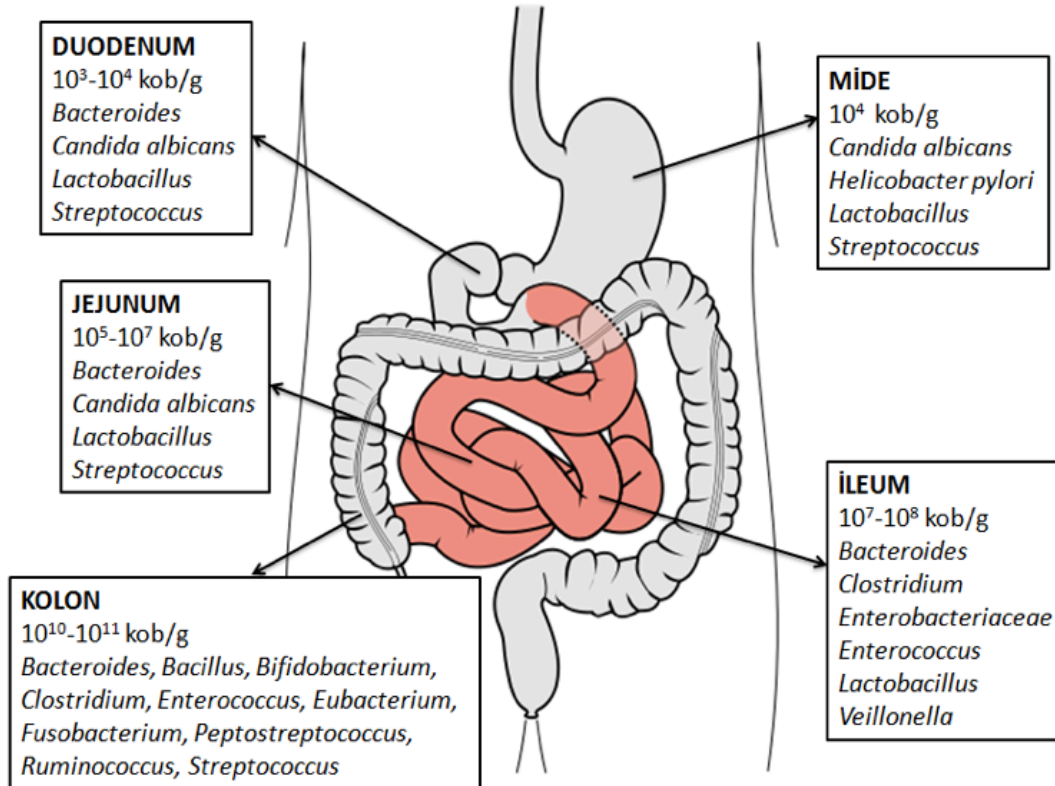
İnsan kaynaklı kolon hücre hattı HT29'da oksidatif DNA hasarı üzerine laktik asit bakterilerinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada tek hücre jel elektroforezi kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. LAB'lerinin HT29 hücrelerinde bir ön tedavi modeli olabileceği belirtilmiştir (39). Tüm bu çalışmalar probiyotik tüketiminin gerçekten DNA hasarını azaltarak ve

karsinogen bileşiklerin seviyelerini düşürerek kanseri önleyebilir olduğunu göstermektedir.

3. BAZI KANSER TÜRLERİNDE PROBİYOTİKLERİN ETKİSİ

3.1 Kalın Bağırsak Hastalıkları ile Bakteriyel Flora Arasındaki İlişki

Mide, oniki parmak bağırsağı (duodenum) ve ince bağırsağın orta kısmı (jejunumda) peristaltizmin daha hızlı olması, asidik ortam (mide) ve safra tuzları (duodenum) nedeni ile daha az sayıda bakteri barındırmaktadır. İnce bağırsağın son kısmından (ileum) itibaren geçiş yavaşladığından bakterilerin sayı ve çeşitliliği kolondakine benzer görünüm kazanmaya başlar (24). Şekil 3'de mide-bağırsak



Şekil 3. Sindirim sistemi bakteri florası

sisteminde bulunan bakterilerden bazıları verilmiştir.

Mide asidine ve safra tuzlarına karşı direnç göstererek ince bağırsağa ulaşan probiyotik mikroorganizmaların ilk temas yüzeyi mukus tabakasıdır. Probiyotik mikroorganizmaların peristaltik hareketler ile ince bağırsaktan kayıp gitmemesi için bağırsak lümenini örten mukus tabakasına ve epitel hücrelerine tutunması gerekmektedir. Probiyotik mikroorganizmalar reseptörlere tutunmak için patojen mikroorganizmalar ile yarışmaktadırlar. Bu tutunmanın patojenlere karşı antagonistik aktivite, geçici kolonizasyon, immün sistemin aktive edilmesi ve zarar gören mukozanın tamir edilmesi için önemli olduğu düşünülmektedir. Tutunmadan sonra bağırsak yüzeyine kolonize olan probiyotik mikroorganizmalar, patojen mikroorganizmalara karşı engel oluşturmada ve ürettikleri antimikrobiyal maddelerle bağırsak yüzeyini patojenlerin zararlı etkilerinden koruyabilmektedir. Ayrıca bağırsak lümeninde bulunan besinler için de rekabet oluşmakta, patojen bakteriler için elverişli besinler probiyotik mikroorganizmalar tarafından tüketilerek patojenlerin çoğalması önlenmektedir (40).

Kalın bağırsakta koloni oluşturan bakterilerin türü hatta suşu bireyden bireye farklılık gösterir. Bu farklılığın konakçının genetik farklılıkları ile bir araya geldiği zaman kalın bağırsakta bazı hastalıklara (Crohn, kolit ülseroza, kalın bağırsak kanseri vs) yol açabileceğini gösteren veriler mevcuttur. Bu konuda yapılan araştırmalar, bakteri-bakteri, bakteri-konakçı immün sistemi, bakteri-epitelyal hücre ilişkisinin anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır. Hayvan denemeleri *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* türlerinin tümör gelişimini önlediği, oysa *Bacteroides* türlerinin (*vulgatus*, *stercoris*) ise tümör gelişimi için risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur (41). Tüm bunlara ilaveten bağırsak florası tam olan hayvanlar, diğerlerine göre daha fazla fagositik aktivite ve Ig düzeyine sahiptir. Bağırsak florasında bulunan laktobasiller ve *Enterococcus faecium*'un bağırsaktan dolaşım sistemine geçerek fagositik aktiviteyi teşvik

ettiği ve antikor düzeylerini arttırdığı da saptanmıştır (42).

3.1.1 Kalın Bağırsak Florası Düzenlenebilir mi?

Bireysel kalın bağırsak florasının özelliklerinin oluşmasında; vajinal doğum, sezeryan ile doğum, anne sütü ile beslenme, doğrudan hazır mama ile beslenme gibi faktörlerin rolü vardır. Ayrıca annenin vajinal ve kalın bağırsak florasının da bebeğin florasının oluşmasında etkisi vardır. Daha ileri yaşlarda kişinin beslenme tarzının ve yaşam koşullarının da flora üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Fakat genellikle florada önemli değişim görülmez, yani yaklaşık olarak sabittir (35). Ancak yararlı bakteriler düzenli olarak alınırsa kalın bağırsak florasında olumlu yönde değişiklik olabileceği gösterilmiştir (43, 44). Bu floradaki bireysel farklılıkların yanı sıra kişilerdeki genetik özelliklerin bazı kolon hastalıklarının patogeneğinde rolü olabileceği gündeme getirilmiştir. Bu nedenle kalın bağırsakta yararlı bakterilerin koloni oluşturmasıyla olası hastalıkların önlenileceği düşünülmektedir (3,44).

Çeşitli çalışmalarda elde edilen bulgular, kalın bağırsak mikroflorasının kanser etiyolojisinde rolü olduğu görüşünü desteklemektedir (10, 21, 45-48). Bu bulgular özetle aşağıda verilmiştir.

İnsan dışkısının mutajenik olduğu gösterilmiş ve bakteriyel orijinli genotoksik maddeler izole edilmiştir.

Bağırsak bakterileri, diyet bileşiminden genotoksik, karsinojenik ve tümör arttırıcı aktivitesi olan ikincil maddeler üretebilir.

Bağırsak bakterileri, prekarsinojenleri DNA reaktif maddelere dönüştürür.

Karsinojen 1,2-dimetilhidrazin uygulanan mikropsuz sıçanlar ile normal mikroflorası olan sıçanlar karşılaştırıldığında, kolon tümörleri normal mikroflorası olan sıçanlarda daha düşük orandadır.

Mikropsuz sıçanlar insan gıdaları ile beslendiğinde

geleneksel sıçanlara göre dokularda kansere yol açan kovalent bağlı kimyasalları içeren DNA miktarı (DNA adduct) daha azdır.

Kalın bağırsak florasının probiyotiklerle düzenlenmesi yoluyla kalın bağırsakta meydana gelen kolon kanserinin yanı sıra kolit, kısa bağırsaksendromu, karın ağrısı, ishal, kabızlık gibi hastalıkların önlenmesi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Akut bulaşıcı diyare, antibiyotik ile ilişkili diyare, irritabl bağırsak sendromu, ülseratif kolit, nekrotizan enterokolit ve Crohn hastalıklarının azaltılmasında bazı probiyotik müdahalelerin etkinliğini destekleyecek iyi kanıtlar bulunmaktadır (10, 45-47). Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi inflamatuvar bağırsak hastalığı, KRK için bilinen risk faktörleridir (10).

Yapılan bir meta-analizde erken doğmuş 2.500 g altında doğan 1.425 bebeğe probiyotik verilmesi ile nekrotizan enterokolit gelişmesinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Ancak probiyotik verilmesi nozokomiyal sepsis oranını etkilememiş ve parenteral (sindirim yolu dışında) beslenme süresini de kısaltmamıştır (48).

Diğer bir bağırsak hastalığı olan kısa bağırsak sendromu üzerine probiyotiklerin etkisini belirlemek amacıyla yapılan çift kör plasebo kontrollü bir çalışmada, 9 ay-17,5 yaş arasındaki 21 kısa bağırsaklı çocuk yer almıştır. Çocukların dokuzuna günde 109 kob (koloni oluşturan ünite) içeren LGG kapsülü, diğer 12 çocuğa ise plasebo içeren kapsül dört hafta boyunca verilmiştir. Ancak çalışma sonucunda her iki gruptaki çocukların bağırsak geçirgenliği farklı bulunmamıştır (49). İkinci bir randomize çalışmada irritabl bağırsak sendromlu 32 çocuk ile 72 hasta olmayan çocuğa LGG 3X109 ya da plasebo 4 hafta boyunca verilmiş ve LGG grubunda %33, plasebo grubunda %3 olguda ağrının kaybolduğu anlamlı olarak gözlenmiştir. Ancak iki grupta da bulguların iyileşmesi, ağrı sıklığı ve ciddiyeti, ilaç kullanımı ve okula devamsızlık gibi değişkenler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (49). Çocuklarda çift kör plasebo kontrollü randomize bir çalışmada 50 çocuk iki gruba ayrılmış ve bir gruba

LGG 1010 kob, diğer gruba ise plasebo 6 hafta boyunca verilmiştir. Her iki grup arasında karın ağrısı, ishal ve kabızlık gibi yakınmalarda farklılık saptanmamıştır (50).

Goldin ve Gorbach (1977), DMH uygulaması yapılan sıçanlarda kalın bağırsak tümör insidansı üzerine *L. acidophilus* etkisini araştırmıştır. Bakteri enzimleri olan β -glukuronidaz, azoredüktaz ve nitroreduktaz sıçanların dışkı mikrofloralarında ölçülmüştür. Diyet, ileri yaş, *L. acidophilus* takviyeleri ve DMH'nin bu mikrobiyal enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Tahıl diyetinden et diyetine geçiş, üç enzimin aktivitesinde 1,5-2,5 kat artma ile sonuçlanmıştır. Et diyeti tüketen 20 aydan büyük hayvanlar, dışkı β -glukuronidaz aktivitesinde daha fazla artış gösterirken, tahıl diyetiyle beslenen sıçanlarda üç mikrobiyal enzimin seviyesi de artmıştır. *L. acidophilus*'un ek besin olarak takviyesi, et yiyen hayvanlarda fekal nitroreduktaz ve azoredüktaz'ın aktivitesini önemli ölçüde düşürmüştü, ancak tahıl ile beslenen hayvanlarda nitroreduktaz aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. DMH, hem tahıllı hem de et ile beslenen hayvanlarda fekal β -glukuronidaz aktivitesini arttırmış, ancak nitroreduktaz veya azoredüktaz etkinliği üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Bu çalışmanın sonuçları, bağırsak mikroflorasının metabolik aktivitesinin çeşitli faktörlerden etkilendiğini göstermektedir. Bulgular, et diyetinin sıçanın mikroflorasında β -glukuronidaz, nitroreduktaz ve azoredüktaz aktivitesini arttırdığını göstermektedir (51). Goldin ve ark. (1984)'nın başka bir çalışmalarında ise *L. acidophilus*'un ağız yoluyla uygulanması sonucu, fekal bakteriyel enzim aktivitesi üzerindeki etkisini araştırılmıştır. β -glukuronidaz, nitroreduktaz ve azoredüktaz olmak üzere üç bakteriyel enzim denenmiştir. Bu dışkı enzimleri, prokarsinojenlerin karsinojene dönüştürülmesini katalize edebilir. Deney grubuna *L. acidophilus*, kontrol grubuna ise steril süt dört hafta süreyle verilmiştir. Deney grubunda üç dışkı enzim aktivitesinde de 2-4 kat azalma gözlenmiş. Bu çalışma, insan kökenli yaşayan *L. acidophilus*

oral yoldan verilmesinin sağlıklı bireylerde bağırsak mikroflorasının metabolik aktivitesinde bir değişikliğe neden olabileceğini göstermektedir. Laktobasil ile beslendikten dört hafta sonra dışkıda enzim seviyeleri tekrar normale dönmüştür. Yalnız süt ile beslenmek önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu sonuca göre, mikroflorada bu enzim etkilerinin muhafaza edilmesi için bu organizmaların sürekli olarak tüketilmesinin gerekli olduğu anlaşılmaktadır (52).

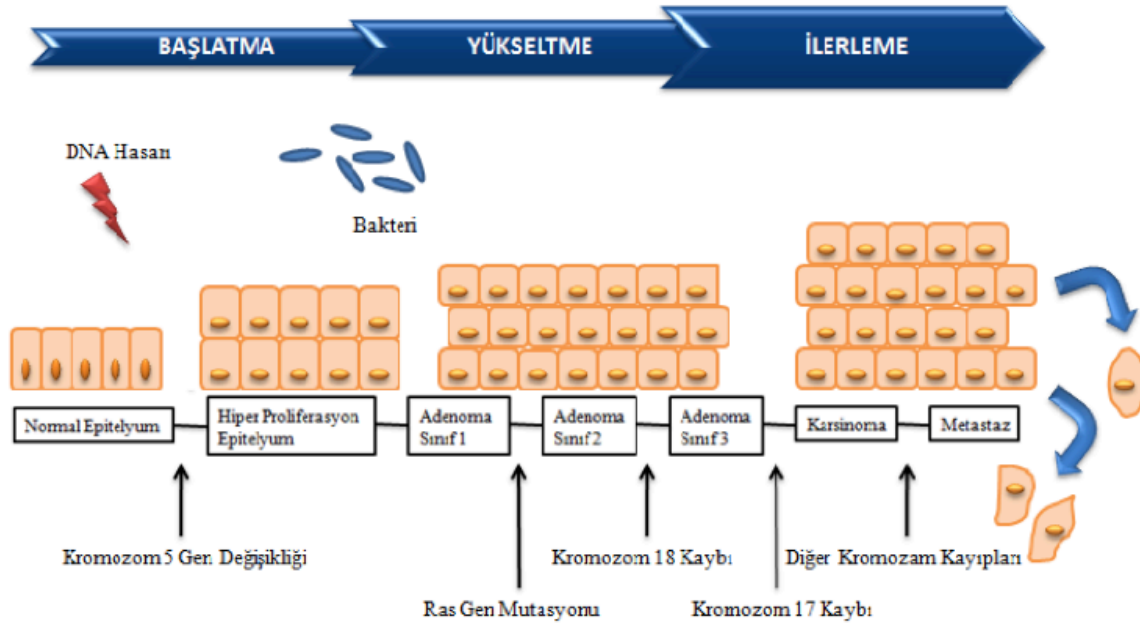
3.1.2 Kalın Bağırsak Kanseri ve Probiyotikler

2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı verilere göre, dünyada üçüncü önde gelen kanser sebepli ölümlerdedir (13). KT, RT ve cerrahi de dahil olmak üzere mevcut tedavilerin tümünde komplikasyon riski yüksektir ve bu tedavi türleri her zaman başarılı değildir. Bu nedenle yeni tedavi stratejileri geliştirmek ihtiyaç haline gelmiştir (25).

Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı'nın istatistik verilerine göre Türkiye'de de hem kadınlar hem de erkeklerde üçüncü en sık görülen kanser türü KRK olarak bildirilmiştir. Türkiye'de 2016 yılında kolon

kanser hızı erkeklerde yüz binde 246,8 kadınlarda ise yüz binde 173,6'dır (53).

Kalın bağırsak kanserinin genetik olarak farklı aşamaları çok iyi karakterize edilmiştir (Şekil 4). KRK'nin gelişimi, temelde üç ana aşamalı, sistematik bir süreç olarak görülebilir; Bunlar, başlatma, yükseltme ve ilerleme aşamalarıdır. Başlangıç sürecinde, ya kendiliğinden ya da karsinojen maddelere maruz kaldıktan sonra normal hücrelerin DNA diziliminde değişimler meydana gelir ve yapı, neoplastik hücrelere dönüşür. İlerleme fazında mutasyona uğramış hücreler tipik bir doku büyümesini ve tümör oluşumunu teşvik ederek klonal çoğalmaya maruz kalırlar. İlerleme evresinde, malign tümör dönüşümü ve çoğalmaya ek mutasyonlar, epigenetik değişiklikler ve genetik istikrarsızlıkla gerçekleşir. Dolayısıyla, KRK gelişimi, hücresel büyüme ve farklılaşma ile ilgili normal kontrol mekanizmalarının aşamalı olarak kaybından kaynaklanmaktadır (54, 55). Tüm aşamalar Şekil 4 üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4. Kalın bağırsak kanserinde genetik yapılanma

KRK vakalarının % 70'inin çevresel faktörler sebebiyle ortaya çıktığı bilindiğinden, bu kanser aşamaları üzerinde beslenme şeklinin önemli bir etkisinin olduğu düşünülmektedir. Gıdalar ve besin öğelerinin kanserle ilişkisinin araştırıldığı pek çok çalışma sonucunda kanser riskini arttıran ve azaltan besin öğeleri bulunmuş ve bunun üzerine çalışmalar yapılmıştır. Beslenme şeklinin yanı sıra bağırsak mikrobiyotasındaki değişiminde KRK'in başlamasından kısmen sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bifidobakterilerin azalması da dahil, bağırsak mikrobiyolojisinde değişiklik, KRK'in başlangıcından kısmen sorumlu tutulabilir (10). Gıda takviyesi olarak probiyotik kullanımıyla kanserin önlenmesinin ya da kanserden korunmanın mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, probiyotiklerin deneysel hayvan modellerinde birçok yararlı etkisi gözlenmiştir (34-36).

Bazı diyet faktörleri (toplam yağ ve protein, et alımı, yüksek kalori alımı) kanser riskini arttırma ile ilişkili olabilir ve karsinogenez üzerindeki etkileri hakkında farklı hipotezler vardır. Etle ilgili bileşikler, özellikle heterosiklik aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitritler ve nitratlar KRK'de rol oynayan mutajenlerdir. Aşırı et, dolayısı ile hayvansal protein tüketilen ülkelerde kalın bağırsak-rektum kanseri, hayvansal protein az tüketilen ülkelere daha fazla görülmektedir (54, 57). Bu diyet faktörleri başlatma fazında etki gösterebilir. Bu etki beslenme sırasında alınan genotoksik bileşikler (mutajenler) ile kalın bağırsak lümeninde meydana gelmektedir. Böylece mutajenler DNA hasarına yol açabilir ve onkogen aktivasyonuna sebep olabilir. Diyet risk faktörlerinin örneğin etle ilgili bileşiklerin diğer tipik bir örneği yağlardır. Yağ bağırsaklara giden birincil safra asitleri miktarını artırır ve bunlar da bağırsak mikroflorasında bulunan zararlı bakteriler tarafından ikincil safra asitlerine dönüştürülür. Böylece tümör arttırıcı yönde hareket edebilirler (54). KRK gelişimi, hücre büyüme ve farklılaşma ile ilgili normal kontrol mekanizmalarının aşamalı olarak kaybindan kaynaklanmaktadır (55). Öte

yandan, diyet lifleri, sebze, meyve, vitamin A, C, D ve E vitaminleri ve kalsiyum gibi bazı diyet faktörleri tümör riskini azaltma ile ilişkilendirilmiştir (54). A ve C vitamini vücuda alınan karsinojenleri etkisiz hale getirmektedir. D vitamini ve yeterli kalsiyum alımı KRK'nın yanı sıra kemik ve deri kanseri riskini de azaltır. E vitamini ise güçlü bir antioksidan olduğu için toksik maddelerin etkilerini azaltır ve yağların oksidasyonunu önler (57).

Kalın bağırsak kanserinin oluşumunda beslenme şeklinin rol oynadığı ilk kez Haenszel ve arkadaşları (1973) tarafından gösterilmiştir. Bu amaçla Japon geleneksel beslenmesi ve Hawaii batı tipi beslenme karşılaştırılmıştır. Deneme bağırsak kanseri olan 179 Japon hasta ve Hawaii'deki 357 hastane kontrolü üzerinde yapılmıştır. Japonya'dan Hawaii'ye göç eden bireylerde kalın bağırsak kanseri riskinin, yerli Hawaii nüfusu düzeyine ulaştığını bildirmişlerdir. Bu durumun Japon göçmenlerin giderek geleneksel yerel Japon diyetinden, batı tipi bir diyetle kaymış olmalarından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (58).

Benzer çalışmalar daha sonraki yıllarda da sürdürülmüştür. Epidemiyolojik çalışmalar, *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* içeren fermente süt ürünlerinin büyük miktarlarda tüketiminin kalın bağırsak kanseri yoğunluğunun düşmesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, konak florasındaki inflamatuvar yanıtta azalma, bağırsak bakterilerinin metabolik aktivitelerinde değişim, prokarsinojen veya mutajen durum oluşturan bakteri sayısında azalma ve anti-tümör etkili ve mutajen oluşumunu engelleyici madde üretimi de doğrulanmaktadır (47). Früktanlar gibi prebiyotiklerin, laktobasiller ve bifidobakteriler gibi probiyotiklerin ya da prebiyotik ve probiyotik karışımlarının (sinbiyotikler) kolon kanserine karşı koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir. Femia ve ark. (2002)'nin yaptığı çalışmada oligofruktazla zenginleştirilmiş inülin, *B. lactis* (Bb12) ve (LGG) ya da sinbiyotiklerin sıçanlarda azoksimetanla (AOM) teşvik edilmiş kolon kanserine karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Bu amaçla sıçanlar batı tipi

beslenmeye benzer şekilde yağ ve karbonhidrat içeriği yüksek, selüloz içeriği düşük bir diyetle beslenmiştir. Prebiyotik ve sinbiyotik verilen gruplar kontrole kıyasla tümör sayısında önemli düzeyde ($p<0,001$) azalma göstermiştir. Probiyotik verilen grupta ise malign tümörlerin sayısı daha az bir değişim göstermiştir. Sonuç olarak sıçanlarda prebiyotik içeren diyetle beslenmenin AOM'la teşvik edilmiş karsinogenezi azalttığı vurgulanmıştır (59). Çalışmada probiyotiklerin kolon kanserinin önlenmesi açısından etkisi prebiyotiklere ve sinbiyotiklere kıyasla daha az bulunmakla birlikte Gao ve ark. (2017)'nin yaptığı çalışmada *Lactobacillus reuteri*'nin luminal histamin üretimini sağlayarak, yangıya bağlı olarak oluşan kolon kanserini baskıladığı gösterilmiştir. Bu amaçla Hdc-/- (Histidin dekarboksilaz) farelerin bağırsaklarında hdc+ *L. reuteri*'nin verilmesiyle luminal hdc gen ekspresyonu ve histamin üretimi gerçekleştirilmiştir. Histamin üreten probiyotik, kolon tümörlerinin sayısını azaltmış ve tümörleri küçültmüştür (60). Yapılan çalışmalar gösteriyor ki, probiyotik bakterilerin KRK'in önlenmesi üzerine etkileri değişkenlik göstermekte, bu değişkenlik ise suşların farklılıklarından kaynaklanmaktadır.

3.1.3 Kalın Bağırsak Kanseri ve Probiyotikler

Dünya çapında en önemli kanser türlerinden biri olan mesane kanseri, kadınlara göre erkeklerde üç kez daha sık etkili olmaktadır. Buna ilaveten, mesane kanserleri sıklıkla malign olmakta ve tekrarlayabilmektedir. Bu nedenle, tümör tekrarının önlenmesi mesane kanseri için büyük önem taşımakta ve yardımcı tedaviye gereksinim duyulmaktadır (13). Bu gereksinim farklı yaklaşımları beraberinde getirmiştir.

Probiyotiklerin mesane kanseri üzerindeki baskılayıcı etkisi belirlenmiş, ancak spesifik mekanizma henüz anlaşılmamıştır. Daha önce de bahsedildiği gibi NK hücrelerin antitümör efektör hücrelerdir. Farelerde NK hücre aktivitesi antitümör etki göstermektedir (31).

Karsinojen heterosiklik aminler içeren pişmiş et sindiriminin insanlarda üriner mutajenitenin artmasına neden olduğu bilinmektedir. Hayatsu ve Hayatsu (1993), sigara içmeyen altı sağlıklı kişi ile üç hafta boyunca ağız yoluyla *L. casei* verilmesinin kızarmış kıymadan kaynaklanan üriner mutajenite üzerindeki etkisini araştırmışlardır. *L. casei* uygulamasından önce ve sonra bulunan üriner mutajenitenin karşılaştırılması, tedavinin mutajenitenin azalmasına (ortalama %47,5) neden olduğunu göstermiştir. Bu azalma etkisinin bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerle ilgili olduğu sonucuna varılmıştır. Burada sunulan veriler, insanların etten türetilmiş karsinojenlere maruziyetinde bağırsak mikrobiyotasının kalitesinin önemini ortaya koymaktadır. Diğer bir açıklama ise, pişmiş et mutajenlerinin bağırsak bakterilerinin metabolik fonksiyonu veya bifidobakteri ile zenginleştirilmiş mikroflora popülasyonu tarafından sindirim yolunda bozularak mutajen maruziyetinin azalmasına neden olmasıdır (61).

Aso ve ark. (1995), 138 hastada trans-üretral rezeksiyon sonrası mesane yüzeysel transizyonel hücreli kanser tekrarı üzerine *L. casei*'nin etkisini incelemişlerdir. Birincil çoklu tümörler ya da tekrarlayan tümör olan hastalarda, tekrar etmeme oranı plasebo grubunda %54,9 'den *L. casei* grubunda %79'a yükselmiştir. Ayrıca bu uygulamanın ileri düzeyde prognozu veya tekrarlayan çoklu tümörü olan hastalarda anlamlı bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Farklı araştırmacıların tespiti ise laktobasiller tarafından bağırsaklık sisteminin uyarılmasının hastaların üzerindeki etkisinin önemli bir faktör olduğu yönündedir (62).

1976 yılında yüzeysel mesane kanseri tedavisi için canlı mikroorganizma kullanımı önerilmiş ve Bacillus-Calmette-Guerin (BCG)'nin kullanımı başlamıştır. BCG hala yüzeysel mesane kanseri için bir ön basamak tedavi olarak kullanılmaktadır (63). Yüzeysel mesane kanseri tedavisinde BCG ile bölgesel bir bağırsaklık tepkisi yaratılmaktadır (31). 1986 yılında bir Japon

ürolog olan Dr Michio Asano, ilk olarak laktik asit bakterilerinin mesane kanserini önlemek için önermiştir. Deneysel bir fare mesane tümörü modeli kullanarak Asano ve ark. (1986) *Lactobacillus casei* (LC 9018) tüketimi sonucunda tümör büyümesinin engelleneceğini ve mesane kanserinin tekrarının önlenilebileceğini bulmuşlardır (64). Lim ve ark. (2002) ise LGG'nin de bir mesane tümör kitlesi içine uygulandığında gelişmekte olan mesane kanser hücrelerini engelleyebildiğini göstermişlerdir (65). Bu çalışmalara ilaveten Seow ve ark. (2010), mürin mesane kanseri modelinde LGG'nin, BCG kadar etkili olabileceğini belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. İnsan MB49 mesane kanseri hücreleri dışı C57BL/6 farelerine ortotopik olarak yerleştirilmiştir. Fareler intravezikal instilasyon yoluyla verilen canlı ya da liyofilize LGG ile veya haftada bir kez oral ve intravezikal LGG ile tedavi edilmiş, LGG ve BCG immünoterapi karşılaştırması yapılmıştır. Sonuç olarak, LGG'nin çok sayıda nötrofil ve makrofajı tümör bölgesine yönlendirdiği gözlenmiştir. LGG ve BCG immünoterapi ile tedavi edilmemiş farelerde % 20 iken, immünoterapi uygulananlarda iyileşme oranları sırasıyla % 89 ve % 77 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle "LGG, mesane kanseri tedavisinde BCG immünoterapinin yerini alma potansiyeline sahiptir" sonucuna varılmıştır (66).

3.1.4 Karaciğer Kanseri ve Probiyotikler

Karaciğer kanserlerine tüm kanserler içinde daha az rastlanır. Batı toplumlarında daha nadir rastlanan bir tümördür ve özellikle hepatit B enfeksiyonunun yaygın olduğu Güneydoğu Asya ve Güney Afrika'da görülür. Karaciğer kanserleri çoğunlukla hepatosit adı verilen karaciğer hücrelerinden köken alırlar. Bu nedenle, karaciğer kanserlerinin %85-90'ına hepatosellüler kanser adı verilir (53).

Bu konuda sınırlı sayıda çalışma yapılmış ve probiyotiklerin karaciğerde hepatosit hasarını, inflamasyonu ve proinflamatuvar sitokinleri azalttığı ve antioksidan aktiviteyi arttırdığı böylece kanser

oluşumunu engellediği saptanmıştır. Örneğin *B. longum* diyetinin (% 0,5 liyofilizasyonlu *B. longum*, 1x10¹⁰ canlı bakteriyel hücre / gün) erkek sıçanların, karaciğer tümörlerini oluşumunu ve çoğalmalarını baskıladığı gözlenmiştir. Tümör sıklığında karaciğerde %80 azalma olduğu görülmüştür. Dişi sıçanlarda, *Bifidobacterium* kültürlerle diyet takviyesi yapıldığında, karaciğer karsinogenezi %27 oranda azalmıştır. Fakat kontrol diyeti alan grup ile anlamlı fark görülmemiştir (67). Benzer bir şekilde Li ve ark. (2016)'nın yaptıkları çalışmada, hepatosellüler karsinoma üzerine probiyotiklerin etkisini incelemişlerdir. Oluşturdukları hayvan denemesinde bir probiyotik karışımı (Prohep) ile bir fare modelini bir hafta önce beslemiş, daha sonra kontrol ile karşılaştırıldığında tümör ağırlığının ve boyutunun %40 oranında azaldığını gözlemlemişlerdir. Bulguları ile probiyotiklerin faydalı etkisinin, antiinflamatuvar metabolitleri üreten bazı yararlı bakterilerin bolluğu ile yakından ilişkili olduğunu, böylece bağırsak ve tümör arasındaki etkileşimin proinflamatuvar immün hücre popülasyonu düzenlediğini göstermişlerdir (68).

Japonya'da yapılan araştırmada karaciğer kanseri ve probiyotikler arasındaki ilişkiye bakıldığında, hastalarda *L. acidophilus* takviyesi sayesinde %65 oranında, bağırsaklarda bulunan *E. coli*, *Streptococcus faecalis* ve *Clostridium paraputrificum*'un neden olduğu karaciğer tümörlerinin bastırıldığı gözlenmiştir (69).

Bağırsak bakterilerinin veya metabolitlerin portal ven yoluyla karaciğere girmesinden ötürü, bağırsak mikroorganizmalarının değişiminden karaciğer büyük ölçüde etkilenmektedir. Probiyotiklerin karaciğer kanseri üzerine etkilerini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu yararlı bakteriler, karaciğer kanseri için risk faktörlerini azaltarak ve karaciğer DNA mutasyonuna sebep olan toksinleri bağlayarak etkili olmaktadır. Çalışmalarda probiyotik ile beslenmenin hayvan denemelerinde karaciğer kanseri ve karaciğer kanserine sebep olan mutajenik maddeler üzerine etkileri deneysel olarak gösterilmiştir. Örneğin,

daha önce bahsedildiği gibi aflatoksinler, Hepatit B enfeksiyonunu daha sonra da karaciğer kanserini teşvik eden DNA mutasyonuna sebep olmaktadır. Aflatoksin ile yapılan bir çalışmada, wistar sıçanlarda AFB1'in neden olduğu deneysel karaciğer hasarında probiyotik fermente süt ürününün klorofin ile kombine olarak hepatoprotektif etkisi araştırılmıştır. Tek tek veya birlikte klorofilin ile probiyotik fermente süt ürünü uygulanan sıçanlarda, AFB1 ile artan hepatokarsinogenezise karşı güçlü bir koruyucu etki saptanmıştır (20).

Karaciğer kanserinin en önemli nedenini Hepatit B ve C enfeksiyonları oluşturmaktadır. Probiyotiklerin steatohepatitin engellenmesinde etkileri de incelenmiştir. Metiyonin ve kolinden fakir diyet ile oluşturulan non-alkolik steatohepatitte, iki probiyotik karışımının koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, altmış adet erkek Wistar sıçan kullanılarak 2 ve 6 haftalık olmak üzere iki farklı sürede deneme gerçekleştirilmiştir. İki haftalık çalışmada altı gruptan oluşturulmuştur. Sıçanlar metiyonin ve kolinden fakir diyet veya kontrol diyetle beslenmiş ve orogastrik sonda ile plasebo ya da iki probiyotik karışımı (Pro-1, Pro-2) verilmiştir. Altı haftalık çalışmada ise sıçanlar dört gruba bölünerek metiyonin ve kolinden fakir diyet ya da kontrol diyet ile beslenmişler ve plasebo ya da Pro-2 verilmişlerdir. Serum alanin aminotransferazları saptanan hayvanlarda steatozis, inflamasyon, tümör nekroz faktörü- α ekspresyonu ve apoptozisin saptanması için histolojik ve immünohistokimyasal inceleme yapılmıştır. Her iki çalışmada da metiyonin ve kolinden fakir diyet tüm sıçan karaciğerlerinde, TNF- α , proapoptotik Bax, caspase 3, caspase 8 ve anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonuna neden olduğu görülmüştür. Sonuç olarak Pro-1 ve Pro-2, sıçanlarda metiyonin ve kolinden fakir diyet ile oluşturulan steatohepatiti azaltmaktadır. Probiyotiklerin koruyucu etkisi kısmen apoptoz modülasyonu ve antiinflamatuvar etkilerine bağlı olabilir şeklinde yorumlanmıştır (70).

3.1.4 Meme Kanseri ve Probiyotikler

Meme kanseri kadınlarda görülen kanser tipleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Hayat boyu her sekiz kadından birinin kansere yakalanma riski vardır. Genel olarak, meme kanseri tüm kanser tipleri arasında sağ kalım oranları en yüksek olanıdır ve bu sebeple ölümlerin sayısı azalmaktadır. Meme kanseri tanısı konulan kadınların yaklaşık %89'u tedavi sonrası en az beş yıl boyunca yaşayabilmektedir (53).

Kanser gelişimi üzerinde probiyotiklerin önemli etkinliği olarak, bağışıklık sistemi hücre aktivasyonunda artış ve prokarsinojenlerin bastırılması da dahil birkaç çeşit bilimsel kanıt ve hipotez önerilmektedir. Çoğu veri kalın bağırsak (55) ve meme kanseri vakalarından elde edilmiştir. Meme kanseri vakalarında probiyotiklerin yararlı etkilerinin, tümör önleyici bağışıklık sistemi aktivitesinin artışıyla meydana geldiği düşünülmektedir (34,71).

Maroof ve ark.'nın 2012'de yaptıkları çalışmada meme kanseri fare modeline ağız yoluyla *L. acidophilus* ve siklofosamid verilmiş, tümör gelişimi ve bağışıklık sistemi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda IFN- γ , IL-4, TGF- β ve lenfosit miktarlarında artış, tümör büyüklüklerinde ise azalma gözlenmiştir. Hollanda'da bir vaka-kontrol çalışmasında bazı fermente süt ürünlerinin meme kanserine karşı koruyucu bir etki sağlayabileceği ileri sürülmüştür. Sonuçlar göstermiştir ki; %50 oranında bir azalma için fermente süt ürünleri günde > 225 g (yoğurt, ayran, lor ve kefir) miktarında tüketilmelidir. Yoğurt gibi kültür ile üretilen süt ürünlerince zengin bir diyetin meme kanseri hücrelerinin gelişimini engellediği bildirilmiştir (34). Chang ve ark. (2002)'nin farelerde MCF-7 insan göğüs kanseri modeli oluşturarak bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus lactis* veya bifidobakterileri içeren fermente edilmiş soya sütü içeceğinin farelerde meme kanserinin büyümesini engellediğini bildirmişlerdir (71). MCF-7 hücre hattı ile yapılan bir başka çalışmaya göre ise, *Bacillus subtilis* CSY191 (CSY191) suşunun ürettiği

surfakin, meme kanseri hücrelerine karşı anti kanser aktivite sergilemiştir. CSY191 fermente edilmiş soya yaprağından elde edilmiş ve fermantasyon sırasında surfakin içeriği 48 saatte 0,3'den 48,2 mg / kg'a yükselirken, anti kanser aktivitesi 2,6'dan 5,1 katına yükselmiştir (72).

Tüm bu bilgilere ilaveten, meme kanseri üzerinde probiyotik içeren fermente edilmiş soya sütü kullanılarak yapılan klinik olmayan insan çalışmaları da mevcuttur. Örneğin, Toi ve ark. (2013), 40-55 yaşları arasında 306 meme kanseri hastası ve 662 sağlıklı kadın kontrolleri içine alan bir anket çalışması yapmışlardır. Diyet, yaşam tarzı, diğer risk faktörleri ve soya sütü tüketimi gibi soruların yer aldığı anketin sonucuna göre, "soya sütü tüketimi ne kadar fazla olursa göğüs kanseri olasılığı düşük olur" kanısına varılmıştır (73).

4. KANSER HASTALARINDA PROBİYOTİK KULLANIMI

KT ve RT en temel anti kanser tedavilerindedir. Sitotoksik tedaviler olan KT ve RT'nin getirdiği anlamlı sağ kalım katkısının yanında neden oldukları olumsuz etkiler hastalar için oldukça rahatsız edici olabilmektedir. Bu olumsuz etkiler hematolojik, GI ve organ toksisitesi, saç dökülmesi, KT ile ilişkili yorgunluk, anti kanser tedavisi sonucunda görülen bazı belirtiler ve bazen de hayatı tehdit edebilen yan etkileri olabilmektedir. RT'de bağırsak florasının değişimi, diyare, GI toksisite, mide bulantısı, iştah kaybı, mukozal hasar ile ilişkili iyonize radyasyonun sebep olduğu bazı yan etkilere sebebiyet vermektedir (21). Ayrıca KT ve RT, hastalarda immün sistemin zayıflamasına ve hastaların enfeksiyonlara açık hale gelmesine yol açmaktadır. Tedaviye bağlı olarak gelişen bu yan etkiler ile mücadele etmek, kanser tedavisinde hastaların hayat kalitesini artırma yönünde önemli bir yere sahiptir (74).

Yan etkiler ile mücadelede farklı ilaçlar, beslenme destek ürünleri ya da yöntemler kullanılabilir. Son dönemde, probiyotiklerin GI ve immün sistemde

sağladığı yararlı etkilerini gösteren çalışmalar ve pozitif veriler artmıştır. Böylece araştırmacıları kanser tedavisinin yan etki kontrolünde de probiyotiklerin koruyucu özelliklerinin hastalarda normal şartların devamlılığına yardımcı olabileceği ve kanser tedavisinin getirdiği yan etkileri azaltabileceği görüşüne yöneltmiştir. Bu konuda yeni çalışmalar oluşturulmaya başlanmıştır. Örneğin Marschalek ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada oral olarak uygulanan *Lactobacillus* preparatının, meme kanseri için KT gören kadınlarda vajinal mikrobiyotik gelişme potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir (75). Benzer şekilde KRK hastalarında KT yan etkilerini hafifletmek için tamamlayıcı terapilerin ek olarak kullanılması, en sık uygulanan yardımcı ilaç olan diyet takviyeleri ile ön plana çıkmaktadır. KRK hastaları için sıklıkla kullanılan diyet takviyeleri arasında probiyotikler, omega-3 yağ asidi ve glutamin yer almaktadır (76).

Kanser tedavisinde yan etkiler ile mücadelede, probiyotiklerin in vitro ve hayvan çalışmalarında immün sistemi aktive edebilmesi ve antimikrobiyal etki ile fırsatçı enfeksiyonları engelleyebilmesi, bu konudaki klinik çalışmalara yol gösterici olmuştur. Ancak hala yeterli klinik çalışma bulunmamaktadır (21).

Probiyotikler en çok KT ve RT ile ilişkili diyare ve KT'nin enfeksiyon komplikasyonlarından korunmada değerlendirilmiştir. Pek çok kanser hasta grubunda diyarenin sıklığı oldukça yüksektir. İnsanlarda yapılmış çalışmalar özellikle pelvik bölgede kanseri olan KT ve/veya RT alan hastalarda diyare gelişimi üzerindeki etkisi üzerine olmuştur. Bu konu ile ilgili yayınlamış bine yakın hasta sayılı üç randomize plasebo kontrollü çalışmayı da içeren on klinik çalışma bulunmaktadır. Bütün çalışmalarda KT ya da RT öncesinde veya beraberinde probiyotik kullanımı ile tedaviye bağlı görülen diyarenin anlamlı ölçüde azaldığı ve probiyotik kullanan hastaların tedavilerini ara vermeden tamamladıkları gösterilmiştir (21).

Kanser hastalarında probiyotiklerin araştırıldığı

diğer bir konu da KRK hastalarında cerrahi sonrası gelişebilecek komplikasyonların engellenmesidir. Bu konuda yapılmış 714 hasta içeren toplam 8 çalışmanın sadece üçünde ameliyat sonrası komplikasyonların pre-/pro-/sinbiyotik kullanımı ile azaldığı gösterilmiştir. Dört çalışmada plasebo ile fark görülmemiştir. Pozitif çalışma sonuçlarına göre probiyotik kullanımı ile bağırsak mukoza bütünlüğünün korunabildiği ve immün sistemin desteklenmesi ile komplikasyonların daha az oranda görülebileceği belirtilmiştir (77).

SONUÇ

Bakterilerin, vücudumuza zararlı ve hastalıklara neden olduğu kanısı uzun yıllar kabul görmüştür. Oysa günümüzde sayıları giderek artan bilimsel araştırma sonuçlarına göre canlı mikroorganizmaların bazı hastalıkların önlenmesinde, hatta tedavisinde kullanılabilmesine işaret edilmektedir. Bu bağlamda probiyotiklerin önemi de gün geçtikçe artmaktadır.

Probiyotiklerle gastrointestinal enfeksiyonların tedavisi ve kanserin önlenmesi ile ilgili birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, kullanılan probiyotik mikroorganizma türü, doz, çalışmada kullanılan insan popülasyonları, veya çalışmanın in-vitro, in-vivo olması ve hastalığın durumu gibi bir çok faktördeki farklılıklar nedeniyle bu çalışmaların sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılması söz konusu olamamaktadır. Yapılan birçok çalışmada probiyotiklerin intestinal sağlık üzerine yararlı etkilerinin mikroorganizma türü ve suşuna göre

farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir. Probiyotiklerin sağlık üzerine etkilerinin kesinleştirilebilmesi için daha fazla kontrollü çalışmaların yapılması yararlı olabilir.

Her geçen yıl artan oranda karşımıza çıkan kanser hastalığının riskini artırıcı birçok faktör sayılabilmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda beslenmenin kanser riski oluşturmada en büyük paya sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle beslenme ile ilgili basit önlemler alarak, iyi ve bilinçli yapılan beslenme hem kanser oluşumunu engellemekte, hem de kanserle mücadelede önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle fonksiyonel gıda bileşenleri olarak değerlendirilen probiyotiklerin bu açıdan önemli etkileri bulunmaktadır.

Probiyotik bakterilerin suşlara özgü özellikleri doğrultusunda, kanser oluşumu ve mekanizması üzerine etkileri belirlenmeli, böylece olumlu etki gösteren suşlar tespit edilmelidir. Ayrıca probiyotiklerin, prebiyotikler ile veya birbirleriyle kombinasyonları denenerek, kanser üzerine etkileri belirlenmelidir.

Sonuç olarak; probiyotiklerin kanser mekanizması üzerine etkileri ile ilgili bilinmeyenlerin çözümü üzerinde yeni, kapsamlı ve çok disiplinli (multi disiplinler) çalışmaların yapılması gerekmektedir. Tüm bu çalışmalar sonrasında yakın bir gelecekte hastalıkların teşhisinde de mikrobiyotadan belirteç olarak yararlanılacak ve probiyotikler bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO), 2002; Working Group Report on Drafting Guidelines for the valuation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1.
2. Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, J Appl Microbiol, 2006; 100(6):1171-85.
3. Yılmaz K, Altındış M. Sindirim Sistemi Mikrobiyotası ve Fekal Transplantasyon, Nobel Med, 2017; 13(1): 9-15.
4. Lerner A, Neidhöfer S, Matthias T. The gut microbiome feelings of the brain: A perspective for non-microbiologists, microorganisms, 2017; 5, 66.

5. Avetisyan M, Schill EM, Heuckeroth RO. Building a second brain in the bowel, *The Journal of Clinical Investigation*, 2015; 125, 3.
6. Jayasinghe R. 2017; A look at the Second Brain: The Brain in the Gut, Researchgate, <https://www.researchgate.net/publication/315726781>.
7. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*, 1991; 32, 439-42.
8. Tamime AY, Marshall VME. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, editör Law B.A. *Microbiology and Technology of Fermented Milk*, 2. Baskı, Blackie Academic & Professional Publ. London, 1997; 153-192.
9. Aragón F, Perdigón G, LeBlanc A.M. Modification in the diet can induce beneficial effects against breast cancer, *World J Clin Oncol*, 2014; 5(3): 455-64.
10. Chong ESL. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action, *World J Microbiol Biotechnol*, 2014; 30: 351-74.
11. Gao C, Ganesh B.P, Shi Z, Shah R.R, Fultz R, Major A, Venable S, Lugo M, et al. Gut microbe mediated suppression of inflammation-associated colon carcinogenesis by luminal histamine production. *The American Journal of Pathology*, 2017; Vol. 187, No. 10.
12. Ölgen S, Bıçak I, Nebioğlu D. Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar *Ankara Ecz, Fak, Derg.* 2002; 31 (3)193-214.
13. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2016; Uluslararası Kanser Araştırma Bürosu, Kanser Raporu.
14. Türkiye İstatistik Kurumu, 2017; 2009-2016 Yılları Türkiye Kanser İnsidansı, www.tuik.gov.tr.
15. Dönmez M, Cankurtaran M, Diken F, Günendi P. Gıda beslenmesi ve kanser ilişkisi, *Ulusal Meslek Yüksekokulları Öğrenci Sempozyumu (MYO-OS)*, 21-22 Ekim, Düzce. 2010.
16. Aliustaoglu M, Temel kanser fizyopatolojisi, *Klinik Gelişim*, 2014; 46-495.
17. Bolognani F, Rumney CJ, Rowland IR. Influence of Carcinogen binding by lactic acid producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens, *Food and Chem. Toxicol.* 1997; 35: 535-45.
18. Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints, *Methods Mol Biol.* 2014; 1170: 29-40.
19. Nezami H, Mykkanen H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B, from the chicken duodenum. *J Food Prot*, 2000; 63: 549-52.
20. Kumar M, Verma V, Nagpal R, Kumar, A, Behare PV, Singh B, et al. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B1-induced liver carcinogenesis in rats, *British Journal of Nutrition*, 2012; 107, 1006-16.
21. Kıray E, Kariptaş E. Probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotiklerin kolorektal kanser ilişkisi, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 2015; Cilt: 13(1): 28-46.
22. Alagözülü H. Karsinogeneziste diyet ve mikrobiyotanın yeri. 5. Ulusal Gastroenteroloji Cerrahi Kongresi. 1st Euroasian Gastroenterological Association Symposium. 5 - 8 Nisan, Antalya, 2017.
23. Perdigon G, Locascio M, Medici M, Pesce A, Holgado R, Oliver G. Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function *BIOCELL*, 2003; 27(1): 1-9 ISSN 0327 - 9545.
24. Coşkun T. Pro-, pre- ve sinbiyotikler, çocuk sağlığı ve hastalıkları Dergisi, 2006; 49: 128-148.
25. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Probiotics, prebiotics and synbiotics, A Role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biology & Therapy*, 2006; 5: 10, 1265-9.
26. Lidbeck A, Geltner U, Allingert K, Orrhage M, Ottovat L, Brismars B, et al. Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the faecal microflora and soluble faecal bile acids in colon cancer patients. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 1991; 4: 81-8.
27. Schiffrin E, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann J, Donnet-Hughes A. Immunomodulation of human blood cells following ingestion of lactic acid bacteria. *J, Dairy Sci*, 1996; 78, 491-7.
28. Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld JH. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci.* 1997; 80(6):1031-7.
29. Herich R, Levkut M. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system, *Vet, Med, Czech*, 2002; 47 (6):169-80.
30. Bhakdi S, Jensen J,T. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*, *Microbiological Reviews*, 1991; 55 (4), 733-51.
31. Feyisetan O, Tracey C, Hellawell G.O. Probiotics, dendritic cells and bladder cancer, *BJU International*, 2011; 109: 1594 - 7.
32. Takeda K, Suzuki T, Shimada SI, Shida K, Nanno M, Okumura K. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota, *Clinical and Experimental Immunology*, 2006; 1365-2249.

33. Pertigon G, deMakfas ME, Alvarez S. Systemic Augmentation of the immun response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus GG*- derived enzymes. Immunol. 1998; 63: 17-23.
34. Maroof H, Mohammad HZ, Mobarez AM, Mohamadabadi MA, *Lactobacillus acidophilus* Could Modulate the Immune Response Against Breast Cancer in Murine Model, Clin. Immunol. 2012; 32: 1353-59.
35. Lee A, Lee YJ, Yoo HJ, Kim M, Chang Y, Lee DS, Lee JH. Consumption of Dairy Yogurt Containing *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* and Heat-Treated *Lactobacillus plantarum* Improves Immune Function Including Natural Killer Cell Activity, nutrients, 2017; 9, 558.
36. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of Murine Colitis by *Lactococcus lactis* Secreting Interleukin-10. Science, 2000; 289, 1352-5.
37. Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney C, et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* mediated antigenotoxicity in the colon of the rat, Nutrition and Cancer, 1996; 26, 365-80.
38. Zsivkovits M, Fekadu K, Sontag G, Nabinger U, Huber W.W, Kundi M, et al. Prevention of heterocyclic amine-induced DNA damage in colon and liver of rats by different *Lactobacillus* strains, Carcinogenesis, 2003; 24 (12) :1913-8.
39. Koller VJ, Marian B, Stidl R, Nersesyan A, Winter H, Simic T, et al. Impact of lactic acid bacteria on oxidative DNA damage in human derived colon cells. Food and Chemical Toxicology, 2008; 46, 1221-9.
40. Göçer ÇEM, Ergin F, Küçükçetin A. Sindirim Sistemi Modellerinde Probiyotik Mikroorganizmaların Canlılığı, Akademik Gıda, 2016;14(2) 158-65.
41. Karahan A.G, Çakmakçı ML. Probiyotikler. Gıda, 1996; 21(4):297-302.
42. Gawronska A, Dziechciarz P, Horvath A, Szajewska H. A randomized double-blind placebo-controlled trial of *Lactobacillus GG* for abdominal pain disorders in children. Aliment Pharmacol Ther 2007; 25(2): 177-84.
43. Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, Bressollier, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field, Food Science and Technology 50, 2013; 1-16.
44. Sanders ME, Guarner F, Guerrant R, Holt P.R, Quigley E.M.M, Sartor R.B, et al. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. Gut, 2013; 62(5): 787-96.
45. Verna EC, Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? Therap Adv Gastroenterol, 2010; 3:307-19.
46. Lauranne AAP, Levinus AD, Hoentjen F. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2016; 30, 55e71.
47. Burns AJ, Rowland IR. Anti-Carcinogenicity of Probiotics and Prebiotics. Curr, Issues Intest, Microbiol, 2000; 1(1): 13-24.
48. AlFaleh K, Anabrees J, Bassler D, Al-Kharfi T. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants, The Cochrane Library, 2011; 3: 1-46.
49. Sentongo T. A, Cohran V, Korff S, Sullivan C, Iyer K, Zheng X. Intestinal Permeability and Effects of *Lactobacillus rhamnosus* Therapy in Children With Short Bowel Syndrome. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2008; 46: 41-7.
50. Bausserman M, Michail S. The use of *Lactobacillus GG* in irritable bowel syndrome in children: a double-blinded randomized control trial. J Pediatr, 2005; 147:197-201.
51. Goldin BR, Gorbach SL. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements, and dimethylhydrazine. Cancer, 1977; 40(5 Suppl):2421-6.
52. Goldin BR, Gorbach SL. The Effect of Milk and *Lactobacillus* Feeding on Human Intestinal Bacterial Enzyme Activity. The American Journal of Clinical Nutrition, 1984; 39: 756-61.
53. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2017; Kanser Daire Başkanlığı istatistik verileri.
54. Denariáz G, Dugas B, Kasper H, Schmucker D, Schrezenmeir J. Immunity And Probiotics, Nutrition and Health Collection, 1999; 7-49.
55. Coleman O.I, Nunes T. Role of the Microbiota in Colorectal Cancer: Updates on Microbial Associations and Therapeutic Implications. BioResearch, 2016; 5 (1).
56. Minemura M, Shimizu Y. Gut microbiota and liver diseases. World J Gastroenterol, 2015; 14; 21(6): 1691-702.
57. Yıldız E. Kanser ve Beslenme, Sağlık Bakanlığı, 2008; Yayın No: 728
58. Haenszel W, Berg J.W, Segi M, Kurihara M, Locke F.B. Large-bowel cancer in Hawaiian Japanese. J Natl Cancer Inst. 1973; 51(6):1765-79.

59. Femia AP, Luceri C. Antitumorogenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 2002; 23 (11) : 1953-60
60. Gao C, Ganesh B.P, Shi Z, Shah R.R, Fultz R, Major A, et al. Gut MicrobeeMediated Suppression of Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis by Luminal Histamine Production The American Journal of Pathology, 2017; 187 (10).
61. Hayatsu H, Hayatsu T. Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human, *Cancer Letters*, 1993; 73:173-9
62. Aso Y, Akaza H, Kotake T, Tsukamoto T, Imai K, Naito S. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double blind clinical trial. *Eur, Urol*, 1995; 27, 104-9
63. Dwivedi A, Nomikou N, Nigama PS, McHalea AP. The effects of microencapsulated *Lactobacillus casei* on tumour cell growth: In vitro and in vivo studies, *International Journal of Medical Microbiology*, 2012; 302: 293-9
64. Asano M, Karasawa E, Takayama T. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* (LC 9018) against experimental mouse bladder tumor (MBT-2). *J. Urol.*, 1986; 136, 719-21
65. Lim BK, Mahendran R, Lee YK, Bay BH, Chemopreventive Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on Growth of a Subcutaneously Implanted Bladder Cancer Cell Line in the Mouse, *Jpn. J. Cancer Res*, 2002; 93, 36-41
66. Seow SW, Cai S, Rahmat JN, Bay BH, Lee YK, Chan YH, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG induces tumor regression in mice bearing orthotopic bladder tumors. *Japanese Cancer Association*, 2010; 101 (3): 751-8
67. Reddy BS, Rivenston A. Inhibitory Effect of *Bifidobacterium longum* on Colon, Mammary, and Liver Carcinogenesis Induced by 2-Amino-3-methylimidazo [4,5] quinoline, a Food Mutagen, *Cancer Res*. 1993; 53: 3914-18
68. Li J, Sung CYJ, Lee N, Ni Y, Pihlajamäki J, Panagiotou G, El-Nezami H. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice. E1306-E1315/ *Proceedings National Academy of Sciences*, 2016; 16, 1306-15
69. Cargill M. Probiotics Are Here to Stay. *Holistic Medicine for People and Pets*, 2009; (617) 247-1446
70. Karahan N, İşler M, Koyu A, Karahan AG, Kılıç GB, Çiriş İM, Set al. Effects of probiotics on methionine choline deficient diet-induced steatohepatitis in rats, *Türk J Gastroenterol*, 2012; 23 (2): 110-21
71. Chang W.H, Liu J.J, Chen C.H, Huang T.S, Lu F.J. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by fermented soy milk. *Nutr. Cancer*, 2002; 43, 214-226
72. Lee JH, Nam SH, Seo VT, Yun HD, Hong SY, et al. The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells, *Food Chemistry*, 2012; 131, 1347-54
73. Toi M, Hirota S, Tomotaki A, Sato N, Nozumi Y, Anan K, Nagashima T, Tokuda Y, Masuda N, Ohsumi N. Probiotic beverage with soy isoflavone consumption for breast cancer prevention: A case-control study. *Curr. Nutr. Food Sci*. 2013; 9, 194-200
74. Mego M, Holec V, Drgona L, Hainova K, Ciernikova S, Zajac V. Probiotic bacteria in cancer patients undergoing chemotherapy and radiationtherapy, *Complementary Therapies in Medicine*, 2013; 21, 712–723
75. Marschalek J, Farr A, Marschalek ML, Domig KJ, Kneifel W, Singer CF, Kiss et al. Influence of Orally Administered Probiotic *Lactobacillus* Strains on Vaginal Microbiota in Women with Breast Cancer during Chemotherapy: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blinded Pilot Study. *Breast Care*, 2017;12:335-9
76. Golkhalkhali B, Paliany AS, Chin KF, Rajandram R. The Roles of Adjuvant Supplements in Colorectal Cancer Patients on Chemotherapy - Reaping Benefits from Metabolic Crosstalk. *Nutrition and Cancer*. 2018; 70 (2): 1-8
77. Liu Z, Qin H, Yang Z, Xia Y, Liu W, Yang J, Jet al. Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery - a double-blind study, *Aliment Pharmacol Ther*, 2011; 33(1):50-63

Polimerik veziküller ve biyolojik uygulamaları

Polymeric vesicles and biological applications

Umut Can ÖZ¹, Asuman BOZKIR¹

ÖZET

Bilimin gelişmesindeki temel yaklaşım olan doğayı taklit etme çabasının günümüzdeki en son örneklerinden birisi polimerik veziküler sistemlerdir. Hücresel bölümlendirmenin yapıtaşı olan fosfolipitlerin kendiliğinden oluşum süreci ile veziküler yapıları oluşturması sürecinin, sentetik amfilik kopolimerler üzerinde uygulanması ile üretilen polimerik veziküllerin biyolojik uygulamaları, özellikle eczacılık ve tıp alanında büyük ilgi görmüştür. Polimerik veziküller, kopolimerin hidrofobik bloğunun su ile temasını en aza indirmek için yan yana gelerek çifte tabakalı bir membran oluşturması ve bu membranın sulu ortamı çevrelemesiyle meydana gelen mikroskopik/nanoskopik partiküllerdir. Yapılarındaki sulu lümen içerisinde hidrofilik molekülleri barındırabilen bu sistemler aynı zamanda hidrofobik molekülleri kopolimerik vezikül membranı içerisinde taşıyabilmektedirler. Dolayısıyla, yapısında her türlü molekülü taşıyabilme kapasitesi olan ve üretilen çeşitli kopolimerler ile kendisine farklı uygulama alanları bulmuş polimerik veziküller, araştırmacılar tarafından çoğunlukla ilaç taşıyıcı sistemler, medikal görüntüleme ajanları, nanoreaktörler ve son yıllarda da kendiliğinden çalışan nanomotorlar olarak kullanılmaktadır. Bu derleme ile, polimerik veziküller üzerinde çalışma yapacak bilim insanlarına/

ABSTRACT

One of the most recent example of the effort to imitate nature which is the basic approach for the development of science, is the polymeric vesicular systems. The biological applications of the polymeric vesicles produced by the application of self-assembly process of vesicle forming phospholipids which are the building blocks of cellular compartmentalization, on synthetic amphiphilic copolymers, have attracted considerable interest, especially in the field of pharmaceuticals and medicine. Polymeric vesicles are microscopic / nanoscopic particles which are formed by the confinement of an aqueous environment by the copolymeric bilayer membrane which is shaped by the aim of minimizing the contact angle between the hydrophobic block of the copolymer and water. These systems, which can contain hydrophilic molecules in their aqueous lumen, can also carry hydrophobic molecules in the copolymeric vesicle membrane. Therefore, polymeric vesicles, which have the capacity to carry all kinds of molecules in the structure and can be produced from various copolymers, have been utilized in different application areas such as drug delivery systems, medical imaging agents, nanoreactors and self-propelling nanomotors in recent years. With this review, it is aimed to present a general perspective to scientists / researchers who will work on

¹Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Asuman BOZKIR

Ankara Üni. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 06100 Ankara - Türkiye
Tel : +90 532 431 83 94 E-posta / E-mail : bozkir@pharmacy.ankara.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 08.12.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.87369

Öz UC, Bozkır A. Polimerik veziküller ve biyolojik uygulamaları.
Türk Hij Den Biol Derg, 2018; 75(4): 443-458

araştırmacılara genel bir perspektifin sunulması ve güncel bilgilerin bir arada verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: polimerik vezikül, polimerzom, ilaç taşıyıcı sistem, yapay hücre

polymeric vesicles and along with outlining the current information in the field.

Key Words: polymeric vesicle, polymersome, drug delivery system, protocell

GİRİŞ

Son 40 yıl içerisinde kimya ve biyoloji alanlarında kaydedilen bilimsel ilerlemeler; tıp, enerji, gıda, tarım ve iletişim gibi insan hayatında oldukça önemli yer tutan farklı sektörler üzerinde büyük etki yapmıştır. Özellikle tıp, eczacılık ve biyoloji alanlarında nanoteknolojik uygulamaların kendine yer bulmasıyla beraber bu disiplinlerdeki araştırmalar ve elde edilen ürünler büyük bir değişime uğramıştır.

Günümüzün bu gelişmeleri, insanoğlunun doğayı taklit etme çabaları sonucunda elde edilen verilerin birikerek yorumlanması ile ortaya çıkmaktadır. Yaşamın yapı taşlarının ayrıştırılıp izole edilmesinin ve herhangi bir canlı sistemin/organizmanın karmaşık yapısını oluşturmuş dinamik doğanın sağlanmasının ilk adımı “bölümlendirme”dir (1). Bölümlendirme, bir başka deyişle kontrol edilebilir hacimler yaratma ve molekülleri birbirinden ayırma yeteneği, karmaşık uygulamalar için en önemli gereksinimdir. Biyolojik bölümlendirme, boyutları nanometreden mikrometreye kadar değişebilen, sulu bir ortamı çevreleyen birkaç nanometre kalınlığındaki membranın oluşturduğu yapıların kullanılması ile gerçekleşmektedir. Membran oluşumu, kapalı sulu bölümlerin meydana gelişinin temel yapıtaşıdır. Farklı birimlerden oluşan bu tasarım, hücre içindeki düzenlenmenin ve insan vücudu gibi kompleks bir makinenin kontrolü için gerekli evrimsel bir adımdır. Hücre seviyesinde protein taşınımının, endozomal membranın tomurcuklanarak taşınacak proteini tamamen çevreleyerek, gerçekleşebilmesi veya bazı

hücre organellerinin kendilerine özgü membranlar ile çevrelenmesi bölümlendirmeye örnek verilebilir (2). Bilim adamları uzun süredir bu yeteneği taklit etmek için çok sayıda sentetik yaklaşım denemişlerdir. Bu sentetik yaklaşımların en başarılısı bölümlendirmeden sorumlu biyolojik yapı taşının taklit edilmesi ile elde edilen “fosfolipit” lerdir. Hâlihazırda, fosfolipitlerin makromoleküler analogları, polimer kimyasının derin bir şekilde anlaşılmasıyla ve gelişmiş kopolimerizasyon tekniklerinin kullanılmasıyla başarılı bir şekilde sentezlenebilmektedir. Yapısında hidrofilik ve hidrofobik kısımları taşıyan (amfifilik) kopolimerler, “kendiliğinden oluşum” (self-assembly) ile bir membranın çevrelediği çeşitli yapılara dönüşecek şekilde tasarlanabilmektedirler. Bunların en basitleri, bir membranın küresel şekilde içine kapanması ile meydana gelen keseler ile temsil edilir ki bunlarda veziküller olarak adlandırılır. Bunlar lipozomların daha dayanıklı analogları olarak değerlendirilmektedir.

1. Polimerik Veziküller

Amfifilik kopolimerlerden oluşmuş polimerik vezikül (Pv)'ler, yaygın olarak bilinen ismiyle “polimerzom”lar ya da “sentetik virüsler” olarak tanımlanmışlardır (Şekil 1). Pv'ler kimyasal etkin madde (3) / gen (4) /protein (5) gibi çeşitli kargo taşıyıcı araç, nanoreaktör (6), medikal görüntüleme ve teşhis ajanı (7) olarak kullanılmaktadır. Pv yapısı ilk olarak Discher ve arkadaşları (1999) tarafından tanımlanıp isimlendirilmiştir (8). 5-15 nanometre

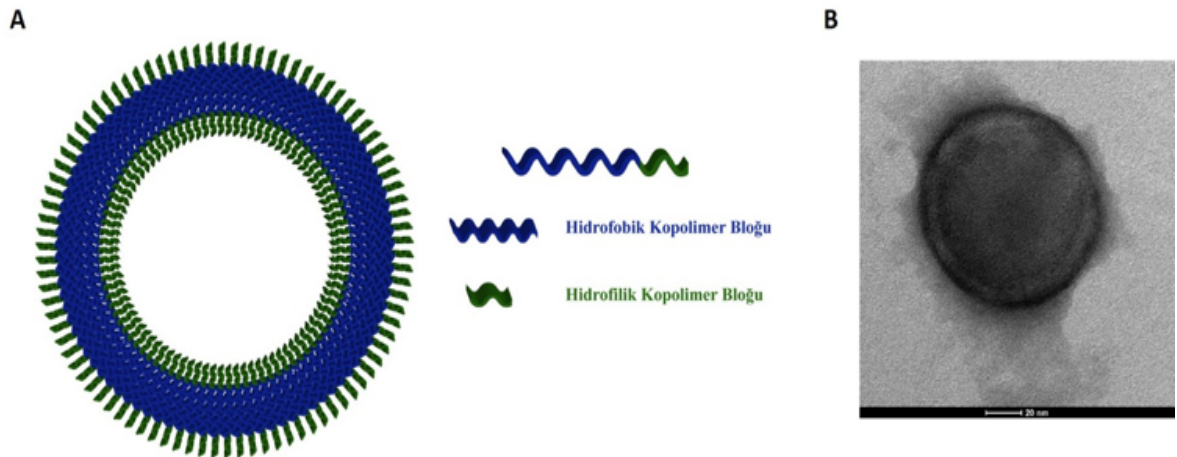
kalınlığındaki polimerik bir membranın sulu bir lümeni çevrelemesi ile meydana gelen mikroskobik/nanoskobik partiküllerdir. Membranın esas yapısını, sulu ortam ile temasını en aza indirmek için bir araya gelmiş, kopolimerin hidrofobik bloğu oluşturmaktadır. Buna ek olarak kopolimerin hidrofilik bloğu ise hem Pv lümenine hem de dış sulu ortama doğru dallanmış pozisyonunda bulunmaktadır.

Amfifilik kopolimerlerin sulu ortamlarda kendiliğinden oluşum prensibiyle meydana getirdiği Pv'ler, yapıları itibarıyla lipozomları andırmaktadır. Lipozomların sergiledikleri bütün avantajlara sahip olmasının haricinde ayrıca lipozomlara kıyasla membran kalınlıkları çok daha fazla olan Pv'ler bu özellikleri nedeniyle koloidal stabiliteleri hem kinetik hem de termodinamik açıdan çok daha fazladır (9). Ayrıca yapıları itibarıyla çok çeşitli kimyasal modifikasyona uygun oldukları için farklı amaçlarda kullanımları mümkündür. Avantajlarının yanı sıra Pv'lerin dezavantaj olarak değerlendirilebilecek tek yönleri ise, üretimleri için gerekli kopolimerlerin hayli gelişmiş kopolimerizasyon bilgisi ve zorlu reaksiyonlar sonrasında elde edilebilir olması ve çok dar bir moleküler alanda vezikül yapılarına dönüşmeleridir.

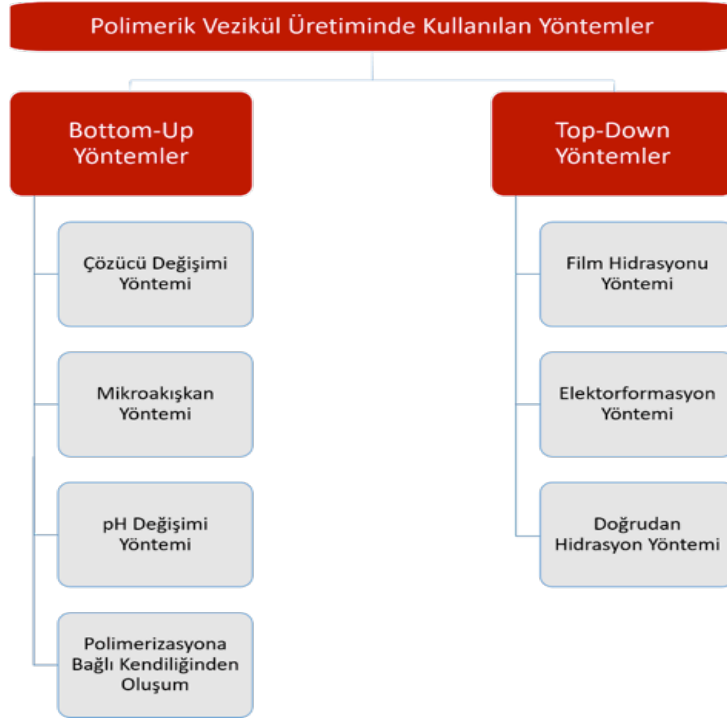
Üretim yöntemi ve kullanılan kopolimerlerin benzerliği nedeniyle Pv'ler, miseller yapıya kısmen benzemektedir. Miseller yapıya göre en önemli üstünlükleri ise kimyasal olarak çeşitli molekülleri (hidrofilik ve hidrofobik), herhangi bir elektrostatik etkileşim ya da fazladan başka bir mekanizmaya ihtiyaç duymaksızın taşıyabilmeleridir. Standart matris ya da kapsül tipi katı nanopartiküllere göre üretim yöntemleri kolay ve ölçek büyütme için uygun olup, agregasyon göstermezler ve farklı kimyasal yapıdaki maddelerin taşınmasına elverişlidirler. Pv'lerin bu avantajları ve amaçlanan uygulamaya yönelik olarak boyutlarının mikrometre seviyesinden nanometre seviyesine geçecek şekilde üretilebilir olmaları, biyomedikal ve elektronik uygulamalara kadar farklı alanlarda çalışan bilim insanları ve mühendislerin dikkatini çekmektedir.

2. Polimerik Vezikül Hazırlama Yöntemleri

Pv hazırlama yöntemleri “bottom-up (yukarıdan aşağıya) yöntemler” ve “top-down (aşağıdan yukarıya) yöntemler” olmak üzere iki sınıfta gruplandırılabilir (Şekil 2).



Şekil 1. Polimerik veziküllerin yapısının şematik gösterilişi (A). Tarafımızca üretilmiş nanometre boyutundaki bir polimerik veziküle ait geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü (B).



Şekil 2. Polimerik veziküllerin üretiminde kullanılan yöntemler.

2.1 Bottom-Up Yöntemler

Aşağıdan yukarıya olarak adlandırılan bu yöntem grubunda PV'ler, blok kopolimerin monomer seviyesinde çözülmüş halde bulunduğu ortamdan hareketle su esaslı bir çözeltinin eklenmesiyle, monomerlerin bir araya gelmeye başlamasıyla oluşurlar.

2.1.1 Çözücü Değişimi Yöntemi: “Çözücü Değişimi Yöntemi” ya da bir diğer adıyla ko-solvan yöntemi çoğunlukla suda çözünmeyen kopolimerlerde kullanılan hazırlama yöntemidir. Tipik bir çözücü değişimi yönteminde (10) öncelikle, kopolimerler, tetrahidrofur, dioksan, dimetilformamid veya dimetilsülfoksit gibi kopolimerin tüm bloklarını çözen ortak bir çözücü içerisinde çözülür. Ardından, bir blok ile uyumlayıp sadece diğer blok için seçici bir çözücü, kopolimer çözeltisine yavaş yavaş ilave edilir ya da tersi olarak kopolimer çözeltisi bu çözücü

içerisine yavaşça ilave edilir. Yaygın olarak kullanılan bir blok için uygun çözücü, hidrofilik blokları çözen ve hidrofobik blokları çözmeyen sulu çözeltidir. Hidrofobik bloklar, veziküle ait membranı oluşturacak şekilde bir araya gelme eğilimi gösterirken, çözülmüş haldeki hidrofilik bloklar vezikülü stabilize eden membranın dış kısmını oluştururlar. Organik çözücü ile su arasındaki oran kendiliğinden oluşan yapıların morfolojisini etkileyebilir. Bununla birlikte, vezikül oluşumunu desteklemek için, su içeriği genel olarak kritik su konsantrasyonundan daha yüksek olmalıdır. Bu teknikte, artan su oranı ile daha büyük hidrofob-su arayüzey geriliminin bir sonucu olarak, sulu bir ortamın ilavesiyle küresel misellerden silindirik misellere ve son olarak veziküllere geçiş tetiklenmektedir (11). Son olarak, organik çözücü, suya karşı diyaliz edilerek ortamdan uzaklaştırılır. Çözücü değişimi yöntemiyle üretilen PV'ler, kullanılan kopolimere bağlı olarak, daha dar partikül büyüklüğü dağılımına ulaşmak için

sonikasyon ve ekstrüzyon gibi üretim sonrası işlemlere maruz bırakılabilmektedirler (12).

2.1.2 Mikroakışkan Yöntemi: Organik çözücü kullanılan bir diğer Pv hazırlama yöntemi ise “Mikroakışkan (Çift Emülsiyon Şablonu) Yöntemi”dir. Esas olarak mikroakışkan cihazı kanalları içerisinde su içinde yağ içinde su (s/y/s) tipi mikroemülsiyon oluşturma temelinde dayanmaktadır (13). Prensipte olarak, kopolimer bloklarını çözen bir organik çözücü içinde çözünmüş kopolimerin mikroakışkan sistem çipinin mikro kanallarında sulu çözelti ile bir araya gelip çift emülsiyonu oluşturması ve sonrasında da organik çözücünün polimerik çift tabakayı oluşturmak için yapıdan uzaklaştırılması şeklinde özetlenebilir. Bu yöntemde, organik çözücünün seçimi çok önemli bir faktördür. Uygun bir organik çözücü veya bunların bir karışımı, belirli bir buharlaşma hızını karşılayacak şekilde seçilmelidir çünkü böylece oluşan çift emülsiyon buharlaştırma işlemi boyunca dengede kalması istenmektedir (14). Bununla birlikte, buharlaştırmadan başka, organik fazının çift emülsiyon damlacıklarından manyetik nanopartiküllerin kullanılmasıyla uzaklaştırıldığı yöntemlerde bildirilmiştir (15). Mikroakışkan yöntemi, çift emülsiyon yaklaşımı ile Pv üretimi için son derece hassas bir araçtır. Oluşturulan Pv’lerin büyüklük dağılımları ve bileşimi oldukça homojen ve tekrarlanabilir niteliktedir. Bu teknik sayesinde etkin maddeler ve çözücüler doğru seçilirse, %100 enkapsülasyon etkinliği kolayca elde edilebilir. Bunun nedeni diğer tekniklerde olduğunun aksine, ortaya çıkan yapıların kendiliğinden oluşum esasına dayanmayan üretim sürecidir. Bununla birlikte, mikroakışkan yönteminin en büyük dezavantajı, şablonun boyut kısıtlamasından dolayı, nanometre ölçeğinde Pv’lerin üretilmemesidir. Ancak daha sonra geliştirilen mikroakışkan çiplerde “hidrodinamik akış odaklama” yöntemiyle nanometre büyüklüğünde Pv’lerin üretimi gerçekleştirilebilmiştir (16). Hidrodinamik akış odaklanmasında, kopolimerin

organik çözücüdeki çözeltisi ve kopolimer bloklarından birisi için seçici bir çözelti olmak üzere birbirleriyle karışabilen iki sıvı beraber akış halinde olup, difüzyon bağlı karışma ve sonrasında da kendiliğinden oluşum sürecini sağlayan laminar bir akış sağlamaktadırlar. Bu gelişmelere rağmen mikroakışkan yönteminin en büyük problemi hala yüksek verimde Pv üretiminin sağlanamamış olmasıdır. Bu problemi aşmak için üretimi paralel hale getirme (17) üzerinde çalışmalar olsa da, bu çalışmaların yüksek verimde Pv üretimi üzerine etkisi henüz gözlemlenmemiştir.

2.1.3 pH Değişimi Yöntemi: Pv’ler, pH duyarlı kopolimerlerin sulu çözeltilerinin pH değeri basit bir şekilde kontrol edilerek hazırlanabilmektedir (18). “pH Değişimi Yönteminde” pH duyarlı kopolimerler öncelikle düşük pH (pH - 1-2) değerine sahip sulu bir çözeltide çözülür ve ardından sistemin pH değeri sodyum hidroksit gibi bazik bir maddenin çözeltisinin yavaşça ilavesi ile artırılıp, kopolimerin veziküler yapıları oluşturmasına izin verilir. Bu yöntem sadece pH duyarlı kopolimere uygulanabilmektedir.

Bu yöntemlerin haricinde, iki farklı yük taşıyan kopolimer karışımının sulu çözelti içerisinde elektrostatik etkileşimler aracılığıyla Pv yapılarını oluşturduğu bildirilmiştir (19).

2.1.4 Polimerizasyona Bağlı Kendiliğinden Oluşum:

Polimerizasyona bağlı kendiliğinden oluşum (Polymerization Induced Self-Assembly, PISA) (20), tersinir eklenme-parçalanma zincir transferi (Reversible Addition Fragmentation chain Transfer, RAFT) polimerizasyonu esnasında, polimerizasyon işleminin in-situ olarak kendiliğinden oluşan yapıların ortaya çıkmasına izin vermesiyle meydana gelmektedir. RAFT polimerizasyonu için başlatıcılar seçici bir çözücüye ilave edilir ve çözünmeyen blok giderek polimerize edilir, böylece farklı yapıların oluşumu ve geçişine yol açar. Zincir sentezi tamamlanmış bir bloğun, diğer bloğun zincir uzamasında makro başlatıcı olarak kullanılması ve zincir uzaması başlayan bu

ikinci bloğun polimerizasyon derecesi kendiliğinden oluşum sürecini yöneterek, ortaya çıkan yapıların morfolojini belirler.

2.2 Top-Down Yöntemler

2.2.1 Film Hidrasyonu Yöntemi: “Film Hidrasyonu Yönteminde” kopolimerler öncelikle bir organik çözücüde çözülürler. Bu çözelti bir vial ya da altı yuvarlak bir balon içerisine konularak organik çözücü uçurulur. Sonrasında, hidrofilik zincir için seçici olan su veya sulu bir tampon film tabakasının üzerine eklenir. Burada Pv oluşumunu tetikleyen durum, su içine difüze olan kopolimer fazı ile kopolimere difüze olan su fazı arasındaki konsantrasyon gradyanıdır. Bu gradyan, zamanla orantılı olarak azalmaktadır. Konsantrasyon gradyanı değiştiğinde, lameller yapıların tamamen gevşeyerek Pv’ler oluşturmaya zamanı olmayabilir (21). Karşılıklı difüzyonu sağlamak ve konsantrasyon gradyanını sabit tutmak için manyetik karıştırma, vorteks ya da sonikasyon gibi harici bir enerji kaynağı uygulanabilir. Pv oluşumu için kullanılan en yaygın yöntem olan film hidrasyonunda, önceden dökülmüş ince kopolimer filmin mekanik karıştırma altında hidrasyonu bu kinetik engelin üstesinden gelir. Ancak bu yöntemle yaygın büyüklük dağılımına sahip ve metastabil fazları içerebilen bir Pv süspansiyonu elde edilir. Bu süspansiyona uygulanacak sonikasyonu takip eden dondur-çöz döngüsü ve sonrasındaki, istenilen por büyüklüğüne sahip membrandan Pv süspansiyonunu belirli sayıda geçirme işlemi, partikül büyüklüğünü daraltarak küçültmektedir (22).

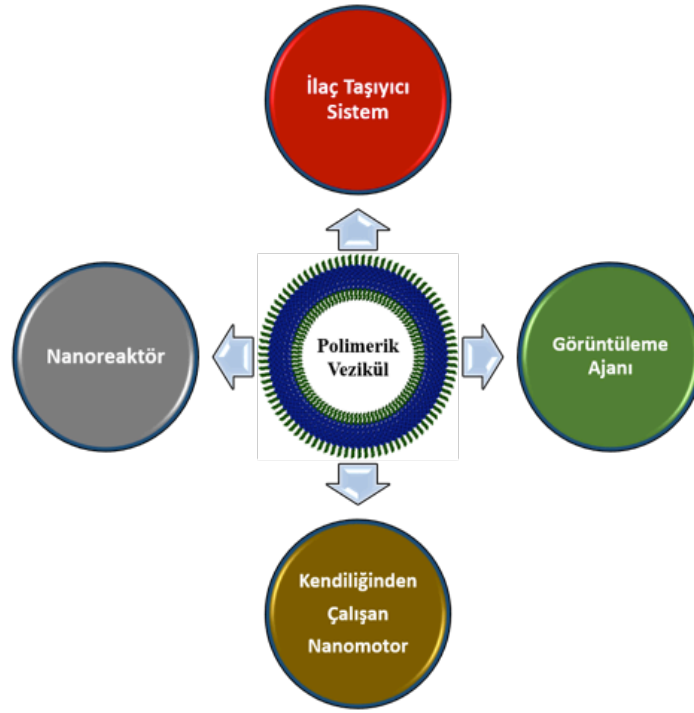
2.2.2 Elektroformasyon Yöntemi: Lipozomların elektrik akımı uygulanması ile elde edilmesi stratejisi (23) modifiye edilerek “elektroformasyon yönteminin” Pv’lerde kullanılması için uyarlanmıştır. Bu yöntem, suyun kopolimer içerisine doğru difüzyonunu artıran bir elektrik alan uygulamasıyla amfilik kopolimer filminin hidrasyonu esasına dayanmaktadır (24). Bu yöntem genellikle tek tabakalı Pv’lerin oluşumunu

sağlamasına karşın, yüksek miktarda üretime izin vermez ve çoğunlukla deneysel bir araç olarak kabul edilir.

2.2.3 Doğrudan Hidrasyon Yöntemi: “Doğrudan Hidrasyon” metodunda, katı haldeki kopolimerin doğrudan su veya sulu tampon çözeltisi içerisinde çöktürülmesi ve takibinde veziküllerin oluşması için kendiliğinden oluşum sürecine izin verilmesi adımları izlenmektedir (25). Kopolimerin sünger fazının, yüksek sıcaklıklarda, hızlı oluşumu ile etkin bir Pv üretimi sağlanmıştır. Sonrasında ise karıştırma işlemi ile soğutulmuş oda sıcaklığına getirilen sisteme aynı sırada, hem kopolimerin hidrofilik kısmı ile uyumlu hem de ortamdaki sulu faz içerisinde çözünebilen diğer bir sulu polimer çözeltisi damla damla eklenmiştir. Amfilik kopolimerin yavaş hidrasyonu ile sünger fazından, istenilen disperse haldeki veziküler yapıya geçiş sağlanarak Pv’ler elde edilmiştir. Bu yöntem hiçbir aşamasında organik çözücü kullanımı içermemektedir. Doğrudan hidrasyonu işleminde kopolimerlerin hidrasyonu, oluşmuş veziküllerin morfolojisini ve boyut dağılımını etkileyebilen, daha uzun süre ve daha yüksek karıştırma hızı gerektirmektedir.

3. Polimerik Veziküllerin Biyolojik Uygulamaları: Polimerik veziküllerin biyolojik uygulama alanları, güncel gelişmeler göz önüne alındığında temel olarak “ilaç taşıyıcı sistemler”, “görüntüleme ajanı”, “nanoreaktörler” ve “kendiliğinden çalışan nanomotorlar (otonom hareketli nanomotorlar)” olmak üzere dört ana başlıkta gruplandırılabilir.

3.1 Polimerik Veziküllerin İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Kullanımı: İlaç etkin maddelerinin in-vivo stabilitelerini yükseltmek, etkinlikte artış sağlamak, biyoyararlanımı artırmak, farmakokinetik profili iyileştirmek, salım profilini modifiye etmek gibi nedenlerle Pv’ler içerisine yüklenebilmektedir. Genel olarak Pv’lerden kimyasal



Şekil 3. Polimerik veziküllerin biyolojik uygulama alanları.

etkin madde moleküllerinin salım kinetiği, etkin maddenin membrandan difüzyonuna bağlıdır ve bu durumda vezikül lümeni ile Pv'yi çevreleyen ortam arasındaki konsantrasyon gradyanı aracılığıyla yönetilmektedir. Bununla birlikte, lipitlere kıyasla daha kalın olan polimerik membranlardan difüzyon oldukça sınırlıdır ve dolayısıyla difüzyon ancak membranın bütünlüğünün bozulması veya morfolojik değişiklikleri ile başarılabilir. Poli(laktik asit) (PLA) ve poli(kaprolakton) (PCL) gibi poliester blokları içeren amfifilik kopolimerlerden oluşan Pv'ler, çoğunlukla bir hidrolitik mekanizma yoluyla bozunmaları nedeniyle, ilaç taşıyıcı uygulamaları için yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Poli(laktik asit)-b-poli(etilen glikol) (PLA-PEG) veya poli(kaprolakton)-b-poli(etilen glikol) (PCL-PEG) blok kopolimerlerinin zincir uçlarının hidrolizi, bloğun hidrofobik fraksiyonunun kısılmasına ve dolayısıyla hidrofilik-hidrofobik blok oranının değişmesine neden olur (26). Bu mekanizma, kopolimerin moleküler şeklinde ve

sonuç olarak da veziküllerin morfolojik faz geçişinde değişikliğe neden olur. Bu nedenle, veziküler yapı içerisinde enkapsüle olan hidrofilik veya hidrofobik etkin maddelerin salım profili, blok kopolimerlerin hidrolitik olarak bozunması ve dolayısıyla agregatların morfolojik faz değişimleriyle yakından ilgilidir (27).

Pv'lerden etkin maddelerin salım oranı, Pv membranının permeabilitesine, kopolimerlerin molekül ağırlığına ve hidroliz oranına bağlı olduğu her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. Buna bağlı olarak, Pv'lerden hızlı bir erken etkin madde salımının sistemik toksisiteye neden olabileceği, buna karşın yavaş salım hızının da etkin maddenin etki alanındaki terapötik etkinliğini engelleyebileceği için Pv zarının geçirgenliği, molekül ağırlığı ve hidroliz oranı, sadece Pv'ler hedef bölgeye ulaştıktan sonra kontrollü etkin madde salımına izin verecek şekilde tasarlanmalıdır. Bu açıdan Pv'ler, uyarıcıya duyarlı kopolimerler pH, sıcaklık, ışık, indirgenme ve manyetik alanlardaki

değişiklikler gibi bazı uyarılardan sinyal almak üzere tasarlanabilmektedir. Bunlar daha sonra Pv'lere aktarılıp uyarılara cevap verilerek terapötik etkin maddenin salımını tetikler.

Pv'lerin çevresel uyarılara cevap verme özelliklerini tasarlamak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir ve bunlar şu şekilde özetlenebilir:

(i) kopolimer zincirinin hidrofobik-hidrofilik dengesinin değiştirilmesi;

(ii) uyarılara yanıt olarak bir blok kopolimerin çözünürlüğünün değiştirilmesi;

(iii) terapötik etkin maddenin salımı için Pv yapısını çözmek ya da parçalamak;

(iv) uyarılara karşı kararsız olan kimyasal bağ açılmasının kullanılması ve

(v) Pv'lerin şişmesine veya yıkılmasına yol açmak.

Terapötik maddenin tetiklenmiş salımı, bu maddenin istenilen vücut bölgesindeki spesifik birikimine dayanarak, farmakokinetik ve güvenlik profillerini iyileştiren programlanmış etkin madde salımı sağlar. Bu durum özellikle, kemoterapötik etkin maddeler gibi, dar terapötik pencere kimyasal etkin maddeler için geçerlidir (28).

Kimyasal ilaç etkin maddelerinin yanı sıra, Pv'lerin sulu lümenine peptit/protein yapısındaki biyomakromoleküller de yüklenebilmektedir. Peptit/protein yapısındaki maddeler kanser, diyabet, kardiyovasküler ve birçok metabolik bozukluklarında dahil olduğu çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilen, güçlü terapötik etkiye sahip makromoleküllerdir. Terapötik proteinlerle yapılan tedavi enzimatik bozunma ve böbrekten atılım aracılığıyla hızlı eliminasyon, vücudun farklı bölgelerine spesifik olmayan giriş, immün yanıtın indüklemesi durumu ve hücre alım ile ilgili sınırlamalardan dolayı hızla ortadan kaldırılmasından dolayı halen zorlu bir görev olarak değerlendirilmektedir (29). Bu sorunları gidermek için, terapötik proteinler polimerlere konjuge edilebilmekte, PEG'lenebilmekte ve ayrıca

lipozomlara, misellere ve terapötik etki bölgelerine güvenli bir şekilde ulaştırılmalarına yönelik diğer taşıyıcılara yüklenebilmektedirler. Ancak protein taşıyıcılarının kullanımı, hazırlanışlarında organik çözücülerin kullanılmasından kaynaklanan protein denatürasyonu, proteinlerin kimyasal modifikasyonu, düşük protein yüklenmesi ve fizyolojik ortamdaki instabiliteleri gibi bu taşıyıcıları sistemik uygulama için uygun olmayan hale getiren bazı dezavantajları kapsayabilmektedir (30). Bahsedilen bu çıkmaz noktaların üstesinden gelebilmek için, farklı proteinlerin yüklenmesinde Pv'ler başarıyla kullanılmıştır.

Pv'ler ayrıca antijen/adjuvan taşıyıcı araçlar olarak da kullanılmaktadır. 2011 yılında yayınlanmış bir çalışmada (31) geliştirilen Pv'lerin yüzeyine influenza virüsü hemagglütinin antijenini adsorbe edilmiş ve viral antijenin in-vivo immünojenitesini artırdığı ortaya çıkmıştır. Poli(etilen glikol)-bl-poli(propilen sülfid) esaslı oksidasyona duyarlı Pv'lerin, dentritik hücre endozomlarına hem antijen hem de adjuvan taşınımı için kullanımı ortaya konulmuştur (32). Bu amaçla, toll benzeri reseptör agonisti olan gardikimod enkapsüle edilmiş Pv'lerin interlökin-6 ve interlökin-12 sitokin ekspresyonunu 10 kat artırdığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar, oksidasyona duyarlı Pv'lerin hücre aracılı antijen spesifik bağışıklık yanıtlarını indüklemek için bir antijen taşıyıcı sistem olarak işlev görebildiğini göstermektedir.

Pv'ler, kimyasal etkin maddeler/ biyomakromoleküllerin terapötik etkilerini arttırmak ve toksisitelerini azaltmak için, farklı aktif hedefleme mekanizmaları vasıtasıyla, enkapsüle ettikleri terapötik kargonun spesifik dokulara veya hücrelere taşınması amacıyla, küçük moleküllerden (33) polisakkaritlere (34), antikora (35), peptitlere (36), proteinlere (37) veya bunların kombinasyonuna (38) kadar değişen farklı hedefleme ligandları ile işlevsel hale getirilebilmektedir. Bu anlamda, farklı patolojik durumlar için spesifik olan hücre reseptörleri veya sinyal yollarını tanımak ve

etkileşimde bulunmak için hedeflenmiş Pv'ler tasarlanmıştır. Bunun haricinde özellikle kanser teşhisli hastalardaki tümör gelişen bölgelerdeki vasküler yapının bozulması ve bu bozuk endotel aracılığıyla tümör dokusunda nanopartiküllerin birikim durumu (Artırılmış Geçirgenlik ve Alıkoyma, Enhanced Permeation and Retention, EPR), pasif hedeflendirme olarak adlandırılmaktadır. Dikkat çeken uygulamalar hâlihazırda mevcut olan kemoterapinin iyileştirilmesi ve kanser hedeflemesine yönelik olmakla birlikte, nörodejeneratif bozukluklar, iltihaplanma ve iştme kaybı dâhil diğer bazı hastalıkları hedeflemek için de Pv'lerin kullanımı araştırılmıştır.

3.2 Polimerik Veziküllerin Görüntüleme Ajansı Olarak Kullanımı

Mükemmel bir kargo taşıyıcı sistem olan Pv'lerin görüntüleme uygulamaları için kullanışlı sistemler olduğu, son araştırmalar ışığında yayınlanan makaleler ile ortaya çıkmaktadır. Ghoroghchian ve arkadaşları (2007), poli(etilen oksit)-b-poli (ϵ -kaprolakton) (PEO-PCL) ve poli(etilen oksit)-b-poli(γ -metil- ϵ -kaprolakton) kopolimerlerinden hareketle özel ışık absorblayıcı özelliklere sahip Pv'ler oluşturmayı başarmışlardır (39). Bu, polimerik membrana, porfirin esaslı floresans veren maddelerin dahil edilmesiyle elde edilebilmiştir. Ortaya çıkan son yapı, görünür bölgeden kızılötesi bölgesine kadar, kuantum noktacıklarına benzer optik özellikler göstermektedir.

Massignani ve ark. (2010), benzer bir amaçla geliştirdikleri Pv'ler aracılığıyla floroforların taşınımı incelenmişlerdir (40). Detayına bakıldığında amfilik floresans özellikli moleküller, Pv membranının yapısı içerisinde olacak şekilde formüle edilmiş ve sitotoksik/immünojenik olmayan bir hücresel takip sistemi üretebilmek için hücre içine taşınmıştır. Dolayısıyla, bu tür floroforlar ile yüklü Pv'ler, "nanometre boyutundaki görüntüleme ajanları" olarak kullanılmak için umut vadeden sistemlerdir (41). Floroforların Pv'ler içine enkapsülasyonuna ilaveten bu taşıyıcının görüntüleme alanında kullanım potansiyeli, gözenekli

poli(etilen oksit)-b-poli(bütadien) (PBD-PEO) Pv'leri içerisine manyetik rezonans (MR) kontrast ajanlarının enkapsüle edilmesiyle araştırılmıştır (42). Pv'ler, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfolipidi ile blok kopolimerin 85:15 molar oranındaki karışımından hareketle film hidrasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Bir dendrimere kovalan olarak tutturulmuş şelat halindeki gadolinyum, Pv lümeni içine yüklenmiş ve daha sonra Pv membranının stabilitesini arttırmak için bir kimyasal başlatıcı eklenerek serbest radikal polimerizasyonu ile diblok kopolimerin çapraz bağlanması sağlanmıştır. Triton X-100 gibi bir sürfaktan ilave edildikten sonra, Pv membranından fosfolipit bileşeni uzaklaştırılmış ve suyun kolay akışı için membran içerisine gözenekler oluşturulmuştur. Görüntüleme amacıyla gadolinyum iyonları tarafından sağlanan sinyalin kuvveti, gadolinyuma bağlı su molekülleri ile bunları çevreleyen su arasındaki hızlı değişim kinetiklerine bağlı olduğu ortaya konmuş ve bu durum da Pv membranındaki gözeneklerin varlığı ile kolaylaştırılmıştır (42). Pv membranındaki gözeneklerden gadolinyumun olası kaçışı, gadolinyum şelatlarının dendrimerler ile konjugasyonu ile engellenmiştir. Pv içerisine enkapsüle edilmiş gadolinyum, serbest olarak bulunan gadolinyum iyonları tarafından üretilen sinyal yoğunluğunu büyük ölçüde artırma avantajına sahiptir, çünkü ortalama her bir Pv içerisine neredeyse 44000 gadolinyum iyonu yüklenmiştir.

PBD-PEO kopolimerlerinin başka bir görüntüleme uygulaması, Pv membranı içindeki kuantum noktacıklarının enkapsülasyonu uygulamasını kapsamaktadır (43). Kuantum noktacığı nanokristalleri, geniş görüntüleme uygulamaları nedeniyle şimdiye kadar büyük oranda incelenmiştir. Kuantum noktacıklarının bu inorganik özellikleri, daha biyoyumlu olan organik bazlı floroforlara kıyasla biyolojik uygulamalarını sınırlayan hücresel toksisiteye neden olmaktadır (41).

3.3. Polimerik Veziküllerin Nanoreaktör Olarak Kullanımı:

Sentetik biyoloji, hücre fonksiyonları için gerekli temel biyolojik süreçler (yaşamın kökeni) ve daha derin anlayışlara sahip olmak için potansiyel imkânlar sunmaktadır (44). Canlı hücrelerden ilham alan bilim insanları, hayatın devamıyla ilgili karmaşık biyolojik süreçleri anlamak için sentetik hücresel yapılar yaratmak üzerine çalışmalarını son yıllarda arttırmışlardır. Bu sentetik hücresel sistemler, “yapay hücreler/sentetik hücreler” olarak isimlendirilmektedir (45). Tanım olarak ideal yapay hücreler, bilgi materyallerini (DNA, RNA, Protein) bölümlendirerek yerleştirme, büyüme ve kendini onarma, kendini kopyalama süreci aracılığıyla evrim ve maddelerin/bilgilerin transferi gibi temel hücre fonksiyonlarını gösteren biyotik, abiyotik materyallerden veya bunların kombinasyonundan üretilebilen sentetik hücre benzeri sistemlerdir (46). Yapay hücreler, hücresel işlevleri incelemek veya biyoteknolojik biyoreaktörler/ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmak üzere biyolojik hücrelerin özelliklerini taklit etmeyi amaçlayan yapay yapılardır. Su bazlı bir bölümde belirli biyolojik süreçler için tasarlanmış sentetik sistemi içeren bu yapay hücreler, hücre dışı ile iletişim sağlamak için tercihen yarı geçirgen veya seçici geçirgen olması gereken bir membran ile sınırlandırılmıştır. Bu yapay hücrelerden, biyolojik süreci istenmeyen dış faktörlerden izole etmek üzere veya biyolojik sürecin unsurlarını birbirine yakın tutmak üzere ya da bazı moleküllerin tasarlanan mikro çevreye girip çıkmasını düzenlemek üzere yararlanılmaktadır.

Preseptte ilkel hücreler, karmaşık biyolojik sistemlerden yoksun hücrelerin temel birimleri olup, esas olarak bileşenlerinin kendiliğinden oluşum özelliklerine dayanmaktadır ve hücre iletişimi, büyümesi ve bölünmesi de dâhil olmak üzere temel hücre fonksiyonlarını elde etmek için çevre ile etkileşimdedirler (47). Bu nedenle, kendiliğinden oluşan veziküler yapılar, ilkel hücrelerin ana bileşenleri oldukları için, yapay hücre geliştirmek için ideal adaydır. Yapısal blokların yağ asitleri, fosfolipitler,

protein-polimer konjugatları, polielektrolitler veya polimerler olduğu kendiliğinden oluşu veya mikro faz ayrımına dayanan sentetik hücre modelleri inşası için, kendiliğinden oluşan blok kopolimerler gibi çeşitli stratejiler araştırılmıştır.

3.3.1. Polimerik Veziküllerin Bölümlendirilmiş Yapay Hücreler Olarak Kullanımı:

Biyobölümlendirme, çeşitli proteinlerin ve enzimlerin hücrenin işlevleri için gerekli olan çeşitli metabolik (biyokimyasal) reaksiyonları gerçekleştirmek için molekülleri ve sinyalleri kolayca iletebildikleri hücrelerin temel gereksinimidir. Doğanın bölümlendirme stratejisini taklit etmek amacıyla Pv'ler, iç sulu lümen ve polimer membran ile dış kısım arasındaki ara yüzeyde bulunan reaksiyon alanı nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Pv'ler belirli biyokimyasal reaksiyonlar için proteinleri ve enzimleri belirli bir mikro/nano alana kapatıp, dışarıyla ile iletişimi sağlamak için de bir membran ile çevreleyebilmektedirler.

Hücrelerin bölümlendirme stratejilerini taklit etmek için geliştirilen model yapay hücreler, Pv alanında yaygın olarak incelenen kavramlardan biridir (48). Çoğu durumda, bölümlendirme stratejilerini temsil etmek üzere geliştirilen Pv esaslı yapay hücreler, nanoreaktörler olarak değerlendirilmektedir. Nanoreaktörlerin kendini onarma ve kendini kopyalama özelliklerine sahip olmalarına rağmen, hücrelerin bazı biyolojik özelliklerini/işlevlerini taklit edebilmeleri noktalarında yapay hücre tanımını yerine getirdikleri görülmektedir. Bu nedenle, yapay hücreler ile nanoreaktörler eş anlamlı olarak kullanılabilirlerdir.

Pv esaslı nanoreaktörler, sulu bölümlerindeki enzimatik reaksiyonları sağlamak için çeşitli enzimleri enkapsüle eden ve bu enzimlerin kopolimer membrandan salımına izin vermeyen Pv'lerdir. Bu şekilde, nanoreaktörlerin tasarımı hassas enzimleri proteolitik bozulmadan korumakta ve aynı zamanda sulu lümendeki katalitik reaksiyonlara veya

reaksiyon sonu ürünlerden istenilen bileşiklerin Pv dışarısına taşınmasına izin vermektedir. Genel olarak nanoreaktörler, Pv'lerin membran geçirgenliğine bağlı olarak iki sınıfa ayrılabilirler: (i) seçici veya yarı geçirgen nanoreaktörler ve (ii) kanal donanımlı nanoreaktörler.

Seçici/yarı geçirgen Pv nanoreaktörlerinde kopolimer membran; oksijen türleri, glukoz, tetrametilbenzidin, pirogallol, glukonolakton ve laktonlar gibi çok küçük moleküllere karşı geçirgendir (12). Basit oksijen geçirgen nanoreaktörler, PBD-PEO ve PCL-PEO'dan hareketle üretilmiş ve hemoglobin enkapsüle edilmiş Pv'lerin kullanımıyla elde edilebilmektedir (5). Bu örneklerden ikincisinde oksijen geçirgenliği, Pv'lerin (~ 8 ve 18 nm) artan membran kalınlığı ile % 57'ye kadar düşmüştür. Hemoglobinin enkapsülasyonunun oksijen bağlama kapasitesini değiştirmediğini, ancak nanoreaktörlerin azalmış aktivitesinin esasen sınırlı membran geçirgenliğinden kaynaklandığı belirtilmiştir.

Süper oksit dismutaz enkapsüle edilmiş poli(2-metil oksazolin)-b-poli(dimetil siloksan)-b-poli(2-metil oksazolin) triblok kopolimerinden oluşan Pv'ler, antioksidan nanoreaktörler olarak bildirilmiştir (12). Kopolimer membranın süperoksit radikallerine geçirgen olduğu, böylece hidrojen peroksit halinde detoksifikasyonun sağlandığı gösterilmiştir. Stabilitate ve bozunmaya karşı korumaya ek olarak, enkapsüle edilmiş süper oksit dismutazın birkaç hafta boyunca etkinliğini koruduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, nihai ürün olan H₂O₂ hala biyolojik koşullarda zararlı etkilere neden olabilecek bir reaktif oksijen türüdür.

Alternatif bir stratejide hem süper oksit dismutaz hem de peroksidazı taklit eden çifte enzim görevi yapabilen, küçük bir molekül (metal kompleksi) enkapsüle edilmiş benzer Pv'lerin kullanımını incelemiştir. Bu yolla süperoksit radikalleri, Pv membranına nüfuz ederek öncelikle H₂O₂'ye ve daha sonra toksik olmayan bir nihai ürün olan suya detoksifiye edilebilmektedir (28). Bununla birlikte,

kopolimerik membran suya geçirgen değildir (49) ve bu durum belirli bir süre sonra, bir nihai ürün olarak suyun sürekli birikimi üzerine nanoreaktörlerin ozmolizine yol açabilir. Süperoksit radikallerinin triblok kopolimer membrandan geçebilmesinin, kopolimerin hidrofobik bölümünün blok uzunluğuna oldukça bağımlı olduğu bildirilmiştir.

Messenger ve ark. (2016), seçici geçirgenliğe sahip olan ve 1,5 nm boyutundaki organik moleküllerin taşınmasına izin veren hibrid nano-taşıyıcılar geliştirilmiştir (50). Boyutça büyük enzimlerin (yaklaşık 5 nm), bu veziküllerin içine enkapsüle edilebilir, işlemde sonrada katalitik olarak aktif kalabilecekleri ve bu hibrid yapıların yeni bir enzimatik nanoreaktör türünü oluşturduğu ifade edilmiştir. Araştırmanın temelinde, membran yapısında DNA nano-gözenekleri olan Pv'ler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Pv'lerin ve DNA gözeneklerinin amaçlanan hedef doğrultusunda yüksek ayarlanabilirliği; ilaç taşınımı, biyolojik görüntüleme, biyo-kataliz ve yapay hücre uygulamaları için nano-taşıyıcıların hazırlanmasında anahtar olduğu gösterilmiştir. Öncelikle Pv'ler ve DNA nano-gözenekleri ayrı ayrı hazırlanıp, sonrasında bir arada inkübe edilerek, ortalama her bir Pv'nin 7 DNA nano-gözeneği taşıyacağı şekilde, nano-gözeneklerin Pv membranına eklenmesi gerçekleştirilmiştir. Nano-gözenekler ile dekore edilmiş Pv'lerin işlevselliği, hibrid taşıyıcıların enzimatik nanoreaktörlere dönüştürülebileceğini gösteren bir enzimatik deneyle gösterilmiştir. Deney, florojenik bir enzim substratının, DNA gözenekleri boyunca taşınması ve Pv içerisine enkapsüle edilmiş tripsin ile floresans ürüne bölünmesine dayanmaktadır. DNA nano-gözeneği taşıyan Pv'lerdeki enzimatik aktivitenin, taşımayanlara oranla 10 kat daha hızlı olduğu bulunmuştur.

Yapay hücrelerin yaratılmasında önemli olan hücrelerin yaşamı bakımından gerekli olan bilgilendirme bileşiklerini, kendini eşleme (replikasyon) süreci boyunca üretmektir. Hücrenin kendini onarması ve çoğalması için, enzimatik reaksiyonların aracılık ettiği

gen (DNA/RNA) ve protein ifade etme yetenekleri, hayati önem taşımaktadır. Çeşitli sentetik hücresel sistemlerde RNA replikasyonu, DNA çoğaltılması (polimeraz zincir reaksiyonu), DNA transkripsiyonu ve mRNA translasyonu gibi biyolojik işlemleri taklit eden model yapay hücreler, farklı araştırma grupları tarafından kapsamlı olarak incelenmiştir (51). Genel olarak protein ekspresyon süreci, bir proteine dönüşen mRNA üretimi ile sonlanan DNA transkripsiyonundan oluşur. Bu işlem, DNA, RNA, nükleotidler, enzimler (polimerazlar), fosfatlar, vb. gibi bileşenlerin bir havuzunu gerektirir. Dolayısıyla, tamamen biyolojik makinelerin tek bir yapay hücreye dâhil edilmesi oldukça karmaşıktır. Bununla birlikte, piyasada bulunan protein sentez kitleri, bu bileşenlerin yapay hücrelere dâhil edilmesini sıradan hale getirmektedir. Ancak, tüm bu maddelerin karışımının geleneksel yöntemlerle enkapsülasyonunda karşılaşılan karmaşıklık, yapay hücreler ile protein sentezinin verimliliğini etkileyen sınırlayıcı faktördür. Alternatif olarak, yüksek enkapsülasyon etkinliğini sağlayan mikroakışkan teknolojisi, enkapsülasyon sürecini kontrol etmek için kullanılmaktadır. Model yapay hücrelerin çoğu, protein sentezi için gerekli biyolojik sisteminin enkapsüle edilmesinden oluşan bir protein ifade sistemi olarak geliştirilmiştir. Bu sistemin beslenmesinde kullanılan tüm bileşenler protein sentezi için kullanıldıktan sonra, gerekli bileşenlerinin dışarıya transferine izin vermeyen geçirimsiz sentetik membranlar nedeniyle zamanla protein üretimi doygunluğa ulaşır. Bu nedenle, yapay hücrelere kontrollü membran geçirgenliği kazandırmak, daha uzun süre sürekli protein üretilmesini sağlamaktadır.

Lipozom tabanlı yapay hücreler ile karşılaştırıldığında, gen ekspresyonu ve protein sentezi için Pv esaslı yapay hücrelerin geliştirildiği örnek sayısı hayli azdır. Martino ve arkadaşları (2012), PLA-PEG'den oluşan Pv'ler içerisine, bakteri membranı ilişkili hücre iskeleti aktin benzeri proteinin (MreB) hücre dışı olarak ekspresyonu için gerekli bütün biyolojik gereksinimler örneğin; *E. coli*'den elde edilmiş ribozomal ekstre ve pDNA gibi

moleküller başarıyla enkapsüle edilmiştir (52). Bu çalışmada, Pv'lere ilişkin genel bir sınırlama olan yaygın büyüklük dağılımı ve düşük enkapsülasyon etkinliği, mikroakışkan teknolojisi kullanılması ile aşılmıştır. Oldukça büyük boyutlu Pv'ler (126 µm) içinde MreB-kırmızı floresan proteininin birkaç saat içindeki yüksek verimli hücre dışı ifadesi, 32°C'deki floresans ile kanıtlanmıştır.

3.4. Polimerik Veziküllerin Kendiliğinden Çalışan Nanomotorlar Olarak Kullanımı

Hücrelerin otonom hareketi, diğer hücreler ile iletişim kurmak ve kendi aralarında koordine olmak için gerektiği kadar, çevresel değişikliklere tepki olarak, ya belirli bir bölgeye doğru ya da bu bölgeden uzaklaşarak hücre göçünü düzenlemek için de vazgeçilmez bir işlemdir. Bu nedenle, bilim adamları hücre içi ve hücre motiliteyi anlamak ve otonom olarak hareket eden biyolojik motorlar olarak işlev görebilecek yapay hücreleri tasarlamak için kendiliğinden hareket eden hücrelerin hareketini taklit etmek için çaba göstermektedirler. Ortam sinyallerine cevap olarak herhangi bir dış kuvvet olmadan göç etmeye yönlendirilebilen kendiliğinden hareket özellikleri, tamamıyla sentetik Pv esaslı nanoreaktörlerin oluşturulmasında önemli bir adımdır (28).

Temel olarak hücre hareketliliği, hücre iskelet polimerleri ve motor proteinlerin birleştirilmesi ve ayrılması ile yönetilmektedir. Bu bağlamda sentetik hücresel sistemlerde membran hareketini oluşturmak için aktin filamentleri ve mikrotübüllerin dinamik olarak birleşmesini ve ayrılmasını gösteren az çalışma bulunmaktadır. Örneğin, aktin filamentleri, hücrenin motilitesinde önemli bir rol oynayan membran çıkıntılarına yol açan kuvveti oluşturur (53). Daha erken aşamalarda, proteinlerle kaplı polistiren mikroküreler, aktin polimerizasyonunu katalize ederek aktin filamentlerinin simetrik olarak düzenlenmesine yol açmıştır. Bu simetrisinin kendiliğinden kırılmasının ardından, mikroküreler tek yönlü hareket göstermiştir

(54). Lipozomlar içerisindeki aktin polimerizasyonu, yapay hücre hareketliliğinin gelişimi için gerekli olan, hücre iskeletine benzer ağlar oluşturmak için araştırılmıştır (55).

Lemièr ve ark. (2015) membranın ileri doğru itilmesini sağlayan membrandaki aktin polimerizasyonunu taklit etmek için, membran lamellipodyum (Lamellipodium: Hücrenin hareketini sağlayan, yüzeylerindeki aktin proteini içerikli hücre iskeleti uzantısıdır) uzantısının hücre mekanizması ile benzer, hücre boyutunda lipozomlar geliştirilmiştir (56).

Otonom hareket, sadece aksiyon polimerizasyonu ve motor proteinler gibi biyolojik ilkeler kullanılarak elde edilmemektedir. Asimetrik ortamlardaki brownian hareketler ve difüzyonel etki gibi tamamen abiyotik fiziksel prensipler, sentetik hücre sistemlerinin hareketliliğini yönlendirmek için itici güç üretmek üzere ayarlanabilmektedir. Yapay hücrelerde yönlendirilmiş hareketi başarmak için iyon gradyanının, çeşitli kimyasal reaksiyonların ve adezyonun kullanımı gibi farklı yaklaşımlar önerilmektedir (57).

Joseph ve ark. (2017), farklı blok kopolimerler kullanarak, glukoz konsantrasyonunun yüksek olduğu bölgeye doğru kendiliğinden hareket eden asimetrik Pv'ler geliştirmişlerdir. Bu amaçla, kopolimerik membranın glukoz geçirgen olduğu asimetrik Pv'lerin içerisine glukoz oksidaz ve katalaz enzimlerini enkapsüle etmişlerdir. Ortamda bulunan glukozun kopolimer membrandan Pv içerisine girişini takiben,

enkapsüle edilmiş enzimler aracılığıyla meydana gelen birbirini takip eden reaksiyonlar sonucunda toksik olmayan D-glukono- δ -lakton glukoz ürünü oluşmakta ve Pv'nin dışarısına atılmaktadır. Böylece Pv sistemi glukoz konsantrasyonunun yüksek olduğu bölgelere otonom olarak yönelmektedir. Araştırmacılar geliştirdikleri bu sistemi, moleküllerin kan beyin bariyerinden taşınması amacıyla kullanmışlardır ve geliştirdikleri kendiliğinden hareket eden bu sistemin, peptit aracılı hedeflendirilmiş sistemlere göre kan beyin bariyerini dört kat daha fazla oranda aşabildiğini göstermişlerdir (58).

SONUÇ

Polimer kimyasındaki son gelişmeler ile araştırmacıların, geliştirdikleri polimer mimarileri üzerindeki artan hakimiyetleri, biyoloji alanında kullanılan sentetik sistemlerin artmasına neden olmaktadır. Özellikle ilaç taşıyıcı sistemler ve yapay hücreler (sentetik virüsler) alanında kendine büyük bir araştırma/uygulama alanı bulmuş Pv'ler, son yirmi yılda oldukça ilgi çekmiştir. Polimerik mimari ve kompozisyonun, hedeflenen amaç doğrultusunda şekillendirilebilir ve modifiye edilebilir olması, bu sistemlerin araştırma odağında bulunmasının temel nedeni olduğu şüphesizdir. Sentetik nanoreaktörlerden kendiliğinden çalışan nanomotorlara kadar çeşitli araştırma konularına yayılmış uygulamaları olan polimerik veziküllerin gelecekte, multidisipliner bakış açısı ile farklı alanlardaki ihtiyaçları giderecek yeni uygulamalar bulacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Konu ile ilgili çalışmalar, TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 213M760).

KAYNAKLAR

1. Massignani M, Lomas H, Battaglia G. Polymersomes: A Synthetic Biological Approach to Encapsulation and Delivery. In: Carusco, ed. *Modern Techniques for Nano- and Microreactors/-reactions*. Heidelberg: Springer, 2010: 115-54.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. New York: Routledge, 2002.
3. Ahmed F, Pakunlu R, Brannan A, Bates F, Minko T, Discher DE. Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *Journal of Controlled Release*, 2006; 116(2): 150-8.
4. Lomas H, Du J, Canton I, Madsen J, Warren N, Armes SP, et al. Efficient encapsulation of plasmid DNA in pH-sensitive PMPC-PDPA polymersomes: Study of the effect of PDPA block length on copolymer-DNA binding affinity. *Macromolecular Bioscience*, 2010; 10(5): 513-30.
5. Rameez S, Alostha H, Palmer AF. Biocompatible and biodegradable polymersome encapsulated hemoglobin: A potential oxygen carrier. *Bioconjugate Chemistry*, 2008; 19(5): 1025-32.
6. Gaitzsch J, Appelhans D, Wang L, Battaglia G, Voit B. Synthetic bio-nanoreactor: Mechanical and chemical control of polymersome membrane permeability. *Angewandte Chemie - International Edition*, 2012; 51(18): 4448-51.
7. Huang WC, Chen YC, Hsu YH, Hsieh WY, Chiu HC. Development of a diagnostic polymersome system for potential imaging delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015; 128: 67-76.
8. Discher BM, Won YY, Ege DS, Lee JCM, Bates FS, Discher DE, et al. Polymersomes: Tough vesicles made from diblock copolymers. *Science*, 1999; 284: 1143-6.
9. Bozkır A, Kocyiğit S. An investigation of physical and chemical stabilities of liposomes. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 1995; 24(1): 42-52.
10. Ayen WY, Garkhal K, Kumar N. Doxorubicin-loaded (PEG)-PLA nanopolymersomes: effect of solvents and process parameters on formulation development and in vitro study. *Molecular Pharmaceutics*, 2011; 8(2): 466-78.
11. Shen H, Eisenberg A. Morphological phase diagram for a ternary system of block copolymer PS310-b-PAA52/Dioxane/H₂O. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1999; 103(44): 9473-87.
12. Axthelm F, Casse O, Koppenol WH, Nauser T, Meier W, Palivan CG. Antioxidant nanoreactor based on superoxide dismutase encapsulated in superoxide-permeable vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008; 112(28): 8211-7.
13. Lorenceau E, Utada AS, Link DR, Cristobal G, Joanicot M, Weitz DA. Generation of polymersomes from double-emulsions. *Langmuir*, 2005; 21(20): 9183-6.
14. Ho CS, Kim JW, Weitz DA. Microfluidic fabrication of monodisperse biocompatible and biodegradable polymersomes with controlled permeability. *Journal of the American Chemical Society*, 2008; 130(29): 9543-9.
15. Habault D, Dery A, Leng J, Lecommandoux S, Le Meins JF, Sandre O. Droplet microfluidics to prepare magnetic polymer vesicles and to confine the heat in magnetic hyperthermia. *IEEE Transactions on Magnetics*, 2013; 49(1): 182-90.
16. Thiele J, Steinhauser D, Pfohl T, Förster S. Preparation of monodisperse block copolymer vesicles via flow focusing in microfluidics. *Langmuir*, 2010; 26(9): 6860-3.
17. Romanowsky MB, Abate AR, Rotem A, Holtze C, Weitz DA. High throughput production of single core double emulsions in a parallelized microfluidic device. *Lab Chip*, 2012; 12(4): 802-7.
18. Du J, Tang Y, Lewis AL, Armes SP. pH-sensitive vesicles based on a biocompatible zwitterionic diblock copolymer. *Journal of the American Chemical Society*, 2005; 127(51): 17982-3.
19. Kishimura A, Koide A, Osada K, Yamasaki Y, Kataoka K. Encapsulation of myoglobin in PEGylated polyion complex vesicles made from a pair of oppositely charged block ionomers: A Physiologically available oxygen carrier. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007; 46(32): 6085-8.
20. Wan WM, Hong CY, Pan CY. One-pot synthesis of nanomaterials via RAFT polymerization induced self-assembly and morphology transition. *Chem, Commun*; 2009; (39): 5883-5.
21. Battaglia G, Ryan AJ. Pathways of polymeric vesicle formation. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006; 110(21): 10272-9.
22. Photos PJ, Bacakova L, Discher B, Bates FS, Discher DE. Polymer vesicles in vivo: Correlations with PEG molecular weight. *Journal of Controlled Release*, 2003; 90(3): 323-34.
23. Angelova MI, Dimitrov DS. Liposome electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 1986; 81(0): 303-11.

24. Lee James CM, Bermudez H, Discher BM, Sheehan MA, Won YY, Bates FS, et al. Preparation, stability, and in vitro performance of vesicles made with diblock copolymers. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001; 73(2): 135-45.
25. O'Neil CP, Suzuki T, Demurtas D, Finka A, Hubbell JA. A novel method for the encapsulation of biomolecules into polymersomes via direct hydration. *Langmuir*, 2009; 25(16): 9025-9.
26. Ahmed F, Discher DE. Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: Hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *Journal of Controlled Release*, 2004; 96(1): 37-53.
27. Geng Y, Discher DE. Visualization of degradable worm micelle breakdown in relation to drug release. *Polymer*, 2006; 47(7): 2519-25.
28. Balasubramanian V, Herranz-Blanco B, Almeida PV, Hirvonen J, Santos HA. Multifaceted polymersome platforms: Spanning from self-assembly to drug delivery and protocells. *Progress in Polymer Science*, 2016; 60: 51-85.
29. Torchilin VP, Lukyanov AN. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: Challenges and solutions. *Drug Discovery Today*, 2003; 8(6): 259-66.
30. Liu G, Ma S, Li S, Cheng R, Meng F, Liu H, et al. The highly efficient delivery of exogenous proteins into cells mediated by biodegradable chimaeric polymersomes. *Biomaterials*, 2010; 31(29): 7575-85.
31. Barnier Quer C, Robson Marsden H, Romeijn S, Zope H, Kros A, Jiskoot W. Polymersomes enhance the immunogenicity of influenza subunit vaccine. *Polymer Chemistry*, 2011; 2(7): 1482-5.
32. Scott Ea, Stano A, Gillard M, Maio-Liu AC, Swartz MA, Hubbell JA. Dendritic cell activation and T cell priming with adjuvant- and antigen-loaded oxidation-sensitive polymersomes. *Biomaterials*, 2012; 33(26): 6211-9.
33. Pang Z, Gao H, Yu Y, Guo L, Chen J, Pan S, Ren J, Wen Z, Jiang X. Enhanced intracellular delivery and chemotherapy for glioma rats by transferrin-conjugated biodegradable polymersomes loaded with doxorubicin. *Bioconjugate Chemistry*, 2011; 22(6): 1171-80.
34. Huang J, Bonduelle C, Thévenot J, Lecommandoux S, Heise A. Biologically active polymersomes from amphiphilic glycopeptides. *Journal of the American Chemical Society*, 2012; 134(1): 119-22.
35. Lee JS, Groothuis T, Cusan C, Mink D, Feijen J. Lysosomally cleavable peptide-containing polymersomes modified with anti-EGFR antibody for systemic cancer chemotherapy. *Biomaterials*, 2011; 32(34): 9144-53.
36. Pangburn TO, Bates FS, Kokkoli E. Polymersomes functionalized via "click" chemistry with the fibronectin mimetic peptides PR_b and GRGDSP for targeted delivery to cells with different levels of $\alpha 5 \beta 1$ expression. *Soft Matter*, 2012; 8(16): 4449-61.
37. Egli S, Nussbaumer MG, Balasubramanian V, Chami M, Bruns N, Palivan C, et al. Biocompatible functionalization of polymersome surfaces: A new approach to surface immobilization and cell targeting using polymersomes. *Journal of the American Chemical Society*, 2011; 133(12): 4476-83.
38. Robbins GP, Saunders RL, Haun JB, Rawson J, Therien MJ, Hammer DA. Tunable leuko-polymersomes that adhere specifically to inflammatory markers. *Langmuir*, 2010; 26(17): 14089-96.
39. Ghoroghchian PP, Frail PR, Li G, Zupancich JA, Bates FS, Hammer DA, et al. Controlling bulk optical properties of emissive polymersomes through intramembranous polymer-fluorophore interactions. *Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society*, 2007; 19(6): 1309-18.
40. Massignani M, Canton I, Sun T, Hearnden V, Macneil S, Blanazs A, Armes SP, Lewis A, Battaglia G. Enhanced fluorescence imaging of live cells by effective cytosolic delivery of probes. *Plos One*, 2010; 5(5): e10459.
41. Duncan TV, Ghoroghchian PP, Rubtsov IV, Hammer DA, Therien MJ. Ultrafast excited-state dynamics of nanoscale near-infrared emissive polymersomes. *Journal of the American Chemical Society*, 2008; 130(30): 9773-84.
42. Cheng Z, Tsourkas A. Paramagnetic porous polymersomes. *Langmuir*, 2008; 24(15): 8169-73.
43. Mueller W, Koynov K, Fischer K, Hartmann S, Pierrat S, Basché T, et al. Hydrophobic shell loading of PB-b-PEO vesicles. *Macromolecules*, 2009; 42(1): 357-61.
44. P Stano. Synthetic biology of minimal living cells: primitive cell models and semi-synthetic cells. *Systems and Synthetic Biology*, 2010; 4(3): 149-56.
45. Dzieciol AJ, Mann S. Designs for life: Protocell models in the laboratory. *Chemical Society Reviews*, 2012; 41(1): 79-85.
46. Szostak JW, Bartel DP, Luisi PL. Synthesizing life. *Nature*, 2001; 409(6818): 387-90.
47. Hanczyc MM, Szostak JW. Replicating vesicles as models of primitive cell growth and division. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004; 8(6): 660-4.

48. Palivan CG, Fischer-Onaca O, Delcea M, Iteľ F, Meier W. Protein-polymer nanoreactors for medical applications. *Chemical Society Reviews*, 2012; 41(7): 2800-23.
49. Kumar M, Grzelakowski M, Zilles J, Clark M, Meier W. Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007; 104(52): 20719-24.
50. Messenger L, Burns JR, Kim J, Cecchin D, Hindley J, Pyne AL, et al. Biomimetic hybrid nanocontainers with selective permeability. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016; 55(37): 11106-9.
51. Hammer DA, Kamat NP. Towards an artificial cell. *FEBS Letters*, 2012; 586(18): 2882-90.
52. Martino C, Kim SH, Horsfall L, Abbaspourrad A, Rosser SJ, Cooper J, et al. Protein expression, aggregation, and triggered release from polymersomes as artificial cell-like structures. *Angewandte Chemie - International Edition*, 2012; 51(26): 6416-20.
53. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 2003; 112(4): 453-65.
54. Van Oudenaarden A, Theriot JA. Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility. *Nat Cell Biol*, 1999; 1(8): 493-9.
55. Stachowiak JC, Richmond DL, Li TH, Brochard-Wyart F, Fletcher DA. Inkjet formation of unilamellar lipid vesicles for cell-like encapsulation. *Lab on a chip*, 2009; 9(14): 2003-9.
56. Lemière J, Carvalho K, Sykes C. Cell-sized liposomes that mimic cell motility and the cell cortex. In: Jennifer, R. Wallace, eds. *Methods in Cell Biology*. Oxford. Academic Press. 2015: 271-85.
57. Kamat NP, Katz JS, Hammer DA. Engineering polymersome protocells. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2011; 2(13): 1612-23.
58. Joseph A, Contini C, Cecchin D, Nyberg S, Ruiz-Perez L, Gaitzch J, et al. Chemotactic synthetic vesicles: Design and applications in blood-brain barrier crossing. *Science Advances*, 2017; 3(8):e1700362.

75. CİLT YAZAR DİZİNİ / 75. ISSUE AUTHOR INDEX

A		BEDİR H.	3/225	ENGİNYURT Ö.	4/383
AÇIKGÖZ ZC.	1/13	BODUR H.	3/265	ERDEM G.	1/29
AKBAŞ E.	1/1	BOZKIR A.	3/305-4/443	ERGON C.	3/245
AKBULUT İ.	4/353	BÖREKÇİ D.	2/175	EROL Ö.	3/287
AKINCI E.	3/265	BURGAZ S.	2/195	ERSAN G.	4/345
AKINER MM.	3/225	BUT A.	3/265	ESEN B.	1/1
AKSOY A.	2/101	C - Ç		EVRAKOS-AKSÖZ B.	3/253
AKSOYALP ZŞ.	2/213	CESARETLİ Y.	2/143	EYİGÖR M.	2/117-4/333
AKSU E.	4/365	ÇALIŞKAN O.	1/89	G	
AKSU-KOCA N.	2/101	ÇAMUR D.	1/65	GAZYAĞCI A.	3/287
AKTAŞ D.	2/117-4/333	ÇELİK D.	4/345	GENÇ Ö.	4/365
AKTAŞ-ŞÜKÜROĞLU A	2/195	ÇETİN-ÇOBAN S.	4/399	GÖKDEMİR A.	3/225
AKYILDIZ F.	1/43	ÇETİN-DURAN A.	3/245	GÖL N.	2/117
ALTUĞ Ü.	3/225	ÇETİN-HAZIROLAN G. ..	2/101	GÖZALAN A.	1/13-4/333
ALVER O.	1/37	ÇİÇEK B.	1/77	GÜL S.	1/89
ARAL M.	2/109	ÇOLAK C.	3/383	GÜLAY Z.	2/117-4/333
ASLANER H.	3/265	ÇÖPLÜ N.	1/1-1/29-2/117-4/333	GÜLDEMİR D.	2/135
AVCIKÜÇÜK H.	1/29	D		GÜNEŞ-ÇELEBİ Z.	2/175
AYAR A.	1/53	DEMİRCİ B.	3/225	GÜR D.	4/333
AYDEMİR Ş.	4/333	DEMİRTAŞ R.	3/225	GÜRDOĞAN K.	2/117
AYDOĞAN S.	1/13	DEMLİ F.	4/391	GÜRLER N.	4/333
AYGÜN Ö.	2/153	DİKMEN D.	1/93	H	
AYPAK A.	3/265	DİKTAŞ H.	2/169	HASDEMİR U.	4/333
B		DOĞAN AF.	3/225	HAZIROLAN G.	1/21
BAKAR-ATEŞ F.	3/239	DOST M.	2/175	I - İ	
BALCI E.	1/53	DUMAN P.	4/399	IRMAK H.	3/225
BALCI M.	1/89	DUMAN Y.	4/353	İLTER H.	1/65-4/391
BARLAS G.	4/399	DURAK ZE.	4/391	İNCEDAL-SONKAYA Z.	1/53
BAŞTUĞ A.	3/265	DÜLGEROĞLU Y.	2/127	K	
BAYINDIR-BİLMAN F.	2/183	E		KAÇMAZ B.	1/89
BAYRAM M.	2/117	ENER B.	1/37	KAÇMAZ G.	4/383
BAYRAMOĞLU G.	2/117-4/333			KAHRAMAN M.	4/421

75. CİLT YAZAR DİZİNİ / 75. ISSUE AUTHOR INDEX

KANER G.	1/77	ÖNGÜRÜ P.	3/265	TORUN-EDİS Ç.	3/287
KANYILMAZ D.	3/265	ÖZAKIN C.	2/117	TULMAÇ Ö.	1/89
KARACA S.	2/143	ÖZARSLAN F.	4/399	TURHANOĞLU NM. ..	2/183
KARACAER Z.	2/169	ÖZCAN-DAĞ Z.	1/89	TÜRETGEN İ.	4/323
KARAHAN AG.	4/421	ÖZÇELİK S.	1/43	U - Ü	
KARAKUŞ S.	1/43	ÖZDEMİR A.	1/93	UÇAR G.	3/253
KARAMAN Ö.	4/383	ÖZDEMİR Ş.	3/277	ÜLGENALP O.	3/291
KARAMAN Ü.	4/383	ÖZMEN N.	3/239	V	
KAŞKATEPE B.	1/29	ÖZPINAR N.	1/43	VARIŞLI AN.	2/101
KAVAK M.	3/287	ÖZTÜRK M.	3/225	Y	
KAYA E.	2/109	ÖZÜDOĞRU B.	4/409	YAVUZ AF.	1/13
KAYA-SEZGİNER E. ..	3/239	P		YAVUZ G.	4/323
KAYIŞ A.	2/109	PAKÖZ Nİ.	2/109	YAZGAN A.	1/13
KAYNAR P.	2/143	PAŞALI-KİLİT T.	4/365	YELEKÇİ K.	3/253
KAZIK Y.	4/409	PERÇİN D.	2/117-4/333	YETKİN MA.	3/265
KIZILASLAN M.	4/409	POLAT F.	4/353	YILMAZ BÖ.	1/77
KOÇ BT.	3/291	S - Ş		YÜZÜGÜLLÜ-KARAKUŞ Y.	4/353
KOÇAK FE.	4/365	SANAL L.	1/29		
KORKUT Y.	4/365	SELÇUK MY.	3/277		
KOYUNCU E.	2/183	SERTEL A.	4/353		
KÖŞE S.	4/345	SEZEN F.	2/175		
KURT EE.	3/239	SEZGİN B.	1/1		
KURTCEBE ZÖ.	3/225	SÖNMEZ C.	4/375		
KÜÇÜKTÜRKMEN B.		SÜZÜK-YILDIZ S.	1/29		
N		ŞENSES M.	2/143		
NACİTARHAN C.	2/213	ŞİMŞEK H.	1/1-2/117-4/333		
O - Ö		T			
OĞUZOĞLU TÇ.	3/291	TAŞ EE.	1/13		
ONBAŞI K.	4/365	TEMEL F. ...	2/117-2/175-4/399-4/409		
ORHAN G.	4/391	TERZİ Ö.	3/277		
ORHAN Z.	2/109	TOPBAŞ M.	1/65		
ÖDEMİŞ İ.	4/345	TOPLUOĞLU S.	3/225		

75. CİLT YILLIK DİZİN / 75. ISSUE ANNUAL INDEX

Cilt / Vol: 75	Sayı / Number: 1	Yıl / Year: 2018
1. EFSUN AKBAŞ, NİLAY ÇÖPLÜ, HÜSNIYE ŞİMŞEK, BERRİN ESEN, BERNA SEZGİN.....		1 - 12
Laboratory evaluation of susceptibility tests for National Antimicrobial Resistance Surveillance System (NAMRSS) in Turkey Türkiye’de Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) için duyarlılık testlerinin laboratuvar değerlendirmesi		
2. SİBEL AYDOĞAN, AYLİN YAZGAN, EMRE ERDEM TAŞ, AYŞEGÜL GÖZALAN, AYŞE FİLİZ YAVUZ, ZİYA CİBALI AÇIKGÖZ.....		13 - 20
The presence and distribution of high risk HPV types in simultaneous cervical cytology samples Eş zamanlı servikal sitoloji örneklerinde yüksek riskli HPV tiplerinin varlığı ve dağılımı		
3. GÜLŞEN HAZIROLAN.....		21 - 28
Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi’nde hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen candida suşlarının dağılımı (2010-2015) Distribution of candida species isolated from nosocomial infections of Ankara Numune Training and Research Hospital (2010-2015)		
4. SERAP SÜZÜK-YILDIZ, BANU KAŞKATEPE, HAYVA AVCIKÜÇÜK, LASER SANAL, GÜL ERDEM, NİLAY ÇÖPLÜ.....		29 - 36
Escherichia coli idrar izolatlarında sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile fosfomisin duyarlılığının belirlenmesi ve üriner sistem enfeksiyonlarında sık kullanılan diğer antibiyotiklerle karşılaştırılması The determination of fosfomycin susceptibility with broth micro dilution method in urinary Escherichia coli isolates and comparison of sensitivity against other antibiotics frequency used in urinary tract infections		
5. OKTAY ALVER, BEYZA ENER.....		37 - 42
Bursa’da 2013-2014 yılları arasında sıtma epidemiyolojisi The epidemiology of malaria in Bursa between 2013 and 2014		
6. FATİH AKYILDIZ, SEMRA ÖZÇELİK, NECATİ ÖZPINAR, SAVAŞ KARAKUŞ.....		43 - 52
Vajinit ön tanılı kadınlarda Trichomonas vaginalis sıklığının araştırılması ve tanısında üç farklı kültür yönteminin karşılaştırılması Comparison of three different culture methods in the diagnosis and investigation of frequency of Trichomonas vaginalis in women with the pre-diagnosis of vaginitis		
7. ZEHRA İNCEDAL-SONKAYA, ELÇİN BALCI, ARIF AYAR.....		53 - 64
Üniversite öğrencilerinin gıda okuryazarlığı ve gıda güvenliği konusunda bilgi, tutum ve davranışları “Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu örneği” University students food literacy and food safety knowledge, attitudes and behaviors “Example of Amasya University Sabuncuoğlu Şerefeddin Health Services Vocational School”		
8. HÜSEYİN İLTER, DERYA ÇAMUR, MURAT TOPBAŞ.....		65- 76
Türkiye’deki belediyelerde biyosidal ürün uygulamaları ve belediye çalışanlarının bu konu hakkındaki bilgileri Biocidal product applications in the municipalities of Turkey and knowledge of municipality staff on this issue		
9. BEYTÜL OGE YILMAZ, BETÜL ÇİÇEK, GÜLŞAH KANER.....		77 - 88
Kayseri ilindeki liseelerde öğrenim gören adölesanlarda obezite düzeyinin ve ilişkili risk faktörlerinin belirlenmesi Determining the obesity level and related risk factors in adolescents attending at high schools in Kayseri province		
10. BİRGÜL KAÇMAZ, ZEYNEP ÖZCAN-DAĞ, MAHİ BALCI, SERDAR GÜL, ÖZLEM TULMAÇ, OKAN ÇALIŞKAN.....		89 - 92
On haftalık gebede Staphylococcus aureus’un etken olduğu koryoamniyonit Chorioamnionitis caused by Staphylococcus aureus in a ten weeks pregnant patient		
11. ASLIHAN ÖZDEMİR, DİLEK DİKMEN.....		93 - 100
Gıda savunmasında yeni yaklaşımlar: risk yönetim metodolojileri New approaches to food defense: risk management methodologies		
Cilt / Vol: 75	Sayı / Number: 2	Yıl / Year: 2018
1. AYŞE NURİYE VARIŞLI, GÜLŞEN ÇETİN-HAZIROLAN, ALTAN AKSOY, NERİMAN AKSU-KOCA.....		101 - 108
İdrar örneklerinden MALDI-TOF MS sistemi ile direkt bakteri tanımlanması Direct definition of direct bacteria by MALDI-TOF MS system from urinary examples		
2. NURİYE İSMİHAN ECE PAKÖZ, ESRA KAYA, ZARİFE ORHAN, ARZU KAYIŞ, MURAT ARAL.....		109 - 116
Farklı klinik örneklerden izole edilen çoğul dirençli Acinetobacter baumannii izolatlarında tigesiklin ve kolistin dirençlerinin disk difüzyon, E-test ve otomatize sistem yöntemleri ile karşılaştırılması Comparison of disc diffusion, E-test and automated system methods for the determination of resistances to tigecycline and colistin by multiple resistant Acinetobacter baumannii isolates which isolated from different samples		
3. NİLAY ÇÖPLÜ, ZEYNEP GÜLAY, FEHMİNİZ TEMEL, HÜSNIYE ŞİMŞEK, NEŞE GÖL, DİLBER AKTAŞ, GÜLÇİN BAYRAMOĞLU, CÜNEYT ÖZAKIN, METE EYİGÖR, DUYGU PERÇİN, KEZBAN GÜRDOĞAN, MURAD BAYRAM.....		117 - 126
The first external quality assurance laboratory proficiency assessment study of national antimicrobial resistance surveillance system in Turkey Türkiye’deki ulusal antimikrobiyal direnç sürveyans sisteminin ilk dış kalite güvencesi laboratuvar yeterlilik değerlendirmesi		
4. YAKUP DÜLGEROĞLU.....		127 - 134
Spotchem EZ SP-4430 kuru kimya cihazında çalışılan bazı biyokimya testleri verifikasyonu Verification of some biochemistry tests that to be analyzed in Spotchem EZ SP-4430 dry chemistry system		
5. DİLEK GÜLDEMİR.....		135 - 142
Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında ortam kontrolü nasıl yapılır? How to control of the workspace environment in the molecular microbiology laboratory?		
6. PINAR KAYNAR, MUKADDES ŞENSES, SİBEL KARACA, YILDIRIM CESARETLİ.....		143 - 152
TS EN ISO/IEC 17025 standart kapsamında akredite olan su laboratuvarlarında müşteri memnuniyetinin değerlendirilmesi Evaluation of customer satisfaction in water laboratories which are accredited within the scope of TS EN ISO/IEC 17025 standard		
7. ÖZCAN AYGÜN.....		153 - 168
Adana ilindeki bazı çiftçilerin genetiği değiştirilmiş tohumlar hakkındaki bilgi düzeyleri ve tutumları Knowledge and attitudes of some farmers about genetically modified seeds in Adana province		
8. ZEHRA KARACAER, HÜSREV DİKTAŞ.....		169 - 174
Increased rates of vaccination among healthcare workers through cause-directed solutions: a state hospital example Nedene yönelik çözümlerle artan aşılanma oranları: ikinci basamak hastane örneği		
9. ZEYNEP GÜNEŞ-ÇELEBİ, DEMET BÖREKÇİ, FİGEN SEZEN, FEHMİNİZ TEMEL, MUSTAFA DOST.....		175 - 182
Adıyaman ili Kahta ilçesinde bir öğrenci yurdunda görülen gıda kaynaklı salgın, Şubat 2015 A foodborne outbreak in a dormitory in Kahta district in Adıyaman province, February 2015		
10. NEZİRE MİNE TURHANOĞLU, ESRA KOYUNCU, FULYA BAYINDIR-BİLMAN.....		183 - 194
Yara kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik dirençleri, 2010-2015 Microorganisms and antibiotic resistances isolated from wound cultures, 2010-2015		

11. AYÇA AKTAŞ-ŞÜKÜROĞLU, SEMA BURGAZ.....	195 - 212
Kuaför salonlarındaki kimyasallara mesleki maruziyet ve sağlık riski Occupational exposure to the chemicals in hairdressing salons and health risk	
12. ZİNNET ŞEVVAL AKSOYALP, CAHİT NACİTARHAN.....	213 - 224
Kardiyovasküler hastalıklarda barsak mikrobiyotasının rolü The role of gut microbiota in cardiovascular diseases	

Cilt / Vol: 75 Sayı / Number: 3 Yıl / Year: 2018

1. MUHAMMET MUSTAFA AKINER, BERNA DEMİRCİ, HİLAL BEDİR, MURAT ÖZTÜRK, RIDVAN DEMİRTAŞ, AHMET FERHAT DOĞAN, AKGÜN GÖKDEMİR, SEHER TOPLUOĞLU, ÜNAL ALTUĞ, ZEHRA ÖZLEM KURTCEBE, HASAN IRMAK.....	225 - 238
Surveillance and Control of Invasive Aedes Species in The Eastern Black Sea Area of Turkey Türkiyenin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde istilacı Aedes türlerinin izlenmesi ve kontrolü	
2. FİLİZ BAKAR-ATEŞ, NURİ ÖZMEN, ECEM KAYA-SEZGİNER, EMİN EMRE KURT.....	239 - 244
Effects of colchicine on cell cycle arrest and MMP-2 mRNA expression in MCF-7 breast adenocarcinoma cells Kolşisin'in MCF-7 insan meme adenokarsinoma hücrelerinde hücre döngüsü tutulumu ve MMP-2 mRNA ifade seviyesi üzerine etkisi	
3. ALEV ÇETİN-DURAN, CEM ERGON.....	245 - 252
Bruselloz ve atipik pnömoni şüpheli hastalarda Coxiella burnetii antikor varlığının ELISA ve IFA yöntemleri ile araştırılması Detection of Coxiella burnetii antibodies in patients with suspicion of brucellosis and atypical pneumonia by ELISA and IFA methods	
4. BEGÜM EVRANOS-AKSÖZ, GÜLBERK UÇAR, KEMAL YELEKÇİ.....	253 - 264
2-pirazolin yapısındaki yeni bir bileşiğin sentezi, moleküler modellemesi ve monoaminoksidaz inhibitörü etkisinin araştırılması Investigation of synthesis, molecular modelling and monoaminoksidase inhibitor activity of a new 2-pyrazoline compound	
5. HALİDE ASLANER, ESRAĞÜL AKINCI, AYŞE BUT, DİLEK KANYILMAZ, ALİYE BAŞTUĞ, ADALET AYPAK, MELTEM ARZU YETKİN, PINAR ÖNGÜRÜ, HÜRREM BODUR.....	265 - 276
Üçüncü basamak bir hastanede tespit edilen cerrahi alan enfeksiyonlarının değerlendirilmesi Evaluation of surgical site infections detected in a tertiary care hospital	
6. ÖZLEM TERZİ, ŞULE ÖZDEMİR, MUSTAFA YAŞIN SELÇUK.....	277 - 286
Bir hastane yemekhanesinde yaşanan gıda zehirlenmesinin incelenmesi Investigation of food poisoning in a hospital cafeteria	
7. ÇİĞDEM TORUN-EDİŞ, ÖZLEM EROL, AYCAN GAZYAĞCI, MEHMET KAVAK.....	287 - 290
Psychoda albipennis'e bağlı tekrarlayan üriner miyazis Recurrent urinary myiasis caused by Psychoda albipennis	
8. ONUR ÜLGENALP, BAHATTİN TAYLAN KOÇ, TUBA ÇİĞDEM OĞUZOĞLU.....	291 - 304
Viral enfeksiyonlarda otofaji Autophagy in viral infections	
9. BERRİN KUÇUKTURKMEN, ASUMAN BOZKIR.....	305 - 322
Özel saklama koşulu gerektiren veya soğuk zincire tabi ilaçlar ve uygulamalar açısından değerlendirmeler Drugs subject to special storage conditions or cold chain and evaluation in terms of applications	

Cilt / Vol: 75 Sayı / Number: 4 Yıl / Year: 2018

1. GÖKÇE YAVUZ, İRFAN TÜRETGEN.....	323 - 332
Nanoteknolojik dezenfektanların heterotrofik biyofilmler üzerine etkisi The efficacy of nanotechnological disinfectants on heterotrophic biofilms	
2. NİLAY ÇÖPLÜ, HÜSNİYE ŞİMŞEK, DENİZ GÜR, AYŞEGÜL GÖZALAN, UFUK HASDEMİR, ZEYNEP GÜLAY, GÜLÇİN BAYRAMOĞLU, NEZAHAT GÜRLER, ŞÖHRET AYDEMİR, METE EYİĞÖR, DUYGU PERÇİN, DİLBER AKTAŞ.....	333 - 344
Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları Microorganisms isolated from blood cultures of the patients in intensive care units and their antibiotic susceptibilities	
3. İLKER ÖDEMİŞ, ŞÜKRAN KÖSE, GÜRSEL ERSAN, DİDEM ÇELİK, İLKAY AKBULUT.....	345 - 352
Hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi Evaluation of antibiotic susceptibilities of enterococcus strains isolated from clinical samples of hospitalized patients	
4. YONCA YÜZÜGÜLLÜ-KARAKUŞ, ARZU SERTEL, YONCA DUMAN, FİKRİYE POLAT.....	353 - 364
Endüstriyel enzimler üreten Bacillus izolatlarının morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu Morphological, biochemical and molecular characterization of Bacillus isolates as a producer of industrial enzymes	
5. ÖZLEM GENÇ, EVRİM AKSU, TÜRKAN PAŞALI-KİLİT, FATMA EMEL KOÇAK, YASEMİN KORKUT, KEYSER ONBAŞI.....	365 - 374
Asymptomatic bacteriuria, urinary tract infection and risk factors in women with type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance Tip 2 Diyabet hastalığı ve bozulmuş glikoz toleransı olan kadınlarda asemptomatik bakteriyüri ve üriner sistem enfeksiyonları	
6. CEMİLE SÖNMEZ.....	375 - 382
"Genital Mikoplazma" sıklığının multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması: klinikte önemli olabilir mi? Detection of "Genital Mycoplasma" Incidence by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction: Could it be clinically important?	
7. ÜLKÜ KARAMAN, ÖZGÜR ENGİNYURT, ÖMER KARAMAN, CEMİL ÇOLAK, GAMZE KAÇMAZ.....	383 - 390
Ordu ili ilköğretim okulu öğrencilerinde baş biti Pediculus humanus capitis yaygınlığının belirlenmesi Determination of the prevalence of head lice Pediculus humanus capitis in primary school students in Ordu province	
8. FİGEN DEMLİ, GÜNNUR ORHAN, ZAHİDE ESRA DURAK, HÜSEYİN İLTER.....	391 - 398
Ankara ve Konya illerine ait suların organoklorlu ve organofosforlu pestisitler yönünden değerlendirilmesi Evaluation of organochlorine and organophosphate pesticides of waters in Ankara and Konya	
9. FATMA ÖZARSLAN, PINAR DUMAN, SERAP ÇETİN-ÇOBAN, GÜLŞEN BARLAS, FEHMİNAZ TEMEL.....	399 - 408
Aksaray, Nevşehir ve Niğde illerindeki ilçe okullarında Stafilokokal enterotoksin ve Bacillus cereus ilişkili gıda kaynaklı salgın, 2015 Food-borne outbreak associated with Staphylococcal enterotoxin and Bacillus cereus in districts schools-Aksaray, Nevşehir and Niğde provinces, 2015	
10. BURCU ÖZÜDOĞRU, YAVUZ KAZIK, MECİT KIZILASLAN, FEHMİNAZ TEMEL.....	409 - 420
Bayburt il merkezinde Shigella sonnei gastroenterit salgını, Ekim 2014 A Shigella sonnei gastroenteritis outbreak in Bayburt Province, Turkey, October 2014	
11. MÜNEVVER KAHRAMAN, AYNUR GÜL KARAHAN.....	421 - 442
Probiyotiklerin tümör baskılayıcı etkileri Tumor suppressor effects of probiotics	
12. UMUT CAN ÖZ, ASUMAN BOZKIR.....	443 - 458
Polimerik veziküller ve biyolojik uygulamaları Polymeric vesicles and biological applications	

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE



HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

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

Makale Türü/Article Type:

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

Makale Başlığı/Article Entitled :

Sayın Editör,

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.

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

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

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

Tel/Phone : +90 312 565 55 80

Faks/Fax : +90 312 565 55 91

e-posta/e-mail : thsk.thdbd@saglik.gov.tr

