

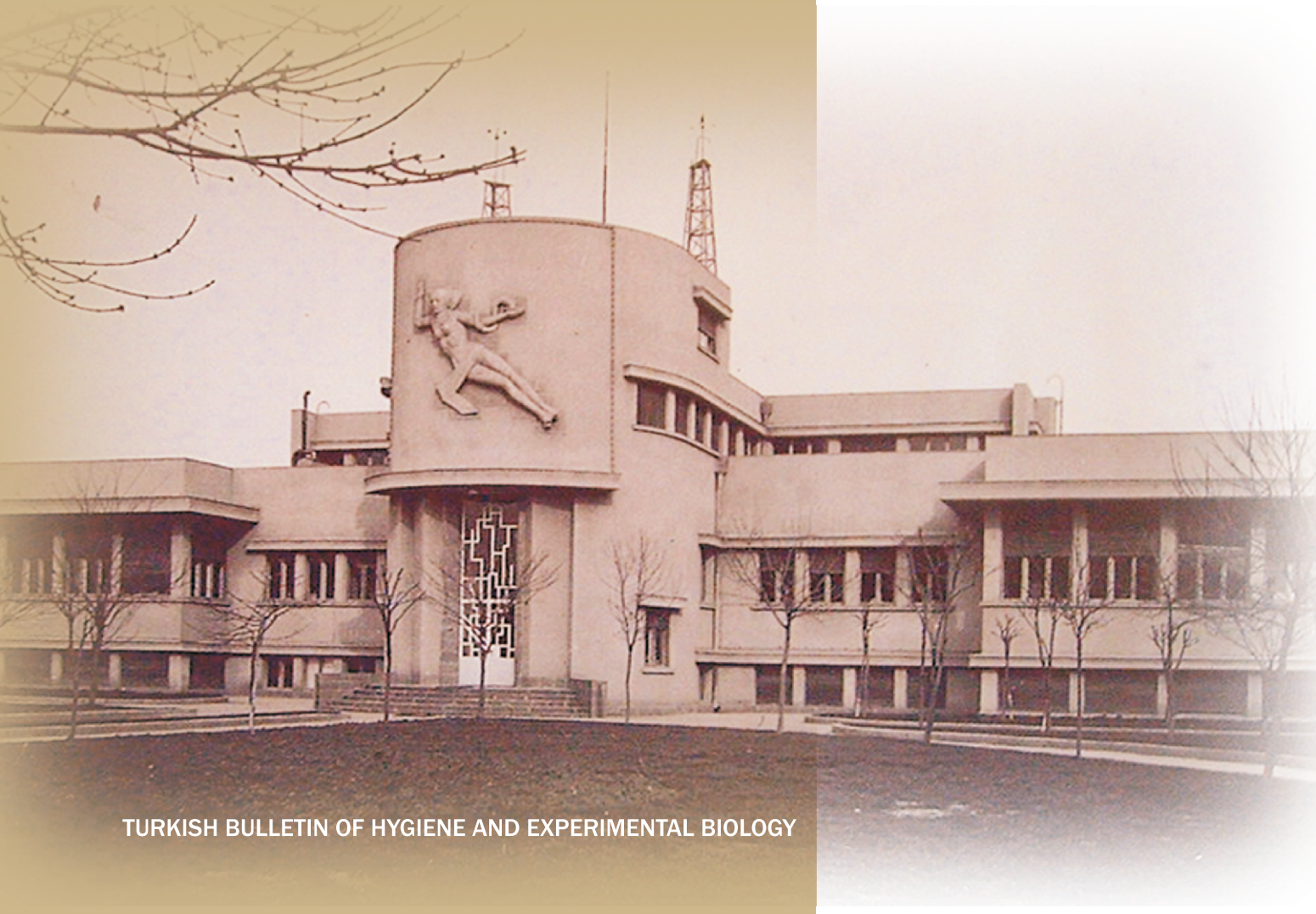


T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 73 ■ Sayı/Number 2 ■ Yıl/Year 2016





T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

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

ISSN 0377-9777 (Basılı / Printed)

ISSN 1308-2523 (Çevrimiçi / Online)

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 73 ■ Sayı/Number 2 ■ Yıl/Year 2016

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu adına

On behalf of Public Health Institution of Turkey

İrfan ŞENCAN, Başkan (President)

EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Hasan IRMAK

EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Yavuz UYAR

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

Demet CANSARAN-DUMAN

Nurhan ALBAYRAK

Pınar KAYNAR

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Fatih BAKIR

Mehmet Kürşat DERİCİ

Mestan EMEK

Şule ŞENSES-ERGÜL

Arsun ESMER

Sibel KARACA

Selin NAR-ÖTGÜN

Dilek YAĞCI-ÇAĞLAYIK

Dilek DİKMEN

Gülsen TOPAKTAŞ

Sinan BULUT

TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Ahmet Murad BAYRAM

Murat DUMAN

Zeynep KÖSEOĞLU

Selahattin TAŞOĞLU

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY
ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

Asitsiz kağıt kullanılmıştır / Acid free paper is used

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

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

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

Azim Matbaacılık
Büyük Sanayi 1. Cad. No: 99/33 İskitler-ANKARA
Tel: +90 312 342 03 71-72
e-posta: info@azimmatbaacilik.com

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

2016

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, Sweden

Anna PAPA, Greece

Aziz SANCAR, USA

Cristina DOMINGO, Germany

Daniel MOTLHANKA, Botswana

Dwight D. BOWMAN, USA

Isme HUMOLLI, Kosovo

Isuf DEDUSHAJ, Kosovo

Iva CHRISTOVA, Bulgaria

Johan LINDH, Sweden

Kosta Y. MUMCUOĞLU, Israel

Manfred WEIDMANN, U.Kingdom

Paul HEYMAN, Belgium

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Cuba

Sıraç DİLBER, Sweden

Susana RODRIGUEZ-COUTO, Spain

Takashi AKAMATSU, Japan

Varalakshmi ELANGO, India

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Ahmet KART, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Arsun ESMER, Ankara

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Ayhan FİLAZİ, Ankara

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Çorum

Banu ÇAKIR, Ankara

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 DİKMEN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Duygu TUNCER, Ankara

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fatih KÖKSAL, Adana

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnur TARHAN, Adıyaman

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TRKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Hakan ABACIOĞLU, İzmir
Hakan LEBLEBİCİOĞLU, Samsun
Haluk VAHABOĞLU, İstanbul
Hasan IRMAK, Ankara
Hasan TEZER, Ankara
Hilal ÖZDAĞ, Ankara
Hürrem BODUR, Ankara
Işıl MARAL, İstanbul
İ. Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir
İrfan EROL, Ankara
İrfan ŞENCAN, Ankara
İsmail CEYHAN, Ankara
Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara
Koray ERGÜNAY, Ankara
Levent AKIN, Ankara
Mahinur AKKAYA, Ankara
Mehmet Ali ONUR, Ankara
Mehmet Kürşat DERİCİ, Çorum
Mestan EMEK, İzmir
Metin KORKMAZ, İzmir
Mithat ŞAHİN, Kars
Muhsin AKBABA, Adana
Murat DİZBAY, Ankara
Murat GÜNAYDIN, İstanbul
Murat HÖKELEK, İstanbul
Mustafa Kemal BAŞARALI, Ankara
Mustafa KAVUTÇU, Ankara
Mutlu ÇELİK, Kocaeli
Mükerrem KAYA, Erzurum
Nazmi ÖZER, Ankara
Nilay ÇÖPLÜ, Ankara
Nur AKSAKAL, Ankara
Nur Münevver PINAR, Ankara
Nuran ESEN, İzmir
Nurhan ALBAYRAK, Ankara
Nuri KİRAZ, İstanbul
Oğuz GÜRSOY, Denizli
Orhan BAYLAN, İstanbul
Orhan YILMAZ, Ankara

Ömer Faruk TEKBAŞ, Ankara
Özlem KURT AZAP, Ankara
Pınar KAYNAR, Ankara
Pınar OKYAY, Aydın
Rahmet GÜNER, Ankara
Recep AKDUR, Ankara
Recep KEŞLİ, Afyon
Recep ÖZTÜRK, İstanbul
Rıza DURMAZ, Ankara
S. Aykut AYTAÇ, Ankara
Sami AYDOĞAN, Kayseri
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
Sercan ULUSOY, İzmir
Sibel KARACA, Ankara
Sultan ESER, İzmir
Suzan ÖZTÜRK YILMAZ, Sakarya
Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa
Sümer ARAS, Ankara
Şule SENSES ERGÜL, Ankara
Tevfik PINAR, Kırıkkale
Yavuz UYAR, İstanbul
Yeşim ÇETİNKAYA ŞARDAN, Ankara
Yeşim ÖZBAŞ, Ankara
Yeşim TUNÇOK, İzmir
Zafer ECEVİT, Ankara
Zafer KARAER, Ankara
Zati VATANSEVER, Kars
Zehranur YÜKSEKDAĞ, Ankara
Zeynep GÜLAY, İzmir

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

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

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

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

2. Makale başlığı, İngilizce başlık, kısa başlık, yazar adları, 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 stafilokok, streptokok gibi dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir. Antibiyotik isimleri dil bütünlüğü açısından okunduğu gibi yazılmalı; uluslararası standartlara uygun olarak kısaltılmamalıdır.

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

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

7. Metnin tamamı 12 punto Times New Roman karakteri ile çift aralıklı yazılmalı ve sayfa kenarlarından 2,5 cm boşluk 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 çalışmada 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 tanıyacak fotoğraf kullanıldığında, hastanın yazılı onayı gönderilmelidir.

11. Araştırma yazıları;

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

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

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

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

d) **Giriş:** Araştırmanın amacı ve gerekçesi güncel literatür bilgisi ile desteklenerek iki 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 yazılımlı ile ilgili aşağıda örnekler verilmiştir. Daha detaylı bilgi için “Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals” (J Am Med Assoc 1997; 277: 927-934) (<http://www.nejm.org/>) 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 numarası.

• 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 numarası.

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

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

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

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

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

Şekil ve Tablolar: Her tablo veya şekil ayrı bir sayfaya basılmalı, alt ve üst çizgiler ve gerektiğinde ara sütun çizgileri içermelidir. Tablolar, “Tablo 1.” şeklinde numaralandırılmalı ve tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne yazılmalıdır. Açıklayıcı bilgiye başlıkta değil 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 edilen yazar sayısı ikiden fazla olmamalıdır. Yazar(lar) daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olmalı; bu deneyimlerini derleme yazısında tartışmalı ve kaynak olarak göstermelidir. Derlemelerde Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet (en az 250, en fazla 400 kelime içermelidir) ve anahtar kelimeler bulunmalıdır. Derleme türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 60 olmalıdır.

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

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

16. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

17. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

Tel : (0312) 565 55 79

Faks : (0312) 565 55 91

e-posta : turkhijyen@thsk.gov.tr

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. Research Articles;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Example of standard journal article: Demirci M, Unlü M, Sahin U. A case of hydatid cyst diagnosed by kinyoun staining of lung bronco-alveolar fluid. *Türkiye 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 papers: Entrala E, Mascaro C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, Izmir-Turkey. 1994.

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

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

Figure and Tables: Each table or figure should be printed on a separate sheet, the top and bottom lines and if necessary column lines must be included.

Tables should be numbered like "Table 1." and the table title should be written above the top line of the table. Explanatory information should be given in footnotes, not in the title and appropriate icons (*, +, ++, etc.) should be used.

Photos should be in "jpeg" format. In case the quality of the photos is not good for publication, the originals can be requested.

12. Research articles should have up to 40 references.

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

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

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

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

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Public Health Institution of Turkey

Tel : +90 312 565 55 79

Fax : +90 312 565 55 91

e-mail : turkhijyen@thsk.gov.tr

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

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

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

- Bütün yazarlarca isim sırasına göre imzalanmış telif hakkı devir formu eksiksiz olarak dolduruldu.
 - Yazar isimleri açık olarak yazıldı.
 - Her yazarın bağlı bulunduğu kurum adı, yazar adının yanına numara verilerek başlık sayfasında belirtildi.
 - Yazışmalardan sorumlu yazarın adı, adresi, telefon-faks numaraları ve e-posta adresi verildi.
 - Türkçe ve İngilizce başlıklar ile kısa başlık yazıldı.
 - Türkçe ve İngilizce özetlerin kelime sayısı (300-500 arası) kontrol edildi.
 - Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (MeSH ve Türk Tıp Terimleri Sözlüğü'ne uygun) verildi.
 - Tüm kısaltmalar gözden geçirildi ve 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 “Public Health Institute of Turkey (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu)” of Ministry of Health. The Journal is published every three months and one volume consists of four issues.
- The journal publishes biology, microbiology, infectious diseases, pharmacology, toxicology, immunology, parasitology, entomology, chemistry, biochemistry, food safety, environmental, health, public health, epidemiology, pathology, pathophysiology, molecular biology, genetics, biotechnology in the field of original research, case report, reviews and letters to the editor are published in Turkish and English.
- Articles which are not previously published in another journal or not currently under evaluation elsewhere can be accepted for the journal.
- Articles approved by the Scientific Committee and Editorial Board are eligible to be released after receiving at least two positive opinions from the Scientific Committee members. Those committees have the authority to make all corrections and abbreviations but not to change the content of the article.
- The authors have the all the scientific and legal responsibilities of the articles.
- The authors must fully obey the ethics of research and publication.
- The copyright of the article published in the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology belongs to the Journal. Copyright fee is not paid to the authors.

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

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

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



DOAJ
DIRECTORY OF
OPEN ACCESS
JOURNALS



INDEX
INTERNATIONAL
COPERNICUS

CAS
A division of the American Chemical Society

Google
scholar
beta

SCIRUS
for scientific information only

Academic Journals Database
disseminating
quality controlled scientific knowledge

BASE
Bielefeld Academic Search Engine

New Jour
• Electronic Journals & Newsletters •

EBSCO
HOST
Electronic
Journals
Service

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.



TURK
MEDLINE



TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

ULRICHSWEB™
GLOBAL SERIALS DIRECTORY

Wolters Kluwer
Health | Ovid LinkSolver™

GENAMICS™
...research from your desktop

libsearch

Scopus

medoanet
Mediterranean Open Access Network

crossref

İLETİŞİM

CORRESPONDENCE

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

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

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

Tel: 0312 565 55 79

Faks: 0312 565 55 91

e-posta: turkhijyen@thsk.gov.tr

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

www.turkhijyen.org

■ Editöre Mektup / Letter to the Editor

1. Human brucellosis in Thailand: Reported cases summary

Tayland'daki insan brusellozisi: Rapor edilmiş vakaların özeti

Joób BEUY, Viroj WIWANITKIT

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.10846 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

99 - 100



■ Araştırma Makalesi / Original Article

2. Clinical characteristics and incidence of bacterial and viral pathogens in patients hospitalized with community acquired pneumonia in childhood in Konya between October 2008 and February 2010

Konya'da Ekim 2008 - Şubat 2010 tarihleri arasındaki çocukluk çağında toplum kökenli pnömoni tanısı ile hastaneye yatırılan hastalarda bakteriyel ve viral etkenlerin insidansı ve klinik özellikleri

Sadiye SERT, Melike EMİROĞLU, Uğur ARSLAN, Osman KOÇ, Rahmi ÖRS

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.86547 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

101 - 110



3. Genotoxic and cytotoxic effects of formic acid on human lymphocytes in vitro

Formik asidin insan lenfositleri üzerindeki in vitro genotoksik ve sitotoksik etkisi

Pınar AKSU, Gökhan NUR, Süleyman GÜL, Ayşe ERCİYAS, Zeynep TAYFA, Tülay DİKEN ALLAHVERDİ, Ertuğrul ALLAHVERDİ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.82621 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

111 - 120

4. Sinop ilindeki hamsi ve zargana balıklarından *Vibrio* spp. izolasyonu ve karakterizasyonuIsolation and characterization of *Vibrio* spp. from anchovy and garfish in the Sinop province

Cumhur AVŞAR, İsmet BERBER, Ahmet Kenan YILDIRIM

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.58815 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

121 - 130

5. 2013 yılında Muğla ili Marmaris ilçesinde görülen *Staphylococcus aureus* enterotoksin kaynaklı gıda zehirlenmesinin değerlendirilmesiEvaluation of food poisoning of *Staphylococcus aureus* enterotoxin source in 2013 in the Marmaris district of Muğla, Turkey

Celal TUTUŞ, Demet BÖREKÇİ, Gürkan PARCIKLİ, Fehminaz TEMEL, Mustafa Bahadır SUCAKLI

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.79847 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

131 - 138



6. İzmir'de sağlık kurumlarına yemek üretim ve dağıtım hizmeti veren bir firmada çalışanların gıda hijyeni ile ilgili bilgi ve davranışları

The knowledge and behaviour of workers on food hygiene who worked in a company providing catering and distribution service to the health institutions in İzmir

Şadan KÖKSAL, Ahmet SOYSAL, Gül ERGÖR, Gülşah KANER

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.39129 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

139 - 148

7. İstanbul'un sivrisinek faunası ve *Culex pipiens* larvalarının *Bacillus* cinsi bakterilere karşı duyarlılığıThe mosquito fauna of Istanbul and susceptibility of *Culex pipiens* larvae to *Bacillus* spp. bacteriae

Erdal POLAT, Serdar Mehmet ALTINKUM, Fadime YILMAZ, Sema TURAN-UZUNTAŞ, Yaşar BAĞDATLI

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.48254 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

149 - 156



■ Olgu Sunumu / Case Report

8. Fascioliasis tanısında hekimlerde ERCP yerine serolojik test farkındalığı yaratmak: Olgu sunumu

To create awareness of serological tests instead of ERCP for fascioliasis diagnosis among physicians: A case report

Ayşegül AKSOY-GÖKMEN, Bayram PEKTAŞ, Mehmet CAMCI, Celal BUĞDACI, Erkan YULA, Selçuk KAYA, Mustafa DEMİRCİ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.93196 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

157 - 160



■ Derleme / Review

9. Aşı epidemiyolojisi: Aşı etkililiği için epidemiyolojik çalışma tasarımları

Vaccine epidemiology: Epidemiologic study designs for vaccine effectiveness

Can Hüseyin HEKİMOĞLU

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.28482 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

161 - 174



10. Mantar enfeksiyonlarının serolojik tanısı

Serological diagnosis of fungal infections

Asuman BİRİNCİ, Yeliz TANRIVERDİ-ÇAYCI

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.74418 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

175 - 182



11. Dijital PZR ve kullanım alanları

Digital PCR and applications

Ahmet ÇARHAN, Elif ERCAN, Tuğba YALÇINKAYA

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.48902 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

183 - 198



Human brucellosis in Thailand: Reported cases summary

Tayland'daki insan brusellozisi: Rapor edilmiş vakaların özeti

Joob BEUY¹, Viroj WIWANITKIT²

INTRODUCTION

Brucellosis is an important zoonosis from cattle, swine, goats, sheep and dogs. It can be seen in many countries around the world (1). The patient can have wide spectrum of clinical feature and it is usually seen as a case of fever of unknown (FUO) origin (2). However, in Southeast Asia, this disease is extremely rare. In Thailand, a tropical country in Southeast Asia, brucellosis was firstly reported in 1970 and there were sporadic case reports after that (3, 4). Here, the authors have summarized on the clinical features of all available case reports of brucellosis in Thailand until now (October 2015). According to the searching in standard databases (PubMed, Scopus, Index Copernicus and Thai Index Medicus), there are at least 14 cases of human brucellosis reported from Thailand (4-10). All cases are also recorded due to the national disease notification system. All cases were adult patients except one. Prolonged FUO was the main clinical presentation seen in all cases. All adult cases also presented the complaint of weight loss. Lung complications (lobar pneumonia) could be seen in two cases. There was no problem of dermatological or gastrointestinal problem. The common laboratory finding in all cases was pancytopenia. Immunological test (serum

agglutination test, cut off point 1:160) and blood culture helped to confirm diagnosis in all cases (no PCR test was available for diagnosis in studied reported cases). Standard antibiotic (doxycycline) treatment was used in all cases and it was proved to be effective for management of all Thai cases; complete recovery could be observed. Although there are few case reports on human brucellosis in Thailand. The high seropositivity (45.35%) among general health people was recently reported (11) from a city where the outbreak took place in the previous year. In that recent study (11), "contact with labored or aborted goats" and "consumption of raw goat products" were approved as risk factors for human brucellosis in Thailand. In Thailand, brucellosis can be seen and the clinical pattern is concordant with the standard medical textbooks and published literatures. In Thailand, fever is the main clinical presentation and the respiratory problem is predominate. Goat is the major source of infection and *B. melitensis* the principal cause of human brucellosis. Although the cases are rare in Thailand, it is also similar to the previous report from other countries such as Turkey (12).

Key Words: Human, brucellosis, Thailand

¹ Sanitation I Medical Academic Center, BANGKOK, THAILAND

² Hainan Medical University, BANGKOK, THAILAND



İletişim / Corresponding Author : Joob BEUY

Sanitation I Medical Academic Center, BANGKOK, THAILAND

Tel : 662 465 82 92

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

Geliş Tarihi / Received : 24.12.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 12.02.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.10846

Beuy J, Wiwanitk V. Human brucellosis in Thailand: Reported cases summary. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 99-100.

CONFLICTS of INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Hasanjani Roushan MR, Ebrahimpour S. Human brucellosis: An overview. *Caspian J Intern Med*, 2015; 6: 46-7.
2. Mir T, Nabi Dhobi G, Nabi Koul A, Saleh T. Clinical profile of classical Fever of unknown origin (FUO). *Caspian J Intern Med*, 2014; 5: 35-9.
3. Subharnngkasen S. Brucellosis in Thailand. *Bull Off Int Epizoot*, 1970; 73: 9-15.
4. Visudhiphan S, Na-Nakorn S. Brucellosis. First case report in Thailand. *J Med Assoc Thai*, 1970; 53: 289-93.
5. Paitoonpong L, Ekgatat M, Nunthapisud P, Tantawichien T, Suankratay C. Brucellosis: the first case of King Chulalongkorn Memorial Hospital and review of the literature. *J Med Assoc Thai*, 2006; 89: 1313-7.
6. Manosuthi W, Thummakul T, Vibhagool A, Vorachit M, Malathum K. Case report: Brucellosis: a re-emerging disease in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2004; 35: 109-12.
7. Lapphral K, Leelaporn A, Vanprapar N, Chearskul P, Sawawiboon N, Wittawatmongkol O, Choekphaibulkit K. First case report of brucellosis in a child in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2014; 45: 890-6.
8. Wongphruksasoong V. Investigation of brucellosis case and death in Chondaen district, Phetchabun province, Thailand, December 2009. *W Epidemiol Surveil Rep*, 2010; 41: 539-44.
9. Wiangcharoen R. Brucellosis in western region of Thailand. *Reg 6-7 Med J*, 2006; 25: 123- 9.
10. Laosiritaworn Y, Hinjoy S, Chuxnum T, Vagus A, Choomkasien P. Re-emerging human brucellosis, Thailand 2003. *Bull Dept Med Serv*, 2007; 32: 415-23.
11. Ekpanyaskul C, Santiwattanakul S, Tantisiriwat W, Buppanharun W. Factors associated with seropositive antibodies to *Brucella melitensis* in the Nakhon Nayok, Thailand. *J Med Assoc Thai* 2012; 95 Suppl 12:S40-6.
12. Kılıç S, Aalantaş Ö, Çelebi B, Pınar D, Babür C. Investigation of Seroprevalences of Q Fever, Brucellosis and Toxoplasmosis in Risk Groups in Hatay. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2007; 64: 16 - 21.

Clinical characteristics and incidence of bacterial and viral pathogens in patients hospitalized with community acquired pneumonia in childhood in Konya between October 2008 and February 2010

Konya'da Ekim 2008 - Şubat 2010 tarihleri arasındaki çocukluk çağında toplum kökenli pnömoni tanısı ile hastaneye yatırılan hastalarda bakteriyel ve viral etkenlerin insidansı ve klinik özellikleri

Sadiye SERT¹, Melike EMİROĞLU², Uğur ARSLAN³, Osman KOÇ⁴, Rahmi ÖRS⁵

ABSTRACT

Objective: It was aimed to investigate clinical characteristics and incidence of bacterial and viral pathogens in patients who were hospitalized with the clinical diagnosis of community acquired pneumonia (CAP).

Method: In this study 91 patients at the ages between one month and six years who required hospitalization and were admitted to pediatrics clinics and pediatric emergency services of the Selçuk University Meram Medical Faculty, and also who did not use antibiotics for 48 hours before hospital admission and had the clinical diagnosis of CAP were investigated from October 2008 to February 2010. Demographic and clinic characteristics of the patients were recorded. Blood samples for complete blood count, erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, procalcitonin, blood culture and nasopharyngeal aspirate samples for detection of the viral etiologies by real time polymerase chain reaction (RT-PCR) were taken at the time of hospital admission. Initial posteroanterior (PA) chest X-rays of all patients were checked.

Results: The agents of pneumonia were detected in 24.2% (22/91) but not in 75.8% (69/91) of our patients. Of 91 patients, 11 (12.1%) were positive for viral infections, 9 (9.9%) were positive for only bacterial infections, 3 (3.3%) had viral coinfection, 2 (2.2%) were positive for both viral and bacterial infections. Out of 11 viral positive patients, 7, 2, 1, 2, and 1 patients

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada; toplum kökenli pnömoni tanısı (TKP) ile hastaneye yatırılan hastalarda bakteriyel ve viral etkenlerin insidansı ve klinik özellikleri araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 1 Ekim 2008-28 Şubat 2010 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Poliklinikleri ve Çocuk Acil Servisine başvuran ve yatırılarak tedavi edilmesi gereken, başvurudan 48 saat öncesine kadar antibiyotik kullanmayan, klinik olarak TKP tanısı olan, yaşları 1 ay ile 16 yaş arasındaki toplam 91 hasta çalışma kapsamına alındı. Bu hastaların demografik ve klinik özellikleri kaydedildi. Hastane başvurusu esnasında tam kan sayımı, eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif protein, prokalsitonin, kan kültürü için kan numuneleri ve viral etiyojijiyi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile saptamak amacıyla nazofaringeal aspirat numuneleri alındı. Tüm hastaların PA akciğer radyografileri kontrol edildi.

Bulgular: Hastaların %24,2 (22/91)'sinde pnömoni etkeni saptanırken, %75,8 (69/91)'inde herhangi bir pnömoni etkeni saptanamadı. 91 hastanın 11 (%12,1)'inde viral enfeksiyon, dokuzunda (%9,9) sadece bakteriyel enfeksiyon, üçünde (%3,3) viral koenfeksiyon, ikisinde (%2,2) hem virus hem de bakteri vardı. Virus tespit edilen 11 hastanın yedisinde Parainfluenza (PIV) 2, ikisinde PIV 3, birinde adenovirus, ikisinde hem PIV3 hem

¹ Department of Pediatrics, Beyhekim State Hospital, KONYA, TURKEY

² Department of Pediatric Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Selçuk University, KONYA, TURKEY

³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Selçuk University, KONYA, TURKEY

⁴ Department of Radiology, Faculty of Medicine, Necmettin Erbakan University, KONYA, TURKEY

⁵ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Necmettin Erbakan University, KONYA, TURKEY

İletişim / Corresponding Author : Sadiye SERT

Department of Pediatrics, Beyhekim State Hospital, KONYA, TURKEY

Tel : +90332 224 30 00

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

Geliş Tarihi / Received : 06.08.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 01.01.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.86547

Sert S, Emiroğlu M, Arslan U, Koç O, Örs R. Clinical characteristics and incidence of bacterial and viral pathogens in patients hospitalized with community acquired pneumonia in childhood in Konya between October 2008 and February 2010. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 101-10.

were detected to have parainfluenza virus (PIV) 2, PIV 3, adenovirus, both PIV 3 and adenovirus, both PIV 2 and PIV 3, respectively. RSV, PIV 1 and human metapneumovirus (hMPV) were not detected in any of cases. Out of 11 bacteria positive patients, 5, 2, 1, 1, 1, and 1 patients were detected to have *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. sobrinus* and *S. mitis*. Also mixed viral-bacterial agent presence were detected in 2 (2.2%) of our patients. Out of ninety one pneumonia patients those having their diagnosis clinically, 59 (64.7%) had radiological signs.

Conclusion: Our study demonstrated the etiological influence of viral agents in CAP. Parainfluenza virus 2 was the most common viral agent among detected viruses in all age groups. Improving the etiological diagnosis of viral infections may avoid unnecessary the use of antibiotic. Further comprehensive and randomized controlled studies are needed to confirm our results.

Key Words: Childhood, etiology, community acquired pneumonia, real time-PCR

adenovirus, birinde hem PIV2 hem de PIV3 tespit edildi. Hastaların hiçbirinde RSV, PIV1, hMPV saptanmadı. Bakteri tespit edilen 11 hastanın beşinde *Stafilokokus epidermidis*, ikisinde *S. saprophyticus*, birinde *S. shominis*, birinde *S. capitis*, birinde *S. sobrinus* ve birinde *S. mitis* tespit edildi. Hastaların ikisinde de viral-bakteriyel karma etken olduğu saptandı. Klinik olarak pnömoni tanısı alan 91 hastanın 59 (%64,7)'unda radyolojik olarak pnömoni varlığı belirlendi.

Sonuç: Çalışmamız TKP'de viral etkenlerin etiyolojik etkisini gösterdi. Parainfluenza virus 2 tüm yaş gruplarında en sık tespit edilen viral etkendi. Viral enfeksiyonların etiyolojik tanılarının iyileştirilmesi ile gereksiz antibiyotik kullanımından kaçınılabılır. Sonuçlarımızı doğrulamak için daha kapsamlı ve randomize kontrollü çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Çocukluk çağı, etiyoloji, toplum kökenli pnömoni, gerçek zamanlı PZR

INTRODUCTION

Childhood community-acquired pneumonia (CAP) remains a leading cause of morbidity and mortality worldwide. The aetiological agents, patient age, clinical manifestations and seasonal occurrence of childhood CAP vary between countries. Rational antibiotic treatment requires knowledge of the most likely pathogens in each geographical region (1). Recent estimates from the World Health Organization (WHO) suggest that pneumonia is responsible for 20% of deaths in <5 years of age group, leading to 3 million deaths per year. Of these deaths, two thirds occur during infancy and more than 90% occur in the developing countries (2). There have been relatively few comprehensive studies of the viral and bacterial etiology of CAP in children. Identifying the cause of CAP in children is difficult for several reasons. The procedures used to confirm the pathogen, such as bronchoalveolar lavage and lung puncture for

bacterial culture, are too invasive. The positive rate for blood cultures in pneumonia is only 0 to 5% in cases in developed countries (3-6).

Viral pathogens are gradually recognized as playing a major role in the etiology of lower respiratory tract infections (LRTIs), and are considered the predominant pathogens in CAP in preschool children (7). As these respiratory viral pathogens cause very similar clinical symptoms, differential diagnosis of the pathogens is required in appropriate sample. Monospecific PCR assays require separate amplification of each target and are therefore expensive and resource intensive. For clinical diagnosis, multiplex PCR has a significant advantage, as it permits simultaneous amplification of several viruses in a single reaction mixture, facilitating cost-effective diagnosis (8). Real-time PCR method was found to be more sensitive than cell culture on a range of different respiratory samples.

The specificity of the real-time PCR was reported to be as high as 93% and the sensitivity as 100% (9). Thus, in our study we used multiplex real-time PCR method for diagnosis and differentiation of different viral agents.

Comprehensive information on the etiology of CAP is required for the formulation of treatment recommendations and the introduction of preventive measures. Evaluation of mixed infections and the relative importance of each potential pathogen may also contribute to improved understanding of the etiopathogenesis of CAP (10).

We aimed to investigate clinical characteristics and incidence of bacterial and viral pathogens in children aged one month to 16 years who were hospitalized for CAP.

MATERIAL AND METHODS

Study design

The study was a 17-months study. We evaluated to investigate clinical characteristics and incidence of bacterial and viral pathogens among children who were diagnosed and hospitalized for CAP. Patients aged one month to 16 years old diagnosed as CAP by inclusion criteria were recruited into the study. The study was approved by the local ethics committee, and written informed consent was obtained from parents of all patients. A patient was enrolled in the study if she/he met the following criteria (11). Fever with body temperature >37.8 °C, respiratory rate more than average per age by WHO criteria, abnormal chest x-ray together with signs of respiratory distress. Children were excluded if they were currently on antibiotic therapy or were admitted to hospital for more than 48 hours. Upon enrolment, demographic characteristics and baseline clinical data were recorded. Pulmonary auscultation findings of each patient were recorded with detailed physical examination.

Study population

From October 2008 to February 2010, 91 children aged one month to 16 years (44 girls and 47 boys,

median age: 11 months) who were diagnosed as CAP and were hospitalized at department of pediatrics, Selcuk University Hospital, Konya, Turkey were included in the study.

Radiology

A senior radiologist, unaware of clinical and laboratory findings, reviewed all chest radiographs. Chest x-rays were interpreted and recorded radiological findings such as normal chest radiography, consolidation, interstitial infiltration, peribronchitis, hiler/mediastinal lymphadenopathy, atelectasis, air bronchogram, pleural effusion, and hyperinflation by the radiologist.

Microbiology

A nasopharyngeal sample was aspirated through a nostril and kept under -80 °C until virologic tests (n =91) were done. Existence and genotyping of viruses (PIV type 1, 2 and 3, respiratory syncytial virus (RSV), adenovirus and human metapneumovirus) causing viral CAP were investigated with RT-PCR. Viral DNA isolation of a nasopharyngeal sample was made by using High Pure PCR Template Preparation (Cat.No. 11 796 828 001, Roche Diagnostic, Germany). RT-PCR device (LightCycler®, Roche Diagnostic, Germany) was used for detection of pathogens. The virologic studies were carried out at the Department of Microbiology, Selcuk University Hospital, Konya.

Serum procalcitonin (PCT) levels were measured with BRAHMS PCT reactive (BRAHMS- Diagnostica, Berlin/ Germany). Assays were performed with Lumat LB 9501 immunoassay device (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) by using immunoluminometric method.

Serum C-reactive protein (CRP) levels were measured using Nephelometer 100 Device (Dade Behring Marburg, Germany).

Erythrocyte sedimentation rate (ESR) measurements were performed by using fully automated ESR assay device (Diesse Ves Cube 200, Diesse Diagnostica Senese SpA, Italy).

Complete blood count (CBC) assays were performed with fully automated CBC device (Cell-Dyne 3700, Abbott Diagnostics Division, Abbott Laboratories, Abbott Park IL, USA).

Blood cultures were obtained via BD Bactec Peds Plus/F vials before initiation of parenteral antibiotic therapy among all patients and incubated in automated blood culture system (Bactec 9240 BD, Becton Dickinson and Company, Sparks MD, USA). Isolated strains were also identified by using automated bacteria identification system (VITEK 2, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

Statistical analysis

Data were reported as mean \pm SD, minimum-maximum (range) or percent. After testing for normality with a one sample Kolmogorov-Smirnov test, differences in the means of variables were evaluated using both parametric (Student's t-test) and nonparametric tests (Mann-Whitney U-test) depending on the distribution of the variables. Categorical data were analysed with the chi-square test or Fischer's exact test. Results were considered significant if $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with the Statistical Package for Social Science program (SPSS version 15.0 for Windows; Chicago, IL).

RESULTS

The demographic and clinical features of the patients with CAP were shown in Table 1. The study included 47 (51.6%) boys and 44 (48.4%) girls. The median age of the patients was 11 months, ranging from 1 to 192 months. Nasal congestion and rhonchi were significantly frequent than in patients with viral infection when compared to those with bacterial pneumonia ($p=0.049$, $p=0.028$). The agents of pneumonia were detected in 24.2 % (22/91) with nasopharyngeal aspirate and blood culture but not in 75.8 % (69/91) of our patients. Of 91 patients, 11 (12.1%) were positive for viral infections, 9 (9.9%)

were positive for only bacterial infections, 3 (3.3%) had viral coinfection, 2 (2.2%) were positive for both viral and bacterial infections. Out of 11 viral positive patients, 7, 2, 1, 2, and 1 patients were detected to have parainfluenza virus (PIV) 2, PIV 3, adenovirus, both PIV 3 and adenovirus, both PIV 2 and PIV 3, respectively. RSV, PIV 1 and human metapneumovirus virus were not detected in any of cases. Out of 11 bacteria positive patients, 5, 2, 1, 1, 1, and 1 patients were detected to have *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis*, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mitis*. Also mixed viral-bacterial agent presence were detected in 2 (2.2%) of our patients. Table 2 shows viral and bacterial agents causing CAP in hospitalized children.

The mean body temperature on admission was 37.9 ± 1.05 °C. Considering the pulmonary auscultation findings of the patients, crackles, rhonchi and wheezing were found in 85 (93.4%), 54(59.3%) and 38 (41.8%) children, respectively. The median leukocyte count, CRP, PCT and ESR values were $9000/\text{mm}^3$, 10.7 mg/L, 0.13 ng/mL, 13 mm/h, respectively.

The distributions of etiologic agents of community-acquired pneumonia according to different age groups were shown in Table 3. PIV-2 had the highest rate among detected viruses in all age groups. Adenovirus was detected only in one patient in 2-11 months of age group. Parainfluenza 3 were found in <2 and 2-11 months of age group. PIV-2 was the most common viral agent among <2 and 2-11 months of age group. Positive blood culture was detected the higher in <2 months of age group than those in other groups.

There was no statistically significant difference between viral and bacterial pneumonia groups with regard to ESR values ($p=0.669$). Also, there was no statistically significant difference between viral and bacterial pneumonia groups with regard to PCT values ($p=0.993$). The radiological findings of patients with CAP were shown in Table 4. Chest x ray showed notable alveolar

Table 1. The demographic and clinical features of the patients with CAP

Demographic features	
Gender	
Boy	47 (51.6) †
Girl	44 (48.4)
Age (Month)	
Median (Range)	11 (1-192)
Residential area	
Urban	70 (76.9)
Rural	21 (23.1)
Underlying diseases	14 (15.4)
Vaccination	
Appropriate according to age	91 (100)
At least one time hospitalising for lower respiratory tract infection	18 (19.8)
Antibiotic therapy in the last month	51 (56)
Age of mother (Year)	
Mean	28.4 ±5.6
Median (Range)	28 (18-47)
Age of father (Year)	
Mean	31.5± 5.6
Median (Range)	31 (22-49)
Family history of atopy	11 (12.1)
Upper respiratory tract infection in family during the last month	61 (67)
Environment related to smoking	39 (42.9)
Clinical presentation	
Fever	90 (98.9)
Cough	90 (98.9)
Wheezing	71 (78)
Irritability	65 (71.4)
Poor feeding	61 (67)
Dyspnea	58 (63.7)
Vomiting	44 (48.4)
Cyanosis	34 (37.4)
Rhinorrhoea	30 (33)
Nasal congestion	24 (26.4)
Productive cough	23 (25.3)
Headache	13 (14.3)
Sore throat	13 (14.3)
Chest pain	11 (12.1)
Abdominal pain	11 (12.1)
Findings of physical examination	
Body temperature (°C)	
Median (Range)	38 (36.2-40)
Mean	37.9 ± 1.05
Crackles	85 (93.4)
Tachypnea	62 (68.1)
Rhonchi	54 (59.3)
Cyanosis	40 (44)
Tachycardia	39 (42.9)
Nasal flaring	39 (42.9)
Wheezing	38 (41.8)
Chest retraction	36 (39.6)
Underweight (<% 3)	13 (14.3)
Short stature (<% 3)	7 (7.7)

†: n (%), Data are shown as mean ±standard deviation, median (range) or percent

Table 2. The laboratory and microbiological features of the patients with CAP

Leukocyte count (/mm³)	
Median (Range)	9000 (2100-37600)
CRP (mg/L)	
Median (Range)	10.7 (1.3-106.7)
Procalcitonin (ng/ml)	
Median (Range)	0.13 (0.02-75.3)
ESR (mm/h)	
Median (Range)	13 (2-80)
RSV	-
PIV 1	-
PIV 2	7 (7.7) †
PIV 3	2 (2.2) †
Adenovirus	1 (1.1) †
hMPV	-
Viral coinfection	
PIV3+adenovirus	2 (2.2) †
PIV2+PIV3	1 (1.1) †
Positive blood culture	11 (12.1)†
<i>Staphylococcus hominis</i>	1 (1.1) †
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5 (5.4) †
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2 (2.2) †
<i>Staphylococcus capitis</i>	1 (1.1) †
<i>Streptococcus sobrinus</i>	1 (1.1) †
<i>Streptococcus mitis</i>	1 (1.1) †

†: n (%), Data are shown as median (range) or percent

Table 3. The distributions of etiologic agents of community-acquired pneumonia according to age groups

Age (Month)	Number of patients (%)			Total	
	Etiology	Virus	Positive blood culture		Unknown etiologic agent
<2		2 (12.5)	4 (25.1)	10 (62.5)	16 (17.6)
2-11		6 (19.4)	4 (12.9)	21 (67.7)	31 (34.1)
12-23		1 (6.7)	1 (6.7)	13 (86.7)	15 (16.5)
24-59		0 (0)	2 (12.5)	14 (87.5)	16 (17.6)
>59		2 (15.4)	0 (0)	11 (84.6)	13 (14.3)
Total		11 (12.1)	11 (12.4)	69 (75.8)	91 (100)

infiltration in 24 (26.3%) of the 91 patients and interstitial infiltration in 35 (38.4%). There was no statistically significant difference between viral and bacterial pneumonia groups with regard to length of hospitalization (p=0.252). None of the children required mechanical ventilation or died.

DISCUSSION

Table 4. Chest x-ray findings of the patients with CAP

Radiological findings	n (%)
Normal	28 (30.8)
Intercystital infiltration	23 (25.3)
Consolidation	19 (20.9)
Peribronchitis	12 (13.2)
Air bronchogram	5 (5.5)
Pleural effusion	2 (2.2)
Hiler/ mediastinal lymphadenopathy	1 (1.1)
Atelectasis	1 (1.1)
Hyperinflation	-

The present study showed causative infective agents and characteristics of hospitalized children with pneumonia. Real time-PCR as molecular diagnostic technique was used in our study to comprehensively study the viral etiology of CAP in hospitalized children who were 1 month to 16 years old. Using this method, infection with 6 viruses was investigated, and the presence of viral infection was identified in 12.1% of the patients. Bacterial infection was detected in 9 (9.9%) of 91 patients. These results were less than previously reported etiological rates; in previous studies, the rate has been reported as 43% to 85% (6, 12, 13). Epidemiologic data related to pneumococcal diseases are very limited in Turkey, despite the fact that pneumococcus is the most important organism causing childhood bacterial diseases. The emergence and spread of resistant

pneumococcal strains have led to an emphasis on the prevention of pneumococcal disease by vaccination. Routine vaccination with 7-valent pneumococcal conjugated vaccine (PCV-7) for children <1 year of age was agreed upon in Turkey at the end of 2008 and was included in the National Immunization Schedule in 2009. PCV-7 was used for 2 years in Turkey before being replaced by PCV-13 in November 2011. In 2010 and 2011, 96% and 97% of the target population, respectively, were vaccinated with PCV-7 (14). In our study, *Streptococcus pneumoniae* was not detected in any of the blood cultures. It can depend on the Vaccine Schedule.

In clinical practice, it is important to distinguish between contamination and bloodstream infections to prevent unnecessary prescription of antimicrobial agents leading to a selection of antimicrobial-resistant organisms (15, 16). Contamination is usually presumed if only one of at least two sets of blood cultures is positive for Coagulase-negative staphylococci, whereas true bloodstream infection is assumed if at least two blood cultures yield Coagulase-negative staphylococci (17, 18). Thus, we made the discrimination of yielding and contamination according to these data.

Iwane et al (19) showed that younger age (particularly <1 year), male gender, and presence of chronic underlying illness were associated with higher hospitalization rates for viral acute respiratory illness. In our study, the ratio of male to female was closed to 1 and 51.7% of patients were younger than 1 year of age. Our results were in accordance with previous studies' findings (20).

In a previous study by Juven et al (21), the most common symptoms were fever in 96%, cough in 76%, rhinorrhea in 48% and dyspnea in 37% of the patients with pneumonia. In this study, twenty-four percent of the patients had typical pneumonic rales/crackles on auscultation. Decreased breathing sounds were found in 15% of patients, wheezing in 20% and rhonchi in 33% of the patients. Auscultation was normal in 28% of the patients. In our study, the most

common symptoms were fever in 98.9% and cough in 98.9% of the patients. Auscultation findings of the patients, crackles, rhonchi and wheezing were found in 85 (93.4%), 54(59.3%) and 38 (41.8%) children, respectively.

Viruses have been most commonly associated with CAP diagnosed in infants and younger children (22). However, recent evidence suggests that, when sensitive detection methods are used, the prevalence of viral infections in older children with CAP is higher than previously thought (6). In our study, 12.1% of the patients were found to be infected with viruses. Cilla et al. had investigated 14 respiratory viruses in children aged less than 3 years old with CAP using molecular or immunochromatographic techniques and/or viral culture. In their study, at least one virus had been detected in 66.9% of the episodes (23).

Juvé et al. (6) reported a very high rate (62%) of viral etiology in pediatric CAP. In their study, rhinovirus, detected by PCR, accounted for a large proportion of viral pneumonia. In our study, rhinovirus was not investigated.

RSV is accounted for an estimated 13, 3, and 0.4 RSV-associated hospitalizations per 1000 children who were younger than 1 year, 1 year of age, and in children 2 to 5 years of age, respectively (23). In our study, RSV was not detected. The cause for this is clearly unknown.

A recent study showed that the positive detection rate of adenovirus by RT-PCR was 0.63% in children with pneumonia (24). Similarly, in our study, adenovirus was detected only in one patient in 2-11 months of age group. However, this ratio is lower than in that reported in a study by Samransamruajkit et al. (25) in which adenovirus was detected in 6.6 % of pneumonia patients.

Predictable parainfluenza-related hospitalization rates in the New Vaccine Surveillance Network study were 3.2, 1.5, and 0.4 per 1000 children younger than 1 year, 1 year, and 2 to <5 years of age, respectively (19). In our study, PIV-2 had the highest rate among

detected viruses in all age groups. Parainfluenza 3 were found in <2 and 2-11 months of age group. PIV-2 was the most common viral agent among <2 and 2-11 months of age group.

Human metapneumovirus, a respiratory virus first isolated in the Netherlands in 2001, has been increasingly recognized as a common cause of acute respiratory tract infection in young children worldwide. Human metapneumovirus infection has been associated with a spectrum of clinical manifestations, ranging from influenza-like illness to bronchiolitis and pneumonia. Among children hospitalized for acute LRI in southern Israel during a 1-year period, human metapneumovirus was detected in 13% of the patients and was the third most common viral pathogen (26). In our study, human metapneumovirus was not detected.

In a previous study, in 27% of the episodes of childhood CAP multiple viral infections were detected. Infection severity was more in multiple viral infections than single viral infection due to the greater frequency of hospitalization (23). We also detected viral co-infection in 3 patients. In our study population, mixed infections were uncommon (3.1 %), although in previous studies mixed infections were reported as high as 23 % of pneumonia cases in children (27).

The usefulness of PCT for distinguishing between bacterial and viral pneumonia has been analyzed in children but the data are also conflicting. Moulin et al. found that a PCT value of 1 ng/ml or greater had better specificity and sensitivity and higher positive and negative predictive values than CRP, IL-6 or white blood cell count for discriminating between bacterial and viral CAP in untreated children admitted to hospital (28). In a similar study Toikka et al. also reported high values of PCT in children with bacterial pneumonia, but with a large overlap between bacterial and viral pneumonia (29). In their study, Don et al. (30) concluded that the four non-specific inflammatory markers, CRP, PCT, ESR, WBC

count and their combinations have a limited role in the separation of bacterial from viral pneumonia in children. In particular, low levels considered as typical for viral infections were not able to rule out bacterial infection. In our study, we also found no statistically significant difference between viral and bacterial pneumonia groups with regard to ESR and PCT values.

In clinical practice, alveolar infiltrations on chest radiograph are often considered to indicate bacterial etiology of pneumonia, but clinical studies have failed to confirm this concept (31, 32). Virkki et al.(33) recently found that most children with alveolar infiltrates and, in particular, with lobar infiltrates, had bacterial pneumonia, whereas interstitial infiltrates were present in both viral and bacterial cases. In our study, there were alveolar infiltration in 24 (26.3%) and interstitial infiltration in 35 (38.4%) of the 91 patients.

This study, like others that investigated viral and bacterial pneumonia, has three major limitations: First of all, documentation of infection in the upper respiratory tract does not necessarily prove the etiological agent of pneumonia. However, in 69 of 91 cases no etiological agent was detected. The RT-PCR method is an extremely powerful and useful tool; however, if we had been included other viral agents including rhinovirus and human bocavirus detected by RT-PCR, numbers of diagnosed cases might be higher. We also did not investigate *Mycoplasma pneumoniae* serologically. Second, month-to-month variations in the prevalence of different pathogens may affect their association with CAP. Third, the other important limitation is that we only studied hospitalised patients, and the results cannot be generalised to outpatients with pneumonia.

In conclusion, our study demonstrated the etiological influence of viral agents in CAP. Parainfluenza virus 2 was the most common viral agent among detected viruses in all age groups. Improving the etiological diagnosis of viral infections

may avoid unnecessary antibiotics and allow for preventive isolation of infected patients. Further larger and randomized controlled studies are needed to confirm our results.

CONFLICTS of INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Chiang WC, Teoh OH, Chong CY, Goh A, Tang JP, Chay OM. Epidemiology, clinical characteristics and antimicrobial resistance patterns of community-acquired pneumonia in 1702 hospitalized children in Singapore. *Respirology*, 2007; 12: 254-61.
- Mulholland K. Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions. *Pediatr Pulmonol*, 2003; 36: 469-74.
- Paisley JW, Lauer BA, McIntosh K, Glode MP, Schachter J, Rumack C. Pathogens associated with acute lower respiratory tract infection in young children. *Pediatr Infect Dis*, 1984; 3: 14-9.
- Nohynek H, Eskola J, Laine E, Halonen P, Ruutu P, Saikku P, et al. The causes of hospital-treated acute lower respiratory tract infection in children. *Am J Dis Child*, 1991; 145: 618-22.
- Gendrel D, Raymond J, Moulin F, Iniguez JL, Ravilly S, Habib F, et al. Etiology and response to antibiotic therapy of community-acquired pneumonia in French children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1997; 16: 388-91.
- Juvé T, Mertsola J, Waris M, Leinonen M, Meurman O, Roivainen M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J*, 2000; 19: 293-8.
- Sinaniotis CA, Sinaniotis AC. Community-acquired pneumonia in children. *Curr Opin Pulm Med*, 2005; 11: 218-25.
- Coiras MT, Pérez-Breña P, García ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol*, 2003; 69: 132-44.
- Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol*, 2004; 42: 1564-9.
- McIntosh K. Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med*, 2002; 346: 429-37.
- World Health Organization. Technical bases for the WHO recommendation on the management of pneumonia in children at first level health facilities. World Health Organization, 1991, Geneva.
- Heiskanen-Kosma T, Korppi M, Jokinen C, Kurki S, Heiskanen L, Juvonen H, et al. Etiology of childhood pneumonia: serologic results of a prospective, population-based study. *Pediatr Infect Dis J*, 1998; 17: 986-91.
- Wubbel L, Muniz L, Ahmed A, Trujillo M, Carubelli C, McCoig C, et al. Etiology and treatment of community-acquired pneumonia in ambulatory children. *Pediatr Infect Dis J*, 1999; 18: 98-104.
- Ceyhan M, Ozsurekci Y, Gürler N, Ozkan S, Sensoy G, Belet N, et al. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes that cause parapneumonic empyema in Turkey. *Clin Vaccine Immunol*, 2013; 20: 972-6.
- Herwaldt LA, Geiss M, Kao C, Pfaller MA. The positive predictive value of isolating coagulase-negative staphylococci from blood cultures. *Clin Infect Dis*, 1996; 22: 14-20.
- Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am*, 2009; 23: 73-98.

17. Seybold U, Reichardt C, Halvosa JS, Blumberg HM. Clonal diversity in episodes with multiple coagulase-negative staphylococcus bloodstream isolates suggesting frequent contamination. *Infection*, 2009; 37: 256-60.
18. Toldos CM, Yague G, Ortiz G, Segovia M. Assessment of multiple coagulase-negative staphylococci isolated in blood cultures using pulsed-field gel electrophoresis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1997; 16: 581-6.
19. Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg GA, et al; New Vaccine Surveillance Network. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. *Pediatrics*, 2004; 113: 1758-64
20. Nascimento-Carvalho CM, Rocha H, Benguigui Y. Effects of socioeconomic status on presentation with acute lower respiratory tract disease in children in Salvador, Northeast Brazil. *Pediatr Pulmonol*, 2002; 33: 244-8.
21. Juvén T, Ruuskanen O, Mertsola J. Symptoms and signs of community-acquired pneumonia in children. *Scand J Prim Health Care*, 2003; 21: 52-6.
22. British Thoracic Society. Guidelines for the management of community-acquired pneumonia in childhood. *Thorax*, 2002; 57: 1-24.
23. Cilla G, Oñate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *J Med Virol*, 2008; 80: 1843-9.
24. Lu MP, Ma LY, Zheng Q, Dong LL, Chen ZM. Clinical characteristics of adenovirus associated lower respiratory tract infection in children. *World J Pediatr*, 2013; 9: 346-9.
25. Samransamruajkit R, Hiranrat T, Chieochansin T, Sritippayawan S, Deerojanawong J, Prapphal N, et al. Prevalence, clinical presentations and complications among hospitalized children with influenza pneumonia. *Jpn J Infect Dis*, 2008; 61: 446-9.
26. Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N, et al. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J*, 2006; 25: 320-4.
27. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, Rollins N. Epidemiology and characteristics of community acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics*, 2004; 113: 701-7.
28. Moulin F, Raymond J, Lorrot M, Marc E, Coste J, Iniguez JL, et al. Procalcitonin in children admitted to hospital with community acquired pneumonia. *Arch Dis Child*, 2001; 84: 332-6.
29. Toikka P, Irjala K, Juven T, Virkki R, Mertsola J, Leinonen M, et al (2000) Serum procalcitonin, C-reactive protein and interleukin-6 for distinguishing bacterial and viral pneumonia in children. *Pediatr Infect Dis J*, 19: 598-602.
30. Don M, Valent F, Korppi M, Canciani M. Differentiation of bacterial and viral community-acquired pneumonia in children. *Pediatr Int*, 2009; 51: 91-6.
31. Isaacs D. Problems in determining the etiology of community acquired childhood pneumonia . *Pediatr Infect Dis J*, 1989; 8: 143-8.
32. Korppi M , Kiekara O , Heiskanen-Kosma T , Soimakallio S . Comparison of radiological findings and microbial aetiology of childhood pneumonia . *Acta Paediatr*, 1993 ; 82: 360-3 .
33. Virkki R, Juven T, Rikalainene H, Svedström E, Mertsola J, Ruuskanen O. Differentiation of bacterial and viral pneumonia in children . *Thorax*, 2002; 57: 438-41.

Genotoxic and cytotoxic effects of formic acid on human lymphocytes in vitro

Formik asidin insan lenfositleri üzerindeki in vitro genotoksik ve sitotoksik etkisi

Pınar AKSU¹, Gökhan NUR², Süleyman GÜL¹, Ayşe ERCİYAS¹,
Zeynep TAYFA¹, Tülay DİKEN ALLAHVERDİ³, Ertuğrul ALLAHVERDİ⁴

ABSTRACT

Objective: Formic acid is an ubiquitous chemical constituent in the environment, being produced by sources as diverse as vegetation, ants, soil, vehicles, biomass burning, and photochemical reactions. The present work is focused on in vitro analysis of cytotoxic and genotoxic effects of formic acid, using cytogenetic tests such as the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) and chromosomal aberration analysis, in human lymphocytes.

Method: This study was carried out using blood samples from healthy, non-smoking adults aged 18-22 years, of whom 10 were male and 6 were female. Different concentrations (0.07, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8 mM) of formic acid was added to the lymphocyte culture test for chromosomal aberration (CA) analysis. Mitomycin-C (0.3 mg/ml) was used as the positive control. Human peripheral blood lymphocyte cells were treated with 20, 40, 60, 80 mM concentrations of formic acid for 48 h. for the CBMN test. Mitomycin-C (0.5 mg/ml) was added to the Lymphocyte culture as a positive control. The present research was carried out to assess the cytotoxic and genotoxic effects of formic acid on human peripheral lymphocytes in vitro using the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN), as well as chromosomal aberration (CA) analysis.

ÖZET

Amaç: Formik asit, bitkiler, arılar, toprak, araçlar, gübre yanması ve fotokimyasal reaksiyonlar gibi çeşitli kaynaklarca üretilen ve çevrede yaygın olarak bulunan kimyasal bir bileşimdir. Mevcut çalışma, insan lenfositlerinde sitokinez-blok mikronükleus tayini ve kromozomal aberasyon analizi gibi sitogenetik testler kullanarak formik asidin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin in vitro analizine odaklanmıştır.

Yöntem: Bu çalışma 18-22 yaş arası 10'u erkek, 6'sı kadın sağlıklı, sigara kullanmayan yetişkinlerinden kan örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Lenfosit kültürüne kromozomal aberasyon (CA) testi için formik asidin farklı konsantrasyonları (0,07, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,8 mM) eklendi. Pozitif kontrol olarak mitomycin-C (0,3 µg/ml) kullanıldı. Sitokinez-blok mikronükleus tayini (CBMN) için, insan periferik kan lenfositleri 20, 40, 60, 80 mM derişimde formik asitle 48 saat işleme tabi tutuldu. Lenfosit kültürüne, pozitif kontrol olarak mitomycin-C (0,50 µg/ml) eklendi. Bu araştırma, sitokinez-blok mikronükleus tayinini (CBMN) ve kromozomal aberasyon (CA) analizini kullanarak in vitro insan periferik lenfositlerinde formik asidin sitotoksik ve genotoksik etkilerini değerlendirmek için yapılmıştır.

¹ Kafkas University, Faculty of Science and Arts, Department of Biology, KARS, TURKEY

² Gaziantep University, Vocational School of Higher Education in Islahiye, Department of Veterinary, GAZİANTEP, TURKEY

³ Kafkas University, Faculty of Medicine, Department of General Surgery, KARS, TURKEY

⁴ Kars State Hospital, Department of Orthopedic and Traumatology, KARS, TURKEY



İletişim / Corresponding Author : Gökhan NUR

Gaziantep University, Vocational School of Higher Education in Islahiye, Department of Veterinary GAZİANTEP, TURKEY

Tel : +90 342 869 03 00

E-posta / E-mail : gokhannur@gantep.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 02.06.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 03.12.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.82621

Aksu P, Nur G, Gül S, Erçiyas A, Tayfa Z, Diken-Allahverdi T, Allahverdi E. Genotoxic and cytotoxic effects of formic acid on human lymphocytes in vitro. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 111-20.

Results: A significant increase was observed for induction of micronucleus frequency in all treatments of formic acid concentrations for 48 h. comparing with the negative control and mitomycin C (MMC, 0.5 µg/ml) which was used as positive control. When compared with negative control and with mitomycin C (MMC, 0.3 µg/ml) which is used as positive control, it is observed that formic acid is rising the frequency of chromosomal aberration significantly at all appliance concentrations in 24 h. The frequency of micronuclei and chromosomal aberrations increased in a dose dependent manner. The results showed that there were significant correlations between formic acid concentration and micronuclei frequency ($r=0.92$), numbers of necrotic cells ($r=0.95$), and apoptotic cells ($r=0.91$).

Conclusion: Our data provided evidence that there is a significant correlation between the concentration of formic acid and the following chromosomal aberrations: frequency of micronuclei, apoptotic cells, and necrotic cells in vitro.

Key Words: Formic acid, human lymphocyte culture, chromosomal aberration, micronucleus, cytotoxicity

Bulgular: Pozitif kontrol olarak kullanılan mitomisin C (MMC, 0,5 µg/ml) ile negatif kontrol karşılaştırıldığında formik asidin tüm dozları mikronükleus frekansını belirgin bir düzeyde arttırdığı gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan mitomisin C (MMC, 0,3 µg/ml)'nin negatif kontrolle karşılaştırıldığında formik asidin 24 saatte tüm uygulama derişimlerinde, kromozomal aberasyonların sıklığını belirgin bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir. Mikronükleus sıklığı ve kromozomal aberasyonlar, doza bağımlı olarak artmıştır. Sonuçlar formik asit konsantrasyonu, mikronükleus frekansı ($r=0,92$), nekrotik hücrelerin sayısı ($r=0,95$) ve apoptotik hücreler ($r=0,91$) arasında anlamlı korelasyonların var olduğunu göstermektedir.

Sonuç: Verilerimiz, in vitro olarak formik asit konsantrasyonu ve mikronükleus frekansı, apoptotik hücreler ile nekrotik hücreler gibi kromozomal aberasyonlar arasında anlamlı bir korelasyon olduğu kanıtını sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Formik asit, insan lenfosit kültürü, kromozomal aberasyon, mikronükleus, sitotoksiste

INTRODUCTION

Formic acid is the smallest member of the family of saturated monocarboxylic acids; it is a colorless liquid with a tangy odor and a density of 1.22 gram/cm³. It dissolves in water, alcohol, and ether at all proportions. It burns when it comes in contact with skin. If it is heated to 160 °C, it decomposes into carbon dioxide and hydrogen. It exists freely in nature in wood tar, nettles, ants, perspiration, urine and bouillon. Formic acid pollutes water and can spread through the air. Methyl alcohol is transformed into formaldehyde and formic acid by the body's metabolism; its toxicity is due to the acidosis resulting from the formic acid. As a result of this acidosis, nerve damage to the retina and, depending upon the degree of severity, blindness and eventually death may occur (1, 2). Most of the formic

acid in tissues is oxidized via a tetrahydrofolic acid-dependent pathway to CO₂ and H₂O, such as in the liver, erythrocytes and kidneys (2). Literature on the carcinogenic and mutagenic effects of formic acid is quite limited. Tests of sister-chromatid exchange (SCE) performed on the typhimurium strains TA100, TA1535, TA97 and TA98 of *Salmonella* did not find it to be mutagenic. However, mutagenicity was reported in a test conducted on induction of sex-linked recessive lethal mutations as well as another study conducted on chromosomal aberrations (3, 4).

The present work is focused on in vitro analysis of cytotoxic and genotoxic effects of formic acid, using cytogenetic tests such as the cytokinesis-block micronucleus assay and chromosomal aberration analysis in human lymphocytes.

MATERIALS and METHODS

This study was carried out using blood samples from healthy, non-smoking adults aged 18-22 years, of whom 10 were male and 6 were female. Donors provided written, informed consent at the time of donation for the use of their blood samples. Heparinized whole blood (0.4 ml) was added to 5 ml chromosome medium (Biochrome). Cultures were incubated at 37 °C for 72 h. Human lymphocytes were then exposed to different concentrations (0.07, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8 mM) of formic acid for 24 h. A positive control (mitomycin-C), 0.3 µg/ml was included in every experiment (5, 6). Lymphocytes were cultured in the dark for 72 h, and metaphases were blocked during the last 2 h with colchicine at final a concentration of 0.06 µg/ml. Cells were collected by centrifuging (377 g, 10 min) and resuspended in a hypotonic KCl solution (0.075 M) for 30 min at 37 °C. At the end of this procedure, cells were centrifuged again and fixed in a cold methanol:acetic acid (3:1) mixture for 35 min at +4 °C. Following this process, cells were treated two times with fixative. Slides were then prepared by dropping concentrated cell suspensions onto the glass, followed by air drying. The air-dried slides were stained for 15-20 minutes with 5% Giemsa stain (pH 6.8) prepared in a Sorensen buffer. One hundred metaphases per culture were analysed for the presence of chromosomal aberrations (CA). The number of CAs was obtained by calculating the percentage of metaphases at each concentration and treatment period that showed structural or numerical chromosome aberrations. Chromatid and chromosome breaks, chromosome exchange and chromatid unions, and polyploid cells were screened at all treatment concentrations (5, 7)

For the micronucleus test in cultured human lymphocytes (CBMN), blood samples were added to 5 ml of chromosome medium (Biochrome). Cell cultures were incubated at 37 °C for 72 h. Cytocalasin-B (6 µg/ml) was added to arrest cytokinesis at 44 h after culture initiation. Human lymphocytes were treated

with different concentrations (20, 40, 60 and 80 mM) of formic acid for the CBMN test. Cells were exposed to the chemical for 48 h and harvested by centrifuging (167 g, 10 min), and then the pellets were resuspended in a hypotonic solution of 0.075 M KCl for 5 min at +4 °C. The cells were centrifuged again and fixed in a cold methanol:acetic acid (3:1) mixture for 15 min. The fixation procedure was administered three times. Formaldehyde (1%) was added to the last fixative to preserve the cytoplasm. Slides were prepared by dropping concentrated cell suspensions onto the glass, followed by air drying. For CBMN analysis, staining was performed using 5% Giemsa (pH = 6.8) prepared in a Sorensen buffer solution for 20-25 min. Slides were then washed in distilled water and dried at room temperature. Positive control (mitomycin-C (MMC), 0.50 µg/ml) was also maintained in the CBMN experiment (8).

Micronuclei were scored in 2000 binucleate lymphocytes for each subject (9). The nuclear division index (NDI) was evaluated using the following formula: $NDI = (M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4))/N$, where M1-M4 indicates the number of cells with 1 to 4 nuclei, and N indicate the total number of cells scored. The NDI of each cytochalasin B-treated culture was determined by screening 2000 interphase cells for the number of nuclei they contained (10).

Apoptotic and necrotic cells were identified with light microscopy according to morphological characteristics of the nucleus. In order to differentiate apoptotic cells from necrotic cells, we checked for the properties of necrotic cells, which exhibit a pale cytoplasm or loss of cytoplasm, numerous vacuoles, and a damaged/irregular nuclear membrane with a partially intact nuclear structure (9). 2000 cells were counted from each sample. The nuclear division cytotoxicity index (NDCI) = $(Ap+Nec + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4))/N$ was evaluated according to Fenech (9), where Ap = the number of apoptotic cells, Nec = the number of necrotic cells, M1-M4 = the number of viable cells with 1-4 nuclei and N = the total number of cells scored.

Statistical analyses of data were done using GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego California USA). Chromosomal aberration frequencies in the cell cultures were analysed using Fisher's exact test. CBMN data were statistically analysed using the F-test for analysis of variance (ANOVA). The significance of differences between the negative control and the series of treatment groups were compared with Dunnett's t-test.

RESULTS

Compared to the other groups, an insignificant number of chromosomal aberrations was found in the metaphases obtained from the blood samples taken from the negative control group where no formic acid was added to the culture (Fig. 1A). Formic acid was administered to parallel cultures at doses of 0.8 mM

and lower (0.07, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8 mM). It was observed that division stopped fully in the culture where the number of metaphases was very low, and as a result the mitotic index was significantly decreased. After a trial was performed, it was determined that an activation period of 24 hours was suitable and that a longer period would prevent mitotic division. It was determined that the chromosomes condensed in the metaphases appeared filose and had a banded appearance (Fig. 1B). It was further observed that inhibition of cell division continued, but chromosomal anomalies in the metaphases were better visualized at an administered dose of 0.5 mM formic acid (Fig. 1C). Banding in chromosomes and chromosome combinations were then observed more clearly. After treatment with 0.4 mM formic acid, it was observed that mitosis was inhibited and that there were breaks in the chromatids and chromosomes in the metaphases (Fig. 1D).

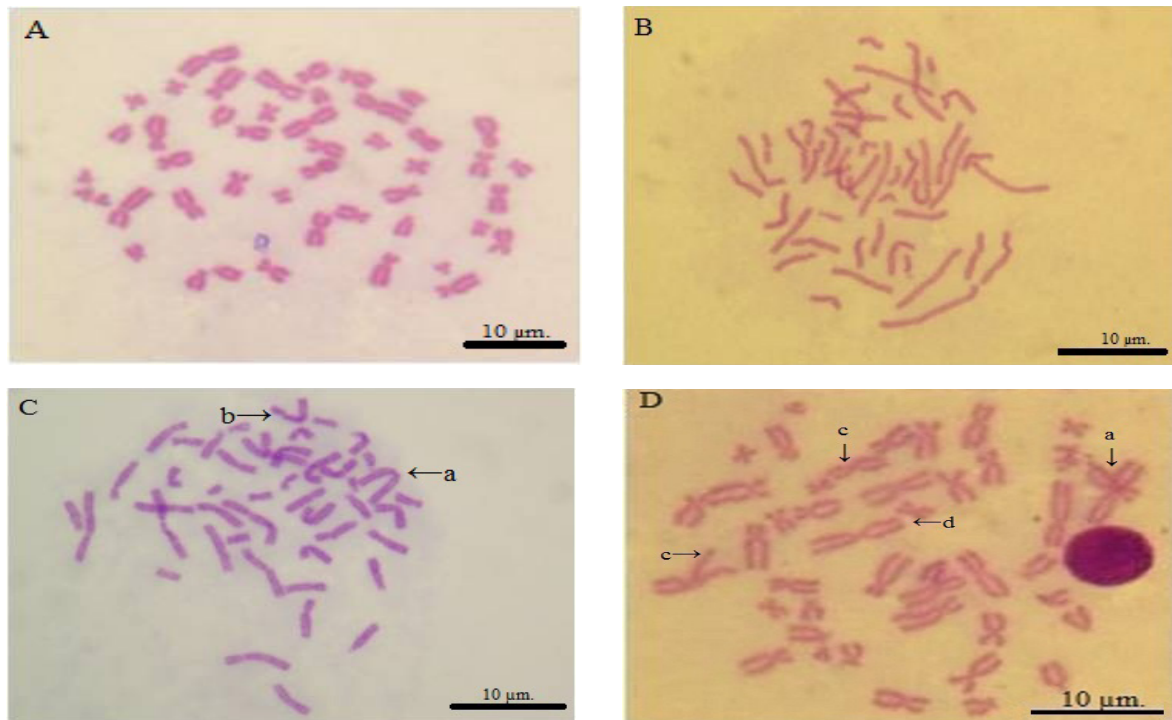


Figure 1. A. Metaphase plaque obtained from a normal individual. B. Metaphase plaque obtained from the culture that was administered 0.8 mM of formic acid. C. Metaphase plaque obtained from the culture that was administered 0.5 mM of formic acid: a. Chromosome combination, b. Chromosome break D. Metaphase plaque obtained from the culture that was administered 0.4 mM of formic acid: a. Chromosome combination, c. Chromatid break, d. Chromatid combination. ($\times 1000$, Bar: 10 μm).

A significant increase in the frequency of chromosomal aberrations was observed in some treatments with formic acid after 24 h, compared to the negative control or treatment with mitomycin C, which was used as a positive control. The results obtained after treatment with 0.07 mM formic acid were in line with the results obtained with the negative control. Polyploidy was observed at some formic acid treatment doses (0.3, 0.4 mM) and after treatment in the positive control (Table1).

Cytokinesis events were prevented by cytochalasin-B, and the frequencies of micronuclei and cell death (apoptosis and necrosis) were examined. Formic acid significantly increased the frequency of micronuclei in a dose dependent manner ($r = 0.92$). The nuclear division index (NDI) was calculated according to the number of nuclei present in the cells. Table 2 demonstrates that the NDI and nuclear division cytotoxicity index (NDCI) were significantly influenced by formic acid.

Table 1. Chromosome anomalies in human peripheral lymphocytes exposed formic acid for 24 hours

Test substance	Treatment		Structural aberrations				Numerical aberrations	Frequency of aberrant cell \pm SEM (%)	Mitotic index \pm SEM (%)
	Period (h)	Doses	ctb	csb	cse	cu	p		
NC	24	1	1	1	-	-	-	0.5 \pm 0.2	4.3 \pm 0.3
MMC (μ g/ml)	24	0.3	19	19	3	7	1	14.5 \pm 3.8*	1.7 \pm 1.2*
Formic acid (mM)	24	0.07	2	2	-	2	-	1.5 \pm 0.5	4.3 \pm 1.2
		0.1	3	3	1	4	-	2.7 \pm 0.6	4.1 \pm 0.8
		0.2	4	4	2	7	-	4.2 \pm 1.0	4.0 \pm 1.0
		0.3	7	7	2	13	1	9.7 \pm 4.5	3.8 \pm 0.9*
		0.4	11	11	1	15	1	9.5 \pm 2.9	3.5 \pm 0.5*
		0.5	12	12	3	18	-	11.3 \pm 3.0*	2.8 \pm 0.8*

ctb: chromatid break, csb: chromosome break, cu: chromatid union, cse: chromosome exchange, nc: negative control (%1 distilled water), MMC: (0.3 μ g/ml mitomycin-C (24 hours), p:polyploidy.

* $p < 0.05$ as compared to control. Fisher's Exact Test.

Table 2. The effects of formic acid on micronucleus frequency, nuclear division index, and nuclear cytotoxic division index in human lymphocytes cultures

	Administration		Number of Cells Counted	Distribution of MN number into Binuclear cells				MN/cell (%) \pm SEM	NDI	NDCI
	Time (s)	Dose		1	2	3	4			
Negative Control	-	-	2000	1	0	0	0	0.002 \pm 0.25	1.981 \pm 0.34	1.981 \pm 0.25
PC (MMC)	48	0.5 μ g/ml	2000	150	16	1	0	0.40 \pm 36.2	1.332 \pm 0.83	1.359 \pm 1.10
Formic acid	48	20 mM	2000	7	1	1	1	0.02 \pm 1.50	1.713 \pm 0.38*	1.731 \pm 0.48
	48	40 mM	2000	7	1	1	2	0.02 \pm 1.40	1.678 \pm 0.55*	1.697 \pm 0.76
	48	60 mM	2000	9	3	2	2	0.04 \pm 1.63	1.626 \pm 0.68*	1.667 \pm 0.47
	48	80 mM	2000	17	2	1	1	0.05 \pm 3.95	1.592 \pm 0.78*	1.625 \pm 0.55

*Significantly different from the negative control $P < 0.05$ (Dunnett's t-test). NDI: Nuclear division index, NDCI: Nuclear cytotoxic division index, SEM: Standard error of the mean.

NDI and NDCI values were lower than in controls. The lowest NDI values were observed in cultures treated with 80 mM formic acid. All doses of formic acid administered increased micronuclei frequency and cell death to a statistically significant degree ($p < 0.05$) compared with the negative control group (Fig. 2A-G). There was a positive correlation between MN frequency, the number of apoptotic cells ($r = 0.91$), and the number of necrotic cells ($r = 0.95$) (Fig. 3A-C).

DISCUSSION

One of the most sensitive methods used to determine the genotoxic risks of mutagens and carcinogenesis is assessing the frequency of chromosome aberration (CA) in peripheral blood lymphocytes (11, 12). Chromosome aberrations occur due to damage at the DNA level. For instance, chromosome breaks may be caused by unrepaired double chain breaks in the DNA, and the emergence of

chromosomes with a new structure may be caused by the false repair of chain breaks in the DNA (13). Due to the fact that the mechanisms by which chromosomal anomalies emergence resemble each another in different tissues, the level of anomalies in lymphocytes is considered to be an indication of the level of anomalies in other tissues that tend to be cancerous; thus it is also an indicator of cancer risk (14, 15). A high frequency of chromosomal aberrations may give an advance indication that there is a high risk of cancer, regardless of the reason that the increase in chromosome anomalies was triggered. Anomalies of both the chromatid type and chromosome type are indicators of cancer risk. However, there is evidence that chromosome anomalies are better determinants than chromatid anomalies (15, 16).

Another type of cytogenetic method used to determine genotoxicity and carcinogenicity is the micronucleus (MN) test (17, 18). According to Bonassi et al. (19), a high MN frequency in

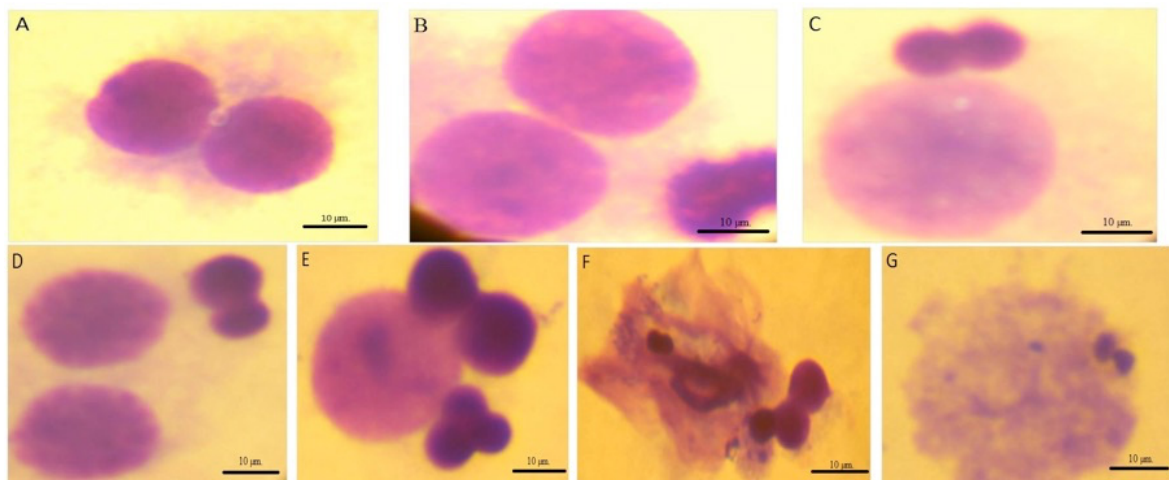


Figure 2. Micronucleus creations lymphocyte culture which was administered different doses of formic acid A. Double nucleus cell in which the normal cytokinesis was inhibited. B. Double nucleus cell containing one micronucleus the cytokinesis of which was inhibited (20 mM formic acid, process of 48 hours). C. Single nucleus cell containing two micronuclei in which the cytokinesis was inhibited (40 mM formic acid, process of 48 hours). D. Double nucleus cell containing two micronuclei in which the cytokinesis was inhibited (60 mM formic acid, process of 48 hours). E. A cell with multi micronuclei in which the cytokinesis was inhibited and which is entering apoptosis (80 mM formic acid, process of 48 hours). F. An apoptotic cell (80 mM formic acid, process of 48 hours). G. Necrotic cell with a pale cytoplasm, many small vacuoles and a cytoplasmic and nuclear membrane with corrupted structure (80 mM formic acid, process of 48 hours). ($\times 1000$, Bar: 10 μm).

peripheral blood lymphocytes indicates a risk of cancer in humans. When the cytokinesis blockage micronucleus method was developed by Fenech and Morley (20), researchers began to examine the MN in cells which have completed nuclear division. MN are the small nuclei found apart from their sister nucleus, created during telophase due to the breaks in non-centric chromosomes or chromatid, and to the backwardness of all chromosomes or chromatides (slow chromosomes) (21). In a study that investigated the cytogenetic effect using the micronucleus, chromosomal aberration and sister

chromatid exchange method, mercuric chloride has been shown to be a clastogenic chemical because of the variety of chromosomal abnormalities and the increase in the number of micronucleated cells (22).

Formic acid is used in carbonated drinks, fruit, vegetables and canned food as a preservative substance. Furthermore, it is commonly employed by honey producers to combat parasitic *Varroa destructor* mites in bee colonies (23). In one of their studies, Morita et al. tested the relationship between the clastogenic activities

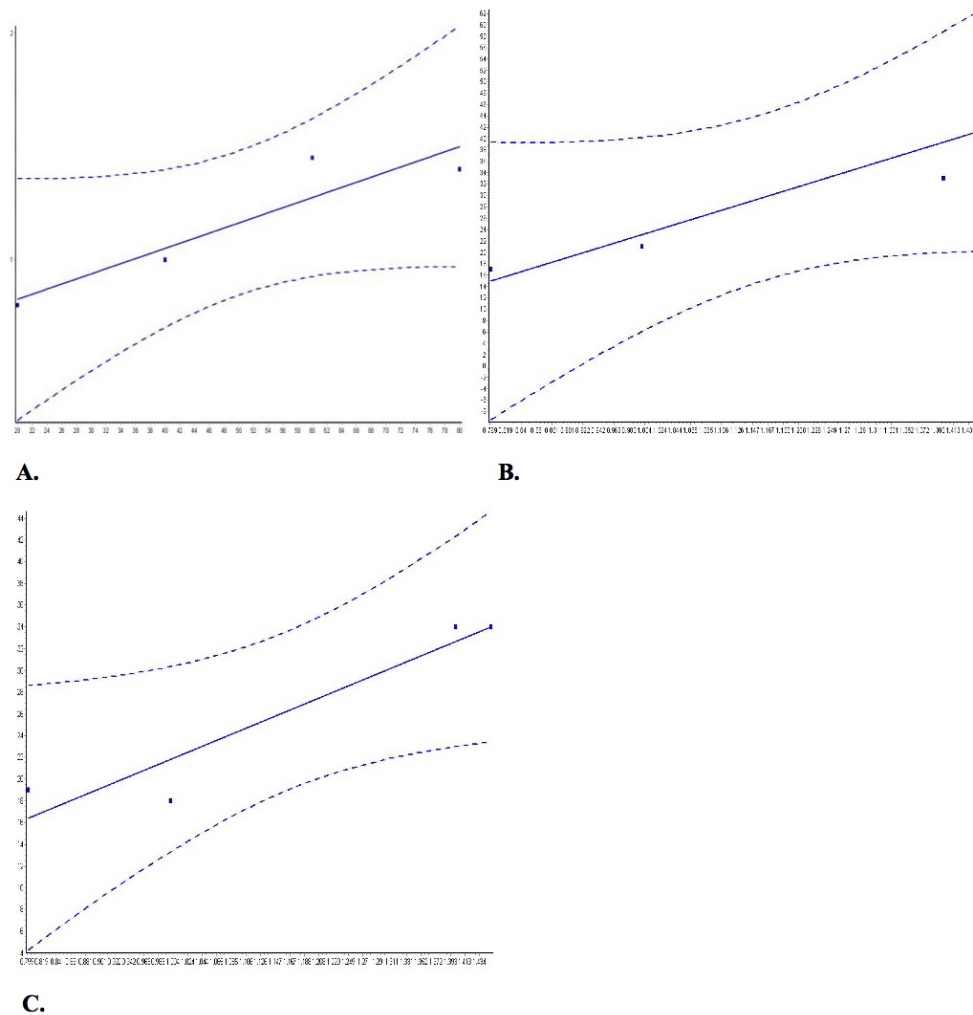


Figure 3. A. Formic acid dose-micronucleus regression charts. B. MN frequency-apoptotic cell regression charts ($r=0.91$, $p<0.05$). C. Micronucleus frequency-necrotic cell regression charts ($r=0.95$, $p<0.05$).

of formic acid and the pH of the medium using Chinese hamster ovary K1 cells. That study reported that acids stimulated chromosomal aberrations in the media with an original pH of 6. It was also determined that 12-16 mM concentrations of this acid exhibited toxicity in the media at pH 5.7 or lower (3). In a study of the inhibitory effect of a mixture of propionic acid and formic acid on *Salmonella pullorum*, it was reported that the mixture of propionic acid-formic acid caused a significant decrease in the number of colonies in the culture compared to the control (24). DNA adductions formed by various chemicals play an important role in cancer initiation. Wang et al. (25) reported that formic acid caused DNA adducts as well as hemoglobin (Hb) adducts in mice.

The frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes is used as a biomarker for chromosome damage (9). The doses that were used in the MN and chromosomal aberration studies were different. The chromosomal aberration treatment dose is typically lower than the MN dose (26-28). However, in some studies the dose producing MN was found to be equal to the dose causing chromosomal aberrations (29, 30). In our study, the dose that caused chromosomal aberrations was found to be lower than that which leads to micronuclei formation.

Conclusion: Our data provide evidence that there is a significant correlation between the concentration of formic acid and the following chromosomal aberrations: frequency of micronuclei, apoptotic cells and necrotic cells in vitro.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was conducted with support from the Kafkas University Scientific and Technological Research Fund (Project No: FEF-26).

Note: This study was previously presented at the 3rd National Veterinary Pharmacology and Toxicology Congress (With International Contribution), 29 September - 2 October 2010, pp.: 88-89, Aydın, Turkey.

CONFLICTS of INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Barceloux DG, Bond GR, Krenzelok EP, Cooper H, Vale JA. American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. *Clin Toxicol*, 2002; 40: 415-46.
2. Boeniger MF. Formate in urine as a biological indicator of formaldehyde exposure-a Review. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1987; 48: 900-8.
3. Morita T, Takeda K, Okumura K. Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1990; 240 (3): 195-202.
4. Tephly TR. The toxicity of methanol. *Life Sci*, 1991; 48 (11): 1031-41.
5. Lazutka JR, Mierasuskiene J, Slapsyte G, Dedonyte V. Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha x piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol*, 2001; 39: 485-92.
6. Roncada T, Vicentini VEP, Mantovani MS. Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and Ara-C in human lymphocytes in vitro. *Toxicol in Vitro*, 2004; 18: 617-22.
7. Yuzbasioglu D, Celik M, Yilmaz S, Unal F, Aksoy H. Clastogenicity of the fungicide a fugan in cultured human lymphocytes. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2006; 604 (1-2): 53-9.
8. Demisia G, Vlastos D, Goumenou M, Matthopoulos DP. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2007; 634: 32-9.
9. Fenech M, Crot J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, 1999; 14: 605-12.
10. Eastmond DA, Tucker JD. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human-lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen*, 1989; 13 (1): 34-43.
11. Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1988; 204: 379-406.
12. Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Hogstedt B, Knudsen L, et al. Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*, 1994; 54 (11): 2919-22.
13. Savage JRK. Update on target theory as administered to chromosomal aberrations. *Environ Mol Mutagen*, 1993; 22: 198-207.
14. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res-Rev Mutat*, 2000; 463: 111-72.
15. Boffetta P, Van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, et al. Chromosomal aberrations and cancer risk: Results of a cohort study from central europe. *Am J Epidemiol*, 2007; 165: 36-43.
16. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Stromberg U, Rossner P, et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res-Fund Mol M*, 2006; 600(1-2): 37-45.
17. Fenech M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 2002; 181-182: 411-6.
18. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. *Environ Mol Mutagen*, 1991; 18 (4): 277-91.
19. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 2007; 28 (3): 625-31.
20. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 1985; 147: 29-36.
21. Surrallés J, Xamena N, Creus A, Marcos R. The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1995; 342: 43-59.

22. Mahboob S, Al-Balwai HFA, Al-Misned F, Ahmad Z. Investigation on the genotoxicity of mercuric chloride to freshwater *Clarias gariepinus*. Pak Vet J, 2014; 34 (1): 100-3.
23. Fries I, Rosenkranz P. Number of reproductive cycles of *Varroa jacobsoni* in honey bee colonies. Exp Appl Acarol, 1996; 20: 103-12.
24. Al-Tarazi YH, Alshawabkeh K. Effect of dietary formic and propionic acids on *Salmonella pullorum* shedding and mortality in layer chicks after experimental infection. J Vet Med Infect Dis Vet Public Health, 2003; 50: 112-7.
25. Wang HF, Xu LH, Sun HF, Xue B, Liu YF, Peng S, et al. High binding of formic acid to biomacromolecules in mice. Nucl Instrum Meth B, 2004; 223: 745-9.
26. Celikler S, Yildiz G, Vatan O, Bilaloglu R. In vitro antigenotoxicity of *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyceae) extract against induction of chromosome aberration, sister chromatid exchange and micronuclei by mutagenic agent MMC. Biomed Environ Sci, 2008; 21: 492-8.
27. Ogura H, Takeuchi T, Morimoto K. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. Mut Res-Rev Gen Toxicol, 1996; 340: 175-82.
28. Panneerselvam N, Sinha S, Shanmugam G. Genotoxicity of the herbicide fluchloralin on human lymphocytes in vitro: chromosomal aberration and micronucleus tests. Mutation Research/Genetic Toxicology, 1995; 344: 69-72.
29. Anwar WA, Khalil MM, Wild CP. Micronuclei, chromosomal-aberrations and aflatoxin-albumin adducts in experimental-animals after exposure to aflatoxin B-1. Mut Res/Gen Toxicol, 1994; 322: 61-7.
30. Buyukleyla M, Rencuzogullari E. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. Ecotox Environ Safe, 2009; 72: 943-7.

Sinop İlindeki hamsi ve zargana balıklarından *Vibrio* spp. izolasyonu ve karakterizasyonu

Isolation and characterization of *Vibrio* spp. from anchovy and garfish in the Sinop province

Cumhur AVŞAR¹, İsmet BERBER¹, Ahmet Kenan YILDIRIM¹

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Sinop ilindeki balıkçılardan temin edilen hamsi ve zargana balık örneklerinden izole edilen *Vibrio* türlerinin karakterizasyonu ile bu izolatların antibiyotik dirençlilikleri, plazmid DNA ve SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezis) toplam hücre protein profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Balık örnekleri taze olarak alınmış, buz üzerinde korunarak laboratuvara getirilmiş ve hemen analize alınmıştır. Balık örnekleri 25 g tartılarak zenginleştirme amacıyla %3 NaCl içeren steril alkali peptonlu su (225 mL) besiyerine ilave edilmiş ve 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası Tiyosülfat Sitrat Safra Sükroz (TCBS) agar besiyerinde gelişen sarı, yeşil veya mavi-yeşil koloniler Tripton Soya Agar (TSA) besiyerine ekilmiş ve izolatların daha sonraki tanımlaması için bir gece süreyle inkübe edilmiştir. İzolatlar morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere göre tanımlanmıştır. Bunlara ek olarak izolatların yedi farklı antibiyotiğe karşı dirençliliği disk-difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca, izolatların SDS-PAGE hücresel protein ve plazmid DNA profilleri de çıkarılmıştır.

Bulgular: Toplam 44 adet balık örneği *Vibrio* türlerinin belirlenmesine yönelik çalışılmış ve morfolojik, biyokimyasal özellikleri yönünden incelenmiştir. İnceleme sonucunda; 12 adet *Vibrio* spp. belirlenmiştir.

ABSTRACT

Objective: In this study it was aimed to characterize the *Vibrio* species isolated from anchovy and garfish samples obtained from fishermen and to determine the antibiotic resistances, plasmid DNA and SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) whole cell protein profiles of these isolates.

Method: The fish samples were taken as fresh, kept in ice during transport to the laboratory and immediately taken for analysis. The fish samples weighed as 25 grams were added into 225 mL of sterile alkaline peptone water supplemented with 3% NaCl broth for enrichment purpose and incubated at 37 °C for 18 to 24 hours. After incubation, yellow, green or blue-green colonies growing on Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) agar were subcultured on Triptone Soya Agar (TSA) and incubated overnight for further identification of the isolates. The isolates were identified according to morphological, physiological and biochemical tests. Moreover, the resistances against seven different antibiotics of isolates were determined by disk-diffusion method. In addition, the SDS-PAGE cell protein and plasmid DNA profiles of isolates were determined.

Results: Totally 44 fish samples were tested for determining *Vibrio* species and were analyzed according to their morphological, biochemical

* Bu çalışma; 6. Ekoloji Sempozyumu'nda (6-9 Mayıs 2015, Sinop-TÜRKİYE) poster bildiri olarak sunulmuştur.

¹ Sinop Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, SİNOP



İletişim / Corresponding Author : Cumhur AVŞAR

Sinop Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, SİNOP

Tel : +90 538 453 36 39

E-posta / E-mail : cumhur.avsar@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 24.08.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 04.01.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.58815

Avşar C, Berber İ, Yıldırım AK. Sinop İlinde ki hamsi ve zargana balıklarından *Vibrio* spp. izolasyonu ve karakterizasyonu. Türk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 121-30.

izolatların, seftazidime %66,6, gentamisine %25, tetrasikline %16,6, seftriazona %91,6, amikasine %16,6, ofloksine %25 ve penisilin G'ye %58,3 oranında antibiyotik dirençlikleri saptanmıştır. Ayrıca, test edilen izolatların MARI (Çoklu Antibiyotik Dirençlilik İndeks) değeri 0,41 oranında bulunmuştur. *Vibrio* spp. izolatlarının SDS-PAGE toplam hücre protein profillerine göre oluşturulan nümerik analiz %80 ve üzerinde benzerlik seviyesinde iki temel küme oluşturmuştur. *Vibrio* spp. izolatların tümünde 1-4 plazmid DNA (1590 - 27000 bp aralığında) tespit edilmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, balıklar yakalandıktan sonra yeterince dondurularak, pişirilerek ve uygun şartlarda depolanarak; ayrıca paketlenme esnasında çapraz bulaşlara engel olunarak mikrobiyal enfeksiyonların önlenilebileceğini söylemek mümkündür. Ayrıca, bakterilerden dolayı kıyı sularında meydana gelen bulaşlar, deniz suyu kaynaklarının kalitesinde düşümlere ve bu yolla da insan sağlığında riske ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Çalışmamız, sağlık için potansiyel risk olabilen ve balıklardan izole edilebilen, antibiyotiklere dirençli *Vibrio* spp. suşlarının varlığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Vibrio*, balık, SDS-PAGE, plazmid, antibiyogram

properties. At the end of the analysis; 12 *Vibrio* species were determined. The isolates were resistant against to ceftazidime 66.6%, gentamisine 25%, tetracycline 16.6%, ceftriaxone 91.6%, amikacine 16.6%, ofloxacin 25% and penicillin G 58.3%. In addition, The MARI (Multiple Antibiotic Resistance Index) values of tested strains were found at the rate of 0.41. The numerical analysis of SDS-PAGE whole-cell protein profiles of *Vibrio* spp. isolates revealed two major clusters at similarity levels of 80% and above. The 1-4 plasmide (range 1590 - 27000 bp) in all of the isolates were determined.

Conclusion: As a result, it is possible to say that microbial infections can be prevented by adequate freezing and cooking, proper storage and processing after harvesting and avoidance of cross-contamination during fish handling. In addition, the coastal contamination due to bacteria leads to decline in the quality of seawater resources and so leads to risks to human health and economic losses. Furthermore, our study indicated that the presence of antibiotic resistant *Vibrio* spp. strains isolated from fishes might be potential risk for health.

Key Words: *Vibrio*, fish, SDS-PAGE, plasmide, antibiogram

GİRİŞ

Bakteriler; toprak, hava, su, hayvan ve bitki yüzeylerinde bulunurlar. Bazıları hastalık etkeni olmakla beraber çoğu zararsız ve organik atıkların geri dönüşümü sırasındaki yararlı etkileri ve birçok faydalı ürünü üretmeleri nedeniyle biyoteknolojide oldukça önemli bir yere sahiptirler. *Vibrio* cinsi; virgül veya kıvrık şekilli, Gram negatif, kamçılı, endospor oluşturmayan, kapsülsüz, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur. Vejetatif formlar, tek başına veya koloni şeklinde görülürler (1). Bu cinsin hücre büyüklüğü yaklaşık 1-4 µ boyunda ve 0,3-0,6 µ enindedir. Genellikle 22 °C ile 40 °C arası ideal büyüme sıcaklıklarıdır. Bu cinsin

üyeleri, karbon ve azot kaynağı olarak mineral tuzları ve asparajin içeren besi-yerlerinde gelişme gösterirler (2). *Vibrio* türlerinin spor ve kapsülü olmadığından yeryüzünde farklı çevrelerde dağılım göstermemektedirler. *Vibrio* cinsinin asıl habitatu tatlı su, asidik su, tuzlu su ve bu sularda yaşayan organizmalardır (3). *Vibrio* türleri neredeyse tüm antimikrobiyal ilaçlara karşı yüksek duyarlılığa sahip olarak nitelendirilmişlerdir. Son on yıldır; insan, tarım alanı ve su ürünleri yetiştiriciliği aracılığıyla antimikrobiallerin aşırı kullanılmasından dolayı çoğu bakteri cinsinde antibiyotik dirençliliği ortaya çıkmış ve zamanla değişim göstermiştir (4).

Bu bakteri türleri, insanlarda ve hayvanlarda zorunlupatojen veya fırsatçı enfeksiyon etkenidirler (5). Bulaş olmuş içme suyu ve gıdalarla bulaşan ve şiddetli diyarenin etkeni olan *Vibrio cholerae*'da bu grubun üyesidir. Ayrıca *V. parahaemolyticus* ve *V. fluvialis*, akut gastroenteritin sebepleridir. Bunların dışında, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, ve *V. damsela*; yara enfeksiyonları, septisemi, menenjit gibi ekstraintestinal enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. Yapılan araştırmalar, *Vibrio* spp. ile meydana gelen yara enfeksiyonlarının sebebinin, hastaların tuzlu ve hafif tuzlu su ile temas ettiğinde oluştuğunu göstermiştir (6). İnsanlarda genellikle barsak hastalığı bulaşı; su, kabuklu deniz hayvanları veya diğer deniz ürünlerinin tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (7).

Sinop İlinde yıl boyunca balık; turizme açık bir yer olması nedeniyle yazın ayrıca midye çok tüketilmektedir. Şehir merkezinin yarım ada şeklinde denize kıyısının olması nedeniyle atıkların direkt denize ulaştığı ve su ürünlerinin mikrobiyal kirliliğe maruz kaldığı bilinmektedir. Tüm bu durumlar göz önüne alınarak bu çalışmada, Sinop İli'nde satışa sunulan hamsi ve zargana balık örneklerinden; *Vibrio* spp. biyokimyasal testlerle karakterize edilmesi, toplam hücre protein profillerinin SDS-PAGE ile karşılaştırılması, antibiyotik dirençliliklerinin tespit edilmesi ve ayrıca plazmid DNA profillerinin çıkarılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Sinop ilinde gün içinde avlanan hamsi ve zargana balıkları Eylül 2014 - Ocak 2015 tarihleri arasında satıcılardan alınmış ve buz içerisinde laboratuvara getirilmiştir.

Bu çalışma, Sinop Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler-Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Laboratuvara getirilen toplam 44 balık örneğinin iç organları atılarak geriye kalan kısımları 25 gram olacak şekilde ayarlanmıştır.

Bakterilerin izolasyonu

Balık örneklerini zenginleştirme amacıyla %3 NaCl içeren alkali peptonlu sıvı (225 mL) besiyerine ilave edilmiş ve stomacherde homojenize edilerek 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası zenginleştirme besiyerinden TCBS Agar besiyerine çizme ekim yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda TCBS agar besiyerinde gelişen 2-3 mm çapında, yuvarlak, sarı, yeşil veya mavi-yeşil renkli koloniler şüpheli koloni olarak değerlendirilmiştir (2). Gram boyama sonrasında Gram negatif, düz veya kıvrık çomak şeklinde görülen kolonilere oksidaz testi yapılmış ve oksidaz pozitif sonuç veren şüpheli kolonilerden TSA besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası bu koloniler indol, Voges-Proskauer (VP), jelatinaz aktivite, sitrat, nitrat, üre, karbonhidrat fermentasyon testi ve %6 NaCl'de gelişebilmeleri incelenmiştir. TSA'dan alınan koloniden üç şekerli demir (Triple Sugar Iron-TSI) agar besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda biyokimyasal test sonuçları, laktoz, sükröz ve glikoz fermentasyonu, gaz ve hidrojen sülfür (H₂S) oluşumu değerlendirilmiştir (8).

Antibiyogram testi

İzolatların antibiyotik dirençlilik testleri disk difüzyon tekniğine göre yapılmıştır (9). Taze kültürlerden 5 mL Mueller-Hinton Broth (MHB) besiyerinde 35 ± 2 °C'de 18 saat geliştirilmiştir. Gelişen kültürlerden 0,5 McFarland skalası esas alınarak yaklaşık olarak 1-2 x 10⁸ kob/mL bakteri stok solüsyonları hazırlanmış ve Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerine 100 µL ekimleri yapılmıştır. Ekim sonrası penisilin (P- 10µg), gentamisin (Gen- 10 µg), seftazidim (Caz- 30 µg), tetrasiklin (Te- 30 µg), seftriazone (Cro- 30 µg), amikasin (Ak- 30 µg) ve ofloksasin (Ofx- 5 µg) antibiyotik

diskleri besiyerlerine yerleştirilmiş ve 18 saat 35 ± 2 °C'de geliştirildikten sonra oluşan inhibisyon zonları milimetrik olarak ölçülmüştür. Zon çapları değerlendirmesinde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI) (10) tarafından Enterobacteriaceae grubu için belirtilen standartlar kullanılmıştır. Ayrıca izolatların test edilen antibiyotiklere karşı çoklu antibiyotik dirençlilik indeksleri (MARI) aşağıda gösterilmiş olan ve Sarter ve ark. (11) tarafından belirtilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$MARI = A / (B \times C)$$

A= Antibiyotiğe dirençli olanların toplam sayısı;

B= Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin toplam sayısı;

C= Test edilen izolatların toplam sayısı.

Toplam hücre proteinlerinin belirlenmesi

Toplam hücre proteinlerin ekstraksiyonu için Laemmli (12)'nin SDS-PAGE yönteminde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Aktifleştirilen *Vibrio* spp. izolatlarından beşer mL TSB besiyerine ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen kültürler 12 000 rpm'de 5 dk santrifüj (Hanil Science Industrial, HM-150 IV, Japan) edilmiş ve üst sıvı kısmı atılarak pelet üzerine 100 µL serum fizyolojik ilave edilerek üç kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası kalan pelet üzerine 20 µL örnek tamponu ilave edilmiş ve 80 °C'de 5 dk kaynatılarak çözümlü proteinler ekstrakte edilmiştir. Örnekler elektroforez yapıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Bakteri kültürlerinden ekstrakte edilen toplam hücre proteinleri, 1 mm kalınlığında dikey elektroforez tankında (Hofer SE400, USA) %4'lük toplayıcı jel boyunca 20 mA ile %10'luk ayırıcı jelde 30 mA'lık sabit akım uygulanmış ve comassie brillant mavi (R-250) boyası ile boyanarak belirlenmiştir. Yürütme işlemi toplayıcı ve ayırıcı jel proteinlerin

molekül ağırlıkları, marker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas, SM0661) kullanılarak hesaplanmıştır.

Plazmid DNA izolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu Sambrook ve ark. (13)'ünün yönteminde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Aktif *Vibrio* spp. kültürleri 10 000 rpm'de ve 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı kısmı atılarak pelet içerisinde 100 µL soğuk çözelti I (50 mM glikoz, 25 mM Tris-HCL - pH 8,0, 10 mM EDTA - pH 8,0) ile sulandırılıp karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra üzerine 200 µL çözelti II (%1 SDS, 0,2 N NaOH) ilave edilerek tüp birkaç defa alt üst edilerek ve iyice karışması sağlandıktan sonra 15 dk buzda bekletilmiştir. Süre bitiminde 10 000 rpm'de, 7 dk santrifüj işlemi yapılmış ve üst sıvı kısmı alınarak fenol: kloroform (1:1) eklenerek karıştırma işlemi yapılmıştır. Bu işlem, plazmid DNA'nın protein kalıntılarında arınması için iki kez yapılmıştır. 10 000 rpm'de, 5 dk santrifüj işlemi sonrası üst sıvı kısım üzerine iki katı kadar soğuk saf etil alkol ekleyerek buz içerisinde 15 dk bekletilmiştir. Süre bitiminden sonra 10 000 rpm'de, 10 dk santrifüj işlemi yapılmış ve pelet üzerindeki alkol tamamen uçurulduktan sonra %70'lik soğuk etil alkol ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra alkolün tamamen uzaklaşması sağlanmış ve 50 µL Tris-EDTA (TE) tamponu içerisinde çözülmüş ve analize kadar -20 °C'de saklanmıştır.

İzole edilen plazmid örneklerin agaroz jel elektroforezi için %0,7'lik agaroz jeli (1X TBE (Tris Borat EDTA) tamponunda 5 µL etidyum bromid eklenerek hazırlanmıştır. Plazmid örnekleri agaroz jel kuyucuklarına konulduktan sonra jel elektroforez cihazında (Thermo Scientific-MS1509112955, UK) yürütme tamponu ile 80 voltluk sabit akımda ve yaklaşık 2,5-3 saat süre ile yürütme işlemi yapılmıştır. Yürütme işleminin bitiminde, jellerin fotoğrafları UV transillüminatörde (Cleaver-MicroDOC, UK) çekilmiştir.

Veri Analizi

Protein profillerinin istatistiksel analizinde; jeller, yüksek çözünürlükle bir tarayıcı (HP Scanjet, G2410) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Ayrıca, plazmid DNA örneklerinin yürütüldüğü jellerin fotoğrafları UV transillüminatör (Cleaver-MicroDOC, UK) altında çekilip diğer işlemler için bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Her bir bandın molekül ağırlığı Total Lab 1D Manual R11.1, UK programı kullanılarak hesaplanmış ve jel görüntüleri programa yüklendikten sonra bantlar piksel pozisyonlarına göre belirlenmiştir.

Küme analizi için veriler Phoretix 1D-Pro (Totalab, UK) programı kullanarak Jaccard'ın benzerlik katsayısı temeline dayanan unweighted pair-group metod using aricmetic averages (UPGMA) metoduyla hesaplanarak dendrogram oluşturulmuştur.

BULGULAR

Çalışmamızda, Sinop ilindeki balık satıcılarından bir kg olacak şekilde alınan toplam 44 adet hamsi ve zargana balık örneklerinden *Vibrio* spp. taraması yapılmış ve toplam 12 örnekte izolasyon gerçekleştirilmiştir. Bakteri izole edilen balık örnekleri, toplandıkları zaman ve bakteri izolatlarına ait numara ve sembolleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

İzolasyonu yapılan ve olası *Vibrio* spp. izolatlarının doğrulamalarının yapılabilmesi için morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanmıştır (Tablo 2). İzolatların tümünün katalaz, oksidaz, nitrat kullanımı, jelatinaz aktivite, sitrat ve %6 NaCl'de gelişebilme testlerinin pozitif olduğu saptanmıştır. İzolatların %58,3'ü için indol pozitif, tümü için ise üreaz, H₂S ve Voges-Proskauer testlerinin negatif oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca tüm izolatlar, glikozu fermente ederken, sakkarozu %66,6'sının, laktozu

%75'inin, mannozu %33,3'ünün ve arabinozu ise %25'inin kullanabildiği görülmüştür (Tablo 2).

Tablo 1. *Vibrio* spp. izolatlarının numaraları/sembolleri izole edildikleri balık isimleri ve balıkların temin edildikleri tarihler

<i>Vibrio</i> spp. İzolat Numarası	<i>Vibrio</i> spp. İzole Edilen Balık Sembolü	<i>Vibrio</i> spp. İzole Edilen Balık İsmi	Balık Örneklerin Alınma Tarihi
1	Z1	Zargana	14 Eylül 2014
2	Z2	Zargana	17 Eylül 2014
3	Z3	Zargana	4 Ekim 2014
4	Z4	Zargana	16 Ekim 2014
5	Z5	Zargana	26 Ekim 2014
6	Z6	Zargana	28 Ekim 2014
7	H1	Hamsi	21 Kasım 2014
8	H2	Hamsi	27 Kasım 2014
9	H3	Hamsi	6 Aralık 2014
10	H4	Hamsi	11 Aralık 2014
11	H5	Hamsi	28 Aralık 2014
12	H6	Hamsi	4 Ocak 2015

Yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre izolatların; seftazidime %66,6, gentamisine %25, tetrasikline %16,6, seftiazona %91,6, amikasine %16,6, ofloksine %25 ve penisilin G'ye %58,3 oranında direnç gösterdikleri saptanmıştır (Tablo 3). Ayrıca belirtilen kriterlere göre MARI değeri 0,2'den yüksek ise; aşırı antibiyotik vb. ilaçların kullanıldığı (yüksek risk) çevrelerden köken alan bakteriyel suşları, değerin 0,2'ye eşit veya daha düşük olması ilaç kullanımının nadir olduğu (düşük risk) çevresel örneklerden köken alan suşları göstermektedir. Çalışmamızda, MARI değeri 0,41 olarak yüksek risk sınıfında bulunmuştur.

Plazmid profiline göre tüm izolatlarda 1-4 plazmid (1.590-27.000 bp aralığında) görülmüştür. İzolatların tümünde 19.400 bp'lik plazmid bulunmakta olup bu durum plazmid profillerine göre izolatlar arasında yüksek benzerlik olduğunu göstermiştir (Şekil 1).

Tablo 2. *Vibrio* spp. izolatlarının numaraları/sembolleri, izole edildikleri balık isimleri ve balıkların temin edildiği tarihler

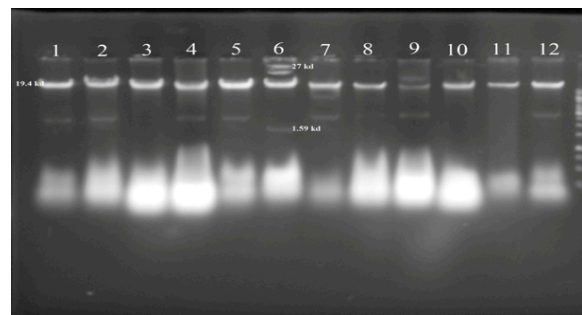
İzolat	Gram boyama	Hareket	Katalaz	Oksidaz	İndol	Üreaz	Nitrat kullanımı	H ₂ S	VP testi	%6 NaCl gelişebilme	Jelatinaz aktivite	Sitrat	Glikoz	Sakkaroz	Laktöz	Mannoz	Arabinoz
Z1	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Z2	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Z3	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Z4	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Z5	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Z6	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
H1	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
H2	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
H3	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
H4	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
H5	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
H6	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

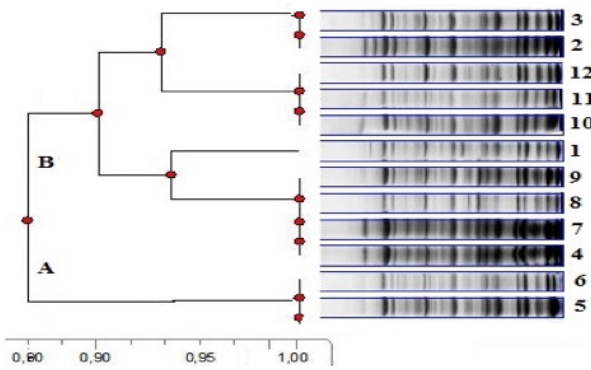
Tablo 3. *Vibrio* spp. izolatlarının antibiyogram sonuçları

İzolat		Antibiyotik Diskler ve Zon Çaplarına (mm) göre Direnç Profilleri						
		P 10	Cro 30	Ak 30	Oft 5	Te 30	Gen 10	Caz 30
1	Z1	R	R	S	S	S	S	S
2	Z2	S	R	S	I	I	S	R
3	Z3	R	R	S	R	S	S	R
4	Z4	S	R	S	S	R	S	I
5	Z5	S	R	R	S	S	R	R
6	Z6	R	R	I	S	S	R	I
7	H1	S	S	R	R	I	S	R
8	H2	R	R	S	R	R	S	R
9	H3	R	R	S	S	I	S	R
10	H4	R	R	S	S	S	S	R
11	H5	S	R	I	I	I	S	R
12	H6	R	R	S	S	S	S	S

R: Dirençli; S: Duyarlı; I: Orta derecede dirençli

Ayrıca, izolatlar ait toplam hücre protein profillerine dayalı oluşturulan dendrograma göre %80 ve üzerinde iki gruba (A ve B) ayrıldığı, A grubunda 5 ve 6 numaralı zargana balık örneklerinden izole edilen suşların olduğu, B grubunun ise kendi içerisinde %91 ve üzerinde benzerlik gösterdiği görülmüş ve bu gruba göre zargana ve hamsi balık örneklerinden izole edilen suşların birbirlerine yüksek oranda benzer oldukları tespit edilmiştir (Şekil 2).

Şekil 1. *Vibrio* spp. izolatlarına ait plazmit DNA görünümü



Şekil 2. *Vibrio* spp. izolatlarına ait SDS-PAGE toplam hücre protein profil dendrogramı

TARTIŞMA

Deniz ve nehir ağız ortamlarında yaşayan *Vibrio* türleri (özellikle *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* ve *V. cholerae*) gastrointestinal hastalıklar ve bazı durumlarda septisemi nedenidirler. Sebep oldukları enfeksiyonlar ise önemli seviyelerde bakteri içeren kabuklu deniz ürünleri veya diğer deniz mahsullerinin uygunsuz işlenmesi, yetersiz pişirilmesi veya çiğ tüketilmesi ile artmaktadır (14).

Amos (15); *Vibrio* cinsi bakterilerde spor ve kapsül bulunmadığından dolayı farklı çevrelere yayılış gösteremediğini, bunun için habitatlarının sucul ortam olduğundan deniz ürünlerinde sıkça bulunduğunu belirtmiştir. Hâstein ve ark. (16) yapmış oldukları çalışmalarında ise *Vibrio* türlerinin sucul çevrelerde yaygın olarak bulunduğunu rapor etmişlerdir. Morris (17); epidemik *V. cholerae* suşlarının çevresel kaynaklardan insanlara ve deniz ürünlerine bulaştığını, *V. vulnificus* ve *V. parahaemolyticus* dâhil diğer *Vibrio* türleri ile *V. cholerae*'nin epidemik olmayan suşlarının deniz ürünlerinin çiğ ya da az pişmiş olarak tüketilmesi ile insanlarda enfeksiyonlara neden olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, Japonya'da gıda yolu ile bulaşan hastalıkların en az %25'inin bu bakteriden kaynaklandığı, Hindistan'da ise ishali hastaların %3,5 ile %23,9'undan bu etkenin izole edildiği

bildirilmiştir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (18), *Vibrio* türlerinin çoğunun gıda kaynaklı olduğunu, sucul ortamlarda yaşayıp ancak kirlenmiş su kaynakları aracılığıyla yayılabildiğini ve bu bakterilerin çoğunun hayatta kalabilmek için sıcak iklimlerde yayılış gösterdiğini bildirmiştir. Korun (19); ülkemizde kültür balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerde özellikle levrek ve son zamanlarda gökkuşacağı alabalığı işletmelerinde ciddi ekonomik kayıpların olduğunu ve bu kayıpların bakteriyel hastalıklara (*Vibriosis*, *yersiniozis*, *furunkulozis* ve bakteriyel hemorajik septisemi) benzer semptomlar meydana getirdiğini vurgulamıştır. Aydın ve Soyutemiz (20) yaptıkları çalışmada; Bursa ilindeki satıcılardan topladıkları balık örneklerinde *V. parahaemolyticus* taraması yapmışlar ve hiçbir örnekte busu rastlamadıklarını bildirmişlerdir. İnal ve ark. (21); 299 deniz balığında *V. parahaemolyticus* taraması yapmışlar ve sadece bir örnekte tespit etmişlerdir. İnal ve ark. (22)'nin yaptıkları başka bir çalışmada ise Samsun-Sinop arasındaki kıyıda avlanan 53 balık örneğinde *V. parahaemolyticus* için 37 pozitif sonuç elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Manjusta ve ark. (23); farklı ortamlardan izole ettikleri *Vibrio* spp. izolatlarının 22 farklı antibiyotik ile çoklu antibiyotik dirençliliğini çalışmışlar ve 119 *Vibrio* izolatının %16,8'inin tüm antibiyotiklere duyarlı olduğunu, %30,3'ünün üç antibiyotiğe, %55,5'inin dört ile on antibiyotiğe, %14,14'ünün on antibiyotikten fazlasına dirençli olduğunu tüm izolatlardan %54'ünün çoklu antibiyotik direnci gösterdiğini saptamışlardır. Rojas ve ark. (24); istiridye ve midye örneklerinden izole ettikleri 19 *V. parahaemolyticus* suşunun içerisinde altı suşun en az iki antibiyotiğe dirençli olduğunu, ayrıca tüm suşların imipenem, nalidiksik asit ve seftazidime duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Marhual ve ark. (25); deniz ürünlerinden izole ettikleri altı *Vibrio* spp. suşunun (üç adet *V. alginolyticus* ve üç adet *V. parahaemolyticus*),

birden fazla antibiyotiğe dirençli olduklarını ve bir ile üç arasında plazmid DNA içerdiklerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmalara paralel olarak elde ettiğimiz çalışmamızın sonuçlarında da izole edilen 12 *Vibrio* spp. suşunun iki veya beş antibiyotiğe karşı çoklu direnç gösterdikleri ve bir ile dört plazmid DNA'ya sahip oldukları görülmüştür. *Vibrio* spp. izolatlarının test edilen antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençli olduğu tespit edilmiş ve bu durumda antibiyotik ve bazı diğer ilaç kalıntıları ile bulaşı su kaynaklarından dolayı olabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmamızda elde edilen 0,41 MARI değeri, bu durumu desteklemektedir.

Yoon ve ark. (26); 13 adet *Vibrio* türünün toplam hücre protein profiline göre tanımlanması üzerine yaptıkları çalışmada, türlerin kendi aralarında ayrımlarında %56 ve üzerinde benzerlik sağladığını böylece bu tekniğin *Vibrio* türlerini ayırmada tür altı düzeyde de hızlı, basit ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir. Benediktsdottir ve ark. (27); hastalıklı balık örneklerinden izole ettikleri 25 *V. viscosus* ve 23 *V. wodanis* suşlarının toplam hücre proteinlerinin benzerliklerine SDS-PAGE yöntemi ile incelemişler ve sırasıyla %92,8 ile %88,3 ve üzerinde benzerlik gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre 12 *Vibrio* spp. izolatının kendi aralarında %80 ve üzerinde benzerliğe sahip olduğu ve bu çalışmalarla paralellik gösterdiği görülmüştür.

Çalışmamızda; *Vibrio* türlerinin diğer patojenik mikroorganizmalara nazaran tuzlu sularda ve bu sularda yetişen organizmalarda bulunması, bu ortamlara uyumlu olması ve ayrıca Sinop ilinde hem deniz suyunun rekreasyonel amaçlarla kullanılması hem de su mahsullerinin çok fazla tüketilmesi bu bakterinin oluşturabileceği olası enfeksiyonları arttırması sonucunu çıkarabiliriz. Ayrıca, deniz ürünlerini tüketmeden önce iyi derecede pişirilmesi gerektiğini söyleyebiliriz.

Balık örneklerinde *Vibrio* türlerinin tespitinde kullanılan SDS-PAGE yöntemi ile toplam hücre protein profillerinin tür düzeyinde ayırımında hızlı, güvenilir ve basit bir teknik olduğunu, buna rağmen tür altı ayırmada yetersiz kaldığı ve bunun için moleküler tekniklerin kullanılması gerektiğini önerebiliriz.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre plazmid DNA profilleri ve çoklu antibiyotik dirençliliği arasında bir korelasyon bulunmamıştır. Tek bir plazmid DNA'ya sahip izolatlarda (3 ve 10 numaralı izolatlar) ikiden fazla antibiyotiğe dirençlilik saptanmıştır. Ayrıca antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı sonucu, denize atık olarak bırakılmasının insan sağlığına etkilerini göz önünde bulundurarak bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin arttığını ve bu durumla mücadele amaçlı sadece uygun antibiyotiklerin kullanılması ile çevreye bilinçsizce bırakılan ilaç türevi maddelerin önüne geçilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999.
2. Uchiyama H. Distribution of *Vibrio* species isolated from aquatic environments with TCBS agar. Environ Health Preven Med, 2000; 4 (4): 199-204.
3. Boe B, Gjerde J. Fatty acid patterns in the classification of some representatives of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. J Gen Microbiol, 1980; 116 (1): 41-9.
4. Han F, Walker RD, Janes ME, Prinyawiwatkul W, Ge B. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. Appl Environ Microbiol, 2007; 73 (21): 7096-8.
5. Alavandi SV, Manoranjita V, Vijayan KK, Kalaimani N, Santiago TC. Phenotypic and molecular typing of *V. harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae. Let Appl Microbiol, 2006; 43 (5): 566-70.
6. Bej AK, Harold N, Vickery MCL, Brasher C, Jeffreys A, Jones DD, et al. Use of PCR to determine genomic diversity and distribution of siderophore-mediated iron acquisition genes in clinical and environmental isolates of *V. vulnificus*, abstr. 97th General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology-Washington D.C., 1997.
7. Amorim A, Vasconcelos V. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Toxicon, 1999; 37 (7): 1041-52.
8. Farmer III JJ, Hickman Brener FW. The Genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, eds. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd edn. New York: Springer, 2006: 508-64.
9. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J Clin Pathol, 1966; 45 (4): 493-6.
10. Anonymous. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standard M100-S20 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
11. Sarter S, Nguyen HNK, Hung LT, Lazard J, Montet D. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. Food Control, 2007; 18 (11): 1391-6.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970; 227: 680-5.
13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
14. Panicker G, Call DR, Krug MJ, Bej AK. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. Appl Environ Microbiol, 2004; 70 (12): 7436-44.
15. Amos K. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3rd. edn. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 1985.
16. Håstein T, Hjeltnes B, Lillehaug A, Skare JV, Berntssen M, Lundebye AK. Food safety hazards that occur during the production stage: challenges for fish farming and the fish industry. Rev Sci Tech off Int Epiz, 2006; 25: 607-25.
17. Morris JG. Cholera and other types of *Vibriosis*: a story of human pandemics and oysters on the half shell. Clin Infect Dis, 2003; 37 (2): 272-80.
18. Anonymous. *Vibrio cholerae* izolasyonu ve identifikasyonu standart laboratuvar prosedürleri. Ankara: THSK, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı, 2012.
19. Korun J. Kültürü yapılan çipuralarda (*Sparus aurata* L.) görülen *Listonella anguillarum* enfeksiyonu üzerine bir çalışma. Ege JFAS, 2006; 23 (Ek 1/2): 259-63.
20. Aydın A, Soyutemiz E. Bazı balık türlerinden ve kum midyelerinden (*Venus gallina*) *Vibrio parahaemolyticus* izolasyonu ve identifikasyonu. Turk J Vet Anim Sci, 2002; 26: 1249-53.
21. İnal T, Yurtyeri A, Ambarcı I. Untersuchungen über das Vorkommen von *Vibrio parahaemolyticus* im Jahre 1971 in der Türkei. Fleischwirtschaft, 1973; 53(9): 1299.

22. İnal T, Yurteri A, Ambarcı I, Tolgay Z, Tezcan I. Untersuchungen über das vorkommen von *Vibrio parahaemolyticus* an der Schwarzmeerküste der Türkei. *Alimenta*, 1977; 16: 129-33.
23. Manjusha S, Sarita GB, Elyas KK, Chandrasekaran M. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. *Am J Biochem Biotech*, 2005; 1(4): 201-6.
24. Rojas MVR, Matté MH, Dropa M, Silva ML, Matté GR. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and nussels in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2011; 53 (4): 201-5.
25. Marhual NP, Das BK, Samal SK. Characterization of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Penaeus monodon*: antimicrobial resistance, plasmid profiles and random amplification of polymorphic DNA analysis. *Afr J Microbiol Res*, 2012; 6 (20): 4270-6.
26. Yoon LC, Ryu J, Oh SS, Hwang IG. Detection and identification of *Vibrio* species using whole-cell protein pattern analysis. *J Microbiol Biotech*, 2012; 22 (8): 1107-12.
27. Benediktsdóttir E, Verdonck L, Spröer C, Helgason S, Swings J. Characterization of *Vibrio viscosus* and *Vibrio wodanis* isolated at different geographical locations: a proposal for reclassification of *Vibrio viscosus* as *Moritella viscosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000; 50 (2): 479-88.

2013 yılında Muğla ili Marmaris ilçesinde görülen *Staphylococcus aureus* enterotoksin kaynaklı gıda zehirlenmesinin değerlendirilmesi

Evaluation of food poisoning of *Staphylococcus aureus* enterotoxin source in 2013 in the Marmaris district of Muğla, Turkey

Celal TUTUŞ¹, Demet BÖREKÇİ¹, Gürcan PARCIKLİ¹, Fehminaz TEMEL¹, Mustafa Bahadır SUCAKLI¹

ÖZET

Amaç: Aynı yemek firması tarafından verilen öğle yemeği ve akşam yemeği sonrası iki okuldaki öğrenciler ile 17 işyerindeki işçilerden oluşan toplam 116 kişi; bulantı, kusma, karın ağrısı ve ishal şikâyetleri ile 23 Aralık 2013 tarihinde, Muğla İli Marmaris Devlet Hastanesi'ne başvurmuştur. Bu çalışma; zehirlenmenin bulaş yollarını ve olası kaynak ya da kaynakları belirlemek ve kontrol önlemlerini uygulamak için yapılmıştır.

Yöntemler: Şüpheli vaka olarak "23 Aralık 2013 tarihinde söz konusu 17 işyeri ile iki okulda bulunan ve bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal, ateş semptomlarından en az biri görülen kişi" olarak tanımlanmıştır. Olası vaka ise şüpheli vakalardan "kusma veya ishal şikâyeti olan kişiler" olarak kabul edilmiştir. Kontroller, aynı okul/işyerinde bulunan belirtilen semptomları olmayan kişiler arasından seçilmiştir. Çalışmada, işyerlerinde ve okullarda toplam 213 (100 vaka, 113 kontrol) kişi ile yüz yüze görüşülüp anket uygulanmıştır. Analizler 77 olası vaka, 100 şüpheli vaka ve 113 kontrol grubu üzerinden yapılmıştır. Gaita örnekleri, yemek üretim firmasının mutfak araç ve gereçlerinden sürüntü, gıda ve su örnekleri alınmıştır. Ayrıca gıda elleyicilerinden alınan örnekler *Staphylococcus aureus* açısından incelenmiştir.

ABSTRACT

Objective: On 23rd of December, 2013, 116 patients including students of two schools, and workers of 17 work places who consumed lunch and dinner from the same catering company, applied to Marmaris State Hospital, Muğla province suffering from nausea, vomiting, abdominal pain, and diarrhea. This study was conducted to identify the cause, and mode of transmission, and to implement control measures.

Methods: The suspected case was defined as "individuals working in 17 work places and two schools and having at least one of the following symptoms onset on 23 December 2013: nausea, vomiting, stomach ache, diarrhea, and fever". Probable case was accepted as "suspected case having vomiting or diarrhea". Controls were selected from the same school/workplace among persons who didn't have these symptoms. In the study, face to face interviews were conducted for 213 (100 cases, 113 controls) people. Seventy seven probable cases, 100 suspected cases and 113 controls were included in the analysis. Samples from stool, swabs of the kitchenwares and utensils, samples from food and water were taken. Moreover, samples from food handlers were tested for *S. aureus*.

* Bu çalışma; X, 17. Ulusal Halk Sağlığı Kongresi'nde (20-24 Ekim 2014, Edirne-TÜRKİYE ve European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (5-7 Kasım 2014, Stockholm-İsveç) kongresinde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, ANKARA



İletişim/Corresponding Author : Celal TUTUŞ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyolojisi D.B., ANKARA

Tel : +90 312 565 50 00-2525

E-posta / E-mail : drmct.02-98@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 04.08.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 04.01.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.79847

Tutuş C, Borekçi D, Parçıklı G, Temel F, Sucaklı MB. 2013 yılında Muğla ili Marmaris ilçesinde görülen *Staphylococcus aureus* enterotoksin kaynaklı gıda zehirlenmesinin değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 131-8.

Bulgular: Vakaların, 23 Aralık 2013 Pazartesi günü öğle yemeği yenmesinden sonra ortaya çıktığı saptanmıştır. Aynı gün verilen yemek menüsünde; tavuk döner, pilav, mantar çorbası, salata ve ayran olduğu belirlenmiştir. İlk vaka; Muğla İli Marmaris İlçesi Merkez Devlet Hastanesi'ne aynı gün içinde saat 12:30'da bulantı, kusma şikayetleri ile başvurmuştur. Vakalarda en sık görülen semptomlar sırasıyla; bulantı, karın ağrısı, kusma, ishal ve yüksek ateştir. Atak hızı %16 olarak belirlenmiştir. Zehirlenme eğrisi tek kaynaklı olduğunu göstermiştir. Vaka ve kontroller yaş ve cinsiyet açısından benzer bulunmuştur. Vakaların %96 (74/77)'si ve kontrollerin %32'sinin (37/113) yemekte tavuk döner yediği saptanmıştır (TRR - tahmini rölatif risk): 50 %95; Güven Aralığı: 14-171). Mantar çorbası ve salata kontrol TRR - tahmini rölatif risk): 50 %95; GA-güven aralığı: 14-171 edildiğinde (37/113) ise vakalarda kontrollere göre tavuk döner yeme TRR 34 kat (TRR ayar - Ayarlı tahmini rölatif risk = 34, %95 GA= 8,8-129,7) bulunmuştur. İl Gıda Kontrol Laboratuvarında değerlendirmesi yapılan tavuk dönerinde stafilocok enterotoksini tespit edilmiştir.

Sonuç: Marmaris İlçesi'nde görülen zehirlenmeye tavuk dönerde saptana *S. aureus* enterotoksininin sebep olduğu görülmüştür. Araştırmada bulaş kaynağı gösterilememiştir. Yemek firması tarafından kontrol ve koruma önlemlerin alınması ve firma çalışanlarına iyi hijyen uygulamaları konusunda eğitim verilmesi önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, gıda kaynaklı zehirlenme, vaka-kontrol çalışması

Results: Cases started to increase after lunch on Monday at 23 December 2013. The menu of the company included chicken doner, rice, mushroom soup, salad and buttermilk. The first case attended Muğla, Marmaris District Public Hospital during the same day with nausea and vomiting complaints at 12:30. Most common symptoms seen in the cases, were nausea, abdominal pain, vomiting, diarrhea and high fever. The attack rate was determined as 16%. The epidemic curve revealed a point source outbreak. Cases and controls had similar characteristics for age and sex. It was determined that 96% (74/77) of cases and 32% (37/113) of controls ate chicken doner (OR - odds ratio: 50 95% CI: 14-171). After controlling for mushroom soup and salad, odds of being ill was 34 (ORadj - adjusted odds ratio = 34, 95% CI-confidence interval= 8.8-129.7). In the analysis done by the Provincial Agriculture - Food Laboratory on the food samples *S. aureus* enterotoxin was identified in chicken doner sample.

Conclusion: It was found that the poisoning seen in the Marmaris district was caused by *S. aureus* enterotoxin in the chicken doner. In the research the source of contamination was not shown. Recommendations were given to the food company to implement control and protection measures; and to provide training on good hygiene practices for company workers.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, food-borne poisoning, case-control study

GİRİŞ

Gıda kaynaklı hastalıklar, toplumun her kesiminden ve her yaştaki bireyi etkileyen önemli bir toplum sağlığı sorunudur. Gıda kaynaklı enfeksiyonlar, sporadik vaka olarak görülebileceği gibi bulaş gıda kaynaklı, birden fazla kişiyi etkileyen zehirlenmeler şeklinde de görülebilir (1). Yapılan araştırmalarda gıda kaynaklı enfeksiyonların yaklaşık üçte birinin bakteriyel etkenli olduğu saptanmıştır. Gıda kaynaklı

hastalıkların çoğu bakterilerin ürettiği toksinlerden veya bakteri miktarından kaynaklanır. Bazı bakteriler; gerekli su, besin, sıcaklık ve zaman koşulları oluştuğunda milyonlarca üreyebilirler. Ne kadar çok bakteri varsa, enfeksiyon ve hastalık riski de o kadar yüksektir. Gelişen hastalıkların şiddeti, hafif karın ağrısından gıda kaynaklı zehirlenmeye kadar değişen geniş bir spektrum şeklinde görülmektedir.

Hastalıkların oluşumunda en önemli etken, gıdaların hijyenik olmayan koşullarda muhafaza edilmesi ve hazırlanmasında yapılan hatalardır (2).

Endüstrileşme ile beraber hazır yemek ile beslenmeye karşı eğilimin son yıllarda artış gösterdiği görülmektedir. ABD, İngiltere ve Hollanda'da elde edilen istatistiksel verilere göre gıda kaynaklı hastalıkların %70'inden fazlası yemek veya servis hizmeti veren sektörlerle ilişkilendirilmektedir (3).

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol Merkezi (CDC)'nin 2005 yılı raporunda 205 gıda kaynaklı hastalık salgını rapor edilmiştir. ABD'de her yıl 325.000'i hastanede yatmayı gerektiren ve 5.000'i ölüm ile sonuçlanan yaklaşık 76 milyon vakanın olduğu tahmin edilmektedir (4). Bu durum her yıl dört Amerikalıdan birinin bu enfeksiyonlar ile karşılaştığını göstermektedir. İngiltere'de sadece 2000 yılında 1.3 milyondan fazla gıda kaynaklı intestinal enfeksiyon bildirilmiştir (5).

Son zamanlarda gıda kaynaklı salgınlarda en çok *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium perfringens* etken olarak gözlenmektedir. Günümüzde, gıda kaynaklı enfeksiyonlarda 27 temel patojen mevcuttur. En önemlileri *Campylobacter*, *Salmonella* spp., *Clostridium* türleri, *S. aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes*'tir. Bununla birlikte bu patojenler gıda kaynaklı enfeksiyonların toplam tahmini sayısının sadece %19'unu oluşturmaktadırlar (6, 7).

Stafilokokkal gıda zehirlenmeleri ABD'de en sık görülen ikinci sıradaki gıda kaynaklı zehirlenme nedenidir ve gıda kaynaklı salgınların %14-20'sini oluşturmaktadır (8).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, Marmara bölgesinde perakende olarak satılan 1070 gıda örneğinde inceleme yapılmıştır. Patojen etken saptanan 147 örneğin 92 (%62,6)'sinin stafilokokal toksinler ile enfekte olduğu tespit edilmiştir (9). Bu da tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de stafilokokal gıda zehirlenme riskinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma, Marmaris ilçesinde 23 Aralık 2013 tarihinde başlayan bulantı, kusma ve ishal şikayetleri ile seyreden zehirlenmenin bulaş yollarını ve olası kaynak ya da kaynaklarını belirlemek ve kontrol önlemlerini uygulamak için yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, etkilenen kişi sayısının fazlalığı ve olayın toplum sağlığını etkileme riski taşıması nedeniyle Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK), Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyoloji Daire Başkanlığı (EUCSE DB)'nce konuyu inceleme kararı alınmıştır. EUCSE Daire Başkanlığı'ndan görevlendirilen personel ile Muğla Halk Sağlığı Müdürlüğü personeli tarafından 05 Ocak 2014 ile 11 Ocak 2014 tarihleri arasında Muğla ili Marmaris ilçesinde vakaların görüldüğü 17 işyerinde ve iki okulda, iş yeri çalışanlarının ve öğrencilerin tümüne ulaşma gücü nedeniyle vaka-kontrol çalışması yapılmıştır. Şüpheli ve olası olmak üzere iki vaka tanımı oluşturulmuştur.

Şüpheli vaka; yemek firmasının dağıtım yaptığı 17 işyeri ve iki okulda; bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal veya ateş şikâyetlerinden en az birine sahip olan kişiler, olası vaka ise şüpheli vakalar arsından kusma veya ishal şikâyetleri olan kişiler alınmıştır. Kontroller, aynı tarihte iş yerleri ve okullarda bulunan ve herhangi bir rahatsızlığı bulunmayan kişilerden seçilmiştir.

Anket uygulamasının başında en fazla vakanın görüldüğü okul başta olmak üzere, öğrenci/çalışan sayısı yeterli olan okul/işyerlerinde kişi listeleri alınmış, hastaneye başvuranlar çıkarılarak, kalan öğrenci/çalışanlar arasından rastgele yöntemle kişiler seçilmiştir. Her işletmede vaka sayısı kadar kontrol bulunmadığından ve vakalar bazı işletmelerde kontrol sayısından daha fazla olduğundan kontroller işletme bazında alınmamış, bütün işletmelerden rastgele sayılar tablosu kullanılarak seçilmiştir. Çalışmada, işyerlerinde ve okullarda 213 (100 vaka, 113 kontrol) kişi ile yüz yüze görüşülüp anket yapılmıştır. 77 olası vaka ve 113 kontrol ile ileri analizler yapılmıştır. Veri

analizlerinde Excel ve EpiInfo paket programları kullanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde; yüzde dağılımları, atak hızı, olası risk faktörlerini değerlendirmek için %95 GA, TRR ve ayarlanmış TRR (lojistik regresyon) kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı %5 kabul edilmiştir.

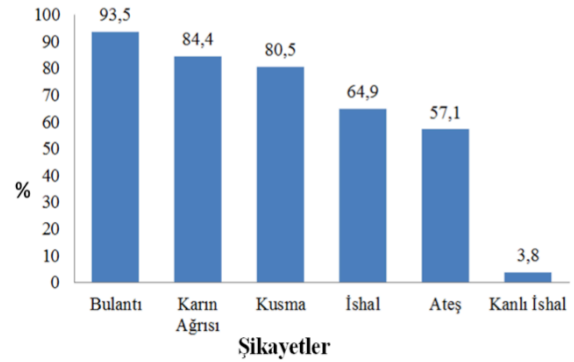
Vakalardan alınan gaita örnekleri incelenmek üzere Marmaris İlçe Devlet Hastanesi Laboratuvarına, gıda ve su numuneleri Muğla İl Gıda Kontrol Laboratuvarı ve Halk Sağlığı Laboratuvarına gönderilmiştir.

BULGULAR

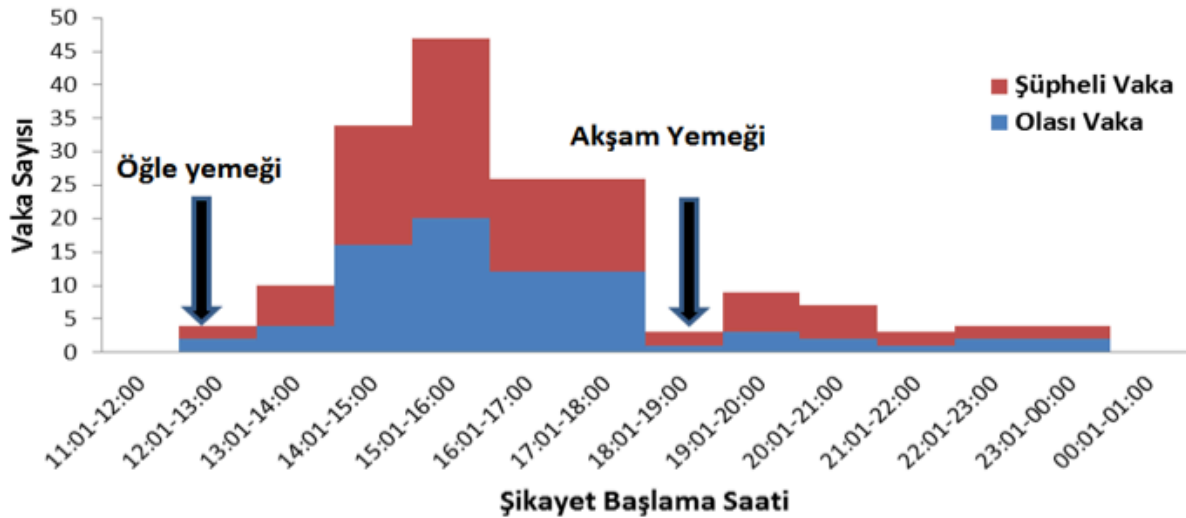
Muğla Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından 24.12.2013 tarihinde, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK) Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığına Marmaris İlçesi'nde 23.12.2013 tarihinde öğle ve akşam yemeği sonrası Devlet Hastanesi Acil Servisine (116 kişi), diğer hastane ve poliklinikler ile toplam 136 kişinin karın ağrısı, bulantı, kusma ve ishal şikâyetlerinden biri veya birkaçıyla başvuran kişilerin beşinin yatışının yapıldığı, büyük bir çoğunluğunun da birkaç saatlik gözlem ile taburcu edildiği uyarısı bildirilmiştir.

İşyeri ve okullarda, 23.12.2013 Pazartesi günü öğle yemeğinden sonra vakalar ortaya çıkmaya başlamıştır. Olası vaka tanımına göre 77 vakanın %66'sı erkek, %34'ü kadındır. Vakaların yaş ortalaması $29,3 \pm 9,37$ olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada; yemek dağıtımı yapılan iş yerleri ve okullarda acile başvuran kişi sayısına göre hesaplanan kaba atak hızı %16 bulunmuştur. Başvuranlarda en fazla görülen şikâyetlerin bulantı ve karın ağrısı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kusma, ishal ve yüksek ateş de görülmüştür (Şekil 1).



Şekil 1. Gıda zehirlenmesi ile başvuranlarda en fazla görülen şikâyetlerin yüzde dağılımları



Şekil 2. Şikâyetlerin başlama saatlerine göre dağılımı

Şikâyetlerin başlama zamanına göre çizilen zehirlenme eğrisinde şüpheli ve olası vakalara ait şikâyetlerin öğle ve akşam yemeklerinden sonra başlamış olduğu ve tepe noktalarının aynı zaman diliminde olduğu saptanmıştır. Zehirlenmenin tek kaynaklı etken özelliği gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 2).

Zehirlenmenin inkübasyon süresinin 4.04 ± 2.15 saat (Ortanca= 3.30 - En kısa = 0.5 - En uzun = 11.20) olduğu bulunmuştur. Bu süre, zehirlenmeye neden olduğu düşünülen *Staphylococcus aureus* ile uyumlu görülmüştür.

Zehirlenmeye yol açan yemekleri tespit etmek için olası vakaların yemek menüsünde yer alan sebze tavuk döner, pilav, mantar çorbası, salata ve ayran yeme-içme durumları da değerlendirilmiştir (Tablo 1).

İlk analizlerde tavuk döner, mantar çorbası ve salatanın zehirlenme ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ancak mantar çorbası ve salata kontrol edildiğinde vakalarda kontrollere göre zehirlenme tahmini rölatif riski 34 kat (8,8-129,7) bulunmuştur (Tablo 1).

Gaita kültürlerinde *Salmonella* spp. ve *Shigella* spp. açısından yapılan inceleme sonuçları negatif bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 1. Vaka ve kontrollerde gıdalara göre olası risk faktörleri

Gıda	Vaka		Kontrol		TRR (%95 GA)	Ayarlı TRR (%95 GA)
	Sayı	%	Sayı	%		
Tavuk döner	74	96,0	37	32,1	50 (14-171)	33,9 (8,8-129,7)
Mantar çorbası	58	75,0	32	28,5	7,6 (3,9-15)	2,3 (1,05-5,4)
Salata	59	76,6	44	38,9	5,09 (2,6 -9,9)	0,9 (0,3-2,4)
Ayran	15	19,5	12	10,6	2,02 (0,8-4,7)	

Tablo 2. Klinik ve klinik dışı örneklerde yapılan analizlerin sonuçları

Örnek	Alınan Örnek Sayısı	Kullanılan Yöntem	Yapılan Mikrobiyolojik Analizler	Sonuç
Klinik Örnekler				
Gaita	13	Kültür	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., parazit yumurtası, kist ve trofozoid	Negatif
Kusmuk	2	Kültür	<i>Salmonella</i> spp. (VIDAS), <i>Shigella</i> spp.	Negatif
Gıda Örnekleri				
Tavuk döner	2	VIDAS	<i>Stafilokokal enterotoksin</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Salmonella</i> spp.	Pozitif
Mantar çorbası	2	VIDAS	<i>Stafilokokal enterotoksin</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Salmonella</i> spp.)	Negatif
Salata	1	VIDAS	<i>E.coli</i> <i>Stafilokokalenterotoksin</i> , <i>Salmonella</i> spp.	Negatif
Ayran	1	VIDAS	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>E. coli</i>	Negatif
Mutfak Araç Örnekleri (Kepçe, Tezgah, Buzdolabı Rafları, Kıyma Makinesi vb.)	19	Kültür	<i>E. coli</i> , maya hücreleri, alfa hemolitik streptokoklar	Negatif
Su Örnekleri Şebeke suyu	1500	Membran filtrasyon	Mikrobiyolojik Kontrol İzlemesi	Uygun

İlçenin su ihtiyacını sağlayan şebeke suyu ile ilgili yapılan mikrobiyolojik kontrol izleme analizleri olarak *Clostridium perfringes* (sporlar dahil), *E. coli*, koliform bakteri ile ağır metal (amonyum, demir) ve iletkenlik, pH, koku, renk ve tat incelemesi sonucunda, su örnekleri ilgili yönetmeliğe uygun bulunmuştur.

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Laboratuvarında yapılan tavuk döner örneğinde stafilocok enterotoksini tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Gıda kaynaklı hastalıklar (GKH) genel anlamda patojenik mikroorganizmalar, mikrobiyal toksinler ile bulaşı olmuş gıdaların yenmesi ile oluşan ve daha çok gastrointestinal semptomlarla seyreden klinik tablolardır (7,10). GKH'ler sporadik olabileceği gibi salgınlar halinde de görülebilmektedir. Bazen küçük çocuklar ve yaşlılarda ölümler (genel halk için % 0,03) nadir olmakla birlikte görülmektedir (6).

Günümüzde, gıda kaynaklarının belli merkezlerden sağlanması ve bu gıdaların farklı bölgelere dağıtılması salgın yaygınlığını arttırmaktadır (11). Bu çalışmada, zehirlenmeye neden olan ana gıda maddesi olan tavuk dönerin üretim yeri ile işlenip servis edilme merkezinin farklı illerde olması, gerekli incelemeler için izinlerin alınamaması nedeni ile işletmeler arasında geriye dönük gıda kontrol çalışması yapılamamıştır.

Stafilokokal gıda zehirlenmesi hızla gelişen, şiddetli ve bol kusma, ishali veya ishalsiz abdominal kramp ile karakterize edilmektedir (7). Çalışmamızda; vakaların bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal ve ateş gibi şikâyetlerinin olması *S. aureus* enfeksiyonunun klinik özellikleri ile uyumludur. İnkübasyon süresi 2-6 saat arasında değişmektedir. Bu süre stafilokokal gıda zehirlenmelerinde görülen inkübasyon süresi (30 dakika-8 saat) ile uyum göstermektedir (6).

Gıda analizinde de tavuk döner örneğinde *S. aureus* enterotoksininin tespit edilmesi tavuk döner kaynaklı bir *S. aureus* gıda zehirlenmesi olduğunu göstermiştir. Mantar çorbasında da riskin yüksek

bulunması yemekler arasında bir çapraz bulaşın olabileceğini düşündürmüştür.

Stafilokokal gıda zehirlenmesi kendi kendini sınırlandıran bir hastalık olsa da hastaların yaklaşık %10'u şikâyetlerinden dolayı acil servise başvurmuştur (12). Çalışmamızda da gıda zehirlenmesi şikâyetleriyle kişiler (%74) hastaneye başvurmuştur. Bunun nedeni bu intoksikasyonun işyerlerinde görülmesini düşündürmüştür. İşyeri, okul gibi toplu yemek yenen yerlerde bu tür gıda kaynaklı zehirlenmelerde genellikle kişilerde semptomlar görüldükçe hastane başvuruları da artmaktadır.

Birçok gıda maddesi, *S. aureus* üremesi için uygun ortam oluşturmaktadır. Sıklıkla süt, krema, kremalı pastalar, tereyağı, jambon, sosis, konserve et, salatalar, pişmiş yemekler, sandviç dolguları bu zehirlenmelerde rol oynamaktadır. İngiltere'de yapılan bir çalışmada; 1969 - 1990 arasında görülen salgınların %53'ü başta jambon olmak üzere etli yemeklere, %22'si kümes hayvanları ile ilgili yemeklere, %8'si süt ürünlerine, %7'si balık ve kabuklu deniz hayvanlarına ve %3,5'i yumurtaya bağlı olduğu görülmüştür (13). Çalışmamızda da beklendiği gibi tavuk döneri kaynaklı bir enfeksiyon olduğu ortaya çıkmıştır.

Gıda zehirlenmelerinde, gıdanın hazırlanmasında görev alan personel bulaşta önemli bir rol oynamaktadır. Stafilokokal gıda zehirlenmelerinin %25'inde elle işleme aşamasında bulaş olmaktadır. Sağlıklı kişilerin %20-50'sinin cildinde, burnunda, boğazında veya enfekte cilt lezyonlarında *S. aureus* taşıdığı bilinmektedir. Organizma gözenekler ve kıl foliküllerinde gizlendiğinden ciltten uzaklaştırılması oldukça zordur. Nemli ellerle yüzeylere ve yiyeceklere bulaşması mümkündür. *S. aureus* taşıyıcılarının düzenli olarak test yapılarak tespit edilmesine çalışmak sürekli uygulanabilir bir durum değildir. Bu nedenle, genel olarak yiyeceklere çıplak elle dokunmaktan kaçınılması gerekmektedir (13). Çalışmamızdaki zehirlenme ile ilgili gözlemlerde; gıda elleyicilerinin eldivenle çalıştığı görülmüştür. Ayrıca laboratuvar

incelemelerinde gerek gıda elleycilerinden alınan örneklerde, gerekse mutfak araç ve gereçlerinden alınan sürüntü örneklerinde herhangi bir bulaş etkiyle karşılaşmamıştır. Yemeklerin hazırlandığı ve servis edildiği ortamın hijyeni de bulaşta önemli bir faktör olarak rol oynamaktadır. Bu ortamın geçmişte yapılan düzenli kontrollerini incelediğimizde ise hijyen konusunda herhangi bir problem yaşamadığı kayıtlardan saptanmıştır. Bu nedenle, bulaşın personel ve ortamdaki kaynaklanmadığı, başka bir aşamada gerçekleştiği düşünülmüştür.

SONUÇ

Laboratuvar sonuçları ve epidemiyolojik analizler, yaşanan gıda zehirlenmesine *S. aureus* enterotoksini bulaşmış tavuk dönerin neden olduğunu göstermiştir. Tavuk dönerin geriye dönük incelemesi yapılmış ve bu gıdanın bir firma tarafından satıldığı öğrenilmiştir. Ancak yemek firması tarafından kullanılan tavuk dönerin imalat yeri ile iletişim sağlanamamış ve incelenmesi için izin alınmamıştır. Bu nedenle, *S. aureus* bulaş yolunun ne şekilde olduğu tam olarak belirlenememiştir.

Gıda kökenli hastalık risklerini önemli ölçüde azaltmak ve toplum sağlığını korumak açısından Dünya Sağlık Örgütü tarafından “güvenli tüketim için işlenmiş gıdaların seçilmesi, pişirilecek gıdalarda pişirme işleminin tam ve kusursuz uygulanması, pişirme sonrası gıdaların bekletilmeden tüketilmesi, pişirilmiş gıdaların korunmasına özen gösterilmesi, gıdaların yeniden ısıtılmasının tam ve kusursuz uygulanması, çiğ ve pişmiş gıdaların birbiriyle temasından sakınılması, el temizliğinin ihmal edilmemesi, mutfaktaki yüzeylerin temiz tutulması, gıdaların kemirgen ve haşerelerden korunması ve temiz su kullanılması olarak “Altın Kuralları” tanımlamıştır. Bu önlemlerin toplu yemek üretim firmaları ve tüketiciler tarafından uygulanması için Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile Sağlık Bakanlığı tarafından önerilerde bulunulmalıdır (14).

Gıda kaynaklı hastalıklarda kaynağın belirlenmesi ve bulaş zincirinin tespiti amacıyla Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile Sağlık Bakanlığı'nın zamanında ve ortak hareket etmesi gerekmektedir. Bu nedenle, yürürlükte bulunan yasal düzenlenmenin uygulanabilirliğinin de artırılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansının Güçlendirilmesi Avrupa Birliği Projesi (TR0802.16-AB Fonu) ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK)'nin maddi desteği ile yapılmıştır.

Çalışmadaki katkılarından dolayı, THSK Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Programları Başkan Yardımcılığına, THSK Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı çalışanlarına, Muğla Halk Sağlığı Müdürlüğü, Muğla İl Gıda Kontrol Laboratuvarı ve Muğla Halk Sağlığı Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Özen NS, Tuğlu Ataman Ş, Seyman D, Akdağ H, Emek M. Antalya ili gıda çalışanlarında nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının ve MRSA oranlarının üç farklı yöntem kullanılarak incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2013; 70 (2): 51-8.
2. Dorman V, Aslan S, Ceylan A, Nacar Küçük S, Günel A, Sarı H, et al. Aynı fabrikadan yemek alan iki inşaat firması işçilerinde meydana gelen toplu besin zehirlenmesi. Dicle Tıp Derg, 2010; 37 (3): 248-53.
3. Şenses-Ergül Ş, Sarı H, Ertaş S, Berberoğlu U, Cesaretli Y, Irmak H. Tüketime sunulan çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72 (3): 199-20.
4. Ayçiçek H, Aktan HT. Gıda kaynaklı salgınlarda soruşturma ilkeleri. Turk Hij Den Biyol Derg, 2003; 60 (3): 95-9.
5. Heymann D. Control of Communicable Diseases Manual. 19th ed. American Public Health Association. Washington DC. United Book Press Inc., Baltimore MD., 2008.
6. Danielsson-Tham ML. Staphylococcal food poisoning. In: Tham W, Danielsson-Tham ML, eds. Food Associated Pathogens. Boca Raton. CRC Press, 2013: 250-68.
7. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. BioMed Res Int, 2014; 1-9.
8. Lima GC, Loiko MR, Casarin LS, Tondo EC. Assessing the epidemiological data of *Staphylococcus aureus* food poisoning occurred in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Braz J Microbiol, 2013; 44 (3): 759-63.
9. Aydın A, Sudagidan M, Muratoglu K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. Int J Food Microbiol, 2011; 148 (2): 99-106.
10. Adams M, Motarjemi Y. Basic food safety for health workers. Geneva: World Health Organization, 1999.
11. Kartal ED, Gıda kaynaklı infeksiyonlar. I. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. 14-15 Kasım, Ankara, Türkiye. 2006.
12. Holmberg, SD, Blake PA. Staphylococcal food poisoning in the United States: New facts and old misconceptions. JAMA, 1984; 251 (4): 487-9.
13. Loir LY, Florence B, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res, 2003; 2 (1): 63-76.
14. Özkaya Durlu F, Cömert M. Gıda zehirlenmelerinde etken faktörler. Turk Hij Den Biyol Derg, 2008; 65 (3): 149-58.

İzmir’de sağlık kurumlarına yemek üretim ve dağıtım hizmeti veren bir firmada çalışanların gıda hijyeni ile ilgili bilgi ve davranışları

The knowledge and behaviour of workers on food hygiene who worked in a company providing catering and distribution service to the health institutions in Izmir

Şadan KÖKSAL¹, Ahmet SOYSAL², Gül ERGÖR², Gülşah KANER³

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı İzmir’de bir yemek firmasında çalışanların gıda hijyeni ve kişisel hijyen ile ilgili bilgi ve davranışlarını araştırmak, bilgi ve davranışlarına etki eden etmenleri belirlemektir.

Yöntemler: Kesitsel tipte planlanan çalışma, ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemine sahip bir yemek firmasının merkez mutfağında ve hizmet verdiği hastane mutfaklarında yürütülmüş, yemek firmasındaki tüm çalışanların (n:73) çalışmaya alınması planlanmış, ancak çalışma 59 kişi ile tamamlanmıştır. Çalışma verilerinin toplanması anket ve gözlem yapılarak araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir. Gözlem yalnızca mutfak çalışanlarında yapılmıştır. Gıda hijyeni ile ilgili bilgileri puanlandırılarak yeterli ve yetersiz olarak, gıda hijyenine yönelik gözlenen davranışları ise uygun ve uygun değil olarak değerlendirilmiştir. Veriler, SPSS 15.0 paket programı ile analiz edilmiş, sosyo-demografik özellikler ve çalışma süresinin hijyen bilgi düzeyi ve davranış durumu ile karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır. Elde edilen p değeri 0,05’ten küçükse fark anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Çalışanların yaş ortalamasının 35,4±7,6 olduğu ve %86,4’ünün mutfak çalışanı, %13,6’sının her zaman mutfakta bulunmayan gıda mühendisi, gıda teknisyeni, sekreter ve şoför olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya katılanların tamamının işe girdikten sonra düzenli sağlık kontrolünden geçtiği, çoğunun çalıştıkları firmada ya da daha önce hijyen

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to determine the knowledge and practice of workers of a catering company in Izmir on food and personal hygiene, and to investigate factors which influence their knowledge and behaviour.

Methods: The cross-sectionally planned study was implemented in the central kitchen of a catering firm having the ISO 22000 Food Safety Management System and in the hospital kitchens served by the firm. It was planned to include all workers (n: 73) of the catering firm to the study however the study was completed with 59 people. The data were collected through the method of the questionnaire and observation by the researcher. Observation was done only with the kitchen workers. The food hygiene knowledge of the workers were scored as sufficient and insufficient while their behaviours were evaluated as appropriate or inappropriate. Data were analyzed with the SPSS 15.0 package program and in comparing the socio-demographic properties and working period with the hygiene knowledge level and behaviour condition chi-square test was used. p value <0.05 was noted statistically significant.

Results: The mean age of the workers were 35.4±7.6 and 86.4% of them were working in the kitchen while 13.6% were food engineer, food technician, secretary, and driver who were not often in the kitchen. It was determined that all workers participating in the study underwent regular medical check-ups after entering the

* Bu çalışma; Türkiye Gıda ve İçecek Sanayi Dernekleri Federasyonun (TGDF) Gıda Kongresinde (12-14 Kasım 2013 Side, Antalya) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

1 Şifa Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İZMİR
2 Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İZMİR
3 İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İZMİR



İletişim/Corresponding Author : Şadan KÖKSAL

Şifa Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İZMİR

Tel : +90 232 308 00 00

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

Geliş Tarihi / Received : 14.07.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 24.01.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.39129

Köksal Ş, Soysal A, Ergör G, Kaner G. İzmir’de sağlık kurumlarına yemek üretim ve dağıtım hizmeti veren bir firmada çalışanların gıda hijyeni ile ilgili bilgi ve davranışları. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 139-48.

eğitimi aldıkları ve yarısından fazlasının gıda iş yerinde yedi yıl ve daha az süredir çalıştıkları belirlenmiştir. Bu çalışmada, çalışanların yarısından fazlasının (%52,5) hijyen bilgi puanının yetersiz olduğu ve gıda hijyenine yönelik davranışlarının (%58,8) uygun olmadığı gösterilmiştir. Eğitim durumu gıda hijyeni bilgi puanına anlamlı olarak etki etmektedir ($p=0,029$). Sosyo-demografik özelliklerin gıda hijyenine yönelik davranışlara anlamlı etkisi olmadığı saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışmada, çalışanların çoğu hijyen eğitimi almalarına karşın, gıda hijyeni ve gıda güvenliğine yönelik bilgilerinin yetersiz olduğu belirlenmiş ve bu bilgilerin davranışa dönüşmediği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gıda çalışanları, gıda hijyeni, bilgi, davranış

work and majority of them have had hygiene training courses at their current workplace or before, and more than half of the workers have been working in the food business for 7 years or less. In this study, it was shown that more than half of workers (52.5%) had insufficient the level of knowledge of hygiene and inappropriate behaviour (58.8%) regarding food hygiene. Educational status is a factor which significantly affects the level of food hygiene knowledge ($p=0,029$). It was determined that socio-demographic characteristics do not have a significant effect on behaviour concerning food hygiene.

Conclusion: In this study, despite the majority of employees having received hygiene training, it was determined that their knowledge on food hygiene and safety was inadequate and it was observed that these knowledge was not transformed to their behaviours.

Key Words: Food handlers, food hygiene, knowledge, behaviour

GİRİŞ

Günümüzde teknolojik gelişmelere, kentleşmeye ve çalışanların sayısındaki artışa paralel olarak toplu beslenme hizmetlerinin önemi giderek artmaktadır. Bugün ileri sanayi ülkelerinde nüfusun %70'i en az bir öğün yemeği ev dışında yemektedir. Türkiye'de de son yıllarda özellikle ayaküstü yemek (fast-food) restoranlarındaki artışa paralel olarak dışarıda yemek yeme oranı oldukça artmıştır (1).

Kaliteli bir toplu beslenme hizmeti, besin değeri korunmuş (uygun hazırlama ve pişirme teknikleri kullanılarak), ekonomik, hijyenik, yeterli miktarda ve çeşitlilikteki yemeklerin tüketicilerin hoşuna gidecek uygun fiziki koşullarda zarif ve doğru bir biçimde sunum/servis edilmesini gerektirir. Toplu beslenme hizmetlerinde, hijyenik ve kaliteli bir yemek servisinin sağlanamadığı durumlar, gıda kaynaklı hastalıklar ve gıda zehirlenmelerine yol açarak halk sağlığını ve ülke ekonomisini olumsuz yönde etkiler (1).

Gıda kaynaklı hastalıklar, günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan tüm ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorununu oluşturmakta ve toplum

sağlığının korunmasında giderek daha büyük bir önem kazanmaktadır (2). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2014 faaliyet raporuna göre, su ve gıda ile bulaşan hastalıkların değerlendirilmesinin yapıldığı Haziran - Ekim ayları arasında vaka sayılarında artış olduğu, laboratuvara gönderilen örneklerde ise en fazla belirlenen etkenin rotavirüs olduğu tespit edilmiştir (3). Yapılan bir çalışmada gıda zehirlenmelerinin önemli bir kısmının gıda maddesi üretimi ve satışının yapıldığı işyerlerinde çalışanların temizlik alışkanlıklarının yetersizliğinden ve çevresel etmenlerin olumsuzluğundan kaynaklandığı belirtilmiştir (4). Bu konu ile ilgili Mersin İlinde yürütülen bir çalışmada, Salmonella ve Shigella taşıyıcılığı ile hepatit A virüs antikorları araştırılmış; bağırsak parazitleri %4,6 oranında pozitif bulunurken; dışkı kültüründe patojen bakteri üremediği görülmüştür. Anti-HAV toplam %84 oranında pozitif olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, gıda yolu ile geçebilecek hastalıkların önlenmesi için gıda işinde çalışanlara eğitim verilmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır (5).

Gıda ürünleri ile bulaşabilecek hastalıklar, Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO), yeni üretim teknikleri, kullanılan tarım ilaçları ve benzeri sağlık riskleri, gıda güvenliği ve hijyeni hususunda temel ilkelerin belirlenmesi ihtiyacını doğurmuştur. Bu amaçla, ülkemizde yürürlükte olan 5996 Sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu ile gıda güvenliği ve hijyenine ilişkin hükümler, Avrupa Birliği normlarına uyumlu hale getirilmeye çalışılmış, uyulması gereken asgari standartlar düzenlenmiştir (6). Ayrıca, gıda hijyeni konusunda çalışanların alacakları eğitimle ilgili hükümler ise yürürlükte olan 1593 sayılı Umumi Hıfzıssıhha Kanunu'nun 126.-127. maddelerinde düzenlenmiştir. Bu hükümlerin uygulanmasına yönelik 05.07.2013 tarihli Hijyen Eğitimi Yönetmeliği yayımlanmıştır (7). Bu Yönetmelikte, çalışanlara yönelik hijyen eğitimi programlarının planlanmasına, eğitimlerin verilmesine, iş yeri sahibinin, işletenlerin ve çalışanların bu konudaki sorumluluklarına, bu iş yerlerinde çalışmaya engel bulaşıcı hastalıkların ve cilt hastalıklarının belirlenmesine ve bu hastalıkların iyileşme hâlinin tespitine ilişkin usul ve esaslar belirlenmiştir (7).

Sağlığın korunması ve geliştirilmesi amacıyla yapılan sanitasyon ve hijyen eğitimleri halk sağlığının en önemli konuları arasındadır (8). İtalya'da gıda işi ile uğraşanlarda yapılan bir çalışmada; gıda ile geçen hastalıkların kontrolü ve önlenmesi için gıda işi ile uğraşanların eğitilmesinin gerekli olduğu bildirilmiştir (9). Gıda çalışanlarının çoğuna hijyen eğitimi verilmesine karşın kişiler, gıda ve kişisel hijyen ile ilgili bilgilerini her zaman davranışa geçiremeyebilirler. Bu nedenle bu çalışmada, İzmir'deki bir yemek firmasında çalışanların gıda ve kişisel hijyen ile ilgili bilgi ve davranışlarını belirlenmesi, çalışanların bilgi ve davranışlarına etki eden etmenlerin saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kesitsel tipte planlanan bu çalışma, ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemine sahip bir yemek firmasının merkez mutfağında ve hizmet verdiği

hastane mutfakları ve yemekhanelerinde yürütülmüş, yemek firmasındaki tüm çalışanların (n:73) çalışmaya alınması planlanmış, ancak çalışma 59 kişi ile tamamlanmıştır.

Çalışma verileri gözlem yapılarak ve anket uygulanarak toplanmış, daha önce bu konuda yapılan benzer çalışmalarda (10, 11) kullanılan formlar temel alınarak geliştirilmiştir. Anket formu; genel bilgiler, gıda hijyenine yönelik bilgiler ve kişisel hijyen ile ilgili genel bilgiler olmak üzere üç bölümden oluşmuştur. Yaş, cinsiyet, meslek grubu, öğrenim ve medeni durum, iş yerinde çalışma süresi, düzenli sağlık kontrolünden geçme ve hijyen eğitimi alma durumu bağımsız değişkenler; gıda hijyeni ile ilgili bilgi ve davranışlar ise bağımlı değişkenler olarak belirlenmiştir.

Çalışanların gıda hijyenine yönelik davranışları araştırmacının geliştirdiği gözlem formu ile saptanmıştır. Gözlem, yemek firmasının merkez mutfağında ve hizmet verdiği hastanelerin mutfak ve yemekhane bölümlerinde yapılmıştır. Gözlem, her bir birey için yemeklerin hazırlanıp, pişirilip servis edilmesi zaman diliminde yapılmıştır.

Çalışmamızda, ilk önce gözlem ile davranışa yönelik veriler toplanmış daha sonra çalışanlardan anket formu ile veri elde edilmiştir. Gözlem ile anket uygulama arasında en az üç gün beklenmiştir.

Gözlem formunun oluşturulması

Gıda Güvenliği ve Kalitesinin Denetimi ve Kontrolüne Dair Yönetmelik'te EK-2 ve EK-3 olarak verilen "Gıda ve Gıda ile Temasta Bulunan Madde ve Malzemeleri Üreten İşyerlerine Ait Denetim ve Kontrol Formu"nun Personel Hijyeni Bölümünden (12) ve Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Beslenme ve Diyet Bölümünün hazırladığı çalışan hijyeni gözlem formundan yararlanılarak geliştirilmiştir.

Gıda hijyeni ile ilgili davranışların değerlendirilmesi

Gıda hijyeni ve güvenliğine yönelik belirlenen 12 davranış, gözlem formu ile araştırmacı tarafından yemeğin hazırlanmasından servisine kadar

geçen sürelerde gözlenerek evet ve hayır olarak işaretlenmiştir. Erkek personel için saç ve sakal traş olma, kadınlar için saçlarının toplu olup olmadığı gözlenmiştir. Bone ya da kep kullanma, tırnakların kısa ve temiz olması, yemeklerin tat kontrolünün uygun şekilde yapılıp yapılmadığı, kıyafetlerin temiz ve ütülü olması, çalışırken eldiven kullanılması, işe başlamadan önce ellerin hijyenik şekilde yıkanması, maske takılması, mutfakta ve yemek servisinde sigara içilmesi, çığ ve pişmiş gıdanın birlikte bekletilmesi, gözle görülür bir hastalık belirtisi, elde görünür bir yara ve/veya lezyon olup olmadığı gözlenmiştir.

Analizlerde davranış durumu ‘uygun’ ve ‘uygun değil’ olarak iki grupta değerlendirilmiştir. Uygun olan davranışa 1 (bir) puan, uygun olmayan davranışa da 1 (bir) puan verilerek her bir katılımcı için davranış puanı hesaplanmış ve puanların ortalaması alınmıştır. 12 davranıştan en az bir davranışı uygun olmayanların davranışı uygun değil, tüm davranışları uygun olanların davranışları uygun kabul edilmiştir. Mutfak çalışanı olmayan, gıda mühendisi, gıda teknikeri, sekreter ve şoförden oluşan meslek gruplarından kişilerin davranışları gözlenmemiştir.

Gıda hijyeni ile ilgili bilgi düzeyinin değerlendirilmesi

Katılımcılara, gıda hijyeni ve güvenliği ile ilgili 21 bilgi ve soru yöneltilerek “evet”, “hayır” ve “bilmiyorum” seçeneklerini kullanarak yanıt vermeleri istenmiştir. Yanıtlar doğru, yanlış ve bilmiyor olarak değerlendirilmiştir. Çözümlemede doğru yanıt 1 (bir), yanlış yanıt 0 (sıfır) puan olarak değerlendirilerek çalışmaya katılan her çalışanın bilgi puanı elde edilmiştir. Bilgi puanlarının ortalaması alınarak, ortalama puanda ve altında kalanlar yetersiz, ortalamanın üstünde puana sahip olanlar yeterli bilgi düzeyine sahip kabul edilmiştir.

Hijyen eğitimi alma

Çalışmaya katılan çalışanların tamamına yakınına (%93,2) Hijyen Eğitimi Yönetmeliğine uygun olarak firmada çalışan gıda mühendisi tarafından on saatlik

hijyen eğitimi verilmiştir. Eğitim, aynı yönetmeliğin sekizinci maddesine uygun olarak (7);

- Hijyen ilkelerine uyulmaması sebebiyle halk sağlığı açısından risk oluşturduğu bilinen virüslerin, bakterilerin, parazitlerin, mantarların ve diğer enfeksiyon etkenlerinin genel özellikleri,
- Bulaşma yolları, hangi iş kolunda nasıl bulaşmalar olabileceği veya halk sağlığının nasıl tehdit göreceği,
- Hastalık belirtileri ve korunma yolları gibi konulardan oluşmuştur.

İstatistiksel analiz

Analizlerde, SPSS 15.0 paket programı kullanılmıştır. Sosyo-demografik özellikler ve çalışma süresinin hijyen bilgi düzeyi ve davranış durumu ile karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir (13). Bu çalışma için, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu’ndan 25-05-2009 nolu onay alınmıştır. Bireylere çalışma içeriği ve amacı ile ilgili genel bir bilgi verilmiş, çalışmaya katılmayı kabul eden her katılımcı onam formunu okuyup imzalamıştır.

BULGULAR

Çalışanların %55,9’u kadın, %44,1’i erkek olup yaş ortalaması $35,4 \pm 7,6$ ’dır. Bununla birlikte %86,4’ü mutfak çalışanı, %13,6’sı her zaman mutfakta bulunmayan, gıda mühendisi, gıda teknikeri, sekreter ve şoförden oluşmaktadır. Öğrenim durumu %62,7’sinde ilkokul ve altı ilken %47,3’ünde ortaokul ve üzeridir. Çalışanların tamamının düzenli olarak sağlık kontrolünden geçtiği, %93,2’sinin hijyen eğitimi aldığı belirlenmiştir. Ayrıca çalışanların %67,8’si toplu beslenme sektöründe yedi yıl ve daha az çalıştığını belirtmiştir. Gıda hijyeni ve güvenliğine yönelik bilgilerin değerlendirilmesi Tablo 1’de gösterilmiştir. Çalışanların %13,6’sı çığ ve pişmiş gıdalar birlikte bekletilebilir cümlesine “evet” diyerek yanlış cevap vermiştir. Yemeye hazır sıcak gıdaları korumak için doğru sıcaklık aralığını katılımcıların yarısından fazlası (%54,2) yanlış bilmektedir. Katılımcıların yarısından

fazlası (%59,3) dondurulmuş gıdalar oda sıcaklığında bekletilerek çözündürülür diyerek; büyük çoğunluğu (%76,3) ise dondurulmuş gıdalar -5 °C'de saklanabilir diyerek yanlış cevap vermişlerdir (Tablo 1).

Çalışanların hijyene yönelik gözlenen bazı davranışlarının dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Çalışanların tamamının bone ya da kep taktığı,

%98,0'inin tırnaklarının temiz ve kısa olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, %88,2'sinin temiz ve ütülü kıyafetle çalıştığı ve çalışırken eldiven kullandığı, %80,4'ünün işe başlamadan önce ellerini yıkadığı, %60,8'inin çalışırken maske kullandığı ve %5,9'unun mutfak ya da yemek servisinde sigara içtiği gözlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 1. Gıda hijyeni ve güvenliğine yönelik bazı bilgilerin değerlendirilmesi

	Doğru Yanıtlar	Doğru Yanıt		Yanlış Yanıt		Bilmiyor	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Bone, maske, eldiven giymek yiyeceklere mikrop bulaşma riskini azaltır.	Evet	59	100,0	0	0,0	0	0,0
Yiyeceklere dokunmadan önce ellerin yıkanması bulaşma riskini azaltır.	Evet	57	96,6	2	3,4	0	0,0
Mutfakta çalışan kadınların tırnakları ojeli olabilir.	Hayır	57	96,6	1	1,7	1	1,7
İnsanlar, gıdalara zararlı bakterilerin bulaşmasında aracılırlar.	Evet	51	86,4	8	13,6	0	0,0
Çiğ gıdalar ile pişmiş gıdalar birlikte bekletilebilir.	Hayır	50	84,7	8	13,6	1	1,7
Buzdolabı için doğru sıcaklık aralığı (°C)	0-5 °C	45	76,3	14	23,7	0	0,0
Çözünmüş gıdalar yalnızca 1 (bir) kez daha dondurulabilir.	Hayır	31	52,5	28	47,5	0	0,0
Yemeye hazır sıcak gıdaları korumak için doğru sıcaklık aralığı (°C)	61-70 °C	27	45,8	32	54,2	0	0,0
Dondurulmuş gıdalar oda sıcaklığında bekletilerek çözündürülür.	Hayır	23	39,0	35	59,3	1	1,7
Dondurulmuş gıdalar -5 °C'de saklanabilir.	Hayır	11	18,6	45	76,3	3	5,1

Tablo 2. Çalışanların hijyene yönelik gözlenen bazı davranışlarının dağılımı*

Gözlenen davranışlar (n=51)	Evet		Hayır	
	Sayı	%	Sayı	%
Bone ya da kep takmış mı?	51	100,0	0	0,0
Tırnakları kısa ve temiz mi?	50	98,0	1	2,0
Yemeklerin tat kontrolünü uygun şekilde yapıyor mu?	49	96,1	2	3,9
Kıyafetleri temiz ve ütülü mü?	45	88,2	6	11,8
Çalışırken eldiven kullanıyor mu?	45	88,2	6	11,8
İşe başlamadan önce ellerini hijyenik şekilde yıkıyor mu?	41	80,4	10	19,6
Maske takıyor mu?	31	60,8	20	39,2
Mutfakta ve yemek servisinde sigara içiyor mu?	3	5,9	48	94,1
Çiğ ve pişmiş besini birlikte bekletiyor mu?	2	3,9	49	96,1
Gözle görülür bir hastalık belirtisi var mı?	1	2,0	50	98,0
Elinde görünür yara lezyon var mı?	1	2,0	50	98,0

* Mutfak çalışanı olmayanlar (sekiz kişi) gözleme alınmamıştır.

Tablo 3. Çalışanların sosyo-demografik özelliklerinin gıda hijyeni bilgi düzeylerine ve gıda hijyenine yönelik davranışlarına etkisi

	Hijyen Bilgi Düzeyi				P değeri	Davranış Durumu				P değeri
	Yeterli		Yetersiz			Uygun		Uygun değil		
	Sayı	%	Sayı	%		Sayı	%	Sayı	%	
Cinsiyet										
Kadın	19	53,8	14	46,2	0,542	14	48,3	15	51,7	0,371
Erkek	12	42,4	14	57,6		7	31,8	15	68,2	
Yaş										
≤35	17	51,5	16	48,5	0,660	10	37,0	17	63,0	0,725
≥36	11	42,3	15	57,3		11	45,8	13	54,2	
Öğrenim durumu										
İlkokul ve altı	13	35,1	24	64,9	0,029*	14	38,9	22	61,1	0,840
Ortaokul ve üzeri	15	68,2	7	31,8		7	46,7	8	53,3	
Çalışma süresi										
≤7 yıl	17	42,5	23	57,5	0,408	13	37,1	22	62,9	0,576
≥8 yıl	11	57,9	8	42,1		8	50,0	8	50,0	
Medeni durum										
Evli	18	46,2	21	53,8	0,996	16	45,7	19	54,3	0,505
Evli değil	10	50,0	10	50,0		5	31,3	11	68,7	

* Pearson ki-kare

Çalışmamızda; çalışanların gıda hijyeni bilgi puanlarının ortalamasının $12,04 \pm 4,4$; davranış puanlarının ortalamasının $10,02 \pm 2,2$ olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, çalışanların yarısından fazlasının (%52,5) hijyen bilgi puanı yetersiz olup gıda hijyenine yönelik davranışları (%58,8) uygun değildir.

Tablo 3'te çalışanların sosyo-demografik özelliklerinin gıda hijyeni bilgi düzeylerine ve gıda hijyenine yönelik davranışlarına etkisi gösterilmiştir. Erkeklerin %42,4'ü, kadınların %53,8'i; 35 yaş ve altında olanların yaklaşık yarısı (%51,5) yeterli hijyen bilgi puanına sahiptir. Ayrıca, öğrenim düzeyi ortaokul ve üzerinde olanların %68,2'si, çalışma süresi sekiz yıl ve üstünde olanların %57,9'u yeterli hijyen bilgi puanına sahiptir (Tablo 3).

Kadınların yaklaşık yarısının (%48,3), erkeklerin (%31,8) ve 35 yaş altında (%37,0) olanların üçte

birinin gıda hijyenine yönelik davranışları uygundur. Ayrıca, öğrenim durumu ortaokul ve üzeri (%46,7), çalışma süresi sekiz yıl ve daha fazla (%50,0), medeni durumu evli olanların yaklaşık yarısının (%45,7) gıda hijyenine yönelik davranışları uygundur (Tablo 3).

TARTIŞMA

Çalışmamızda, İzmir'de bulunan bir yemek firmasının merkez mutfağında ve hizmet verdiği hastane mutfakları ve yemekhanelerinde çalışan personelin, gıda hijyeni ve kişisel temizlik ile ilgili bilgi ve davranışları araştırılmış ve bilgi ve davranışlarına etki eden etmenler belirlenmiştir.

Çalışanların yarısından fazlasının (%67,8) iş yerinde çalışma süresi yedi yıl ya da daha azdır. Bu konu ile ilgili, Ankara'da kamu kurumlarının yemekhanelerinde çalışan mutfak personelinin el

hijyen bilgisi ve uygulamalarının incelendiği benzer bir çalışmada, çalışanların yarıya yakınının (%42,0) iş yerinde çalışma süresinin bir ile on yıl arasında olduğu saptanmıştır (14). Toplu beslenme hizmeti veren işyerlerinde çalışanların çoğunun orta yaş altında olması nedeniyle, işyerlerinde istihdamın sürekli olmadığı, kamu kurumlarının bir çoğunun yemek hizmeti satın aldığı için belirli dönemlerde hizmet veren firmaların değişmesine bağlı çalışanların sıklıkla değiştiği söylenebilir.

Gıda güvenliği ve hijyenine ilişkin hususlarının düzenlendiği 5996 Sayılı Kanun 11.06.2010 tarihinde kabul edilmiştir. Özellikle Avrupa Birliği müktesebatına uyum sağlanmasının amaçlandığı bu kanun gıda ürünlerinin üretiminden başlayarak tüketiciye ulaşana kadar geçen her safhasını kapsamaktadır (6). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından, 5996 Sayılı Kanunun uygulanması amacıyla Gıda ve Yemin Resmi Kontrollerine Dair Yönetmelik, Gıda Hijyeni Yönetmeliği, Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği ve Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği çıkarılmıştır. Ayrıca gıda hijyeni konusunda çalışanların alacakları eğitimle ilgili hükümler yürürlükte olan 1593 sayılı Umumi Hıfzıssıhha Kanunu'nun 126 ve 127. maddelerinde düzenlenmektedir. Bu hükümlerin uygulanmasına yönelik 05.07.2013 tarihli Hijyen Eğitimi Yönetmeliği çıkarılmıştır (7). Umumi Hıfzıssıhha Kanununun 126. maddesinde, gıda üretim ve satış yerleri ve toplu tüketim yerlerinde iş yeri sahipleri, çalışanlarına hijyen konusunda gerekli eğitimi vermeye veya çalışanların bu eğitimi almalarını sağlamakla yükümlü olduklarını belirtmektedir (7). Bu çalışmada, çalışmaya katılanların hepsi işe girdikten sonra düzenli sağlık kontrolünden geçtiklerini, büyük çoğunluğu (%93,2) çalıştıkları firmada ya da daha önce hijyen eğitimi aldıklarını belirtmişlerdir. Çalışmamız, ISO (International Standarts Organizations, Uluslar Arası Standartlar Organizasyonu) 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemine sahip bir firmada yürütülmüştür. Bu yönetim sistemi; uluslararası düzeyde sağlık, çevre ve çeşitli üretim alanlarına göre değişebilen, hijyen ve kalitenin korunmasına yönelik uygulamaları

icermektedir. Ayrıca riskli davranışların önlenmesi, hijyen eğitimleri ve uygulamalarına ek olarak toplum temelli programların hazırlanması ve yürütülmesi de bu yönetim sisteminde oldukça önemlidir (8). Ancak, ülkemizde bu yönetim sistemlerinin kullanımı ile ilgili yasal bir zorunluluk olmadığı için sınırlı sayıda yapılmaktadır. Bu çalışmamızda, çalışanların tamamına yakınının (%93,2) hijyen eğitimi alması; firmanın ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemine sahip olmasından kaynaklandığını düşündürmüştür. ISO Gıda Güvenliği Yönetim Sistemini kullanmayan gıda iş yerlerinde yapılan bir çalışmada; çalışanların %58,3'nün işe girerken sağlık kontrolünden geçmediği, %75,8'nin periyodik sağlık kontrolünden geçmediği, %75,6'sının hijyen eğitimi almadığı belirlenmiştir (8).

Portekiz'de huzurevi ve anaokullarında yapılan çalışmada; çalışanların 12 ay öncesinde hijyen eğitimi almaları ile gıda hijyeni bilgi düzeyleri arasında pozitif anlamlı bir ilişki bulunmuştur (15). Clayton ve ark. (16); İngiltere'de yaptıkları çalışmada, çalışanların %95,0'inin gıda hijyeni eğitimi aldıkları halde %63,0'ünün bazen bildiklerini uygulamadıkları bulunmuştur. Çiğli'deki yemek firmasında yürütülen bu çalışmada da hijyen eğitim alma oranı yüksek olmasına karşın, çalışanların %58,8'inin gıda hijyenine yönelik davranışlarının uygun olmadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda, çalışanların gıda güvenliği ile ilgili bilgilerinin (dondurulmuş gıdaları ve yenmeye hazır sıcak gıdaları uygun saklama dereceleri) eksik olduğu görülmüştür. Çalışmamızda elde edilen sonucun benzer çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (17-21).

Yemek üretim ve dağıtım hizmeti veren bir firmada gıdalara kirleticilerin bulaşmaması için koruyucu giysilerin kullanımı çok önemlidir. İşletmede çalışan herkes potansiyel bir mikroorganizma taşıyıcısı ve bu alanlarda oluşan kirlenmenin ve çapraz bulaşmanın en önemli kaynağıdır. Hastalık, yara, yanık ve kesiklerin, vücut döküntü ve salgıları ile giysilerin, aynı zamanda ellerin dikkat edilmesi gereken noktaların başında geldiği görülmüştür (22). Çalışmamızda; çalışanlara iş üniforması dışında neler giydikleri sorulmuş, tamamının bone ya da kep kullandığı, tamamına yakınının da

önlük, maske ve kolluk kullandıkları belirlenmiştir. Edirne İl merkezindeki hastane mutfaklarında yapılan bir çalışma sonucunda, tüm çalışanların özel iş elbisesi, özel mutfak ayakkabısı, bone-kep kullandığı saptanmıştır (22). Samsun il merkezindeki hastane mutfaklarının hijyen durumunun değerlendirildiği bir çalışmada ise mutfak personelinin %50'sinin kep kullanmadığı, %62,5'inin iş dışı giysilerini iş öncesi değiştirmeye gerek duymadığı saptanmıştır (23).

Gıda işyerinde çalışanların maske kullanımı hastalık etkenlerinin gıdalara bulaşmasını önlemede etkili bir yöntemdir. Çalışmamıza katılan çalışanlardan yaklaşık %40'ının çalışırken maske, %12'sinin ise eldiven kullanmadığı tespit edilmiştir. Yapılan benzer bir çalışmanın sonucunda; hastane mutfaklarında çalışanların %40'ının eldiven, %80'inin maske kullanmadığı saptanmıştır (22). Bu çalışmamızda; çalışanların yaklaşık %40'ının, çalışırken maske kullanmıyor olması, çalışmanın yürütüldüğü firmanın, HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points-Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları) sistemini temel alan ISO 22000 gıda güvenliği yönetim sistemine sahip olması açısından düşündürücüdür. HACCP sisteminin oluşturulması ve etkin bir şekilde uygulanması için belirli bir sürece ihtiyaç olmasına rağmen, hazır yemek üreten firmaların çoğu bu kalite ve yönetim sistemlerine kolayca sahip olmaktadır.

El yıkamak, gıda güvenliğinin sağlanmasında, besin kaynaklı hastalıkların önlenmesinde ve gıda sektöründe hizmet kalitesinin artırılmasında en ucuz ve en güvenilir yöntemdir (24). Çalışmamızda, firma çalışanlarının yaklaşık %20'sinin işe başlamadan önce ellerini hijyenik bir şekilde yıkamadığı gözlenmiştir. Clayton ve Griffith'in (25) yaptığı çalışmada; çalışanların sadece %10'unun iş aktiviteleri esnasında kirli yüzey, ekipman ve gereçlere temas ettikten sonra ellerini yıkadığı belirlenmiştir. Brezilya'da yapılan farklı bir çalışmada; çalışanların sürekli hijyen eğitimi almalarına karşın, %53,3'ünün ellerinden alınan örneklerde stafilocok belirlenmiştir (26).

Bu çalışmamızda, çalışanların yarısından fazlasının gıda hijyeni bilgi düzeylerinin yetersiz,

davranışlarının uygun olmadığı görülmüştür. Gıda güvenliği yönetim sistemini uygulayan bir firmada, bu sonucun elde edilmesi düşündürücüdür. İtalya'da iki ayrı hastanede yürütülen bir çalışmanın sonucunda; gıda dağıtımında çalışanların gıda güvenliği ile ilgili bilgilerinin yetersiz olduğu ve hastanelerde güvenli bir gıda yönetim sisteminin uygulanması gerektiği belirtilmiştir (27). Ankara'daki dört ve beş yıldızlı otellerde çalışan yiyecek ve içecek personelinin hijyen bilgileri ve uygulamalarının incelendiği farklı bir çalışmada; 102 çalışandan 25 kişinin yeterli bilgiye sahip olduğu belirlenmiştir (28). Yapılan benzer çalışmalarda da hijyen bilgisi eksikliğinin, kritik kontrol noktalarını belirleme ve gıda güvenliğini sağlamada engel olduğu belirtilmiş ve hijyen eğitiminin önemi vurgulanmıştır (29-32). Çalışmamızda, öğrenim durumunun gıda hijyeni bilgi düzeyine anlamlı etkisi olduğu saptanmış, öğrenim durumu ilkökul ve altı olan 37 kişiden 24'ünün hijyen bilgi puanlarının yetersiz olduğu belirlenmiştir (p=0,029). Sivas İl merkezinde 494 kişide yapılan farklı bir çalışmada; bireylerin ancak yarısının genel görünüm, saç, sakal, tırnak, yüz, el, giysi gibi kişisel hijyen özelliklerinin iyi olduğu, lise ve üzeri eğitim alanlarda bu oranların anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır (33). Üniversiteli gençler arasında yapılan bir çalışmada da gıda hijyeni bilgi düzeyi ile üniversite son sınıf olma ve eğitim alanı arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (34). Çanakkale'de yapılan farklı bir çalışmada da genel olarak çalışma ortamı ve kişisel hijyen sorularına doğru cevaplar verilmiş, özellikle üniversite eğitimi alanlarda tam puan alanların oranı anlamlı olarak daha yüksek belirlenmiştir (35). İtalya'da yapılan farklı bir çalışmada, hastanelerde gıda hijyeni ile ilgili bilgi, tutum ve uygulamalar incelenmiş ve 290 çalışandan %78,8'inin gıda kaynaklı patojenlere yol açan beş etkeni bilmediği ve bilgi düzeyinin eğitim düzeyinin artmasıyla arttığı saptanmıştır (36).

Bu çalışmamızda, davranış durumuna öğrenim durumunun anlamlı etkisi olmadığı ancak öğrenim durumu ilkökul ve altı olanlarda davranış durumu uygun

olmayanların yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. Aradaki farkın anlamlı bulunmamasının nedeni gıda mühendisi ve gıda teknikeri gibi eğitim seviyesi yüksek kişilerin araştırmacı tarafından gözlemden çıkarılması olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmanın kısıtlılıkları

Bu çalışmamızda, kurumlardan izin alma sorunu nedeniyle tek bir yemek firmasının merkez mutfağı ve hizmet verdiği hastane mutfaklarında yapılması ve çalışmaya katılan kişi sayısının az olması çalışma sonucunun yemek üretim ve dağıtım hizmeti veren tüm firmalar için genellemesini engelleyebilir. Ancak çalışmada elde edilen sonuçlar, çalışma alanı kısıtlı olsa da yemek üretim ve dağıtım hizmeti sunulan

toplum kesitinin büyüklüğü nedeniyle önemli olacağını düşündürmektedir.

SONUÇ

Bu çalışma, ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemine sahip bir firmada yürütülmüş olmasına ve çalışanların tamamına yakınına hijyen eğitimi verilmiş olmasına rağmen gıda hijyeni ve gıda güvenliğine yönelik bilgilerinin yetersiz olduğu belirlenmiş ve bu bilgilerin davranışa dönüşmediği gözlenmiştir. Gıda işyerinde çalışanların öncelikle hijyen konusunda eğitilmiş olmaları, işletmede sağlıklı bir üretim için önemlidir. Bu nedenle gıda çalışanlarına yönelik olarak verilen hijyen eğitimlerinin davranışa dönüşebilmesini sağlayacak yöntemler geliştirilmelidir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızda; veri toplama aşamasında katılan ve destek olan tüm firma çalışanlarına teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Bilici S. Toplu beslenme sistemleri çalışanları için hijyen el kitabı. Ankara: T.C Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Beslenme ve Fiziksel Aktiviteler Daire Başkanlığı Beslenme Bilgi Serisi, 2008.
2. Alpuğuz G, Erkoç F, Mutluer B, Selvi M. Gençlerin (14-24 yaş) gıda hijyeni ve ambalajlı gıdaların tüketimi konusundaki bilgi ve davranışlarının incelenmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2009; 66(3): 107-15.
3. Anonymous. 2014 Faaliyet Raporu. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014.
4. Serbil S, Tümerdem Y, Kıyak M, Hacıoğlu S. İstanbul Küçükçekmece ilçesinde fırınların hijyenik yönden değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2001; 58(3): 93-6.
5. Delialioğlu N, Aslan G, Öztürk C, Kaya A, Ersöz G. Gıda çalışanlarında gıda kaynaklı hastalık etkenlerinin vetaşyıcılık durumunun değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2003; 60(1):19-2.
6. 5996 Sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/06/20100613-12.htm>. (Erişim tarihi: 15.12.2015).
7. Hijyen Eğitimi Yönetmeliği, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/07/20130705-3.htm>. (Erişim tarihi: 15.12.2015).
8. Cevizci S, Önal AE. Halk sağlığı açısından hijyen ve iyi üretim uygulamaları. Türk Hij Den Biyol Derg, 2009; 66(2): 73-82.
9. Angelillo IF, Viggiani NM, Rizzo L, Bianco A. Food hand lersand food borne disease: knowledge, attitudes, and reported behavior in Italy. J Food Prot, 2000; 63(3): 381-5.
10. Baş M, Temel MA, Ersun AS, Kıvanç G. Prerequisite program sand food hygiene in hospitals: Food safety know ledge and practices of food service staff in Ankara, Turkey. Infect Control Hosp Epidemiol, 2005; 26(4): 420-24.

11. Tokuç B, Ekuklu G, Berberoğlu U, Bilge E, Dedeler H. Knowledge, attitudes and self reported practices of food service staff regarding food hygiene in Edirne, Turkey. *Food Control*, 2009; 20(6): 565-68.
12. Gıda Güvenliği ve Kalitesinin Denetimi ve Kontrolüne Dair Yönetmelik, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2008/09/20080926-4.htm>. (Erişim tarihi: 3.12.2008).
13. Aksakoğlu G. Sağlıkta araştırma ve çözümleme. 2. Baskı. İzmir: Dokuz Eylül Rektörlük Basımevi, 2006.
14. Turan İ. Mutfak personelinin el hijyeni bilgisi ve uygulamalarının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
15. Martins RB, Ferreira D, Moreira LM, Hogg T, Gestal J. Knowledge on food hygiene of food service staff working in nursing home and kindergartens in Porto region-Portugal. *Food Control*, 2014; 42: 54-62.
16. Clayton DA, Griffith CJ, Price P, Peters AC. Food handlers' beliefs and self-reported practices. *Int J Environ Health Res*, 2002; 12(1): 25-39.
17. Sani NA, Siow ON. Knowledge, attitudes and practices of food handlers on food safety in food service operations at the Universiti Kebangsaan Malaysia. *Food Control*, 2014; 37: 210-17.
18. Tan SL, Bakar FA, Abdul Karim MS, Lee HY, Mahyudin NA. Hand hygiene knowledge, attitude and practice among food handlers at primary schools in Hulu Langat district, Selangor (Malaysia). *Food Control*, 2013; 34(2): 428-35.
19. Sun YM, Wang ST, Huang KW. Hygiene knowledge and practices of night market foodvenders in Tainan City, Taiwan. *Food Control*, 2012; 23(1): 159-64.
20. Giritlioğlu I, Batman O, Tetik N. The knowledge and practice of food safety and hygiene of cookery students in Turkey. *Food Control*, 2011; 22(6): 838-42.
21. Pang J, Chua SWJL, Hsu L. Current knowledge, attitude and behaviour of hand and food hygiene in a developed residential community of Singapore: a cross-sectional survey. *BMC Public Health*, 2015; 15(577): 1-12.
22. Sert Ş, T. Edirne il merkezindeki hastanelerde mutfak personel hijyeninin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.
23. DüNDAR C, Elmacioğlu F, Topbaş M, Pekşen Y. Samsun il merkezindeki hastane mutfaklarının hijyen durumunun değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2000; 57(1):1-6.
24. Dokuzoğuz B. El hijyeni. *Türkiye Klinikleri Mikrobiyol Enfek Derg*, 2003; 2(2): 79-84.
25. Clayton D, Griffith C. Observation of food safety practices in catering using not ational analysis. *Brit Food J*, 2004; 106(3): 211-27.
26. Soares LS, Almeida RCC, Cerqueira ES, Carvalho JS, Nunes IL. Knowledge, attitude and practices in food safety and the presence of coagulase-positive staphylococci on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brazil. *Food Control*, 2012; 27(1): 206-13.
27. Buccheri C, Casuccio A, Giammanco S, Giammanco M, Guardia ML, Mammina C. Food safety in hospital: knowledge, attitude and practices of nursing staff of two hospitals in Sicily, Italy. *BMC Health Serv Res*, 2007; 7: 45.
28. Sargın Y. Ankara'daki dört ve beş yıldızlı otellerde çalışan yiyecek ve içecek personelinin hijyen bilgilerinin ve uygulamalarının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.
29. Walker E, Pritchard C, Forysthe S. Foodhandlers' hygiene knowledge in small food businesses. *Food Control*, 2003; 14 (5): 339-43.
30. Baş M, Ersun AŞ, Kıvanç G. Implementation of HACCP and prerequisite programs in food businesses in Turkey. *Food Control*, 2006; 17 (2): 118-26.
31. Aarnisalo K, Tallavaara K, Wirtanen G, Majjala R, Raaska L. The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food Control*, 2006; 7(12): 1001-11.
32. Seaman P, Eves A. The management of food safety the role of food hygiene training in the UK service sector. *Int J Hosp Manage*, 2006; 25(2): 278-96.
33. Koçoğlu G, Sümer H, Nur N, Polat H. Gıda maddesi üreten ve satan yerlerde çalışanların sanitasyon konusunda bilgi düzeyleri. 8. Ulusal Halk Sağlığı Kongresi. Diyarbakır, 23-28 Eylül 2002.
34. Low WY, Jani R, Abdul Halim H, Alias AA, MingMoy F. Determinants of food hygiene knowledge among youths: A cross-sectional online study. *Food Control*, 2016; 59: 88-93.
35. Çakır F, Çolakoğlu FA, Berik N. Su ürünleri işleyen ve satan yerlerde çalışanların sanitasyon konusunda bilgi düzeyleri. *Ege J FAS*, 2006; 23(1/3): 377-81.
36. Angellio IF, Viggiani MA. HACCP and food hygiene in hospital: knowledge, attitudes, and practices of food service staff in Calabria, Italy. *Infect Cont Hosp Epidemiol*, 2001; 22(6): 363-69.

İstanbul'un sivrisinek faunası ve *Culex pipiens* larvalarının *Bacillus* cinsi bakterilere karşı duyarlılığı

The mosquito fauna of Istanbul and susceptibility of *Culex pipiens* larvae to *Bacillus* spp. bacteria

Erdal POLAT¹, Serdar Mehmet ALTINKUM¹, Fadime YILMAZ¹, Sema TURAN-UZUNTAŞ¹, Yaşar BAĞDATLI²

ÖZET

Amaç: Çalışmada İstanbul'un sivrisinek faunasını oluşturan *Culex pipiens* larvalarına karşı kullanılan *Bacillus* cinsi bakterilerin etkisine bakılmıştır.

Yöntemler: Çalışmada 15 Nisan - 30 Haziran 2013 tarihleri arasında ilaçlama yapılmadan önce İstanbul'un 39 ilçesinde sivrisinek larvalarının geliştiği kaynaklardan 501 örnek alınmıştır. Alınan örnekler laboratuvara getirilmiş, 24 °C'de tutularak larvaların III. ve IV. evreye gelmesi bir kısmından da erişkin sivrisinek oluşması sağlanmıştır. *C. pipiens* türüne ait III. ve IV. evre larvalara karşı İstanbul Büyükşehir Belediyesi'nin larvasit olarak kullandığı; *Bacillus sphaericus* (200 g/ha, 300 g/ha ve 400 g/ha); *Bacillus thuringiensis* H-14 (200 g/ha, 300 g/ha ve 400 g/ha); *Bacillus sphaericus* (H5a5b, Strain 2362) - *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14, Strain AM65-52) (5000 g/ha) türlerine ait liyofilize preparatlar kullanılmıştır. Bu liyofilize preparatlardan Unat'ın balıklı buyyon besiyerinde hazırladığımız (6,1x10⁸ CFU/ml ve 12,6x10⁸ CFU/ml) kültürler kullanılmıştır. Kalan sivrisinek larvaları ve erişkin hale gelen sivrisinekler sterio ve ışık mikroskopunda incelenerek sivrisineklerin türleri belirlenmiştir.

Bulgular: İstanbul'un 39 ilçesinden alınan örneklerin tümünde *C. pipiens* türüne ait larvalara rastlanmıştır. Büyükçekmece, Silivri ve Ümraniye

ABSTRACT

Objective: In the study the impact of the *Bacillus* species bacteria used in the fight against larvae of *Culex pipiens* which constitute mosquito fauna of Istanbul was evaluated.

Methods: In the study, 501 samples were taken from the sources of mosquito larvae before disinfection, in 39 towns of Istanbul, from 15 April to the end of June, in 2013. Samples were brought to the laboratory, by maintaining at 24 °C to ensure larvae come to stages III and IV, and some of them to adult mosquitoes. Lyophilized preparations of *Bacillus sphaericus* (200 g/ha, 300 g/ha and 400 g/ha); *Bacillus thuringiensis* H-14 (200 g/ha, 300 g/ha and 400 g/ha); *Bacillus sphaericus* (H5a5b, Strain 2362) - *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14, Strain AM65-52) (5000 g/ha) species which are used as larvacide by Istanbul Metropolitan Municipality against *C. pipiens* III and IV stage larvae, were used. The cultures (6,1x10⁸ CFU/ml and 12,6x10⁸ CFU/ml) which prepared from these lyophilized preparations in the medium Unat's fish broth were used. Remaining mosquito larvae and adult mosquitoes were examined under sterio and light microscope to identify the species of mosquitoes.

Results: The larvae of *C. pipiens* species were

¹ İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

² İstanbul Üniversitesi, Çevre Yönetim Birimi Koordinatörlüğü, İSTANBUL



İletişim / Corresponding Author : Erdal POLAT

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Tel : +90 212 414 30 00 - 22743

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

Geliş Tarihi / Received : 25.08.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 05.01.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.48254

Polat E, Altinkum SM, Yılmaz F, Turan-Uzuntaş S, Bağdatlı Y. İstanbul'un sivrisinek faunası ve *Culex pipiens* larvalarının *Bacillus* cinsi bakterilere karşı duyarlılığı. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 149-56.

ilçelerinden alınan örneklerde yoğun olarak görülen *C. pipiens* larvalarının yanı sıra az sayıda Anophel ve Aedes cinsi sivrisineklerin larvalarına da rastlanmıştır. Liyofilize preparatların ve Unat'ın balıklı buyyonun da liyofilize preparatlardan hazırladığımız kültürlerinin ($12,6 \times 10^8$ CFU/ml yoğunluğunun) kullandığı deneylerde ilk larva ölümü 50. dakikada başlamıştır. Kültürlerin $6,1 \times 10^8$ CFU/ml yoğunluğunun kullandığı deneylerde ise ilk larva ölümü 60. dakikada izlenmiştir.

Sonuç: Tüm deneylerde larvaların tamamının 6. saatte öldüğü görülmüştür. Unat'ın balıklı buyyonunda hazırlanan kültürlerin liyofilize preparatlara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Kültürdeki bakteri yoğunluğu azaldığında ölümün daha geç başladığı, ancak larvaların tümünün ölmesi için geçen sürede bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Culex pipiens*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus* - *Bacillus thuringiensis israelensis*, Unat'ın balıklı buyyonu

observed in all samples taken from 39 towns of Istanbul. In samples from Buyukcekmece, Silivri and Umraniye districts, beside densely presented *C. pipiens* larvae, a small amount of Anopheline and Aedes species larvae were also observed. The first larval mortality began in 50th minutes in the experiment with lyophilized preparations and cultures prepared in Unat's fish broth ($12,6 \times 10^8$ CFU/ml density). In the experiments used culture concentration of 6.1×10^8 CFU/ml, the first larvae mortality was observed in 60th minute.

Conclusion: In all experiments, it was observed that all of the larvae died in 6th hours. Cultures prepared in Unat's fish broth were determined to be more effective than lyophilized preparations. It was determined that the reduced density of cultures caused a delay in starting time of mortality but overall time for all larvae deaths was unchanged.

Key Words: *Culex pipiens*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus* - *Bacillus thuringiensis israelensis*, Unat's fish broth

GİRİŞ

Sivrisinekler tropikal ve subtropikal bölgelerde; göllerin, akarsuların ve bataklıkların çevresinde rüzgarsız, kuytu yerlerde yaşarlar. Dişileri geçici dönem ektoparazit olup, genellikle akşamları ve sabahları erken saatlerde sıcakkanlı hayvanlardan ve insanlardan kan emerler. Emdikleri kanın proteinini yumurta oluşturmak için kullanırlar. Sivrisineklerin yumurtlama ve gelişme ortamları açık denizler hariç her türlü su birikintileridir. Anofeller sadece temiz ve berrak sularda geliştiği halde, kuleksler temiz ve kirlili her türlü suda gelişebilmektedirler (1-3).

Besin kaynağı kan olan dişli sivrisinekler; insandan kan emerken kaşıntılı deri lezyonları oluşturmaktadırlar. Ayrıca sivrisinekler kan emerken insanlara *Plasmodium*, filarya ve arbovirüs gibi

enfeksiyon etkenlerini de bulaştırmaktadırlar. Bu nedenle sivrisineklerin kontrolü sağlık açısından önem taşımaktadır. Sivrisineklerin kontrolünde; kimyasal, çevre düzenlemesi, mekaniksel-fiziksel, biyolojik vb. çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (1-4).

Kimyasal yöntemler: pestisitler (böcekler, kemirgenler, mantarlar ve yabancı ot gibi her türlü zararlıya karşı kullanılan maddeler), repellentler (böcek kaçırıcılar), atraktanlar (böcek cezbedenler, trikosenez), kemosterilizanlar (böcekleri kısırlaştırıcılar)'dır. Böcekleri öldürmek için kullanılan insektisitlere karşı böceklerin geliştirdiği direnç ve bu insektisitlerin insanlar ve çevre üzerindeki zararlı etkileri önemli bir sorundur. Gençlik hormonları ve kısırlaştırma gibi genetik yöntemler de vektör kontrollünde kullanılmaktadır.

Mekanik ve fiziki yöntemler: yakalama, vurma aletleri, vantilatörler, tuzaklar, yapışkan maddeler, perde, tel örgü ve cibinlikler. Çevre düzenlemesinde sanitasyon ve durgun su kaynaklarının drenajı önemlidir.

Biyolojik yöntemler: mantarlar (*Lagenidium giganteum*), protozoonlar (*Schistosoma microsporidia*), nematodlar (*Romanomermis culicivorax*), yırtıcı sinekler (*Toxorhynchites* cinsi), balıklar (*Gambusia affinis*, *Rivulus*) ve bakteriler (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*) kullanılmaktadır (1-5).

Sivrisineklerin larvalarına karşı kullanılan insektisitlerin ve biyolojik ajanların etkisinin bilinmesi sivrisineklerin kontrolünde büyük öneme sahiptir. Çünkü sivrisinek larvalarının insektistlere karşı direnç geliştirdiği uzun yıllardan beri bilinmektedir (1-2, 6). Hatta yapılan çalışmalarla sivrisinek larvalarının *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*'a karşı da direnç geliştirdiği belirlenmiştir (7-9).

İstanbul, Avrupa ile Asya kıtaları arasında köprü görevi gören, 5.712 km²'lik alana kurulmuş bir

şehirdir. İstanbul'un 14'ü Anadolu Yakasında, 25'i Avrupa Yakasında olmak üzere toplam 39 ilçesi vardır. Nüfusunun yaklaşık %64,71 (9.162.919)'i Avrupa; %35,29 (4.997.548)'u da Anadolu yakasında yaşamakta olup nüfusu son 20 yılda iki katına çıkmıştır. İşsizlik sebebi ile İstanbul'a göç eden insanlar şehir etrafında gecekondu mahalleleri oluşturmuştur. İstanbul'un bitki örtüsü genellikle maki olup, ormanlık alanı kentin 20 km. kuzeyindeki Belgrad Ormanı'dır. İstanbul'un en büyük akarsuyu, Riva Çayıdır. Boğaza dökülen Küçüksu ve Gökusu Dereleri; Haliç'e dökülen Kağıthane ve Alibey dereleri, Küçükçekmece Gölüne dökülen Sazlıdere, Büyükçekmece Gölüne dökülen Karasu Deresi, Terkos Gölüne dökülen Traşca deresi, İstanbul'un belli başlı akarsularıdır. Marmara Denizi kıyısında bulunan Küçükçekmece (11 km²) ve Büyükçekmece (16 km²) göllerinin suları denizle teması olduğu için tuzludur. İstanbul'un yaz ayları genellikle sıcak, kış ayları fazla soğuk geçmez. Yaz-kış, gece-gündüz arasında büyük ısı farkları görülmez. İstanbul ve 39 ilçesini gösteren harita Resim 1'de verilmiştir.



Resim 1. İstanbul'un 39 ilçesinde sivrisinek üreme alanlarından toplanan 501 örneğin ilçelere göre dağılımı, Nisan 2013

Çalışmada İstanbul'un sivrisinek faunasını oluşturan *Culex pipiens* larvaları ile mücadelede kullanılan *Bacillus* cinsi bakterilerin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İstanbul'un ilçelerinden, 2013 yıllı Nisan ayının ortasında sivrisinek aktivesinin başlaması ile Haziran ayının sonuna kadar ilaçlama yapılmadan önce sivrisinek larvaları toplanmıştır. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve İstanbul Büyükşehir Belediyesi Sağlık ve Sosyal Hizmetler Daire Başkanlığı çalışanlarınca içinde üredikleri su ile birlikte toplanan larvalar 500 ml, 1,5 ve 5 lt'lik pet şişelere konarak laboratuvara getirilmiştir. İstanbul'un 39 ilçesinde sivrisinek larvalarının geliştiği kaynaklardan 501 örnek alınmıştır. Sivrisinek larvalarının alındığı ilçeler ve örnek sayısı Resim 1'de gösterilmiştir.

Laboratuvara getirilen sivrisinek yumurtaları, larvaları ve pupaları 24 °C'de tutularak larvaların III. ve IV. evre, pupaların erişkin sivrisineklere dönüşmesi sağlanmıştır. Larvalar ve erişkin sivrisinekler stereomikroskop (Olympus SZX10) ve ışık mikroskop (Zeiss AX10) ile incelenerek tiplendirilmiştir (1, 3, 4).

B. sphaericus [(H5a5b, Strain 2362) (VectoLex WDG, US)], *B. thuringiensis* [(H-14) (VectoBac WDG,US)] ve *B. sphaericus* (H5a5b, Strain 2362) - *B. thuringiensis israelensis* [(H-14, Strain AM65-52) (VectoMax G, US)] suşları larvasit olarak kullanılmıştır. Liyofilize *Bacillus* preparatlarından, içerisinde 100 ml Unat'ın balıklı buyyonu (10) bulunan 250 ml beherlere ekimler yapılmış ve 37 °C'lik etüvde 48 saat tutulmuştur. Etüvden çıkarılan kültürlerin konsantrasyonu BD Phoenix cihazı ile nefelometrik yöntemle ölçülerek 2 McFarland (MF) ($6,1 \times 10^8$ CFU/ml) ve 4 MF ($12,6 \times 10^8$ CFU/ml) bakteri bulunacak şekilde ayarlanmıştır.

C. pipiens türüne ait III. ve IV. evre larvalar, içerisinde 250 cc su bulunan (pH= 7 ± 02 olan 48 saat dinlendirilmiş musluk suyu) kaplara süzgeç ile 100

adet olarak aktarılmıştır. *B. sphaericus*'un 200 g/ha, 300 g/ha ve 400 g/ha; *B. thuringiensis* H-14 200 g/ha, 300 g/ha ve 400 g/ha; *B. sphaericus* (H5a5b, Strain 2362) - *B. thuringiensis israelensis* (H-14, Strain AM65-52) karışımının 5.000 g/ha'lık, kültürlerin ise $6,1 \times 10^8$ CFU/ml ve $12,6 \times 10^8$ CFU/ml konsantrasyonları kullanılmıştır. Aynı zamanda her deney için bir kaptaki 100 adet larva kontrol için bulundurulmuştur. 24 saat etki süresinde larvaların ölü ve canlı olanları sayılmıştır. Deneyler oda ısısında (24 °C) yapılmıştır (11, 12).

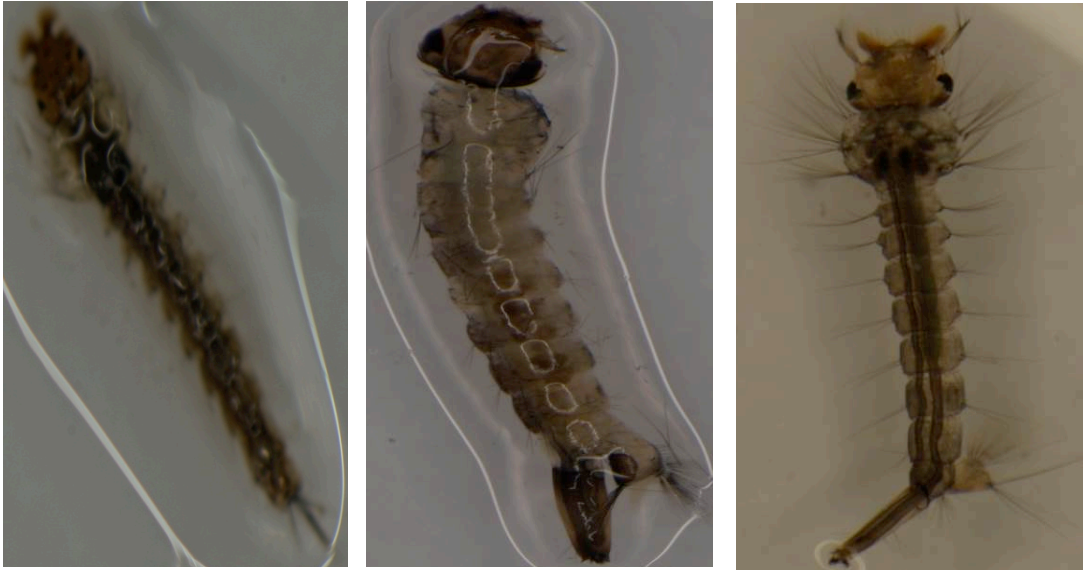
BULGULAR

İstanbul'un 39 ilçesinden sivrisinek larvalarının geliştiği 501 kaynaktan alınan örneklerden sadece Büyükçekmece, Silivri ve Ümraniye ilçelerinde Anophel ve Aedes cinsi sivrisineklerin larvaları görülmüştür. İstanbul'un tüm ilçelerinde ise *C. pipiens* türü sivrisinek larvalarına rastlanmıştır (Resim 2).

Bacillus liyofilize preparatları ve kültürlerinin $12,6 \times 10^8$ CFU/ml konsantrasyonlarda kullanıldığı deneylerde larvalar 50. dakikada, $6,1 \times 10^8$ CFU/ml'lik konsantrasyonunda kullanıldığı deneylerde ise 60. dakikada ölmeye başlamıştır.

50. dakikada *B. sphaericus*'un 4 MF öldürme oranı, 400 g/ha'dan daha yüksektir (%20 - %14). *B. thuringiensis*'in ki ise 300 g/ha ve 400 g/ha'dan daha düşük ancak 200 g/ha ile aynıdır (%20). *B. sphaericus* - *B. thuringiensis* karışımı 4 MF öldürme oranı, 5.000 g/ha konsantrasyonundan daha fazladır (%42 - %40).

Liyofilize preparatlardan 50. dakikada öldürme oranı en yüksek olanı *B. sphaericus* - *B. thuringiensis israelensis* 5.000 g/ha karışımıdır. Bu karışım kullanıldığında larvaların toplu halde öldüğü görülmüştür. Larvalarda ölümün başlangıç - bitiş süresinde değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Değişik yoğunlukta kullanılan biyolojik ajanların larvaların tamamını 6. saatte öldürdüğü tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular Tablo 1'de özetlenmiştir.



Resim 2. İstanbul'un 39 ilçesinde sivrisinek üreme alanlarından toplanan *Anopheles* (a), *Aedes* (b), *Culex* (c) larvaları görünümleri, Nisan 2013

Tablo 1. İstanbul'un 39 ilçesinden toplanan *Culex* larvalarına karşı larvasit olarak kullanılan farklı *Bacillus* türlerinin etkileri, Nisan 2013

Larvasitler	Kullanılan Oranlar	Canlı Larva Sayısı Başlangıç	Ölü Larva Sayısı		
			50. dak	60. dak	6. saat
<i>B. sphaericus</i>	200 g/ha	100	8	8	100
	300 g/ha	100	10	10	100
	400 g/ha	100	14	14	100
	2 MF CFU/ml	100	0	20	100
	4 MF CFU/ml	100	20	20	100
<i>B. thuringiensis</i>	200 g/ha	100	20	20	100
	300 g/ha	100	30	30	100
	400 g/ha	100	40	40	100
	2 MF CFU/ml	100	0	20	100
	4 MF CFU/ml	100	20	20	100
<i>B. sphaericus</i> + <i>B. thuringiensis</i>	5000 g/ha	100	40	40	100
	2 MF CFU/ml	100	0	10	100
	4 MF CFU/ml	100	42	42	100

TARTIŞMA

Gelişmekte olan ülkelerde pestisitlerin en az %90'ı tarım alanında, %10'u kadarı da vektörlerin kontrollünde kullanılmaktadır. Bu da insan sağlığı ve çevre açısından tehlike oluşturmaktadır. Çeşitli

ülkelerde ihtiyaçtan fazla üretilen pestisitlerin stokları, üretiminden daha zor ve pahalıya mal olmaktadır. Bunun doğal sonucu olarak da nehirler, körfezler, toprak ve su kaynakları uzun süreli kirlenmekte; suda yaşayan canlıları ve karada yaşayan

böcekleri, kuşları ve toprağın mikroflorasını etkileyerek ekolojik dengeyi bozmaktadır. Bu canlılar nesillerini sürdürebilmek için pestisitlere karşı direnç geliştirirler. Günümüzde insektisitlere karşı direnç her tür vektörde az çok görülmektedir. Direncin yaygınlaşmasında tarımda büyük oranda kullanılan pestisitlerin etkisi vardır. Sivrisineklerin insektisitlere karşı direnci larva, erişkin veya her iki evrede de olabilir. Larva evresinde direnç genellikle tarımda kullanılan pestisitlerden, erişkin evresindeki direnç ise erişkin sivrisinek mücadelesinde kullanılan aerosollerden kaynaklanmaktadır. Sivrisinekler; dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT), dieldrin, benzen heksaklorür (BCH) gibi organik klorlu insektisitlere, organik fosforlu ve karbamatlı insektisitlere çoklu direnç oluşturabilmektedirler. Dünya Sağlık Örgütü'nün 1980 yılında yayımladığı raporda halk sağlığında ve veterinerlikte öneme sahip 51 anofel, 42 kuleks cinsinin bir veya daha fazla insektisite karşı dirençli olduğunu belirtmiştir (13). Bunlardan dolayı bir insektisit alınmadan önce kullanılacağı bölgedeki sineklere karşı etkili olup olmadığına bakılmalıdır.

Sivrisinek mücadelesinde insektisitler yanı sıra biyolojik yöntemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. İstanbul'da sivrisinek larvalarının mücadelesinde biyolojik olarak; *Gambusia affinis* türü balıklar ve *Bacillus* cinsi bakteriler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sivrisinek larvalarının kontrolünde kullanılan *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* sporlu bakteriler olup güçlü toksin oluşturan türlerdir. Mide zehri olan toksinler sadece larvalar tarafından yutulduklarında etkili olup; pupa, erişkin ve yumurtalara etkisizdirler (1, 2, 5-9).

Unat ve ark. 1994 yılında İstanbul'un Altınşehir, Halkalı ve Yedikule bölgelerinden topladıkları sivrisinek larvalarının *C. pipiens molestus* (Farks) türüne ait olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada özellikle anofel türü sivrisineklerin larvaları ve erişkinleri araştırılmış ancak Beykoz ve Çatalca ilçelerinde Karadenize yakın Karaca Köy, Kıyı Köy ve Riva bölgesinde tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da *Anophele* ve *Aedes* cinsi sivrisineklere; Büyükçekmece, Silivri ve Ümraniye ilçelerinde rastlanmıştır (11).

İstanbul'un coğrafik yapısı ve iklim koşulları sivrisineklerin üremesi için uygundur. Ancak İstanbul'un 39 ilçesinden sivrisinek larvalarının geliştiği kaynaklardan alınan 501 örnekten sadece Büyükçekmece, Silivri ve Ümraniye ilçelerine ait örneklerde *Anophele* ve *Aedes* cinsi sivrisineklerin larvaları görülmüştür. Anofel cinsi sivrisineğin larvaları genellikle organik madde bulunmayan temiz, berrak ve durgun sularda gelişir. İstanbul'da bulunan temiz durgun sular aşırı, düzensiz yapılaşma ve artan nüfus yüzünden hızla kirlenmekte ve yok olmaktadır. İstanbul'un tüm ilçelerinde ise her türlü durgun suda üreyen *C. pipiens* türü sivrisinek larvalarına baskın olarak rastlanmıştır (Resim 2).

Çalışmamızda, *C. pipiens* türüne ait III. ve IV. evre larvalarına karşı *B. sphaericus* (H5a5b, Strain 2362), *B. thuringiensis israelensis* (H-14, Strain AM65-52) ile *B. sphaericus* - *B. thuringiensis* kombinasyonu preparatlarının ve bu preparatların 4 MF (12,6x10⁸ CFU/ml) konsantrasyondaki kültürlerinin etkili olduğu bulunmuştur. *Bacillus* 4 MF konsantrasyondaki kültürlerinin liyofilize preparatlardan daha etkili olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin; liyofilizasyon işlemi esnasında bakterilerin bir kısmının canlılığını kaybetmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Oysa bakteriler 48-72 saatlik kültürlerde canlılığını pek kaybetmezler. *B. sphaericus* ve *B. thuringiensis* H-14 içeren kültürde üreyen bakteri yoğunluğu azaldığında ölümün daha geç başladığı, ancak larvaların tümünün ölmesi için geçen sürede bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir. Unat ve ark. 1994 yılında İstanbul'un Altınşehir, Halkalı ve Yedikule Bölgelerinden, Edirne'nin Enez İlçesi'nden toplanan *C. pipiens molestus* (Farks) larvaları ile yaptıkları iki farklı çalışmada; ABATE (Temephos), ACTELLIC (Primiphos methyl) ve malathion'un *C. pipiens molestus* (Farks) larvalarına karşı %100 etkili olduğunu bulmuşlardır (11, 12). Yaptığımız literatür taramalarına göre Unat ve ark.'nın bu çalışmalarından sonra İstanbul'da insektisitlerle ilgili yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Aldemir ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmalarda Tambro® 500 EC (518 g/l temephos) ve Ekolarv® 500 EC

(500 g/l temephos) laboratuvarında ve Ankara'nın Gölbaşı İlçesi, Mogan Gölü doğal habitatında *A. sachoravi* ve *Culex pipiens* larvalarına karşı etkili bulmuşlardır (14).

Akiner ve ark. yaptıkları çalışmalarda 2007 yılında malathion and propoxur için tüm *A. maculipennis* popülasyonları ölüm oranlarının şüpheli direnç kategorisinde yer aldığını ortaya koymuşlardır. 2008 yılında Trakya Bölgesi popülasyonları (Avanoz, Tatarköy, Dereköy) şüpheli direnç kategorisinde yer alırken Birecik, Beyşehir ve Çankırı popülasyonlarının dirençsiz kategoride olduğunu belirtmişlerdir (6).

Bursalı ve ark. (2013), Aydın, Burdur, Muğla, Isparta ve İzmir'den toplanan *A. maculipennis* kompleksi popülasyonlarında DDT (%4)'yi %64,6, deltametrin (%0,025)'i %90,4 ve permetrin (%0,75)'i %74,8 etkili olarak bulmuşlardır. Kdr (knock-down resistance) mutasyonla 97 örneğin Aydın ve Burdur'da sadece birer adet *A. sachoravi*'de kdr direnci saptamışlardır (15).

Ulaşabildiğimiz kaynaklara göre ülkemizde sivrisineklerdeki direnç ile ilgili çalışmalar (6, 11, 12, 14, 15) genellikle insektisitler kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında sivrisineklerin insektisitlere karşı direnç geliştirdiği ortaya konmuştur. Ancak İstanbul'da biyolojik ajanlar ile de yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Oysa günümüzde İstanbul'da sivrisineklerin larvaları ile mücadelede genellikle *Gambusia affinis* türü balıklar ve *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* türü sporlu bakteriler gibi biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu bakterilere karşı sivrisinek larvalarının bir direnç oluşturup oluşturmadığı bilinmemektedir. Yaptığımız çalışmada *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* - *B. thuringiensis israelensis* bakterileri kombinasyonu *C. pipiens* türüne ait III. ve IV. evre larvalarına karşı etkili bulunmuştur.

Leroux ve ark. (1997) *B. sphaericus*'a karşı *C. pipiens* larvalarının değişik direnç mekanizmalarını çalışmıştır (7). Nielsen-LeRoux ve ark. (2001) *B. sphaericus* Strain 2362 karşı *C. pipiens* larvalarının geliştirdiği değişik çapraz direnç seviyelerini ortaya koymuşlardır (8). Sun ve ark. 2001 yılında yaptıkları çalışmalara göre *C. pipiens* larvalarının *B. sphaericus* ve *B. thuringiensis israelensis* toksinlerine karşı direnç geliştirdiklerini bildirmişlerdir (9). Bundan dolayı sivrisinek larvaları ile mücadelede sporlu bakteriler kullanılsa bile, bu bakteriler alınmadan ve kullanılmadan önce mutlaka sivrisinek larvalarının bu ajanlara karşı direncinin olup olmadığı test edilmiştir.

Biyolojik kontrol, vektör mücadelesinde tamamlayıcı ve ekonomik bir bölümü oluşturmaktadır. Sivrisinek larvaları ile mücadelede kullanılan *B. sphaericus* ve *B. thuringiensis* bakterilerini dışarıdan satın almak yerine Unat'ın tarif ettiği balıklı besiyerinde üretilerek daha da ekonomik hale getirilebilir. Çalışmamızda da *Bacillus* kültürleriyle elde edilen sonuçların liyofilize sonuçlarla benzer hatta daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

Hedef dışı canlılar için nispeten güvenilir oluşu biyolojik yöntemleri değerli kılmaktadır. Biyolojik kontrol temel olarak bu tabii düzenleyici sistemin insanın lehine manipülasyonundan ibarettir.

Sonuç olarak ülkemizde sivrisinek larvalarının kontrolünde kullanılan biyolojik ajanlar ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Oysa yurt dışında yapılan çalışmalarda biyolojik ajanlara karşı direnç varlığı gösterilmiştir. Bundan dolayı ülkemizde sivrisineklerin larvaları ile mücadelede kullanılan *B. sphaericus* ve *B. thuringiensis*'e karşı direncin olup olmadığının daha geniş çalışmalar ile araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

TEŞEKKÜR

İstanbul Büyükşehir Belediyesi Sağlık ve Sosyal Hizmetler Daire Başkanlığı çalışanlarına verdikleri destek ve işbirliği için teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Unat EK, Samastı M. (Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M). Unat'ın Tıp Parazitolojisi, İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. V. baskı, Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı yayınları, 1995; 15: 140-57.
2. Daldal N, Atambay M. Sivrisinekler Familya Culicidae Stephens, 1829). Özcel M, Özbek Y, Ak M. Editörler. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir, 2007; 811-5.
3. Merdivenci A. Türkiye Sivrisinekleri. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. 1984.
4. Merdivenci A. Medikal Entomoloji. 3. Baskı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 1981; 81-116.
5. Yarsan E. Vektör mücadelesinde biyopestisitler. Türk Hij Den Biyol Derg, 2007; 64(1): 61-70.
6. Akıner MM. Malathion and propoxur resistance in Turkish populations of the *Anopheles maculipennis* (Diptera: Culicidae) and relation to the insensitive acetylcholinesterase. Türk Parazitol Derg, 2014; 18: 111-5.
7. Leroux CN, Pasquier F, Charles JF, Sinerge G, Gaven B, Pasteur N. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. J Med Entomol, 1997; 34(3): 321-7.
8. Nielsen-LeRoux C, Rao DR, Murphy JR, Carron A, Mani TR, Hamon S, Mulla MS. Various Levels of Cross-Resistance to *Bacillus sphaericus* Strains in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Colonies Resistant to *B. sphaericus* Strain 2362. Appl Environ Microbiol, 2001; 67(11): 5049-54.
9. Sun F, Yuan Z, Li T, Zhang Y, Yu J, Pang Yi. Reduction of resistance of *Culex pipiens* larvae to the binary toxin from *Bacillus sphaericus* by coexpression of cry4Ba from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with the binary toxin gene. World J Microbiol Biotech, 2001; 17: 385-9.
10. Unat EK. Tıp Bakteriolojisi ve Virolojisi Cilt 1, II. Baskı. Dergah Yayınları, İstanbul, 1986: 75-6.
11. Unat EK, Çalışır B, Polat E. İstanbul'un Altınşehir, Halkalı ve Yedikule bölgelerinden toplanan *Culex pipiens molestus* (Farks) larvalarının kullanılmakta olan insektisidlere karşı duyarlılığı. Türk Parazitol Derg, 1994; 18(4): 503-6.
12. Unat EK, Çalışır B, Polat E. Enez bölgesinden toplanan *Culex pipiens molestus* (Farks) larvalarının kullanılmakta olan insektisidlere karşı duyarlılığı. Türk Parazitol Derg, 1994; 18(4): 507-10.
13. <http://www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-73090/h/turreporttur.pdf> [cited 2015 Aralık 524].
14. Aldemir A, Ege M. Temephos aktif maddeli iki insektisitinin sivrisinek (Diptera: Culicidae) larvaları üzerindeki etkinlik ve kalıcılığı. Türk Parazitol Derg, 2005; 29(2): 126-30.
15. Bursalı F, Şimşek FM. *Anopheles maculipennis* kompleksi populasyonlarında DDT, deltametrin ve permetrin insektisitlerine karşı direnç düzeyi ve kdr (knock-down resistance) mutasyonu ilişkisi. 18. Ulusal Parazitol Kong, Denizli, 2013; 139-40.

Fascioliasis tanısında hekimlerde ERCP yerine serolojik test farkındalığı yaratmak: Olgu sunumu

To create awareness of serological tests instead of ERCP for fascioliasis diagnosis among physicians: A case report

Ayşegül AKSOY-GÖKMEN¹, Bayram PEKTAŞ¹, Mehmet CAMCI², Celal BUĞDACI¹,
Erkan YULA¹, Selçuk KAYA¹, Mustafa DEMİRCİ¹

ÖZET

Fascioliasis, insanda nadir rastlanan karaciğer ve safra yolu hastalığıdır. *Fasciola hepatica* metaserkarya içeren su bitkilerinin yenmesi veya kontamine suların içilmesi ile bulaşmaktadır. Fascioliasis tanısında, dışkıda parazit yumurtasının saptanması esas iken serolojik ve radyolojik testler de önemli yer tutmaktadır. Yetmiş beş yaşında bir hasta, bir aydır karın ağrısı bulantı kusma iştahsızlık şikayetiyle kliniğimize başvurdu. Bir yıl öncesinde kolesistektomi hikayesi olan hastanın %8 eozinofili dışında rutin biyokimyasal parametreleri normaldi. Koledokta taş olup olmadığını görmek ve karın ağrısı etiolojisini ortaya koymak için endoskopik ultrasonografi planlandı. Hastanın koledok kanalında parazit ile uyumlu görüntü olması üzerine tanı ve tedavi amaçlı endoskopik retrograt kolanjiopankreatografi (ERCP) yapıldı. ERCP ile koledok kanalından iki adet *F. hepatica*'yla uyumlu parazit çıkartıldı. Postoperatif, iki doz 10 mg/kg triklabendazol kullanan hastanın, iki hafta sonra yapılan kontrol muayenesinde şikayetlerinin tamamen geçtiği gözlemlendi. Girişimsel yolla tanı ve tedavisini uyguladığımız fascioliasise bağlı bir akut kolanjit vakası ve bununla ilgili literatürün gözden geçirilmesini sunuyoruz.

Anahtar Kelimeler: Fascioliasis, endoskopik retrograt kolanjiopankreatografi (ERCP)

ABSTRACT

Fascioliasis is a liver and biliary tract disease, which is rare in human. It is transmitted by consuming water plants containing *Fasciola hepatica* metacercariae or drinking contaminated water. Detection of parasite eggs in stool and serological/radiological tests are significant in fascioliasis diagnosis. A female patient who is 75-years-old applied to our clinic with one month duration of abdominal pain, nausea, vomit and anorexia. Routine biochemistry parameters of the patients with cholecystectomy were normal except her 8% eosinophilia. Endoscopic ultrasonography was planned in order to determine abdominal pain etiology and if there was a stone in ductus choledochus. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) was applied for diagnosis and treatment purpose after the view of parasite-compatible view in ductus choledochus of the patient. Two parasites compatible with *F. hepatica* were taken out of ductus choledochus by ERCP. It was observed that the complaints of the patient, who was postoperatively treated with two doses of 10 mg/kg triclabendazole, was completely passed in control examination after two weeks. We present an acute cholangitis case depends on fascioliasis that we interventional diagnosed and treated, and the review of literatures on this case.

Key Words: Fascioliasis, endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP)

¹ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, İZMİR

² İzmir Bozyaka Eğitim Araştırma Hastanesi, Gastroenteroloji Bölümü, İZMİR



İletişim / Corresponding Author : Ayşegül AKSOY-GÖKMEN

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, İZMİR

Tel : +90 506 359 20 16

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

Geliş Tarihi / Received : 12.11.2015

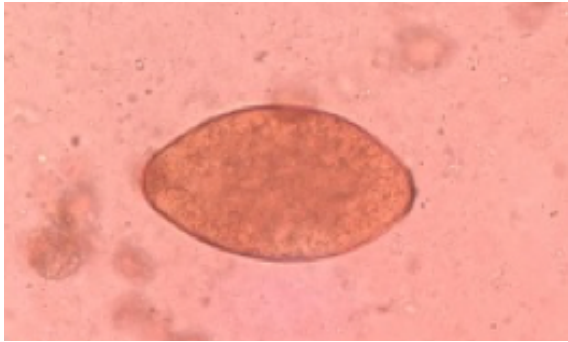
Kabul Tarihi / Accepted : 22.12.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.93196

Aksoy-Gökmen A, Pektaş B, Camcı M, Buğdacı C, Yula, Kaya S, Demirci M. Fascioliasis tanısında hekimlerde ERCP yerine serolojik test farkındalığı yaratmak: Olgu sunumu. Türk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 157-60.

GİRİŞ

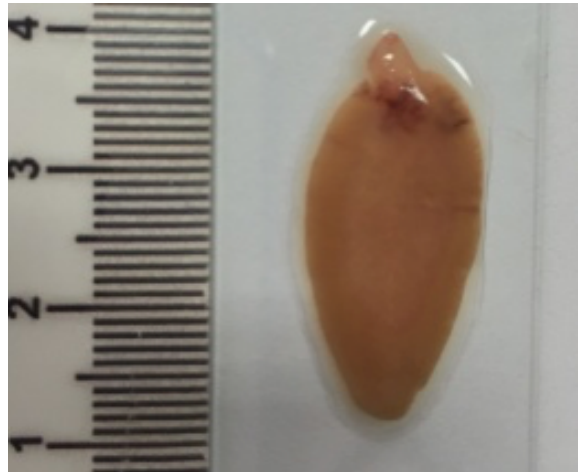
Fascioliasis insanda nadir rastlanan karaciğer ve safra yolu hastalığıdır. *Fasciola hepatica* metaserkarya içeren su bitkilerinin yenmesi veya kontamine suların içilmesi ile bulaşmaktadır (1). Bağırsaklardan periton yoluyla karaciğere göç eden jüvenil parazitler safra yollarında erişkin hale geçer. Akut enfeksiyonda (karaciğer dönemi) ateş, hepatomegali, karın ağrısı, kilo kaybı, anemi ve eozinofili görülür. Kronik olgularda (safra kanalı dönemi) tıkanma sarılığı ve kolanjit hatta siroza kadar giden tablolara rastlanabilir. Kliniğinin nonspesifik olması, ayrıca nadir görülen hastalık olmasından dolayı tanıda akla gelmemesiyle sık atlanan hastalıklar grubundadır ve bu nedenle de tanı zorlaşır (2). Fascioliasis tanısında, dışkıda parazit yumurtasının saptanması ve serolojik testler önemli yer tutmaktadır. Radyolojik testler arasında girişimsel olmayan ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT) tanıda yol göstericidir. Bununla birlikte hem tanı hem de tedavi olanağı sağlayabilen manyetik rezonans kolanjiopankreatografi (MRCP), endoskopik ultrasonografi (EUS), endoskopik retrograt kolanjiopankreatografi (ERCP) gibi yöntemler de tanıda kullanılabilir (3). Özellikle serolojik testlerin kullanılmadığı olgularda, ERCP ile erişkinlerin gösterilmesi ülkemizde hala en yaygın tanı yöntemlerinden birisidir (1-4). Bu olgu sunumunda; karın ağrısı, ateş ve eozinofilisi olan olgularda *F. hepatica*'nın akılda tutulmasına; bu hastalarda invaziv bir işlem olan ERCP yerine serolojik yöntemler (IHA veya ELISA) ile fascioliasis tanısı konulabileceğine ve pozitifliği durumunda triklabendazol ile tedavi sağlanabileceğine dikkat çekmek amaçlanmıştır.



Şekil 1. Koledok sıvısında *Fasciola hepatica* yumurtası X 200 büyütmede

OLGU SUNUMU

Yetmiş beş yaşında Van'da ikamet eden kadın hasta bir aydır karın ağrısı, bulantı, kusma, iştahsızlık şikayetiyle İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniğine başvurdu. Hastanın özgeçmişinde bir yıl önce dış merkezde kolesistektomi operasyonu dışında herhangi bir özellik yoktu. Hemogramında %8 eozinofilisi olan hastanın rutin biyokimyası normaldi. Hastanın epikrizinde kolesistektomi olduğu fakat intrahepatik ve koledok kanallarının bırakıldığı belirtiliyordu. Bir ay önce karın ağrısı nedeniyle dış merkeze giden hastanın yapılan USG'sinde intrahepatik ve koledok kanalının genişlediği ve taş şüphesi olduğu söylenmiş. Bunun üzerine hastanemiz Gastroenteroloji Polikliniğine başvuran hastaya koledokta taş olup olmadığını görmek ve karın ağrısı etiyolojisini belirlemek için EUS planlandı. Hastanın koledok kanalında parazit ile uyumlu görüntü olması üzerine tanı ve tedavi amaçlı ERCP yapıldı. ERCP ile sfinkterotomi ve balonla koledok kanalından iki adet *F. hepatica*'yla uyumlu parazit çıkartıldı. Parazitoloji laboratuvarına gönderilen koledok sıvısı ve erişkin parazit *F. hepatica* erişkini ve yumurtası olarak rapor edildi (Şekil 1, 2). Triklabendazol tedavisi 10 mg/kg gün tek doz verildi ve ilacın iki gün sonra tekrarlanması söylenerek hasta taburcu edildi.



Şekil 2. ERCP ile çıkarılan *Fasciola hepatica* erişkin formu

İki hafta sonra yapılan kontrol muayenesinde hastanın şikayetlerinin tamamen düzeldiği görüldü.

TARTIŞMA

Fascioliasis dünyada 2,4 milyon insanı etkileyen ve 180 milyon insanın risk altında olduğu zoonotik bir hastalıktır (3). Dünyada Afrika, Batı Avrupa ve Latin Amerika'da sık gözlenirken ülkemizde Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi, Akdeniz ve Göller Bölgesinde olduğu bildirilmiştir (2, 3). Ülkemizdeki sıklığı %1'in altında bildirilmesine karşın, Doğu Anadolu'da yapılan bir seroprevalans çalışmasında %2,78 olarak bulunmuştur (3, 4). Demirci ve ark.'larının (5) Isparta bölgesinde yaptığı çalışmada *F. hepatica* seroprevalansı eozinofilik grupta %6,1 iken non-eozinofilik kontrol grubunda %0,9 olarak bulunmuştur.

Fascioliasis kliniğinin özgül olmayan bulgular içermesi tanıdaki zorluklardan birisidir. Klasik hastalık triadı olarak bilinen karın ağrısı, ateş ve eozinofili hastalarda değişkenlik gösterebilmektedir. Hastalığın üç klinik fazı bulunmaktadır. Hepatik faz, latent faz ve safra yollarına yerleşerek kolestaz ve kolanjit bulgularının geliştiği kronik fazdır (6). Bu nedenle karın ağrısı, ateş ve eozinofili olan hastalarda özellikle de endemik bölgede yaşıyorsa fascioliasis akla getirilmeli, akut fazda hastalık teşhis edilip kolanjit ve kolestaz gibi komplikasyonların önüne geçilmelidir (2).

Karın ağrısı ve eozinofili şikayeti ile hastanemize başvuran bu hastaya tanı ve tedavi amaçlı EUS'ta parazitten şüphelenilmesi üzerine bilier obstrüksiyon olmadığı halde, ileri bir merkez olmamız, rutinde sıklıkla ERCP uygulamamız nedeniyle daha maliyetli, invaziv işlem olan ERCP yapılmıştır. Özellikle akut fazda atlanan hastaların bilier obstrüksiyonla geldiği ve bu hastalar için invaziv bir işlem olan ERCP yapılmak zorunda kalındığı olgular bildirilmiştir (Tablo 1).

Ülkemizde literatürde saptayabildiğimiz kadarıyla 2012 yılından bu yana 50'den fazla fascioliasis olgusu bildirilmiştir. Fakat bunların 13'üne ERCP yapılırken

diğerlerine seroloji ve ERCP dışı görüntüleme yöntemleri ile tanı konulmuştur. On üç olgunun ikisine safra yolları malignite şüphesiyle ERCP yapılırken 11'ine bilier obstrüksiyon tanısıyla ERCP uygulanmıştır (Tablo 1) (1, 2, 7-13). Söz konusu olguların tanısında serolojik yöntemlerin (ayırıcı tanıda düşünülmemesi, serolojik yöntemlere ulaşamaması, uygulanmaması gibi nedenlerle) kullanılmadığı görülmektedir.

Fascioliasis tanısında fizik muayene, dışkı mikroskopisi, serolojik yöntemler ve görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (2, 6, 8). Kesin tanısı, dışkıda ya da duodenal aspiratta parazit yumurtalarının saptanması ile kensa da parazitin az sayıda yumurta üretmesinden dolayı konvansiyonel laboratuvar yöntemleri ile tanı şansı düşüktür (6, 12). Fizik muayene ve klinik olarak şüphe edilen hastalardan ilk olarak dışkı mikroskopisi, seroloji ve USG istenmelidir (2). Serolojik olarak IHA, IFA, ELISA, lateks aglütinasyon yöntemleri kullanılmaktadır (5). Kaya ve ark. (14), fascioliasis tanısında ELISA testinin tanısal değerini saptamak için yaptıkları bir çalışmada testin duyarlılığını % 100, özgüllüğünü ise %95 olarak saptamışlardır. Fakat seroloji hakkında hekimlerin yeterli derecede bilgilendirilmemiş olmaları ve her merkezde bu imkanın olmaması nedeniyle seroloji ayağı

Tablo 1. Ülkemizde 2012 yılından bu yana ERCP ile tanı konarak literatüre geçmiş fasiyoliazis vakaları

Yazar	Yılı	Kaynak	İl	Olgu sayısı
Ünal ve ark.	2015	7	Giresun	1
Şenates ve ark.	2014	8	Diyarbakır	1
Bektaş ve ark.	2014	1	Diyarbakır	1
Ulger ve ark.	2014	9	Diyarbakır	1
Yılmaz ve ark.	2014	10	Afyon	1
Odabaşı ve ark.	2014	3	İstanbul	1
Emir ve ark.	2013	11	Elazığ	1
Uyanıkoğlu ve ark.	2013	2	Şanlıurfa	1
Boğa ve ark.	2012	12	İstanbul	1
Sayılr ve ark.	2012	13	İstanbul	4
Toplam				13

genelde atlanmaktadır. Konu hakkında klinisyen ve parazitoloğun işbirliği içinde olmaması, ilgili serolojik testi çalışan laboratuvara ulaşılamaması, fascioliasis ile ilgili tanı metodunun rehberlerde tam olarak yer almaması aksaklıkların diğer nedenleri arasındadır.

Serolojik yöntemlerin invaziv olmaması, risk içermemesi ve görüntüleme yöntemlerine göre ekonomik olması nedeniyle klinik olarak şüphe edilen hastalardan tanıda kullanılması hem hasta hem de hekim yararına olabilir. Özellikle ES-ELISA hızlı duyarlı ve özgül bir yöntem olarak bildirilmiştir (14). Bununla birlikte serolojik testlerinde bazı dezavantajları vardır. Akut ve kronik enfeksiyon ayırımı yapılamadığı gibi, diğer trematodlar yanında, *E. granulosus* ve

E. multilocularis gibi sestodlarla da çapraz reaksiyon verebilmektedir (14).

Fascioliasisli hastalarda eğer bilier obstrüksiyon varsa görüntüleme yöntemlerinden ERCP altın standarttır (11). ERCP, tanıdaki yararının yanında koledok içeriğini temizleyerek ve sfinkterotomi yaparak tedavi olanağı da sağlamaktadır (11). Fakat invaziv işlem olması, deneyimli kişi ve ekipmana ihtiyaç duyması, safra yollarının perforasyonu gibi komplikasyonlarının olması dezavantajdır.

Bu nedenle özellikle eozinofilisi olan hastalarda klasik triad sorgulanmalı ve bilier obstrüksiyon ve kolanjit yoksa günümüzde fascioliasis tanısının serolojik olarak konabildiği de akılda bulundurulmalıdır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Bektaş R, Yalçın K, Çiçek M. Cholestasis caused by *Fasciola gigantica*. Türkiye Parazit Derg, 2014; 38: 201-4.
2. Uyanıkoğlu A, Demir K, Akyüz F, Ermiş F, Beşışık F, Boztaş G. Hepatik kitle ile prezente olan ERCP ile ekstraksiyonu yapılan *F. hepatica*: olgu sunumu ve literatürün gözden geçirilmesi. Endoskopi, 2013; 21(2): 52-4.
3. Odabaşı HM, Yıldız MK, Eriş C, Abuoğlu HH, Günay E, Özkan E, et al. *Fasciola hepatica* tanısında endosonografinin rolü. Endoskopi, 2014; 22(1): 21-4.
4. Kaplan M, Kuk S, Kalkan A, Demirdağ K, Özdarendeli A. Elazığ yöresinde *F. hepatica* seroprevalansının araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2001; 36: 337-42.
5. Demirci M, Korkmaz M, Kaya S, Kuman A. Fascioliasis in eosinophilic patients in the Isparta Region of Turkey. Infection, 2003; 31(1): 15-8.
6. Mıman Ö, Özkeçeci T, Okur N, Çiftçi İH, Polat C. Nadir bir tıkanma sarılığı sebebi: Fascioliasis. Türkiye Parazit Derg, 2010; 34: 190-2.
7. Ünal N, Çaycı YT, Ecemiş Ö, Bektaş A, Hökelek M. *Fasciola hepatica*'nın endoskopik olarak çıkarılması: bir vaka. Türk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(2): 139-42.
8. Şenates E, Doğan A, Şenates BE, Bodakçi E, Bekçibaşı M. An incidental case of biliary fascioliasis mimicking cholangiocellular carcinoma. Infez Med, 2014; 22(4): 313-6.
9. Ulger BV, Kapan M, Boyuk A, Uslukaya O, Oguz A, Bozdağ Z, et al. *Fasciola hepatica* infection at a University Clinic in Turkey. J Infect Dev Ctries, 2014; 8(11): 1451-5.
10. Yılmaz B, Köklü S, Gedikoğlu G. Hepatic mass caused by *Fasciola hepatica*: a tricky differential diagnosis. Am J Trop Med Hyg, 2013; 89(6): 1212-3.
11. Emir S, Yazar MF, Sözen S, Altınsoy HB, Bulut HT, Özkan Z. *Fasciola hepatica*'ya bağlı olarak gelişen akut kolanjit ve pankreatit: olgu sunumu. Meandros Med Dent J, 2013; 14(3): 27-9.
12. Boğa S, Köksal AR, Altınkaya E, Özdoğan O, Ergün M, Alkım CA. Nöropati ile başvuran *Fasciola hepatica* olgusu. Akad Gastroenterol Derg, 2012; 11 (2): 84-6.
13. Sayilir A, Ödemis B, Köksal AS, Beyazit Y, Kayacetin E. Image of the month: *Fasciola hepatica* as a cause of cholangitis. Am J Gastroenterol, 2012; 107(5): 655.
14. Kaya M, Beştaş R, Çiçek M, Önder A, Kaplan MA. The value of micro-ELISA test in the diagnosis of *Fasciola hepatica* infection. Türkiye Parazit Derg, 2013; 37, 23-7.

Aşı epidemiyolojisi: Aşı etkililiği için epidemiyolojik çalışma tasarımları

Vaccine epidemiology: Epidemiologic study designs for vaccine effectiveness

Can Hüseyin HEKİMOĞLU¹

ÖZET

Yeterli etkinliği gösterilmiş ve lisans almış bir aşının bir toplumda uygulanmasıyla ilgili hastalıktan korunma düzeyi ideal olmayan saha koşullarında, gözlemsel epidemiyolojik çalışmalarla belirlenen 'aşı etkililiği' ile ölçülür. Toplumda ilgili hastalık insidandaki azalmanın uygulanan aşılamadan mı, aşılama dışındaki nedenlerden mi kaynaklandığının belirlenmesi için, aşı etkililiği süreyansın bir parçası olarak rutin izlenmelidir. Bu nedenle aşı etkililiği çalışmaları halk sağlığı eylemleri için önemli bir role sahiptir. Kohort ve olgu kontrol çalışmaları gibi klasik gözlemsel epidemiyolojik çalışmalara alternatif olarak geliştirilen çeşitli çalışma tasarımları da aşı etkililiğini belirlemek için kullanılabilir. İlgili aşı ve hastalığa ve mevcut olanaklara göre kohort ve olgu kontrol çalışmalarının yanı sıra indirekt kohort yöntemi, test negatif olgu kontrol tasarımı, olgu olgu çalışması, tarama yöntemi, hane halkı temas çalışması gibi alternatif tasarımlardan uygun olan kullanılarak aşı etkililiği belirlenebilir. Bu tasarımlardan başka olgu kohort çalışması, yuvalandırılmış olgu-kontrol çalışması, insidans yoğunluğu olgu kontrol tasarımı gibi farklı alanlarda kullanılmakta olan tasarımlar da aşı etkililiğini belirlemek için seçilebilecek tasarımlar arasındadır. Ancak bu tasarımların hiç birinin mükemmel olmadığı ve çeşitli genel varsayımların yanı sıra tasarıma göre farklı varsayımlar altında yürütülmeleri gerektiği unutulmamalıdır. Gerekli varsayımların yerine getirilmediği ölçüde aşı etkililiği tahmini gerçek değerinden uzaklaşır. Aşılı veya aşısız

ABSTRACT

Protection level against a disease of interest by application of a licenced vaccine whose effectiveness has been proved in a population is measured by "vaccine effectiveness" which is determined with observational epidemiological studies conducted under non-ideal field conditions. For determination of whether decrease in incidence of related disease in a population is due to vaccination or other reasons rather than vaccination, vaccine effectiveness should be monitored as a routine part of the surveillance. Therefore, vaccine effectiveness studies play an important role in public health actions. Various other study designs that are developed as an alternative to classical observational epidemiological studies such as cohort and case-control studies can also be used in determination of vaccine effectiveness. In accordance with related vaccine and disease and current facilities, vaccine effectiveness can be determined by using appropriate one of the alternative designs such as indirect cohort method, test-negative case-control design, case-case study, the screening method, household contact study, as well as cohort and case-control studies. Additionally, study designs which are used in other fields such as case-cohort study, nested case-control study, incidence density case-control design are among the designs that can be chosen for determination of vaccine effectiveness. However, it should be remembered that none of them is perfect and they should be performed under different assumptions related with each design, as well as various general assumptions. How necessary assumptions are not fulfilled, estimation of vaccine effectiveness will go far from its actual value. Any

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı, Epidemiyoloji Bilim Dalı, İZMİR



İletişim / Corresponding Author : Can Hüseyin HEKİMOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı, Epidemiyoloji Bilim Dalı, İZMİR

Tel : +90 542 247 07 18

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

Geliş Tarihi / Received : 25.11.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 19.02.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.28482

Hekimoglu CH. Aşı epidemiyolojisi: Aşı etkililiği için epidemiyolojik çalışma tasarımları. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 161-74.

gruptaki atak hızını olduğundan daha az veya daha fazla gösteren herhangi bir faktör aşı etkililiği tahmininde taraf tutmaya yol açar. Bu faktörlerin tasarım aşamasında veya analiz sırasında mümkün olduğunca kontrol edilmesi gerekir. Aşı etkililiği tahminlerinin yanıtıcı olmaması için uygun tasarımın seçilmesi ve seçilen tasarıma göre gereken varsayımlar, olası taraf tutma kaynakları ve karıştırıcılar çalışmanın planlama aşamasında ve çalışma sonuçları yorumlanırken mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Aşı etkililiği, aşı epidemiyolojisi, çalışma tasarımları

factor that shows attack rate in vaccinated or unvaccinated groups less or more than its actual value leads to bias in estimating vaccine effectiveness. These factors should be controlled as much as possible in phase of design or during analysis. For vaccine effectiveness estimation not to be misleading; an appropriate study design should be selected and necessary assumptions in accordance with the selected design, potential bias sources and confounders should be taken into account in planning phase of the study and while study results are being interpreted.

Key Words: Vaccine effectiveness, vaccine epidemiology, study designs

GİRİŞ

Günümüzde hastalıkların önlenmesinde en başarılı girişimlerden biri aşılamadır. Aşı ile hedeflenen hastalıktan korunma düzeyini ifade eden 'aşı etkisi', girişimsel ve gözlemsel epidemiyolojik çalışmalarla belirlenir (1-3). Aşı etkisi aşılananlarda aşılanmayanlara göre ilgili hastalık insidansındaki azalma yüzdesi ile hesaplanır. Bu yüzde girişimsel bir çalışmayla belirlendiyse 'aşı etkinliği', gözlemsel bir çalışmayla belirlendiyse 'aşı etkililiği' elde edilir. Girişimsel çalışmalar genellikle kısıtlı örnek büyüklüğü ile yürütülen faz 3 çalışmaları oldukları için, aşı etkinliği ile yalnızca aşı bireylerdeki 'direkt etki' gösterilebilmektedir. Eskiden 'saha etkinliği' olarak bilinen aşı etkililiği ise zaten yeterli etkinliği gösterilmiş olan aşının, aslında kendisinin değil, bir toplumda uygulanmasının ilgili hastalıktan ne kadar koruduğunu göstermektedir. Aşı etkililiği aşının aşılanılardaki direkt etkisine ek olarak aşılanmanın toplumda uygulandığında hastalık bulaşını azaltmasından kaynaklanan 'indirekt etki'yi de göstermektedir. Yüksek bir aşı etkililiği, aşı etkinliği ve aşı kapsayıcılığının yüksek olmasının yanı sıra uygun koşullarda ve doğru bir aşı uygulaması ile ilişkilidir (4-6).

Bir toplumda uygulamaya giren aşının artan kapsayıcılığı ile birlikte hastalık insidansında

gözlenen azalmanın aşı uygulanmasından mı, aşı dışı nedenlerden mi kaynaklandığının ayırımının yapılabilmesi için, aşı etkililiği hastalık süreyansının bir parçası olarak izlenmelidir. Bu nedenle girişimsel çalışmalara göre daha ucuz ve basit olan gözlemsel aşı etkililiği çalışmaları halk sağlığı eylemlerini planlamada çok önemli bir yer tutar (2, 5). Aşı etkililiğinin belirlenmesi için klasik gözlemsel çalışmalara alternatif olarak geliştirilen çeşitli epidemiyolojik çalışma tasarımları da bulunmaktadır (7-14). Bu yazıda aşı etkililiğinin belirlenmesinde kullanılan epidemiyolojik çalışma tasarımlarına değinilmiştir.

1. AŞI ETKİLİLİĞİ ÇALIŞMALARINDA VARSAYIMLAR

Aşı etkililiğini belirlemek amacıyla tasarlanan çalışmalar çeşitli varsayımlar altında yürütülür. Bu varsayımların ihlali durumunda aşı etkililiği tahmini karıştırıcılık (confounding) ve taraf tutmadan (bias) etkilenir (4-6). Greenwood ve Yules aşı çalışmalarında yapılan çıkarımların geçerli olabilmesi için üç temel koşul belirlemişlerdir.

1) İlk varsayım, çalışmalardaki aşı ve aşısız bireylerin aşılanma durumu dışında sonuca etkisi olan diğer tüm özelliklerinin benzer olduğu

varsayımdır (15). Karşılaştırılan gruplarda özellikle hastalığa duyarlılığın eşit olduğu varsayılır. Örneğin aşıllılar ve aşısızlar arasında hastalığa karşı doğal bağışıklık seviyeleri farklı olduğunda, bu varsayım yerine getirilmemiş olur. Böyle bir durum bir aşı serolojik testlerle ilgili hastalığa duyarlı olduğu tespit edilen bireylere uygulanıyor, bağışık olan bireyler aşılanmıyorsa görülebilir.

2) İkinci varsayım, aşı ve aşısız gruplarda enfeksiyona maruziyet olasılıklarının aynı olduğudur. Örneğin aşılanan grubun temas sıklığı aşılanmayan gruba göre daha fazla olduğunda, bu varsayım yerine getirilemez ve aşı etkililiği gerçek değerinden daha düşük tahmin edilir. Böyle bir durum bir aşı yalnızca ilgili hastalık etkeniyle karşılaşma açısından yüksek risk grubunda olanlara uygulanıyorsa görülebilir. Bu varsayım karşılanmadığında enfeksiyona maruziyet düzeyini de dikkate alan bulaş olasılığı ve sekonder atak hızı gibi koşullu ölçütlerle aşı etkililiği daha az taraf tutma ile tahmin edilebilir.

3) Son varsayım ise bireylerin aşı olma olasılıklarının ilgili hastalığın gelişme riskinden bağımsız olduğudur. Aşılama için hedef gruptaki bireyler hastalık gelişimi için daha yüksek olasılığa sahip olduklarında bu varsayım ihlal edilmiş olur. Örneğin influenza ve pnömokok aşıları için hedef grup altta yatan hastalığı olanlardır ve bu bireyler daha ciddi hastalık gelişimi için yüksek risk altındadırlar. Bu durumda ciddi hastalık gelişme riski yüksek olan bu grubun aşılanma olasılıkları ciddi hastalık gelişme risklerinden bağımsız olmadığı için, aşının ciddi hastalık gelişimini önlemedeki etkililiğinin tahmininde 'endikasyona göre karıştırıcılık' (confounding by indication) söz konusudur (6, 15).

Aşı etkileri hesaplanırken kullanılan formüller, bireylerin toplumda 'random' olarak karşılaştığı ve aşının toplumdaki bireylere 'random' olarak uygulandığı varsayımıyla uygulanır. Ancak gözlemsel çalışmalarda aşılananlar ve aşılanmayanlar girişimsel çalışmalarda olduğu gibi randomizasyonla araştırmacı tarafından değil, araştırmacıdan bağımsız olarak

rutin uygulamayla belirlendikleri için; bu varsayımlar genellikle karşılanamaz. Gerçekte aşıllılar ve aşısızlar pek çok özellikleri açısından genellikle birbirlerinden farklıdırlar. Bu nedenle aşı etkililiği tahmini; yaş, kreşte olma, sağlık hizmeti arama davranışı, fonksiyonel durum, ekonomik düzey, altta yatan hastalıklar gibi karıştırıcılardan etkilenebilir. Aşılanma durumu, hastalık durumu ve muhtemel karıştırıcıların yakalanmasının aşı ve aşısız grupta benzer olmaması halinde ortaya çıkacak taraf tutma aşı etkililiği tahminlerinin geçerliliğini azaltacaktır. Bu nedenle bu çalışmalarda yapılan tahminler aşı ve aşısız grupta aşılanma durumu, hastalık durumu ve ilgili karıştırıcıların yakalanmasının benzer olduğu varsayımı sağlandığında geçerli kabul edilmelidir. Bu formüller aşıllıların toplumda homojen olarak dağıldığının yanı sıra aşının aşıllılarda 'ya hep ya hiç' etkiye sahip olduğu varsayımına dayanmaktadır. Ya hep ya hiç varsayımına göre; bir aşı etkililiği %95 ise aşılama ile tam aşıllıların %95'inde ilgili hastalık tamamen önlenir ve kalan %5'inde herhangi bir koruma sağlanmaz. Aslında tam korunma olmayan aşıllılarda 'hiç korunma' değil, 'bir miktar' korunma olacaktır. Bu 'sızdıran aşı etkisi' (leaky vaccine effect) gözlemsel çalışmalarda göz ardı edilir. Aşı etkililiği çalışmalarındaki bu genel varsayımların yanında çalışma tasarımına göre farklı varsayımların da yerine getirilmesi gerekir. Aşı etkililiği çalışmalarının tasarlanmasında ve sonuçlarının yorumlanmasında bu varsayımlar mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. Aksi takdirde aşı etkililiği tahminlerinin yanıltıcı olabileceği unutulmamalıdır (4, 16-18).

2. OLASI TARAF TUTMA KAYNAKLARI

Aşı etkililiği çalışmalarında yukarıda bahsedilen varsayımlar yerine getirilmediği ölçüde tahminler gerçek değerinden uzaklaşır. Aşı ve aşısız gruptaki atak hızını olduğundan daha az veya daha fazla gösteren herhangi bir etmen aşı etkililiği tahmininde taraf tutmaya yol açar. Yani aşının etkililiği gerçekte olduğundan daha fazla veya daha azmış gibi bulunabileceği gibi, aslında koruyucu etkisi olan

bir aşı etkili değilmiş veya koruyucu etkisi olmayan bir aşı etkisizmiş gibi de bulunabilir. Gözlemsel aşı etkililiği çalışmalarının tasarım aşamasında veya analizi sırasında etkisi en aza indirilmesi gereken pek çok taraf tutma kaynağı ve karıştırıcı faktör vardır (5, 19).

2.1. Olgu Tanımı

Diğer epidemiyolojik çalışmalarda olduğu gibi gözlemsel aşı etkililiği çalışmalarında da olgu tanımının duyarlılığı ve özgüllüğünün %100 olması istenir. Olgu tanımının duyarlılığı arttıkça aşı etkililiği tahmininin de keskinliği artar. Ancak aşı etkililiğinin nokta tahmini olgu tanımının duyarlılığının düşük olmasından, aşı ve aşısız gruplarda duyarlılık eşit olduğu sürece, çok fazla etkilenmez. Örneğin boğmaca aşısı olanlar, genellikle aşısız olanlara göre daha hafif bir hastalık geçirecekleri için olgu tanımını karşılamayacaklardır. Bu durumda aşı grubunda boğmaca olanlar gerçekte olduğundan daha az bulunur ve dolayısıyla aşı etkililiği olduğundan fazla tahmin edilir. Bu tahmin aslında boğmacayı önlemede aşı etkililiği değil, klinik olarak şiddetli boğmacayı önlemede aşı etkililiğidir (5).

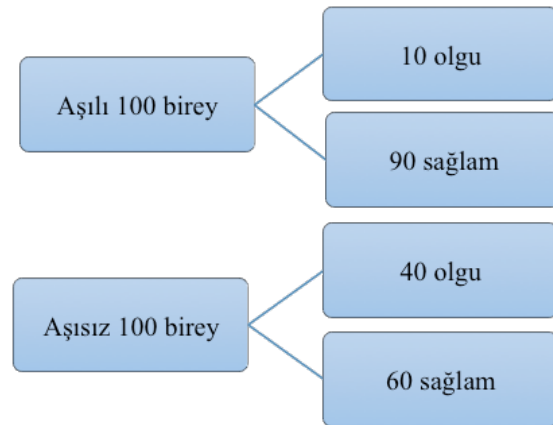
Olgu tanımının özgüllüğü ise aşı etkililiği tahmininde duyarlılığa göre daha önemlidir. Başka hastalıkları olanların olgu olarak yanlış sınıflandırılması, aşı grubunda atak hızını aşısız gruba göre daha fazla artırır. Çünkü aşı grubunda daha az gerçek olgu olması beklenir. Bu durum aşı etkililiğinin gerçek değerinden daha düşük tahmin edilmesine neden olur. Hastalık ne kadar nadir görülüyorsa ve olgu olarak yanlış sınıflandırılan hastalığın insidansı ne kadar yüksekse, aşı etkililiği de o kadar düşük tahmin edilecektir. Böyle bir taraf tutma olgu tanımının duyarlılığı azaldıkça da artacaktır (5, 19-21).

Şekil 1'de aşı ve aşısız 100'er kişilik iki gruptaki olgu sayıları görülmektedir. Aşı grubunda 10 ve aşısız grupta 40 olgu vardır. Bu örnekte olgu tanımının duyarlılığının ve özgüllüğünün %100 olduğunu kabul edelim. Aşı grubundaki insidans $10 / 100 = 0,1$ ve aşısız

gruptaki insidans ise $40 / 100 = 0,4$ 'tür. Rölatif risk $0,1 / 0,4 = 0,25$ ve aşı etkililiği ise $1 - 0,25 = 0,75$ (%75) bulunur. Duyarlılık ve özgüllük %100'den düşük olduğunda tespit edilecek olgu sayıları aşağıdaki formülle hesaplanabilir (22).

Tespit edilecek olgu sayısı = (gerçek olgu sayısı x duyarlılık) + [(gerçek sağlam sayısı x (1 - özgüllük)]

Aynı örnekte, iki grupta da olgu tanımı için duyarlılık %80 ve özgüllük %90 olsaydı; o zaman aşı grubunda $(10 \times 0,8) + (90 \times 0,1) = 8 + 9 = 17$ olgu ve aşısız grupta $(40 \times 0,8) + (60 \times 0,1) = 32 + 6 = 38$ olgu tespit edilecekti. Aşı grubunda insidans $17 / 100 = 0,17$ ve aşısız grupta insidans $38 / 100 = 0,38$ olacaktı. Bu durumda rölatif risk $0,17 / 0,38 = 0,44$ ve aşı etkililiği $1 - 0,44 = 0,56$ (%56) bulunurdu. Duyarlılığın %80 ve özgüllüğün %90'a gerilediği bu durumda, aşı etkililiği gerçek değerinden daha düşük bulunmuştur. Bir de özgüllüğün daha fazla azaldığı başka bir durum düşünelim. Eğer olgu tanımı için duyarlılık %90 ve özgüllük %80 olsaydı; bu sefer aşı grubunda $(10 \times 0,9) + (90 \times 0,2) = 9 + 18 = 27$ ve aşısız grupta $(40 \times 0,9) + (60 \times 0,2) = 36 + 12 = 48$ olgu saptanacaktı. Bu durumda aşı grubunda insidans $27 / 100 = 0,27$ ve aşısız grupta insidans $48 / 100 = 0,48$ bulunurdu. Rölatif risk $0,27 / 0,48 = 0,56$ ve aşı etkililiği $1 - 0,56 = 0,44$ (%44) olurdu. Örneklerde görüldüğü gibi duyarlılık ve özgüllük azaldığında aşı etkililiği tahmini olduğundan daha düşük bulunmuş



Şekil 1. Aşı ve aşısız iki gruptaki olgu sayıları

ve özgüllüğün duyarlılığa göre daha fazla azalması aşı etkililiği tahmininde daha fazla taraf tutmaya neden olmuştur. Bu nedenle, çalışmalarda bulunan farklı aşı etkililiği tahminlerini yorumlarken çalışmalardaki olgu tanımlarının duyarlılık ve özgüllüklerinin göz önünde bulundurulması önemlidir.

2.2. Olgu Yakalama

Randomize kontrollü çalışmalarda özellikle hastalık durumunu belirleyen gözlemcinin bireylerin aşılama durumu açısından kör tutulması ile olgular aşılama durumundan bağımsız olarak değerlendirilir ve böylece olgu yakalamada taraf tutma azaltılabilir. Gözlemsel çalışmalarda ise aşı ve aşısız bireyler kendi kendilerine seçilmiş gruplardır ve bu grupların sağlık hizmetlerine erişiminin eşit olmaması halinde aşı ve aşısız gruplarda olgu yakalama da farklı oranlarda olur. Örneğin aşılar sağlık hizmetlerine daha fazla erişebildikleri için aşılanmış, aşısızlar ise zaten sağlık hizmetlerine erişemedikleri için aşılanmamış olabilirler. Bu durumda aşılar arasında daha fazla olgu yakalanmış olabilir ve aşı etkililiği ise gerçekte olduğundan daha az bulunabilir. Ayrıca daha ağır klinik belirtileri olan olgular daha fazla yakalanıyor ve daha hafif klinik belirtileri olanların tanısı atlanıyor olabilir. Bu durumda aşılarında büyük olasılıkla daha hafif bir klinik gözleneceğinden, atak hızı olduğundan az ve aşı etkililiği olduğundan fazla bulunur. Aşılar arasında olguların daha az yakalanması, örneğin hekimin aşılarının tam olduğunu bildiği çocuklarda boğmaca, kızamık gibi hastalıkları atlaması durumunda meydana gelir (20, 21, 23).

Birleşik Krallık'taki bir boğmaca salgını incelemesinde olası olgu kriterlerini karşılayan 90 çocuğun yalnızca 31'inin bildirildiği ve yalnızca bildirilen olgular çalışmaya alındığında aşı etkililiğinin %88 olduğu bulunmuştur. Olası olgular da çalışmaya dahil edilginde ise aşı etkililiği %75 bulunmuştur. Olası olgu kriterlerini karşılamayan, en az iki hafta öksürük nöbetleri olan tüm çocuklar çalışmaya dahil edildiğinde ise aşı etkililiği tahmininin %68'e gerilediği

görülmüştür. Yazar aşılanmış olduğu bilinen çocukların daha az tanı alıp daha az bildirildiğine dikkat çekmiştir (24). Bu nedenle aşı etkililiği çalışmalarında en doğru aşı etkililiği tahminini yapabilmek için olgu yakalama hızı aşı ve aşısız gruplarda eşit olmalıdır.

2.3. Aşılama Durumunun Tespiti

Aşılı olguların aşısız olarak yanlış sınıflandırılmasıyla aşısızlardaki atak hızı artarken, aşılılardaki atak hızı azalacaktır. Bu durumda aşı etkililiği gerçekte olduğundan yüksek bulunur. Tersine aşısız olgular aşı olarak yanlış sınıflandırıldığında, aşılılarda atak hızı artarken, aşısızlarda atak hızı azalacaktır. Bu durumda ise aşı etkililiği tahmini olduğundan düşük bulunur. Ailelerin çocuklarının aşılama durumlarını hatırlamalarının aşı kapsayıcılığının olduğundan fazla tahmin edilmesi yönünde olduğu görülmüştür. Yazılı kayıtlardan aşılama durumu tespit edildiğinde ise aşı kapsayıcılığı olduğundan daha az tahmin edilebilir. Tam koruyuculuk için birden fazla doz aşılama gereken durumlarda uygulanan aşı dozları da bilinmelidir. Tam doz aşılamanın da bir miktar koruyuculuk olduğu ön görülüyorsa, bu durum analizde ayrıca ele alınmalı ve eksik aşılılardaki aşı etkililiği ayrıca belirlenmelidir. Eğer eksik aşılar aşısız olarak değerlendirilirse, aşısızlardaki atak hızı düşer ve aşı etkililiği olduğundan daha az tahmin edilir. Eksik aşılar tam aşı olarak değerlendirildiğinde ise aşılılardaki atak hızı artar ve aşı etkililiği yine olduğundan daha az tahmin edilir. Bu nedenle tam aşılanmanın etkililiği değerlendirilecekse eksik aşılar dışlanmalı ve tam aşılar ile aşısızlar karşılaştırılmalıdır. Benzer şekilde aşılama durumu bilinmeyenler, aşı veya aşısız olarak kabul edilmemeli ve analizde yer almamalıdır (5, 19, 20, 25).

2.4. Grupların Karşılaştırılabilirliği

Gözlemsel çalışma tasarımlarında genellikle aşılar aşısızlardan aşılama ile ilişkili kişisel tercih, aşı kontrendikasyonuna sahip olma gibi özellikler açısından farklıdır. Eğer bu farklılıklar hem aşılama

hem de ilgili hastalığın gelişimi ile ilişkili ise o zaman karıştırıcılık nedeniyle aşı etkililiği tahmininde taraf tutulmuş olur. Örneğin aşısızlar daha düşük sosyo ekonomik düzeye sahip ve bu nedenle daha kötü beslenen ve hastalığa daha duyarlı bir göçmen grup olabilir. Gruplar arasındaki farklı özelliklerin bir kısmı araştırmacı tarafından fark edilebilir ve tasarım veya analiz aşamasında bu farklılıkların etkisi kontrol edilebilir. Ancak yine de fark edilmeyen veya ölçülmemiş farklılıkların sonuçların geçerliliğini azaltabileceği unutulmamalıdır.

Aşı etkililiği çalışmalarındaki en önemli karıştırıcı hastalığa maruziyettir. Hastalığa maruziyet düzeyi grupların, örneğin yaş ve yerleşim yeri dağılımları gibi, çeşitli özellikleri ilişkili olabilir. Aşılamanın indirekt etkileri hem aşı ve hem de aşısız gruplarda maruziyet olasılığını etkileyebilir ve bu etki gruplarda farklı büyüklükte olabilir. Bu nedenle aşı etkililiğini toplum düzeyinde tahmin eden çalışmalarda aşının 'random' olarak uygulanıp uygulanmadığı önemlidir. Eğer yüksek aşı kapsayıcılığına sahip grupların enfeksiyona maruziyet riski düşük ise, aşı etkililiği ilgili hastalığa maruz kalan bireylerdeki koruyuculuk düzeyini gösterir. Bu durumda toplumda aşılama durumunun kümelenmesi yanlış olarak yüksek aşı etkililiği tahminiyle sonuçlanır. Benzer şekilde düşük aşı kapsayıcılığı olan gruplar hastalığa daha fazla maruz kalabilirler ve bu durumda aşı etkililiği yanlış olarak düşük bulunabilir. Yaş ise hem önceden ilgili hastalığa maruz olma olasılığı hem de aşılama olasılığı ile ilişkili olabilir. Hastalığı geçirmekle veya aşılama ile erken yaşta gelişen bağışıklık zamanla azaldığında, yaş aşılama sonrası geçen zaman için bir göstergesi olabilir. Bu nedenle veriler dar yaş gruplarında ayrı ayrı analiz edilmeli veya yaşa göre standardize edilmelidir (5, 19, 20, 26).

Bir bireyin aşılama için bir sağlık kurumuna başvuruda bulunması genel olarak o kişinin kendi sağlığı açısından daha olumlu davranışlarda bulunduğu bir göstergesi olabilir. Bu bireyler kendi sağlıkları için yapılan öneriler doğrultusunda

hareket eden, daha yüksek öğrenim düzeyindeki bireyler olabilirler ve aynı zamanda herhangi bir nedenle hastaneye yatma ve ölme olasılıkları da daha düşük olabilir. Benzer şekilde, genel olarak sağlıkları açısından olumlu davranışlarda bulunmayan bireylerin aşılama için başvuruda bulunma olasılıkları daha düşük ancak hastaneye yatış veya ölme olasılıkları daha yüksek olabilir. Bu durum 'sağlıklı aşı etkisi' (healthy vaccine effect) olarak bilinir. Sağlıklı aşı etkisi nedeniyle aşılananlarda daha az hastalık gelişimi gözlenirken, aşısızlarda daha fazla hastalık gelişir ve aşının etkililiği bu durumda olduğundan daha fazla bulunur (6, 27). Bu nedenle gözlemsel aşı etkililiği çalışmalarında aşı ve aşısız grupların mümkün olduğunca karşılaştırılabilirliğinin sağlanması ve karıştırıcı faktörlerin göz önünde bulundurulması önemlidir.

3. AŞI ETKİLİLİĞİ İÇİN EPİDEMİYOLOJİK ÇALIŞMA TASARIMLARI

Aşı etkililiği kohort ve olgu kontrol çalışmaları gibi klasik gözlemsel epidemiyolojik çalışma tasarımlarının yanı sıra, bu klasik tasarımlardan türetilmiş alternatif aşı etkililiği çalışma tasarımlarıyla da belirlenebilir. Ayrıca olgu kohort çalışması (case-cohort study), yuvalandırılmış olgu kontrol çalışması (nested case-control study), insidans yoğunluğu olgu kontrol tasarımı (incidence density case-control design) gibi farklı alanlarda kullanılmakta olan tasarımlar da aşı etkililiğini belirlemek için kullanılabilir (7-14, 28-32).

3.1. Kohort Çalışması

Kohort çalışmaları, ilgili hastalık için risk altındaki toplum ayrı olarak tanımlanabildiğinde aşı etkililiğini belirlemek için en uygun çalışma tasarımıdır. Kohort çalışmalarında aynı toplumdaki (kohort) aşı ve aşısız grupların hastalık gelişme riskleri (insidans) karşılaştırılır. Kohort genellikle bir okul, kreş, kurum vb. tabanlı olarak veya coğrafi olarak belirlenmiş bir alanda tanımlanır. Kohorttaki tüm bireylerin aşılama durumları ve sonra aşı ve aşısız gruplardaki

atak hızları belirlenerek rölatif risk hesaplanır. Aşı etkililiğini hesaplamada bu rölatif risk kullanılır. Aşı etkililiğini belirlemek için tasarlanan kohort çalışmaları genellikle retrospektif olarak yürütülür. Örneğin kurum, okul salgınlarında retrospektif kohort tasarımı sık kullanılır (4-6). Salgın incelemelerinin bir parçası olarak yürütülen kohort çalışmalarında taraf tutmayı azaltmak için 5 kriter tanımlanmıştır:

- 1) Çalışılan yaş gruplarında önemli ölçüde önceden hastalık aktivitesinin olmaması,
- 2) Hem aşıli hem de aşısız bireylerin çalışma grubuna dahil edilmesi,
- 3) Toplumda çalışılacak yaş grubunda yeterli sayıda kişi olması,
- 4) Yüksek atak hızı olması,
- 5) Mevcut aşı kayıtlarının iyi olması (33).

Salgın uzun süreli ise veya aşılama durumu salgın kontrol önlemlerine bağlı olarak salgın sırasında önemli ölçüde değişiyorsa o zaman kişi-zaman analizi gerekir (4).

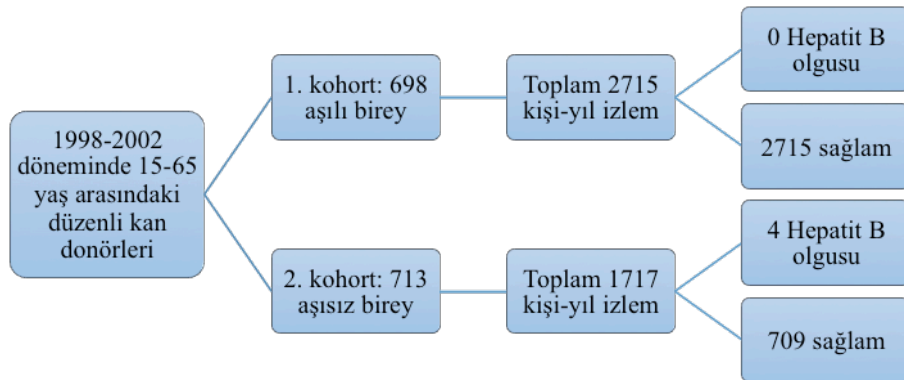
Şekil 2’de rekombinan hepatit B aşısının etkililiğinin belirlenmesi için Brezilya’da yürütülen bir retrospektif kohort çalışma tasarımı görülmektedir. Çalışmada 1998-2002 döneminde düzenli kan donörü olan 15-65 yaş arası bireyler kohortu oluşturmaktadır. Birinci kohortta 698 aşıli ve ikinci kohortta 713 aşısız birey bulunmaktadır. Aşıli kohort toplam 2.715 kişi-yıl, aşısız kohort ise 1.717 kişi-yıl izlenmiştir. İzlem süresince aşıli kohortta hiç hepatit B gelişimi

gözlemlenmezken, aşısız kohortta 4 hepatit B olgusu gelişmiştir. Aşıli kohorttaki insidans hızı 0,00 / 1.000 kişi-yıl, aşısız kohortta ise 2,33 / 1.000 kişi-yıl olarak bulunmuştur. Rölatif risk $0,00 / 2,33 = 0,00$ ve aşı etkililiği $1 - 0,00 = 1,00$ (%100,0 %95GA: %30,0-%100,0) olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmaya göre, rekombinant hepatit B aşısının hepatit B gelişimini önlemede etkililiği %100’dür (13).

3.2. Olgu Kontrol Çalışması

Aşı etkililiğini belirlemek için yürütülen olgu kontrol çalışmalarında, hastalananlar veya enfekte olanlar (olgular) arasındaki aşılama odds’u (aşılı / aşısız oranı) uygun kontrollerin aşılama odds’u ile karşılaştırılarak, aşılamanın odds ratio (OR)’su belirlenir ve bu OR kullanılarak aşı etkililiği hesaplanır. Çalışmaya alınan kontrollerin olguların içinden geldiği toplumun aşı kapsayıcılığını temsil ettiği varsayılır (4-6). Difteri, polio, tüberküloz gibi ‘olgu/enfeksiyon oranı’ düşük hastalıklar için aşı etkililiğini belirlemede olgu kontrol çalışmaları daha verimli ve pratik tasarımlar olabilirler. Atak hızı yüksek olduğunda, kümülatif insidans olgu kontrol çalışması için nadir hastalık varsayımı geçerli olmaz. Bu durumda olgu kohort veya insidans yoğunluğu olgu kontrol çalışması, nadir hastalık varsayımı gerektirmediği için, iyi bir alternatif olabilir (4).

Olgu kontrol çalışmalarındaki olgular toplumdaki olguların bir kısmıdır ve kontroller hasta olmayan

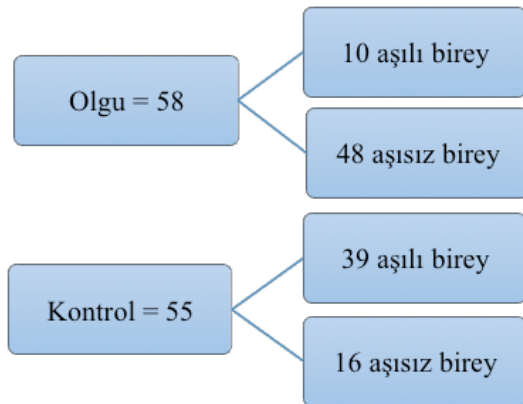


Şekil 2. Rekombinan hepatit B aşısının etkililiğinin belirlenmesi için yürütülen bir retrospektif kohort çalışma tasarımı (23)

toplumun tümünü değil bir örneğini yansıtır. Olgu kontrol çalışmalarında örnekleme kesri (sampling fraction) bilinmediğinden, aşı ve aşısız toplam nüfus hesaplanamaz ve bu nedenle atak hızlarına ulaşılamaz. Ancak nadir hastalıklar için OR yaklaşık olarak rölatif riske eşit olduğu için aşı etkililiği tahmini için kullanılabilir. Atak hızı > %10 olduğu durumlarda ise OR kullanılarak hesaplanan aşı etkililiği tahmini yanlış olarak daha yüksek bulunur (4-6, 33).

Şekil 3'te maternal boğmaca aşılmasının yenidoğanlardaki etkililiğinin tahmin edildiği İngiltere ve Galler'de yürütülmüş bir olgu kontrol çalışma tasarımı görülmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile doğrulanmış boğmaca tanısı olan < 8 haftalık bebekler olgu grubu, olguların aile hekimlerine kayıtlı olup olgudan sonra doğan ilk bebek ise kontrol grubu olarak alınmış ve gruplarda annenin gebelikte boğmaca aşısı olma odds'ları karşılaştırılmıştır. Çalışmadaki toplam 58 olgunun 10'unun ve 55 kontrolün 39'unun annesi gebeliğinde boğmaca aşısı olmuştur. Odds ratio $(10 \times 16) / (48 \times 39) = 0,085$ ve aşı etkililiği $1 - 0,085 = 0,915$ (%91,5) bulunmuştur. Bu çalışmaya göre, maternal boğmaca aşısının < 8 haftalık bebeklerde PCR ile doğrulanmış boğmacayı önlemede etkililiği %91,5'tir (14).

Aşı etkililiğinin belirlenmesi için olgu kontrol çalışmalarından köken alan ve birbirlerinden özellikle kontrollerin seçimi ile ayrılan çeşitli alternatif



Şekil 3. Maternal boğmaca aşılmasının yenidoğanlardaki etkililiğinin tahmini için yürütülen bir olgu kontrol çalışma tasarımı (14)

tasarımlar geliştirilmiştir: indirekt kohort tasarımı, test negatif olgu kontrol tasarımı, olgu olgu çalışması ve tarama yöntemi. Bu tasarımlar aşı etkililiği çalışmalarının genel varsayımlarına ek olarak tasarıma özel varsayımların da yerine getirildiği durumlarda uygulanmalıdır (4-14).

3.3. İndirekt Kohort Tasarımı (Broome Yöntemi)

İndirekt kohort tasarımı yalnızca serotip veya serogrupları olan etkenlerin aşılmasının etkililiğinin belirlenmesi için geliştirilmiştir. Etkenin aşı içeriğinde yer alan bir serotipiyle hastalık gelişenler olgu olarak çalışmaya alınırken, kontroller etkenin aşı içeriğinde yer almayan serotipleriyle hastalık gelişenlerdir. Böylece olgu ve kontroller arasındaki yakalamaya bağlı taraf tutma kontrol edilmiş olur. Yöntem aşı kişilerin etkenin aşı içeriğinde yer alan tipleri dışındaki enfeksiyonlar için aşısızlarla aynı riske sahip olduğunu varsayar. Bu nedenle yöntemin uygulanabilmesi için etkenin aşı içeriği dışında kalan tiplerine karşı aşının çapraz koruyuculuğunun olmaması gerekir. Ayrıca aşılama ile etkenin aşı içeriği dışında kalan tipleri ile hastalık gelişme riski de artmamış olmalıdır (4, 6, 34). Örneğin influenza aşılmasının değerlendirilmesinde bu yöntem uygun değildir. Çünkü influenza aşısı içeriğinde yer almayan influenza tiplerine karşı da aşının bir miktar koruyuculuğu olabilir (35). Bu yöntemde örneğin tüm invaziv pnömokokal hastalık (IPH) olguları bir kohort gibi düşünülerek, aşı ve aşısızlar olarak iki kola ayrılmazlar. Klasik olgu kontrol tasarımında olduğu gibi etkenin aşı içeriğinde yer alan ve aşı içeriği dışında kalan serotipleri ile hastalık gelişenler arasındaki aşılama durumları (odds'ları) karşılaştırılarak elde edilen OR kullanılarak aşı etkililiği hesaplanır (4, 6, 34).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 7 valanlı konjuge pnömokok aşısının (KPA-7) 2-59 aylık çocuklarda etkililiğinin değerlendirildiği bir çalışmada yaklaşık 3,5 yıllık IPH sürveyansı verileri kullanılmıştır. Çalışmada KPA-7'nin içeriğinde yer alan serotipler (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) ile IPH gelişen çocuklar

olgu grubunu oluştururken, bu serotipler dışındaki serotiplerle IPH gelişen çocuklar ise kontrol grubunu oluşturmuştur. En az bir doz KPA-7 ile aşılanmış olan çocuklar aşıli kabul edilerek, toplam 153 olgunun 74'ünün ve 919 kontrolün 825'inin aşıli olduğu tespit edilmiştir. Odds ratio $(74 \times 94) / (79 \times 825) = 0,106$ ve aşı etkililiği $1 - 0,106 = 0,894$ (%89,4) bulunmuştur. Bu çalışmaya göre, KPA-7'nin 2-59 aylık çocuklarda KPA-7'nin içeriğinde yer alan serotiplerle IPH gelişimini önlemede etkililiği %89,4'tür (8).

3.4. Test Negatif Olgu Kontrol Tasarımı

Test negatif olgu kontrol tasarımında ilgili hastalığın tanısı için laboratuvar test sonucu negatif olan klinik olgular kontrol, pozitif olanlar ise olgu olarak alınır. Böylece sağlık hizmetlerine erişim farklılığından kaynaklanan olgu yakalamadaki taraf tutma engellenmiş olur. Yöntem kontrollerdeki hastalıkların ilgili aşidan etkilenmediğini varsayar. Ayrıca bu yöntem söz konusu laboratuvar testinin duyarlılığının yüksek olduğunu kabul eder ve yalancı negatiflikleri de yok sayar (misclassification bias) (6, 36). Son yıllarda özellikle sentinel sürveyans verileri kullanılarak influenza aşı etkililiği izleminde test negatif olgu kontrol tasarımı sık kullanılmaktadır. Sentinel influenza sürveyansı kapsamında influenza benzeri semptomu olanlardan influenza için test edilmek üzere alınan örneklerinde influenza testi pozitif saptananlar olgu iken, negatif saptananlar kontrol olarak alınır (37-40).

İspanya'da rotavirus aşısının 3-59 aylık çocuklarda etkililiğini belirlemek için yapılan bir çalışmada akut gastroenterit tablosu olan ve dışkıda rotavirus antijeni bakılan çocuklar test sonucuna göre olgu ve kontrol gruplarına ayrılmıştır. Dışkıda rotavirus antijeni pozitif tespit edilen (olgu) 756 bireyin 45'inin aşıli, 711'inin aşısız; negatif tespit edilen (kontrol) 6.036 bireyin 1.094'ünün aşıli, 4.942'sinin aşısız olduğu saptanmıştır. Odds ratio $(45 \times 4.942) / (711 \times 1.094) = 0,285$ ve aşı etkililiği $1 - 0,285 = 0,715$ (%71,5) bulunmuştur. Bu çalışmaya göre, rotavirus aşısının 3-59 aylık çocuklarda rotavirusa bağlı akut

gastroenterit gelişimini önlemede etkililiği %71,5'tir (10).

3.5. Olgu Olgu Çalışması

Test negatif olgu kontrol tasarımında olduğu gibi seçime dayalı taraf tutmayı önlemek için olgu olgu çalışmalarında kontrol olarak başka bir etiyojolojiye sahip olanlar alınır. Aslında kontrol grubundaki bireyler de başka bir hastalığa sahip olgulardır. Ancak etkililiği değerlendirilen aşının kontrol olarak seçilenlerdeki hastalıklara etkisinin olmaması gerekir (6, 9, 41, 42). Örneğin pnömokok aşısının etkililiğini Broome yöntemiyle belirlemek istediğimizde; pnömokok için test edilen bireyler çalışmaya alınır ve aşı içeriğindeki serotiplerle hastalık gelişenler ile aşı içeriğinde olmayan serotiplerle hastalık gelişenler aşılanma durumları açısından karşılaştırılır. Test negatif olgu kontrol tasarımında ise örneğin pnömokok kültürü yapılanlar çalışmaya alınarak, pnömokok üreyenler ve üremeyenler karşılaştırılır. Klasik bir olgu kontrol çalışmasında örneğin pnömoni olanlar ve olmayanlar karşılaştırılabilir. Bir olgu olgu çalışmasında ise pnömokok üreyenler ile pnömokok dışında bir etken üremesi olanlar karşılaştırılmaktadır.

İspanya'da 2010-2011 sezonunda erişkinlerde laboratuvar konfirme influenza nedeniyle hastaneye yatışları önlemede aşı etkililiği bir olgu olgu tasarımı ile belirlenmiştir. Çalışmaya influenza benzeri hastalık nedeniyle hastaneye yatırılan ve influenza ve diğer solunum yolu virusları için test edilen 826 birey alınmıştır. Test sonuçlarına göre 606 kişide testler negatif saptanırken, influenza konfirme edilen 102 kişi ile diğer solunum yolu virusları açısından pozitif saptanan 116 kişi aşılanma durumu açısından karşılaştırılmıştır. İnfluenza olguları arasında 37 aşıli ve 65 aşısız ve diğer solunum yolu virusu olguları arasında 77 aşıli ve 39 aşısız vardır. Odds ratio $(37 \times 39) / (77 \times 65) = 0,288$ ve aşı etkililiği $1 - 0,288 = 0,712$ (%71,2) bulunmuştur. Bu çalışmaya göre, 2010-2011 sezonunda erişkinlerde laboratuvar konfirme influenza nedeniyle hastaneye yatışları önlemede aşı etkililiği %71,2'dir (9).

3.6. Tarama Yöntemi

Olgu kapsayıcılık tasarımı (case-coverage design) olarak da bilinen tarama yönteminde (the screening method) olguların içinde aşılanların oranı ile toplumdaki aşılanların oranı karşılaştırılarak aşı etkililiği belirlenir. Diğer bir ifade ile kontrol olarak toplumdaki aşı kapsayıcılığı alınmaktadır. Toplumdaki aşı kapsayıcılığı bilindiğinde veya tahmin edilebildiğinde bu yöntem hızlı bir aşı etkililiği taraması için uygun bir araçtır, ancak bu yöntemin kesin bir aşı etkililiği tahmini sağlamadığı unutulmamalıdır. Beklenenden düşük bir aşı etkililiği tahmini elde edilirse diğer tasarımlar ile bunun doğrulanması gerekir. Diğer tasarımlardan farklı olarak tarama yönteminde aşı etkililiği aşağıdaki formülle hesaplanır (4-6, 43).

Aşı etkililiği = $1 - (\text{aşılı olguların oranı} / \text{aşısız olguların oranı}) \times (\text{aşısız toplum oranı} / \text{aşılı toplum oranı})$

Bu yaklaşım aslında tüm toplumun kontrol olarak alındığı bir olgu kontrol çalışmasındaki odds ratio hesabıyla elde edilen aşı etkililiği tahminiyle aynı sonucu verir. Aşılı toplumun veya aşılı olguların oranı çok düşük veya çok yüksek olduğu durumlarda yöntem hatalara karşı daha duyarlıdır ve aşılı olgu / aşılı toplum oranındaki küçük değişikliklerle aşı etkililiği tahmininde büyük farklılıklar görülür (4-6, 43).

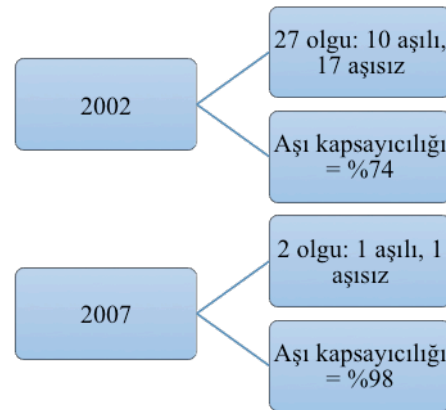
Şekil 4'te tarama yöntemi kullanılarak ABD'de 19-35 aylık çocuklarda KPA-7'nin IPH'yi önlemede etkililiğinin izlendiği bir çalışma tasarımı görülmektedir. Çalışmada 2002 ve 2007 yılları için IPH sürveyans siteminden olgular elde edilmiş ve ulusal bağışıklama araştırmasından aşı kapsayıcılığı (VC) tahmin edilmiştir. İkibin iki yılında 10'u aşılı 27 olgu varken, 2007 yılında ise saptanan iki olgunun biri aşılıdır. Aşı kapsayıcılığı ise 2002 yılında %74 iken, 2007 yılında %98'dir. Aşı etkililiği 2002 yılı için $1 - (10 / 17 \times 26 / 74) = 0,794$ (%79,4) bulunurken, 2007 yılı için $1 - (1 / 1 \times 2 / 98) = 0,979$ (%97,9) bulunmuştur. Bu çalışmaya göre, KPA-7'nin 19-35 aylık çocuklarda IPH'yi önlemede etkililiği 2002 yılında %79,4 ve 2007 yılında %97,9'dur. Bu çalışmada da görüldüğü gibi aşı kapsayıcılığı arttıkça aşı etkililiği de artmaktadır. Artan aşı kapsayıcılığı ile olguların

sayısı azalmış, ancak olguların içindeki aşılanların oranı artmıştır (11). Toplam olgu sayısı ve aşı kapsayıcılığını dikkate almadan yalnızca aşılı olguların oranına bakılarak aşının etkililiğini değerlendirmenin yanıltıcı olabileceği unutulmamalıdır (4).

3.7. Hanehalkı Temas Çalışması

'Hanehalkı temas çalışması' (household contact study) aşılı ve aşısız gruplar arasındaki enfeksiyona maruziyet düzeyindeki farklılıkları ve dolayısıyla bu farklılıklardan kaynaklanan taraf tutmayı azaltmak için tercih edilir. Çalışmada primer olguların bulunduğu hanelerdeki primer olgu hariç toplam nüfus bir araya getirilerek oluşturulan kohortta aşılı ve aşısız gruplar belirlenir. Aşılı ve aşısız gruplardaki sekonder atak hızları hesaplanır ve bu hızların oranı kullanılarak aşı etkililiği hesaplanır. Bu yöntem kızamık için randomize kontrollü çalışmalarla aynı sonucu vermiştir. Diğer taraftan boğmaca için bu yöntem tanı kriterlerinden bağımsız olarak maruziyetin hanehalkı arasında daha yoğun olmasına, aşı başarısızlığı olasılığı yüksek olan hanelerin çalışmaya dahil edilmiş olmasına bağlı olarak aşı etkililiğini daha az tahmin edebilir (4-6, 19, 33).

Bu çalışmada primer olgu aşılı olduğunda, aşılanlarda hastalığın şiddeti ve bulaştırıcılığı daha az olacağı için, temaslarına bulaş olasılığı aşısız primer bir olguya göre daha düşük olur ve aşılı primer olguların oranı



Şekil 4. Tarama yöntemi kullanılarak 19-35 aylık çocuklarda 7 valanlı konjuge pnömokok aşısının invaziv pnömokokal hastalığı önlemede etkililiğinin izlendiği bir olgu kapsayıcılık çalışma tasarımı (11)

arttıkça aşı etkililiği tahmini de olduğundan yüksek bulunur. Ayrıca aşı başarısızlığı için risk faktörleri hanehalkı üyeleri arasında ortak olabilir, bu nedenle aşının aleyhine bir taraf tutma söz konusu olabilir. Olgu saptanmayan hanelerin çalışmaya alınmaması nedeniyle de aşının daha iyi çalıştığı haneler dışlanmış olur. Bu durumda aşı etkililiği daha düşük tahmin edilebilir (4-6).

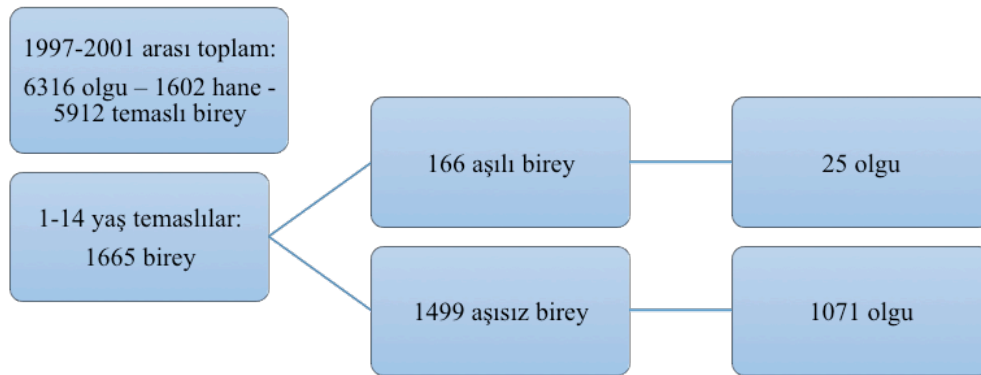
Kalifornia'da 1997-2001 yılları arasında bildirilen suçiçeği olgularının 1-14 yaş arası hanehalkı temasları ile yürütülen çalışmanın tasarımı Şekil 5'te görülmektedir. Çalışmada döküntü başlangıç tarihine göre hanedeki ilk olgu primer olgu ve primer olgunun 10-21. günleri içinde döküntü görülen olgular ise sekonder olgu olarak tanımlanmıştır. Hanedeki primer olgunun 0-9. günü içinde döküntü görülen olgular da primer olgu kabul edilerek analizden dışlanmıştır. Toplam 6.316 olgu saptanan çalışmada, 1-14 yaş grubundaki aşısız primer bir olguyla temaslı 1.665 bireyden 166'sı aşılı, 1.499'u aşısızdır. Aşılı primer olgular ve temaslıları taraf tutmaya neden olmaması için çalışmaya dahil edilmemişlerdir. Aşılı 166 temaslı arasında 25 olgu ve aşısız 1.499 temaslı arasında 1.071 olgu saptanmıştır. Sekonder atak hızı aşılılarda $25 / 166 = 0,15$ ve aşısızlarda $1.071 / 1.499 = 0,714$ 'tür. Sekonder atak hızları oranı $0,15 / 0,714 = 0,21$ ve

aşı etkililiği $1 - 0,21 = 0,79$ (%79) bulunmuştur. Bu çalışmaya göre, suçiçeği aşısının 1-14 yaş grubunda suçiçeği gelişimini önlemede etkililiği %79'dur (12).

Yukarıda bahsedilen gözlemsel çalışma tasarımlarının yanı sıra lisans sonrası dönemde aşı etkililiğini belirlemek için matematiksel modellemelerden de yararlanılabilir. Özellikle son yıllarda kullanımları artan bu modellemeler aşı programlarının etkilerinin değerlendirilmesinde ve maliyet etkililik analizlerinde öne çıkmaktadır. Bu modellemeler ayrıca lisans öncesi dönemde aşı etkinliği belirlemek için de kullanılmaktadır (44-52).

SONUÇ

Aşı etkililiğini belirlemek için yaygın olarak kullanılan klasik gözlemsel çalışma tasarımlarının yanı sıra alternatif tasarımlar da mevcuttur. Ancak bu tasarımların hiçbiri mükemmel değildir. İlgili aşı ve hastalığa, mevcut olanaklara göre uygun olan çalışma tasarımının seçilmesiyle daha doğru, verimli bir şekilde aşı etkililiği tahminleri yapılabilir. Aşı etkililiği çalışmalarında, yanıltıcı aşı etkililiği tahminlerinden kaçınmak için; gerekli varsayımlar, karıştırıcılık, olası taraf tutma kaynakları, tasarım aşamasında ve sonuçların yorumlanmasında mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.



Şekil 5. California'da 1997-2001 yılları arasında bildirilen suçiçeği olgularının 0-14 yaş arası hanehalkı temasları ile yürütülen bir hanehalkı temas çalışması tasarımı (12)

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

KAYNAKLAR

1. World Bank. World development report 1993: investing in health. New York, NY: Oxford University Press, 1993: 72-107.
2. Weinberg GA, Szilagyi PG. Vaccine epidemiology: efficacy, effectiveness, and the translational research roadmap. *J Infect Dis*, 2010; 201(11): 1607-10.
3. Begg N, Miller E. Role of epidemiology in vaccine policy. *Vaccine*, 1990; 8(3): 180-9.
4. Chen RT, Orenstein WA. Epidemiological methods in immunization programs. *Epidemiol Rev*, 1996; 18(2): 99-117.
5. Torvaldsen S, McIntyre PB. Observational methods in epidemiologic assessment of vaccine effectiveness. *Commun Dis Intell Q Rep*, 2002; 26(3): 451-7.
6. Hanquet G, Valenciano M, Simondon F, Moren A. Vaccine effects and impact of vaccination programmes in post-licensure studies. *Vaccine*, 2013; 31(48): 5634-42.
7. Simpson CR, Lone NI, Kavanagh K, Ritchie LD, Robertson C, Sheikh A, et al. Trivalent inactivated seasonal influenza vaccine effectiveness for the prevention of laboratory-confirmed influenza in a Scottish population 2000 to 2009. *Euro Surveill*, 2015; 20 (8).
8. De Serres G, Pilishvili T, Link-Gelles R, Reingold A, Gershman K, Petit S, et al. Use of surveillance data to estimate the effectiveness of the 7-valent conjugate pneumococcal vaccine in children less than 5 years of age over a 9 year period. *Vaccine*, 2012; 30 (27): 4067-72.
9. Puig-Barberà J, Díez-Domingo J, Arnedo-Pena A, Ruiz-García M, Pérez-Vilar S, Micó-Esparza JL, et al. Effectiveness of the 2010-2011 seasonal influenza vaccine in preventing confirmed influenza hospitalizations in adults: a case-case comparison, case-control study. *Vaccine*, 2012; 30(39): 5714-20.
10. Castilla J, Beristain X, Martínez-Artola V, Navascués A, García Cenoz M, Alvarez N, et al. Effectiveness of rotavirus vaccines in preventing cases and hospitalizations due to rotavirus gastroenteritis in Navarre, Spain. *Vaccine*, 2012; 30(3): 539-43.
11. Cohen AL, Taylor T Jr, Farley MM, Schaffner W, Leshner LJ, Gershman KA, et al. An assessment of the screening method to evaluate vaccine effectiveness: the case of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in the United States. *PLoS One*, 2012; 7(8) :e41785.
12. Seward JF, Zhang JX, Maupin TJ, Mascola L, Jumaan AO. Contagiousness of varicella in vaccinated cases: a household contact study. *JAMA*, 2004; 292(6): 704-8.
13. Kupek E, de Souza DE, Petry A. Effectiveness of DNA-recombinant anti-hepatitis B vaccines in blood donors: a cohort study. *BMC Infect Dis*, 2007; 7: 124.
14. Dabrera G, Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, et al. A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012-2013. *Clin Infect Dis*, 2015; 60(3): 333-7.
15. Greenwood M, Yule GU. The Statistics of Anti-typoid and Anti-cholera Inoculations, and the Interpretation of such Statistics in general. *Proc R Soc Med*, 1915; 8 (Sect Epidemiol State Med): 113-94.
16. Haber M, Longini IM Jr, Halloran ME. Measures of the effects of vaccination in a randomly mixing population. *Int J Epidemiol*, 1991; 20: 300-10.
17. Clemens J1, Brenner R, Rao M, Tafari N, Lowe C. Evaluating new vaccines for developing countries. Efficacy or effectiveness? *JAMA*, 1996; 275(5): 390-7.
18. Shim E, Galvani AP. Distinguishing vaccine efficacy and effectiveness. *Vaccine*, 2012; 30(47): 6700-5.
19. Orenstein WA, Bernier RH, Hinman AR. Assessing vaccine efficacy in the field. Further observations. *Epidemiol Rev*, 1988; 10: 212-41.
20. Fine PE, Clarkson JA. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev Infect Dis*, 1987; 9: 866-83.
21. Fine PE. Implications of different study designs for the evaluation of acellular pertussis vaccines. *Dev Biol Stand*, 1997; 89: 123-33.

22. dos Santos Silva I. Cancer epidemiology: principles and methods. Geneva, Switzerland. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1999.
23. Cherry JD, Olin P. The science and fiction of pertussis vaccines. *Pediatrics*, 1999; 104: 1381-4.
24. Palmer SR. Vaccine efficacy and control measures in pertussis. *Arch Dis Child*, 1991; 66: 854-7.
25. Lister S, McIntyre P, Burgess M, O'Brien ED. Immunisation coverage in Australian children: a systematic review. *Commun Dis Intell*, 1999; 23: 145-70.
26. Mühlemann K, Weiss NS. Can herd immunity influence the assessment of vaccine efficacy in nonrandomized studies? *Am J Public Health*, 1997; 87: 113.
27. Lone NI, Simpson C, Kavanagh K, Robertson C, McMenamin J, Ritchie L, et al. Seasonal Influenza Vaccine Effectiveness in the community (SIVE): protocol for a cohort study exploiting a unique national linked data set. *BMJ Open*, 2012; 2(2): e001019.
28. Galloway Y, Stehr-Green P, McNicholas A, O'Hallahan J. Use of an observational cohort study to estimate the effectiveness of the New Zealand group B meningococcal vaccine in children aged under 5 years. *Int J Epidemiol*, 2009; 38(2): 413-8.
29. Mahamud A, Kamadjeu R, Webeck J, Mbaeyi C, Baranyikwa MT, Birungi J, et al. Effectiveness of oral polio vaccination against paralytic poliomyelitis: a matched case-control study in Somalia. *J Infect Dis*, 2014; 210 (Suppl 1): 187-93.
30. Richard JL, Zwahlen M, Feuz M, Matter HC; Swiss Sentinel Surveillance Network. Comparison of the effectiveness of two mumps vaccines during an outbreak in Switzerland in 1999 and 2000: a case-cohort study. *Eur J Epidemiol*, 2003; 18(6): 569-77.
31. Hennessy S, Liu Z, Tsai TF, Strom BL, Wan CM, Liu HL, et al. Effectiveness of live-attenuated Japanese encephalitis vaccine (SA14-14-2): a case-control study. *Lancet*, 1996; 347(9015): 1583-6.
32. Hak E, Wei F, Grobbee DE, Nichol KL. A nested case-control study of influenza vaccination was a cost-effective alternative to a full cohort analysis. *J Clin Epidemiol*. 2004; 57(9): 875-80.
33. Orenstein WA, Bernier RH, Dondero TJ, Hinman AR, Marks JS, et al. Field evaluation of vaccine efficacy. *Bull World Health Organ*, 1985; 63: 1055-68.
34. Broome CV, Facklam RR, Fraser DW. Pneumococcal disease after pneumococcal vaccination: an alternative method to estimate the efficacy of pneumococcal vaccine. *N Engl J Med*, 1980; 303(10): 549-52.
35. Crépey P, de Boer PT, Postma MJ, Pitman R. Retrospective public health impact of a quadrivalent influenza vaccine in the United States. *Influenza Other Respir Viruses*, 2015; 9 (Suppl 1): 39-46.
36. Valenciano M, Kissling E, Ciancio BC, Moren A. Study designs for timely estimation of influenza vaccine effectiveness using European sentinel practitioner networks. *Vaccine*, 2010; 28(46): 7381-8.
37. Martínez-Baz I, Martínez-Artola V, Reina G, Guevara M, Cenoz MG, Morán J, et al. Effectiveness of the trivalent influenza vaccine in Navarre, Spain, 2010-2011: a population-based test-negative case-control study. *BMC Public Health*, 2013; 191(13): 1-8.
38. Savulescu C, Jiménez-Jorgea S, Delgado-Sanza C, Mateoa S, Pozoc F, Casas I, et al. A Higher vaccine effectiveness in seasons with predominant circulation of seasonal influenza A(H1N1) than in A(H3N2) seasons: Test-negative case-control studies using surveillance data, Spain, 2003-2011. *Vaccine*, 2014; 32: 4404-4411.
39. Chenga AC, Kotsimbosa T, Kelly HA, Irving LB, Bowler SD, Brown SG, et al. Effectiveness of H1N1/09 monovalent and trivalent influenza vaccines against hospitalization with laboratory-confirmed H1N1/09 influenza in Australia: A test-negative case control study. *Vaccine*, 2011; 29: 7320-5.
40. Flannery B, Thaker SN, Clippard J, Monto AS, Ohmit SE, Zimmerman RK, et al. Interim Estimates of 2013-14 Seasonal Influenza Vaccine Effectiveness - United States, February 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2014; 63(7) :137-42.

41. Galanis E, Mak S, Otterstatter M, Taylor M, Zobel M, Takaro TK, et al. The association between campylobacteriosis, agriculture and drinking water: a case-case study in a region of British Columbia, Canada, 2005-2009. *Epidemiol Infect*, 2014; 142(10): 2075-84.
42. Zenner D, Janmohamed K, Lane C, Little C, Charlett A, Adak GK, et al. The serotype case-case design: a direct comparison of a novel methodology with a case-control study in a national Salmonella Enteritidis PT14b outbreak in England and Wales. *Epidemiol Infect*, 2013; 141(11): 2346-53.
43. Farrington CP. Estimation of vaccine effectiveness using the screening method. *Int J Epidemiol*, 1993; 22(4): 742-6.
44. Ivers LC, Hilaire IJ, Teng JE, Almazor CP, Jerome JG, Ternier R, et al. Effectiveness of reactive oral cholera vaccination in rural Haiti: a case-control study and bias-indicator analysis. *Lancet Glob Health*, 2015; 3(3) :e162-8.
45. Penny MA, Verity R, Bever CA, Sauboin C, Galactionova K, Flasche S, et al. Public health impact and cost-effectiveness of the RTS,S/AS01 malaria vaccine: a systematic comparison of predictions from four mathematical models. *Lancet*, 2015 Nov 5. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00725-4.
46. White MT, Verity R, Churcher TS, Ghani AC. Vaccine approaches to malaria control and elimination: Insights from mathematical models. *Vaccine*, 2015; 33(52): 7544-50.
47. Scott N, McBryde E, Vickerman P, Martin NK, Stone J, Drummer H, et al. The role of a hepatitis C virus vaccine: modelling the benefits alongside direct-acting antiviral treatments. *BMC Med*, 2015; 13: 198.
48. Ultsch B, Damm O, Beutels P, Bilcke J, Brüggjenjürgen B, Gerber-Grote A, et al. Methods for Health Economic Evaluation of Vaccines and Immunization Decision Frameworks: A Consensus Framework from a European Vaccine Economics Community. *Pharmacoeconomics*, 2015 Oct 17. doi: 10.1007/s40273-015-0335-2.
49. Biggerstaff M, Reed C, Swerdlow DL, Gambhir M, Graitcer S, Finelli L, et al. Estimating the potential effects of a vaccine program against an emerging influenza pandemic--United States. *Clin Infect Dis*, 2015;60 (Suppl 1): 20-9.
50. Milne GJ, Halder N, Kelso JK, Barr IG, Moyes J, Kahn K, et al. Trivalent and quadrivalent influenza vaccination effectiveness in Australia and South Africa: results from a modelling study. *Influenza Other Respir Viruses*, 2015 Dec 12. doi: 10.1111/irv.12367.
51. Drolet M, Laprise JF, Boily MC, Franco EL, Brisson M. Potential cost-effectiveness of the nonavalent human papillomavirus (HPV) vaccine. *Int J Cancer*, 2014;134(9): 2264-8.
52. Weidemann F, Dehnert M, Koch J, Wichmann O, Höhle M. Modelling the epidemiological impact of rotavirus vaccination in Germany--a Bayesian approach. *Vaccine*, 2014; 32(40): 5250-7.

Mantar enfeksiyonlarının serolojik tanısı

Serological diagnosis of fungal infections

Asuman BİRİNCİ¹,Yeliz TANRIVERDİ-ÇAYCI¹

ÖZET

İnvaziv mantar hastalıklarının tanısında, günümüzde kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüğündeki yetersizlikler veya klinik olarak yararlı olabilecek bir sonucun elde edilmesinin çok zaman alması nedeniyle zorluklar yaşanmaktadır. Hasta sonuçlarında, hızlı tanı anahtar noktadır. Kültür testleri dışında, konaktaki özgül antikor yanıtının ölçülmesine dayalı serolojik testlerin, hızlı uygulanabilmesi ve invaziv örnek alım yöntemleri gerektirmemesi bu testleri çekici kılmaktadır. Ancak özellikle immüno-supresif durumlar nedeniyle, özgül antikor yanıtı oluşturamayan hastalarda bu testler her zaman invaziv hastalık belirteci olmamaktadır. Mikrobiyal antijenlerin tespitinin ise genellikle daha fazla miktarda mikrobiyal yük gerektirmesi duyarlılığı kısıtlamaktadır. Yine de çok sayıda başarıyla çalışan antijen tespit sistemleri geliştirilmiştir ve bunların bazıları halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Dolaşımdaki *Aspergillus galaktomannan*ları tespit için sıçan monoklonal EB-A2'leri kullanan emzim immünoassay yöntemi (Platelia) ticari olarak kullanımdadır. Bu test 0,5-1,0 ng/ml düzeyindeki galaktomannanı tespit edebilmektedir. Ayrıca, galaktomannan klinik belirti ve semptomlar oluşmadan invaziv aspergillozun erken safhalarında serumda tespit edilebilmektedir. Ancak, bu testin yanlış pozitif veya negatif sonuçlar gibi dezavantajları bulunmaktadır. (1,3)-B-D-glukan *Zygomycetes*'ler hariç mantar hücre duvarının karakteristik bir birleşenidir. İnvaziv enfeksiyonlar sırasında *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Acremonium* ve *Pneumocystis jirovecii* içeren birçok mantar tarafından (1,3)-B-D-glukan kana salınmaktadır.

ABSTRACT

Difficulties are being faced in the diagnosis of invasive fungal diseases due to the lack of sensitivity and specificity of the current diagnostic methods or taking too long time to get a result having clinical importance. Rapid diagnosis is the key point in patient outcomes. Excluding the culture tests, because of its rapid application and no need for invasive sampling, was making the serological tests based on the measurement of response of specific host antibody became attractive. However especially due to immunosuppressive conditions, these tests are not always the indicator of invasive disease in the patients who have no ability to produce specific antibody response. Detection of microbial antigens generally requiring a relatively large microbial burden, limits the assay sensitivity. Nonetheless, several examples of successful antigen detection systems have been developed, and some of these are widely used. To detect circulating *Aspergillus galactomannans* enzyme immunoassay (Platelia) method utilizing the rat monoclonal antibody EB-A2 is commercially in use. This test is able to detect galactomannan in the level of 0.5-1.0 ng/ml. Furthermore, galactomannan could be detected in the serum at an early stage of invasive aspergillosis before clinical signs and symptoms occurred. However, this test has some disadvantages like false positive or negative results. (1,3)-B-D-glucan is a characteristic cell-wall component of fungi except for *Zygomycetes*. A broad range of fungi including *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Acremonium* and *Pneumocystis jirovecii* release (1,3)-B-D-glucan to the blood by some fungi containing *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*,

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, SAMSUN



İletişim / Corresponding Author : Asuman BİRİNCİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, SAMSUN

Tel : +90 362 312 19 19 - 3036

E-posta / E-mail : abirinci@omu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 06.02.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 23.10.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.74418

Birinci A, Tanrıverdi-Çaycı Y. Mantar enfeksiyonlarının serolojik tanısı. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 175-82.

(1,3)-B-D-glukan konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntem, atnalı (horsecrab shoe) yengecinin koagülasyon faktörü olan faktör G'nin glukani aktivelemesine dayanmaktadır. Hem Avrupa'da hem de ABD'de (1,3)-B-D-glukan için çeşitli ticari kitler kullanılmaktadır. Mannan invaziv kandidiyazisi bulunan hastalarda dolaşımdaki ana antijendir. Mannana karşı oluşan antikorların tespiti için birçok serolojik test bulunmaktadır. Ancak bu testler, kolonizasyon ve invaziv enfeksiyon ayırımında başarısız olmaktadır. Mannan antijeniyle kombine edilip çalışıldığında, duyarlılık %80 ve özgüllük %93 olmaktadır. Kriptokokkal enfeksiyonların tespitinde serebrospinal sıvıdan veya serumdan kapsüler antijen tespiti kullanılmaktadır. Kapsüler antijen tespiti için hem lateks aglütinasyon hem de enzimimmünoassay testleri bulunmaktadır. Mantar enfeksiyonlarının tanısı için son yıllarda hızla ilerleme kaydedilerek, mantar enfeksiyonlarının erken tespitini sağlayan birçok yeni yöntem geliştirilmiştir. Ancak en iyi yaklaşımın kültür veya mikroskopi gibi konvansiyonel yöntemlerle serolojik yöntemlerin kombine edilmesi olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mantar enfeksiyonları, galaktomannan, (1-3)- B -D-glukan, mannan

Acremonium and *Pneumocystis jirovecii*. The method used for determination of (1.3)-B-D-glucan concentration depends on activation of glucan by factor G, a horsecrab shoe coagulation factor. There are some commercial test kits available for (1.3)-B-D-glucan both in Europe and USA. Mannan is the major circulating antigen in patients who have invasive candidiasis. There are several serological tests for the detection of antibodies formed against mannan. However, these tests are usually failed in discriminating between colonization and invasive infection. When combination with mannan antigen test was performed, it gave sensitivity of 80% and specificity of 93%. In the diagnosis of cryptococcal infections detection of capsular antigen in the both cerebro-spinal fluid or serum, is used. Both latex agglutination and enzymeimmünoassay tests are found to detection of capsular antigen. The diagnosis of fungal infections has moved forward in the past few years and there are many newly developed methods that are likely to provide early detection of fungal infections. However, it seems that best approach is combining both traditional methods like culture or microscopy with serological methods.

Key Words: Fungal infections, galactomannan, (1-3)- B -D-glucan, mannan

GİRİŞ

Son yıllarda mantar enfeksiyonlarının sıklığında ciddi bir artış mevcuttur. Bu enfeksiyonların erken ve doğru tanısı hem antifungal tedaviye zamanında başlanması açısından hem de gerekli değilse başlanmış olan antifungal ajanların kesilerek toksik etkilerinin en aza indirilmesi açısından önemlidir. Fungal etkenlerin tanısında standart olarak kullanılan yöntemler; direk mikroskopi, histopatolojik inceleme ve kültür yöntemleridir. Ancak bu yöntemler kimi zaman yeterli duyarlılığa ve/veya özgüllüğe sahip olmadıklarından kimi zaman da örnekler için invaziv işlemler gerektirdiklerinden tanı açısından yeterli olamamaktadırlar. Bu nedenle invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında bu yöntemler dışında farklı tanı yöntemlerinede ihtiyaç duyulmaktadır (1, 2).

Mantar enfeksiyonlarının tanısında kültür bazlı olmayan serolojik testler geçen yüzyılın ortalarından beri kullanılmaktadır. Seroloji endemik mikozların tanısında oldukça önemli bir parametredir. Mantar enfeksiyonlarının tanısında kullanılan serolojik yöntemler arasında immünodifüzyon (ID), lateks aglütinasyon (LA), kompleman fiksasyon (KF), enzimimmünoassay (EIA) ve radyoimmünoassay (RAI) yer almaktadır (1, 3). Serolojik testlerin kullanımı invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlardan biri kültür için örnek alınmadığı veya kültürde üreme gözlenmediği durumlarda pozitif serolojik testlerin yardımcı olmasıdır. Diğer bir avantajı da *Coccidioides* türleri gibi çalışılması dikkat gerektiren mantarlar için

kültür gereksinimini azaltmalarıdır. Ayrıca serolojik testlerin minimal invaziv testler olmaları hastalar açısından kolaylık sağlamaktadır. Ancak serolojik testlerin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlardan bazıları; düşük duyarlılık ve özgüllük, bazı testlerin zaman alıcı olması, deneyimli personel tarafından çalışılma zorunluluğu, immün sistemi baskılanmış olan hastalarda antikor testlerinden yeterli verim alınamaması ve fungal etkenler arasındaki çapraz reaksiyonlardır. Ayrıca bir serolojik testin negatif olması mantar enfeksiyonu varlığını ekarte ettirememektedir (3).

Bu derlemede özellikle mantar enfeksiyonlarının serolojik tansında yaygın olarak kullanılan galaktomannan, (1-3)- β -D-glukan, mannan ve glukuronoksilomannan saptanmasına yönelik testler üzerinde durulmuştur.

Mantar Enfeksiyonlarının Serolojik Tanısında Kullanılan Antijenler

Galaktomannan

Galaktomannan (GM) birçok *Aspergillus* türünün hücre duvarında bulunan bir polisakkarittir. İnvaziv aspergilloz enfeksiyonlarının tanısında uzun yıllar LA, EIA ve RAI olmak üzere farklı serolojik yöntemlerle, insan vücut sıvılarında galaktomannan antijeni araştırılmıştır (4). Ancak bu testlerin rutin kullanımı, tespit sınırlarının yüksek değerler (5-15 ng/ml) olmasından dolayı kısıtlı kalmıştır. Çünkü bu ölçüm değerleri ancak hastalığın ilerlemiş dönemlerinde oluşmakta ve bu dönemde antifungal tedavinin etkinliği de sınırlı kalmaktadır (1). Sytenen ve ark. (5) sıçan monoklonal EB-A2 antikorlarının kullanarak serum örneğinde, dolaşımdaki galaktomannan antijenlerini saptayan sandviç ELISA yöntemini geliştirmişlerdir. Bu testte tespit sınırı eski yöntemlerden yaklaşık 10-15 kat düşük olacak şekilde 0,5-1ng/ml'dir. Bu yöntemde pozitiflik galaktomannan LA testinden daha erken saptanmakta ve LA testi negatifleşse bile hala pozitif kalmaktadır. Test, 1997 yılında ticari olarak Platelia *Aspergillus*® (BioRad Laboratories, İngiltere)

adıyla piyasa sürülmüş ve 2003 yılında da Amerika İlaç Dairesi (FDA)'nden onay almıştır (5). İlk piyasaya sürüldüğünde testin eşik değeri 1,5 ng/ml iken, daha sonra 0.5 ng/ml olarak değiştirilmiştir. Test sonuçları galaktomannan indeksi (GMİ) ya da optik dansite indeksi (ODİ) olarak rapor edilmektedir. Haftada iki serum örneğinin çalışılması önerilmekte, üst üste gelen iki örnekte pozitiflik olması durumunda invaziv aspergilloz açısından anlamlı kabul edilmektedir (6).

Deney hayvanlarıyla yapılan bazı çalışmalarda GM antijenemisinin derecesi ile dokudaki fungal yük arasında doğru orantı olduğu bildirilmiştir (2, 4). Allojenik kök hücre nakli yapılmış 100 hastada GM saptanmasının invaziv aspergillozun erken tanısındaki etkisi araştırılmış ve hastaların %83'ünde antifungal tedavinin erken başlamasını sağlamıştır (2). Ancak farklı eşik değerlerin kullanılması bu testle ilgili olarak kafa karıştırıcı sonuçlara neden olmuştur. Kansere hastalarında yapılan, eşik değeri >1,5 GMİ olarak kabul eden ve tek bir örnek sonucunu pozitif olarak değerlendiren bir çalışmada duyarlılık %26,1 olarak bulunmuştur. Eşik değeri >0,7 GMİ'ye indirmek duyarlılığı %50'ye çıkarmıştır (7). Eşik değer 1,5'ten 0,5 GMİ'ye çekilmesi erken tanı açısından da önemlidir. Eşik değer, 0,5 GMİ'ye çekilince 6 gün daha erken tanı konulduğu saptanmıştır (8).

Yapılan çalışmalarda yanlış negatif sonuçların nedeni olarak anti-*Aspergillus* antikorlarının varlığı, enfeksiyonun lokalizasyonu ve sınırlı bir alanda olması, *Aspergillus* türleri arasında GM sentez ve salıverilmesindeki farklılıklar ve GM dolaşımının sürekli olmaması üzerinde durulmuştur. Serumların saklanma koşulları da yanlış negatiflik etkenidir. Ayrıca ampirik veya profilaktik olarak antifungal tedavi uygulanması yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir (2).

GM testi için yanlış negatiflik yanında bir diğer sorun da yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmesidir. GM sütte ve tahıllarda da bulunmaktadır ve özellikle kemoterapiye bağlı mukozit nedeniyle intestinal mukozası zarar görmüş kişilerde, tahıllarla

beslenme sonrasında yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Ayrıca süt ağırlıklı olarak beslenen pediatrik yaş grubundaki hastalarda da yanlış pozitif sonuçlar görülebilmektedir. Piperasilin-tazobaktam, ampisilin-sulbaktam, amoksisilin-klavulonik asit gibi mantar kökenli antibiyotiklerin kullanıldığı hastalarda da yanlış pozitiflikler görülebilmektedir (9, 10). Ayrıca diğer fungal etkenlerle (*Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Rhodotorula rubra*, *Geotrichum capitatum*, *Cladosporium* spp., *Botritistulupae*, *Fusarium oxisporum*, *Paecilomyces variotii*, *Walleimia*) enfeksiyon ve immünoglobulinler ile siklofosfamid gibi immün sistem, baskılayıcı ajanların kullanımı da yanlış pozitifliklere neden olmaktadır (2).

İnvaziv aspergilloz tanısında bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında da GM araştırılabilmektedir. Ağca ve ark. çalışmalarında, GMİ değerleriyle, bronkoalveolar lavaj ve bronşial lavaj kültür pozitiflikleri karşılaştırılmış ve GM testinin erken tanıya katkı sağladığı ve eğer GMİ ≥ 1 ise kültürde fungal üremenin beklenebileceğini belirtmişlerdir (11). Solid organ transplantasyonu yapılmış 81 hastanın, BAL örneğinde GM araştırılmış ve bu çalışmada GM eşik değeri ≥ 1 olduğu zaman duyarlılık %100 ve özgüllük %90,8 olarak saptanmıştır ve BAL GM testinin, serum GM ve BAL sitoloji ve kültüründen daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Ancak akciğer transplantasyonu yapılmış olan 12 hastanın beşinde yanlış pozitif sonuç elde edilmiş, bunun nedeni olarak da bu hasta grubunun transplantasyondan önce solunum yollarının *Aspergillus* spp. türleri ile kontamine olmuş olabileceği belirtilmiştir. Akciğer transplantasyonu yapılan hastalar çıkartıldığında özgüllüğün %92,9'a yükseldiği görülmüştür (12). Fisher ve ark.'nın çalışmasında invaziv pulmoner aspergillozda serum ve BAL'da galaktomannan araştırılmasının erken tanıyı artırdığı ve BAL'daki galaktomannan değerinin antifungal tedaviden etkilenmediğini belirtilmiştir (13). BOS'da GM ile ilgili fazla çalışma bulunmamakla beraber BOS'da indeks değer olarak $>0,5$ GMİ kabul edilmesinin santral sinir sistemi (SSS) aspergillozu lehine değerlendirilebileceği bildirilmiştir (14).

(1-3)- B -D-glukan

(1-3)- B-D-glukan (BG), *Zygomycetes*'ler hariç birçok mantar türünün hücre duvar yapısında bulunan non-allerjenik, suda çözülebilir bir polisakarittir. *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Acremonium* ve *Pneumocystis jirovecii*'nin neden olduğu invaziv fungal enfeksiyonlarda kana salınmaktadır. Nötrofil, makrofaj ve kompleman aktivasyonu yapmaktadır. BG, *Cryptococcus* türleri ve *Mucorales* ile enfekte hastaların kanında saptanmamaktadır (2, 3). Kanda BG tespiti, atnalı (horseshoe) yengeçlerinden elde edilen faktör G'yi, BG'nin aktive etmesiyle birlikte bir koagülasyon kaskatını başlaması ve bu reaksiyonların türbidometrik veya kolorimetrik bir yöntemle tespitine dayanmaktadır (3, 15). BG tespitine yönelik çeşitli ticari kitler de kullanıma sunulmuştur: β -D-glukan Test (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japonya), Fungi Tec (Seikagaku Kogyo Corporation, Tokyo, Japonya), BG-Star (Maruha Corporation, Tokyo, Japonya), Glucatell (Fungitell, Associates of Cape Cod, Falmouth, ABD). Bunlardan, Fungitell testinin FDA onayı bulunmakta ve serum, BAL ve plazma örneklerinden çalışılabilmektedir. Bu test için üretici tarafından belirtilmiş eşik değerler, >80 pg/ml: pozitif, 60-79 pg/ml: ara değer ve <60 pg/ml: negatif'tir (16). Bu testin en büyük avantajı 1 saat gibi kısa bir sürede sonuç verilebilmesidir. Bu testin immün sistemi baskılanmış hastalarda haftada en az iki kez çalışması önerilmiş ve üst üste iki örneğin pozitif olmasının invaziv mantar enfeksiyonu lehine anlamlı olduğu belirtilmiştir (17). Ancak bu testte diğer birçok testte olduğu gibi kısıtlayıcı yönler bulunmaktadır. Testin çalışılması sırasında endotoksin ve glukan içeren cam malzemelerin kullanılmaması gerekmektedir. Ayrıca hemodiyaliz hastalarında kullanılan sellüloz membranlar, cerrahide kullanılan gazlı bezler, i.v. albumin veya gama globulin kullanımı, bakteriyemi yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir (18). Ayrıca BG testinin pahalı bir test olması ve panfungal bir test olduğu için etkeni tam olarak belirleyememesi, testin kısıtlayıcı yönleri arasındadır.

Kanıtlamış invaziv fungal enfeksiyonu olanlarda BG için eşik değer >60 pg/ml olarak kabul edildiğinde kandidoz, aspergilloz ve fusaryoz enfeksiyonu olanlarda duyarlılık sırasıyla %81,3, %80 ve % 100 olarak saptanmış ve BG'nin profilaktik antifungal tedaviden etkilenmediği görülmüştür (2). İnvaziv mantar enfeksiyonu olan (kandidoz, aspergilloz, fusaryoz, trikosporoz) akut myeloblastik lösemi hastalarında BG, klinik tanıdan ortalama 10 gün önce pozitif olarak saptanmış ve negatif prediktif değer %100, özgüllük %90 olarak saptanmıştır (19). Ancak Metan ve ark.'nın çalışmasında otolog hematopoetik kök hücre nakli yapılan 79 hastanın serum örneği BG açısından taranmış ve duyarlılık %27,2, özgüllük %94,4, pozitif prediktif değer %6,2 ve negatif prediktif değer %93,7 olarak saptanmıştır ve bu hasta grubunda BG taramasının kliniğe katkısının sınırlı olduğunu belirtmiştir (20).

P. jirovecii enfeksiyonu olan 9 hastanın hepsinde BG pozitif olarak saptanmış ve BG düzeyinin tedavi ile azaldığı görülmüştür (21). Beta gluklan testinin kan dışındaki vücut sıvılarında durumunu değerlendiren fazla çalışma olmamakla birlikte mevcut verilerle test ümit vaat etmektedir. Daha geniş çaplı ileriye yönelik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Mannan

Mannan, *Candida* türlerinin hücre duvarında bulunan polisakkarit yapıda, yüksek immünojenik özellikte bir antijendir ve immünolojik olarak B-glukandan daha aktiftir. Isıya, kaynatmaya, proteinaz etkisine ve asidik pH'a dirençlidir. Kan kültürlerinin pozitifleşmesinden 2-15 gün öncesinde pozitif sonuç alınabilmektedir. Mannan antijeni invaziv kandidozu olan hastalarda kana salınmaktadır. Ticari olarak mannan tespitine yönelik ELISA ve LA temelli testler mevcuttur. ELISA testlerinde duyarlılığın 10 kat fazla olduğu bildirilmiştir. ELISA testi olarak Platelia *Candida* Antibody Test (BioRad, Redman, ABD) kullanımda olan bir testtir. Bu testte sınır değeri 10 AU/ml'dir. Ancak nötrojenik olmayan

hastalarda duyarlılığı düşük olarak bulunmuştur (22). Serum dışında diğer klinik örneklerle yapılan çalışmalar sınırlıdır. Testin duyarlılığı türlere göre değişmektedir. Duyarlılık; *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* türlerinde %58-70 olarak bildirilirken, *C. parapsilosis*, *C. krusei* *C. kefyr* türlerinde ise %25-30 olarak bulunmuştur. Kandidemisi olan 56 hastanın dahil olduğu bir çalışmada *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* türlerinde testin başarısız olduğu saptanmıştır (22). Duyarlılıklar arasındaki farkın testte kullanılan monoklonal antikorların (Mab) *Candida* türlerinin mannoz epitoplarına bağlanmasındaki farktan kaynaklandığı düşünülmektedir (23). Mannan dolaşımından çok hızlı temizlendiği için serum konsantrasyonları düşüktür. Bu nedenle birden fazla serum örneğinde çalışılması önerilmektedir. Tek serum örneği ile değerlendirme yapılan çalışmalarda duyarlılık %11'e kadar düşebilmektedir. Enfeksiyonu olmayan ancak kandida ile kolonize olmuş olan hastaların serumlarında da anti-mannan antikorları tespit edilebilmektedir. Bu nedenle, kolonizasyon ve invaziv hastalık ayırımında yararlı olamamaktadır (24). Ancak ardışık testlerde antikor titrelerinin artmasının enfeksiyon/kolonizasyon ayırımında yararlı olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, antikor ve antijen testlerinin birlikte kullanımının daha yararlı olacağı belirtilmiştir (25). İnvaziv kandidoz tanısında mannan antikor ve antijenlerinin ELISA yöntemiyle çalışıldığı 14 çalışma incelendiğinde duyarlılık ve özgüllük sırasıyla; sadece mannan antijeni kullanıldığında %58 ve %93, mannan antikorunu kullanıldığında %59 ve %83, kombine mannan antikorunu/antijeni kullanıldığında %83 ve %86 olduğu görülmüştür (26).

Glukuronoksilomannan

Kriptokokkal menenjitin tanısında uzun yıllardır antijen testleri kullanılmaktadır. Lateks aglütinasyon testinde kapsüller bir polisakkarit olan glukuronoksilomannan (GXM) antijenini tespit edilmektedir. Kriptokokkal menenjit sırasında GXM yoğun miktarda hem kan hem de beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunmaktadır (3).

Kriptokokkal menenjit tanısında, lateks aglütinasyon ile antijen tespitinin, mikroskopi ve kültür yöntemleri ile karşılaştırılmasında duyarlılık sırasıyla %91,1, %73,2 ve %69,9; özgüllük ise %96,0, %100 ve %100 olarak tespit edilmiş ve antijen tespitinin konvansiyonel yöntemlere göre erken ve hızlı tanı sağladığı belirtilmiştir (27). Kriptokok kapsüller antijenine karşı poliklonal IgG antikoları kullanan lateks aglütinasyon testlerinde yalancı pozitif sonuçlar oluşabilmektedir. Ayrıca romatoid faktör, sistemik trikosporoz, *Capnocytophaga canimorsus* septisemisi ve malignensilere bağlı olarak da yanlış pozitif sonuçlar bildirilmiştir. Ancak bu yanlış pozitiflikler sıklıkla prozon benzeri etki sonucu oluşmakta ve örneğin dilüsyonu ile önlenebilmektedir (19). Fare kökenli monoklonal IgM kullanan Murex Cryptococcus testi (Murex Diagnostic, Galler) romatoid faktöre bağlı olarak oluşan yanlış pozitiflik sorununu ortadan kaldırmıştır ancak bu testin duyarlılığı tavşan kökenli poliklonal IgG kullanılan testlere göre daha düşük olarak bulunmuştur (28). Başka bir testte ise EIA yöntemi kullanılmıştır. Bu testin (PREMIER Cryptococcal antijen testi, Meridian Diagnostic) serum ve BOS için duyarlılığı ve özgüllüğü lateks aglütinasyon testlerine benzerdir. Bu testin lateks aglütinasyonlarına göre en önemli avantajı romatoid faktörle reaksiyona girmemesi, yanlış pozitif sonuçların daha az olması ve çok sayıda örneğin çalışılabilmesine imkan sağlamasıdır (29).

C. neoformans antijen tespitinde son yıllarda kullanıma giren bir dipstick testi olan Cr Ag lateral flow immünoassay (LFA) özellikle kısıtlı imkanlara sahip kurumlarda kullanım kolaylığı getirmiştir (3).

Diğer testler

İnvaziv kandidozun tanısında kullanılmak üzere geliştirilen bir test de 230-250 kDa'luk germ tüp mannoproteininin tespitine yönelik indirekt immünofloresan bir test olan CAGTA (Candida albicans germ tube antibody) testidir. Bu testin değişik hasta gruplarındaki (intravenöz uyuşturucu kullananlar, kemik iliği alıcıları, hematolojik malignensisi olan hastalar ve yoğun bakım hastaları) özgüllüğü %91-

100 olarak bulunmuştur. *C. albicans* dışında diğer kandidalara (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* ve *C. krusei*) bağlı olarak oluşan invaziv kandidozda da CAGTA sonuçları daha düşük titre de olmakla birlikte pozitif olarak bulunmuştur. Ayrıca CAGTA titrelerindeki azalmanın, invaziv kandidozu olan ve antifungal tedavi alan hastalarda tedaviye yanıtın izlenmesinde de yardımcı olacağı bildirilmiştir. CAGTA tespitine yönelik IFA IgG (Vircell Laboratoire, İspanya) adlı ticari kit geliştirilmiştir. Testler sıklıkla anti-Candida IgG'nin tespitine yönelik olsa da IgM, IgA ve IgE tespitine yönelik testler de kullanılmıştır. Bunlardan özellikle IgA'nın invaziv kandidoz tanısında yararlı bir belirteç olduğu bildirilmiştir (30).

Kandidalarda hücre duvarında değil de sitoplazmada yer alan ve enzimatik aktiviteye sahip enolaz, aspartil proteinaz ve metallo peptidaz gibi antijenlere karşı oluşan antikoları saptamaya yönelik testler de kullanılmıştır. Bu antijenleri saptamaya yönelik ticari kitler henüz bulunmamaktadır. Enolaza karşı oluşan antikoların araştırıldığı bir çalışmada duyarlılık ve özgüllük immün sistemi sağlam bireylerde sırasıyla %50-92 ve %86-95; immün sistemi baskılanmış bireylerde ise %53 ve %78 olarak tespit edilmiştir (30). *C. albicans* için önemli bir virulans faktörü olan salgısal aspartil proteinaza (SAP) karşı oluşan antikoların araştırıldığı bir çalışmada invaziv kandidozlu hastalarda duyarlılık %69,7 ve özgüllük %76 olarak bulunmuştur (30, 31).

Cand-Tec lateks aglütinasyon testi (Ramco Laboratories, Houston, ABD) ısıya duyarlı antijen tespitine yönelik kullanıma giren ilk ticari testtir. Ancak testin duyarlılığı ve özgüllüğü çalışmalar arasında farklılık göstermektedir ve ayrıca romatoid faktör pozitifliğine bağlı olarak yalancı pozitiflikler de bildirilmiştir (1, 32). Bir başka hedef antijen olan enolazın kandidemili hastalarda serumda bulunurken yüzeysel kolonizasyonu olan hastalarda bulunmadığı tespit edilmiştir. Ancak kandidemi tanısında umut vaat eden bu test, üreticisi (Directigen, Becton Dickenson, ABD) tarafından piyasadan çekilmiştir (1).

Sonuç

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının sıklığı her geçen yıl giderek artmaktadır. Bu nedenle erken ve doğru tanının konması ve tedaviye başlanması hayati önem taşımaktadır. Ancak laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmakta olan konvansiyonel yöntemler bazen yetersiz kalmaktadır. Yıllar içinde mantar patojenlerinin virulans faktörlerinin ve antijenik determinantlarının tanımlanması invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısı için yeni yaklaşımların gelişmesini sağlamıştır. Son yıllarda mantar

enfeksiyonlarının tanısında serolojik testler konusunda ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu testler kimi zaman tanıya çok yardımcı olsa da, duyarlılık ve özgüllük sonuçları kimi zaman yetersiz kalabilmektedir. Ayrıca bu derlemede de belirtildiği üzere çeşitli faktörlerin de serolojik testleri etkileyebilmesi göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak klinik, kültür ve mikroskopik yöntemlerle birlikte serolojik testlerin uygun hasta popülasyonunda ve uygun sıklıkta çalışılmasının invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısına katkısının büyük olacağı görülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Yeo SF, Wong B. Current status of non culture methods for diagnostics of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, 2002; 15: 465-83.
2. McLintock LA, Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Brith J Hematol*, 2004;126: 289-97.
3. Kozel TH, Wickes B. *Fungal Diagnostics*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014; doi: 10.1101/cshperspect.a019299.
4. Verweij PE, Meis JFGM. Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, 2000; 2: 80-7.
5. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 497-500.
6. Mennik-Kersten M, Donnelly JP, Verweij P. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet*, 2004; 4(6): 349-57.
7. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F et al. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncology*, 2002; 20: 1898-906.
8. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of invasive Aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis*, 2004; 190(3): 641- 9.
9. Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B et al. Occurrence and Kinetics of False-Positive Aspergillus Galactomannan Test Results following Treatment with beta-lactam Antibiotics in Patients with Hematological Disorders. *J Clin Microb*, 2006; 44: 389- 4.
10. Mattei D, Rapezzi D, Mordini N, Cuda F, Nigro C, Musso M et al. False-Positive Aspergillus Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Results In Vivo during Amoxicillin-Clavulanic Acid Treatment. *J Clin Microb*, 2004; 42: 5362-3.
11. Ağca H, Ener B, Yılmaz E, Ursavas A, Kazak E, Özkocaman V et al. Comparative evaluation of galactomannan optical density indices and culture results in bronchoscopic specimens obtained from neutropenic and non-neutropenic patients. *Mycoses*, 2014; 57: 169-75.

12. Clancy CJ, Jaber RA, Leather HC, Wingard JR, Staley B, Wheat LJ et al. Bronchoalveolar Lavage Galactomannan in Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis among Solid-Organ Transplant Recipients. *J Clin Microbiol*, 2007; 45(6): 1759-65.
13. Fisher CE, Stevens AM, Leisenring W, Pergam SA, Boeckh M, Hohl TM. Independent contribution of bronchoalveolar lavage and serum galactomannan in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Transpl Infect Dis*, 2014; 16: 505-10.
14. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Racil Z, Richardson M, Rogers TR. Detection and investigation invasive mold disease. *J Antimicrob Chemother*, 2011; 66: 15-24.
15. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishikawa N et al. Plasma (1,3)-B-D-Glucan and Fungal Antigenemia in Patients with Candidemia, Aspergillosis, and Cryptococcosis. *J Clin Microbiol*, 1995; 33(12): 3115-8.
16. Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, Touratier S, Raffoux E, Menotti J et al. Use and Limits of (1,3)-B-D-Glucan Assay (Fungitell), Compared to Galactomannan Determination (Platelia Aspergillus), for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol*, 2014; 52(7): 3228-33.
17. Ener B. İnvazif fungal infeksiyonlarda tanısal yaklaşım. *Ankem Derg*, 2013; 27(Ek2): 141-3.
18. Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. *J Antimicrob Chemother*, 2002; 49: 11-4.
19. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ et al. B-D-Glucan as a Diagnostic Adjunct for Invasive Fungal Infections: Validation, Cutoff Development, and Performance in Patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Clin Infect Dis*, 2004; 39: 199-205.
20. Metan G, Koç AN, Kaynar LG, Atalay A, Öztürk A, Eser B et al. What is the role of the (1,3)-b-D-glucan assay in the screening of patients undergoing autologous haematopoietic stem-cell transplantation? *Mycoses*, 2013; 56: 34-8.
21. Koo S, Bryar J, Page JH, Baden LR, Marty FM. Clinical utility of the (1,3)-B-D-glucan assay (BG) in the diagnosis of invasive fungal infections (IFI). Program and abstracts of the 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; September 27-30, 2006; San Francisco, California. Abstract M-1600.
22. Held J, Kohlberger I, Rappold E, Grawitz AB, Häcker G. Comparison of (1,3)-B-D-Glucan, Mannan/anti-Mannan-antibodies and Cand-Tec Candida-Antigen as Serum Biomarkers for Candidemia. *J Clin Microbiol*, 2013;45(6):1158- 64.
23. Sendid B, Poiret JL, Tabouret M, Bonnin A, Caillot D, Camus D, et al. Combined detection of mannanaemia and anti-mannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infections caused by pathogenic *Candida species*. *J Med Microbiol*, 2002; 51: 433- 42.
24. Martínez JP, Gil ML, López-Ribot JL, Chaffin WLJ. Serologic Response to Cell Wall Mannoproteins and Proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*, 1998; 11(1):121- 41.
25. Lopez-Ribot JL, Casanova M, Murgui A, Martinez JP. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2004; 41: 187-96.
26. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C, The Third European Conference on Infections in Leukemia Group. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia Group. *Critical Care*, 2010;14 (R222): 2-14.
27. Wang H, Yuan X, Zhang L. Latex agglutination: Diagnose the early *Cryptococcus neoformans* test of capsular polysaccharide antigen. *Pak J Pharm Sci*, 2015; 28 (Suppl): 307-11.
28. Jaye DL, Waites KB, Parker B, Bragg SL, Moser SA. Comparison of two rapid latex agglutination tests for detection of cryptococcal capsular polysaccharide. *Am J Clin Pathol*, 1999; 109: 634-41.
29. Gade W, Hinnefeld SW, Babcock LS, Gilligan P, Kelly W, Wait K, et al. Comparison of the PREMIER cryptococcal antigen enzyme immuno assay and the latex agglutination assay for detection of cryptococcal antigens. *J Clin Microbiol*, 1991; 29: 1616-9.
30. Quindós G, Moragues MD, Pontón J. Is there a role for antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis? *Rev Iberoam Micol*, 2004; 21: 10-4.
31. Ellepola NBA, Morrison CJ. Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis. *The J of Microbiol*, 2005;43: 65-84.
32. Burnie JP, Williams JD. Evaluation of the Rameo latex agglutination test in the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol*, 1998; 5(4): 98-101.

Dijital PZR ve kullanım alanları

Digital PCR and applications

Ahmet ÇARHAN¹, Elif ERCAN¹, Tuğba YALÇINKAYA¹

ÖZET

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), DNA kompleks havuzundan spesifik bir DNA parçasını çoğaltmaya olanak sağlayan basit, etkin ve özellikle moleküler biyoloji alanında yaygın olarak kullanılan enzimatik bir tekniktir. PZR tekniğinin keşfinden günümüze kadar gelişen teknolojiyle birlikte pek çok PZR tekniği ortaya çıkmıştır. Bu tekniklerden bazıları Gerçek Zamanlı PZR, Kantitatif PZR, Ters Transkriptaz PZR, Nested PZR ve Multipleks PZR dir. Günümüze kadar geliştirilmiş PZR tekniklerinin çeşitli zorlukları yüzünden PZR tekniklerinin kullanım alanını genişletmek ve daha ileri seviye PZR teknikleri bulmak araştırmacıların birinci önceliği haline gelmiştir. Nadir mutasyonların, kopya sayısı varyasyonlarındaki ufak değişikliklerin, gen ifadesi değişiklikleri arasındaki farklılıkların veya metilasyon durumunun değerlendirilmesine izin veren yeni bir yöntem olarak dijital PZR (dPZR) teknolojisi geliştirilmiştir. Dijital PZR, DNA kopya sayısının hassas ölçümü için PZR bazlı yeni bir tekniktir ve örnekleri az sayıda seyrelterek çok sayıda PZR gerçekleştirmeye olanak sağlar ve her birinde ayrı ayrı PZR gerçekleşen çok sayıda küçük bölümlere sahiptir. Aynı zamanda dPZR; şu an çok az miktardaki genetik materyalin miktarını dakikalar içinde tespit etme performansı ile birçok nicel yöntemleri geride bırakmıştır. Tek molekülü sayma stratejisi sayesinde bu yöntem yüksek hassasiyet gösterebilmektedir. Güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik

ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR), is a simple, effective and widely used enzymatic technic especially in the field of molecular biology which provides the opportunity to amplify a specific DNA fragment from DNA complex pool. Several PCR techniques such as real-time PCR, quantitative and qualitative PCR, Reverse Transcriptase PCR, Nested PCR and multiplex PCR have been developed since the first invention of PCR. Due to the various difficulties of the PCR techniques developed so far, widening the application fields and finding out more advanced level of PCR techniques have become the first priority of the researchers. Digital PCR (dPCR) technology has been developed as a new method to permit the evaluation of the small changes in the copy number variations of the rare mutations, differences between the gene expression changes or state of methylation. Digital PCR is a PCR based new technique for the sensitive measurement of number of DNA copies, it provides opportunity to do large number of PCR with a few number of sample dilution and it has so many small compartments where separate PCRs are executed in each. At the same time, dPCR leaves some of the quantitative methods behind with the performance of determining the quantity of small amount of genetic material within seconds. This method shows high

¹ Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Ahmet ÇARHAN

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA

Tel : +90 505 874 56 82

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

Geliş Tarihi / Received : 12.11.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 25.02.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.48902

Çarhan A, Ercan E, Yalçinkaya T. Dijital PZR ve kullanım alanları. Türk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 183-98.

düzeyi oldukça yüksek bir yöntem olmasıyla da dikkat çekmektedir. Bu derleme, digital PZR yönteminin günümüze kadar olan süreçteki gelişimine ve ilerleyen günlerde çözüm bulunması gereken eksik yönlerine dikkat çekmeyi amaçlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Dijital PZR, Nadir Mutasyon, dMIQE Kuralları

sensitivity with the strategy of counting single molecule. It also attracts the attention as a method having quite a high reliability and repeatability level. This review aims to give insight for dPCR development history and the possible difficulties came across in its application.

Key Words: Digital PCR, Rare Mutation, dMIQE rules

GİRİŞ

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) keşfedildiğinden bu yana biyoloji bilimi kökten değişmiştir (1). Bu teknik adını, DNA Polimeraz enzimi kullanılarak DNA'nın bir parçasını in vitro yöntemle çoğaltılmasından almaktadır. PZR sayesinde birkaç farklı düzenlemeyle üretilen DNA parçasının milyonlarca kopyası arasından, istenilen bir DNA parçasının bir tek veya birkaç kopyasını laboratuvar ortamında çoğaltabilmek mümkündür.

PZR genetik işlemlerin geniş bir yelpazede değiştirebilmesine olanak sağlar (2). Yaygın kullanımı nedeniyle PZR'nin temel prensiplerini, genomun ve genlerin gelişmiş şekilde analizini nasıl modifiye ettiğini anlamak önemlidir (3).

PZR, özellikle moleküler biyoloji alanında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (2). PZR hedefli stratejiler ile İnsan Genom Projesi gibi kapsamlı araştırmalar yürütülmüş, tıbbi alanda da klinisyenler ve araştırmacılar tarafından gen dizileri, hastalıkların teşhisi gibi nitel-nicel ve genomik çalışmalarda kullanılmıştır. Yöntemin hassas ve hızlı olması büyük avantaj sağlamaktadır. Klasik PZR, mikrobiyolojide patojenlerin tespiti ve adli tıpta suçluların tanımlanması gibi alanlarda da kullanılmaktadır (3).

PZR ile ilgili bilgiler ilk olarak 1985'de rapor bildirilmiştir (4). 1993 yılında, Mullis PZR üzerine

çalışmalarından dolayı Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür. DNA'nın belirli bir parçasını izole etmek için kullanılan tekniklerin zaman alıcı olması nedeniyle PZR yöntemine ihtiyaç duyulmuştur. Diğer bilim adamları da sınırsız ve kusursuz bir şekilde genetik materyali elde etmek için güçlü bir teknik arayışına girmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda Polimeraz Zincir Reaksiyonunu geliştirerek başarılı olmuşlardır (5).

PZR'nin Genel Mekanizması

PZR, DNA kompleks havuzundan spesifik bir DNA parçasını çoğaltmaya olanak sağlayan basit ve neredeyse kusursuz, enzimatik bir işlemdir. PZR işlemini kavramsallaştıran Kary Mullis PZR yöntemini "DNA'nın yalnızca ilgilendiğiniz bir parçasını istediğiniz kadar almanıza olanak sağlıyor" şeklinde açıklamıştır. PZR yönteminde periferik kan, deri, saç, tükürük ve mikroorganizma olmak üzere farklı tipte hayvansal ve bitkisel kökenli materyal DNA kaynağı olarak kullanılmaktadır. PZR için gerekli olan DNA miktarının elde edilmesi ve yalnızca yeterli miktarda kopyanın analiz edilmesi geleneksel laboratuvar yöntemleri ile sağlanır. Bu nedenle PZR hassas bir yöntemdir (3).

PZR yöntemlerinde termal döngü cihazı kullanılmaktadır. Termal döngü belirli bir diziyeye

sahip PZR örneğinin ısıtılması ve soğutulmasıdır. PZR'nin termal döngüsü; DNA erime sıcaklığı ve DNA replikasyon enzimleri için ısıtma ve soğutma reaksiyonlarının tekrar tekrar uygulanmasıyla ısıya dayanıklı DNA Polimeraz, primer dizi (tamamlayıcı hedef bölge) ve dNTP karışımı kullanılmasına dayanır. Böylelikle, milyonlarca kopya DNA'nın çoğaltılması gerçekleştirilmiş olur. Denatürasyon, bağlanma ve uzatma işlemleriyle hem orjinal DNA şablonuna ve hem de tamamlayıcı bölgeye bağlanabilen primer ile yeni iplikler sentezlenmesine devam edilir ve DNA yeni kopyalar üretmek için uzatılır. Sonuç olarak PZR primer dizileri içeren DNA parçaları üstel olarak artmış olur (6-8).

PZR Çeşitleri

PZR tekniğinin bulunmasından günümüze kadar gelişen teknolojiyle birlikte pek çok PZR tekniği ortaya çıkmıştır. Bunlardan en sık kullanılanlar Gerçek Zamanlı PZR, Kantitatif PZR, Ters Transkriptaz PZR, Nested PZR ve Multipleks PZR'dir.

Gerçek Zamanlı PZR tekniğinin kullanımı son derece yaygın olup, DNA ya da mRNA gibi makromoleküllerin çoğaltılmasına ve ürünlerin tek bir tüpte tespit edilmesine olanak sağlar (9). Bu metot sayesinde çok az miktardaki biyolojik bir örneğin hedef bölgesinin varlığına/yokluğuna veya miktarına hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ulaşılabilmektedir (10).

Gerçek Zamanlı PZR (qPZR)'nin normal PZR'den farkı, başlangıç DNA miktarının hesaplanabilmesidir. Bu metot ile DNA amplifikasyonu, artan floresan ölçümleri ile ilişkilendirip kantitatif sonuçlar elde edilir (11).

Ters Transkriptaz PZR ise RNA moleküllerinden komplementer DNA (cDNA) sentezini, retrovirüslerden izole edilen Revers Transkriptaz enzimi ile gerçekleştirilmesidir. Hassas ve hızlı bir yöntemdir. cDNA sentezlendikten sonra DNA-RNA sarmalı ayrılır, ayrılan DNA dizisi kalıp olarak kullanılarak çift zincirli DNA dizisi çoğaltılır (12).

Nested PZR metodu PZR'nin spesifikliğini arttırmak için geliştirilmiş olup, birbirini takip eden iki polimeraz zincir reaksiyonu ile karakterizedir. İlk amplifikasyonda, hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü iki dış primer kullanılır ve uzun bir bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilir. İkinci amplifikasyonda ise ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç kısmına bağlanan iki iç primer kullanılarak kısa bölgenin de çoğaltılması gerçekleştirilir (11).

Multiplex PZR (mPZR) metodunda ise kalıp DNA üzerinde birden fazla bölge için çoklu primer çifti tasarımı gerçekleştirilir. Sonuç itibarıyla aynı örnek üzerinde çoklu bölgenin çoğaltılmasına imkan sağlar. Net, hızlı ve güvenilir bir metottur (13).

Dijital PZR

Şimdiye kadar geliştirilmiş PZR türlerindeki zorluklar ve kullanım alanlarının daha da genişletilmek istenilmesi ile ileri teknoloji PZR geliştirilmesi araştırmacıların öncelikli hedefi haline gelmiştir.

Son yıllarda dijital PZR olarak bilinen yeni versiyon PZR, yaygın olarak nükleik asit miktarının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Örneklerin mikrolitrelerin altında porsiyonlanıp nükleik asit ölçümlerinde kesinliğin, güvenilirliğin, doğruluğun ve tekrarlanabilir ölçümlerin arttırdığı bir sistemdir. Bu yöntem analog qPZR'nin aksine, çoğaltma işleminin nerede yapıldığına dair logaritmik sinyali, dış kalibrasyona dayalı miktar tayinini, doğrusal ve dijital miktar tayininin sayı olarak pozitif ve negatif reaksiyonlarının sayısını, Poisson dağılımlarını dikkate alarak, hesaplamaya olanak sağlar (48).

qPZR ile kıyaslandığında sonuçlar daha düşük analitik hassasiyette olabilmesi gibi dPZR metodunda reaksiyon hacmine bağlı olarak bazı kısıtlamalar olmasına rağmen, düşük DNA konsantrasyonlarını ölçmeye ve tekrarlanabilir ölçümler yapmaya olanak sağlar. dPZR'nin bu avantajları göz önünde bulundurulduğunda, kendisine birçok kullanım alanı bulmuştur ve büyük potansiyele sahiptir. Örneğin; bitki patojenleri, genetiği değiştirilmiş organizma testleri,

dirençli bakterilerin tespiti, viral teşhisler, nadir mutasyonların tespiti ve kopya sayısı varyasyonları alanlarında kullanılmaktadır (48).

Örneğin; qPZR tekniğindeki standartlar aracılığıyla analizlerin kalibrasyonunda teknik sınırlamalar mevcuttur. Bu tekrarlı iş akışı araştırmacıya vakit kaybettirmektedir (14). Standart analog ölçümlerde aynı analiz belirteçlerini kullanacak bir yöntem geliştirmek amacıyla yola çıkan araştırmacılar, kısıtlı örneklerde bile çalışan ve dijital formatta bilgi veren dPZR'yi geliştirmişlerdir (23).

Klasik genetikte, germ hattı mutasyonları sadece hastalığı anlamak için önemli kabul edilmiştir. Somatik mutasyonların gerçekleşmesi kanserin birincil nedenidir ve aynı zamanda yaşlanmada rol oynayabileceği yeni genetik prensipler olarak ortaya çıkmıştır. Bu keşifler hastalığın yönetilmesine fayda sağlarken aynı zamanda neoplazi patojeninin temel araştırmalarına da olanak sağlar. Bununla birlikte bu fırsatlar çok fazla miktardaki normal hücre arasından bir miktar mutant hücrenin tespitine bağlıdır (23).

DNA dizilemesi, germ-line mutasyonların saptanması için altın standart ama mutasyona uğramış aleller yaklaşık %20 daha büyük olduğu zaman kullanışlıdır. Mutantlara spesifik olan oligonükleotitler bazen küçük miktardaki hücrelerde mutasyonları tespit etmek için kullanılabilir fakat mutant ve vahşi tip (WT) şablonların ses sinyali oranı değişkendir. Mutantlara spesifik primerlerin kullanılması ve spesifik restriksiyon endonükleazlar ile PZR ürünlerinin parçalanması gibi yöntemler mutasyonların saptanması için çok hassas yöntemlerdir ama bu tekniklerle başlangıç popülasyonlarında mutant moleküllerin bölümlerini nicelendirmek zordur. Somatik mutasyonların saptanması için diğer yaklaşımlar gözden geçirilmiştir. Bu yöntemler ile ilgili genel sorun bağımsız bir şekilde herhangi bir mutasyonun varlığının teyit edilmesinin zor veya imkansız olmasıdır. Bu nedenle belirtilen güçlüklerin üstesinden gelmek için bazı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri tamamen

mutant ya da tamamen WT'dir. Böylece bu makalede anlatılan strateji ayrı ayrı şablon moleküllerin amplifikasyonunu içerir. PZR ürünlerinin homojenliği mevcut olan tekniklerin ayırt edilmesini kolaylaştırır. Bu gibi ayrı amplifikasyonlar pratik anlamda yararlıdır. Bununla birlikte çok sayıda basit ve güvenilir tespit elde edilebilir. Bu tür değerlendirmeler için kullanılan tekniklerde analizi yapılan popülasyonlarda mutant allel formlarının çıktığı veren dijital okuması sağlanarak geliştirilmiştir. Bu uygulama teknolojileri için çeşitli öngörüler bulunmaktadır (23).

Dijital PZR, kendi gücünün başka bir örneğini temsil etmektedir, son zamanlarda geliştirilen tespit teknolojileri ile birlikte genetik analizler için fırsatlar sağlamaktadır (23).

Nadir mutasyonların, kopya sayısı varyasyonlarındaki ufak değişikliklerin, gen ifadesi değişiklikleri arasındaki farklılıkların veya metilasyon durumunun değerlendirilmesinin tespitine izin veren yeni bir yöntem olarak dPZR teknolojisi geliştirilmiştir (15).

Tek bir molekülün sayımıyla nükleik asitlerin mutlak ölçümü sınırlayıcı dilüsyon (seyreltme) ve Poisson istatistiksel analizine olanak sağlaması 1992 yılında Sykes ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (16).

Dijital PZR, DNA kopya sayısının hassas ölçümü için PZR bazlı yeni bir tekniktir ve örnekleri az sayıda seyrelterek çok sayıda PZR reaksiyonu gerçekleştirmeye olanak sağlar (17). Bu teknikte, her biri ayrı ayrı PZR reaksiyonu geçiren çok sayıda küçük bölümler bulunmaktadır (18). Yöntem, birçok ayrı PZR reaksiyonunun sınırlı seyreltilmesi temeline dayanır (19). Aynı zamanda dPZR; şu an çok az miktardaki genetik materyalin dakikadaki miktarını tespit etme performansı ile birçok nicel yöntemleri geride bırakan güçlü ve uygun tek moleküllü sayma stratejisidir (15).

Droplet dijital PZR (ddPZR) standart bir eğriye ihtiyaç duymadan nükleik asitlerin mutlak kantitatif ölçümüne olanak sağlar. Bu teknik 20.000 ve hatta

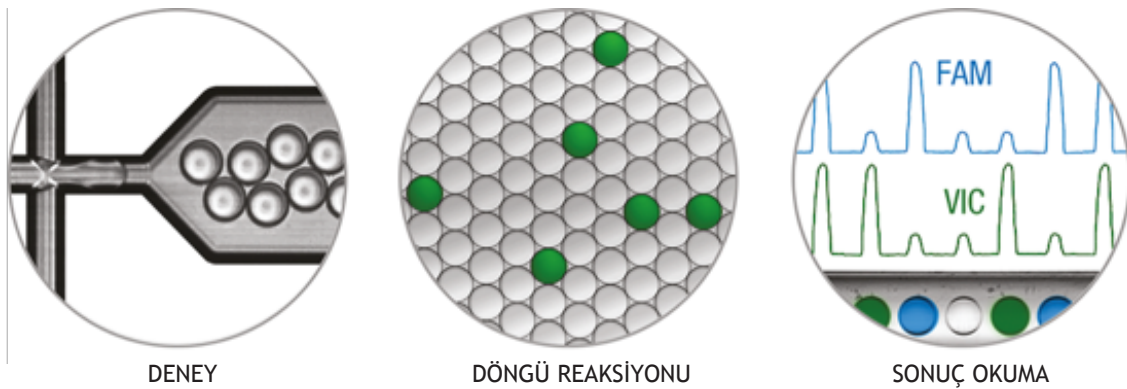
çok daha küçük droplet adı verilen reaksiyon kapları içinde nükleik asitlerin porsiyonlanması temeline dayanır. Standart bir PZR reaksiyonu daha sonra her bir droplet hedefini çoğaltmak için kullanılabilir, böylelikle ayrı ayrı pozitif ve negatif şekilde hedef bağımlı floresan sinyali ölçülebilecektir. “1” olan sinyal pozitif, “0” olan sinyal negatif olmak üzere ikili kod tekniğinin dijital kısmını temsil eder ve veriler Poisson dağılımına uygun olarak hesaplanabilmektedir. Bu da standart eğriye gerek kalmadan herhangi bir örnekten DNA kopya sayılarının doğrudan ve basit bir şekilde hesaplanmasına olanak sağlar (21).

Seyreltilmiş örnek tek tek PZR reaksiyonlarına dağıtılır ve orjinal örnek miktarı analiz bölümlerinin toplam sayısı açısından olumlu bir büyütme ile bölümlerin sayısına göre ölçülür. Bölümlerin içindeki moleküllerin dağılımı bağımsız ve rastgele bir işlemdir (22). Dijital PZR bir numunedeki nükleik asitlerin, kesin olarak miktarının saptanmasını sağlar. Dijital PZR uygulaması için pratik ve ölçeklendirilebilen teknolojilerin eksikliği bu güçlü tekniğin yaygın olarak benimsenmesini engelliyordu. Burada yüksek verimli damlacık dijital PZR sistemi 96 kuyulu bir plaka ile geleneksel TaqMan problemleri kullanılarak ~ 2 milyon PZR reaksiyonu işlenmesini sağlar (20) (Şekil 1). Ayrıca örneğin uygun bir şekilde seyreltilmesi genellikle reaksiyon bölümü başına sadece bir hedef molekülün incelenmesini garanti eder. Daha yüksek konsantrasyonda kalıp kullanılırken, moleküllerin

gerçek sayısı gözden kaçabilir çünkü bazı bölümler birden fazla kalıp molekül içerir. Kullanılan Poisson istatistiği bu bozulmayı bir dereceye kadar önleyebilir (23). Floresan kimyası teknolojisi özgül bir PZR ürünün varlığını veya yokluğunu algılamak üzere qPZR’da da olduğu gibi dPZR’da da kullanılmaktadır. Sonuçta verilerin yorumlanması karmaşık biyoinformatik analizlere sıkı sıkıya bağlı değildir. Bazı uygulamalarda, ardışık olasılık oran testi allel dağılımı normalden farklı olduğu için kanıtların gücünü ölçmekte kullanılabilir (24).

Örneğin Şekil 2’de;

(A) Master mix içeren 20 µL numune, primerler, TaqMan problemleri ve hedef DNA, sekiz kanallı damlacık jeneratör kartuşunun orta kuyularına yüklenir. Emülsiyon stabilize edici yüzey aktif madde içeren damlacık oluşturma yağı (8 x 60 µL) daha sonra damla üretici kartuşunun solundaki kuyunun içine yüklenir. Bir vakum bir basınç farkı oluşturmak için çıkış kuyusuna (sağdaki kuyu) otomatik olarak uygulanır, bu arada mikroakışkan döngü geometrisi sulu örneğin içinde istikrarlı hale dönüşür. Tek dağılımlı olarak su içindeki yağ emülsiyon damlacıkları ve yağ fazındaki yoğunluk farklılıkları nedeniyle yoğunlaşarak kartuşun damlacık toplama kuyusunda toplanır. Her bir kuyudaki damlacıklar daha sonra 96 oyuklu, folyo ile kapatılmış plakaya aktarılır ve son olarak termal döngüye girer (25).



Şekil 1. Dijital PZR'a genel bakış (20)

(B) Amplifikasyon sonrasında plaka damla okuyucuya yüklenir ve burada otomatik olarak damlacıklar mikroakışkan singulatör kullanılarak aspire edilir. Örnekler 100 kHz hızında tek sıra halinde FAM/VIC iki renkli floresan dedektöründen geçirilir.

(C) Damlacıklar için floresan genliklerindeki farklılıklar amplifikasyon varsa veya hiç oluşmadığı durumlarda tipik Fam/Vic dubleks çalışmaları için tüm damlacık popülasyonunu dört ayrı küme halinde böler. Bu dört popülasyonlar hiçbir hedefin bulunmadığı (F -/ V -), hedeflerin birinin (F -V+/ F +V-) veya hedeflerin her ikisini de (F +/ V +) içeren damlacıklar vardır. Damlacıkları sınıflandıran dijital yöntemde her algılama kanalı için bir floresan eşiği ayarlanmıştır ve damlacık başına düşen ortalama kopya sayısının hesaplanması pozitif damlacıkların fraksiyonu ve Poisson modelleme ile bulunabilir (25) (Şekil 2).

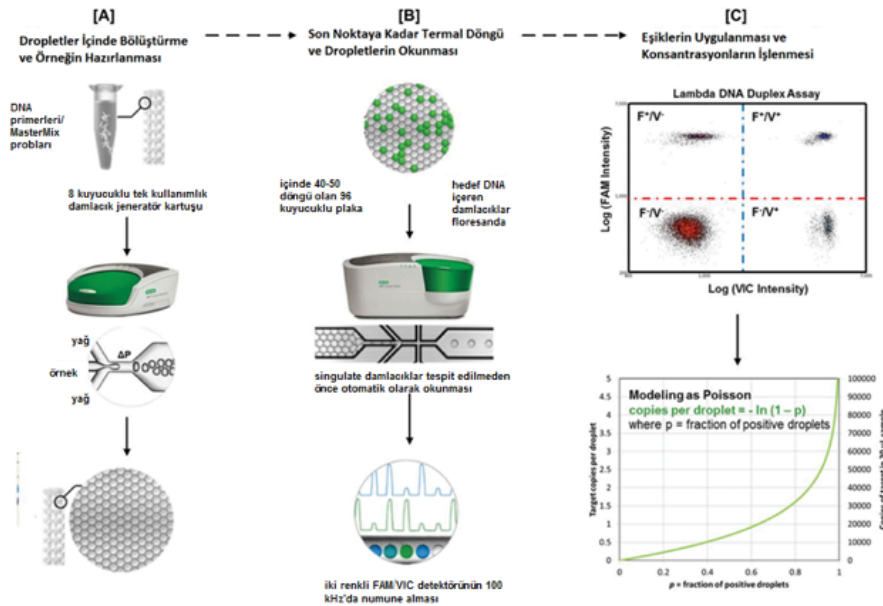
dPZR'nin yukarıda belirtilen özellikleri diğer yöntemlerin tespit yeteneklerinden farklıdır, bu da çeşitli araştırma uygulamaları için dPZR yaklaşımını eşsiz kılar (15). Son zamanlarda dPZR'nin DNA mutlak ölçümü kapasitesi, yeni nesil DNA dizileme

kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılmıştır (26).

Dijital PZR'nin diğer PZR teknolojilerine göre üstünlükleri

Dijital PZR, qPZR'a kıyasla daha yüksek hassasiyet gösteren PZR bazlı mutlak ölçüm tekniğidir. Bugüne kadar yapılan kanser ve viral enfeksiyonlar üzerindeki çeşitli çalışmalar dPZR'nin qPZR'a göre duyarlılığının ve hassasiyetinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (17). Bu avantajın asıl nedeni, reaksiyonların tek tek bölümlendirilebilmesidir (20). Geleneksel qPZR ile karşılaştırsak ddPZR daha düşük saptama limitlerine ve daha büyük dinamik aralığa sahiptir (21).

Dijital PZR teknik olarak Gerçek Zamanlı PZR'den çok daha basittir ve eşik (threshold) verilerini yorumlayabilmek için standart dilüsyon eğrilerine gerek duyulmamaktadır (19). Böylelikle qPZR ile tespit edilemeyen biyolojik ve transkripsiyonel potansiyele sahip çok düşük düzeyde açıklanan genlerin varlığı ddPZR ile tespit edilebilmektedir. Buna ek olarak, dPZR'nin bir üstünlüğü de mutlak ölçüm sağlamasıdır. qPZR kullanılarak tespit edilemeyen düşük veya limitli



Şekil 2. ddPZR'nin genel çalışma prensibi (25)

miktardaki hedefleri tespit etmek için kullanılması çalışmalara avantaj sağlar (27).

dPZR'nin daha kesin sonuç vermesindeki en önemli özellik metot sağlamlığından (robustness) ileri gelmektedir. qRT-PZR daha yüksek bir dinamik aralığa sahip olmasına rağmen dijital PZR örnekler arasındaki en ufak değişiklikleri bile saptamaya olanak sağlar. qRT-PZR'nin aksine dijital PZR, azaltılmış PZR verimliliği karşısında daha dirençlidir. qRT-PZR ile

karşılaştırıldığında dezavantaj olarak daha düşük bir dinamik aralığı vardır (18).

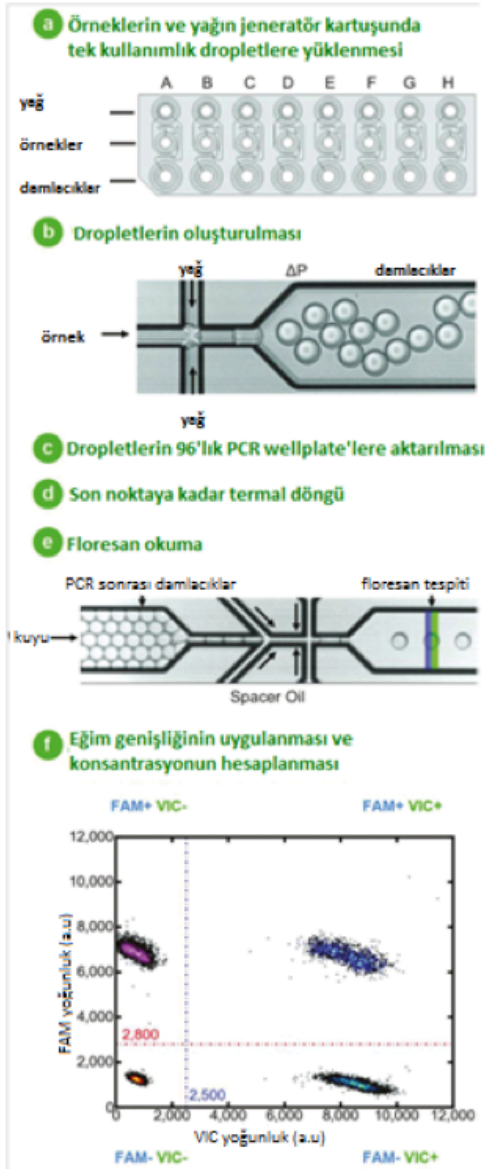
dPZR Avantaj ve Dezavantajları

Dijital PZR'da daha düşük maliyetlerde yüksek verimlilik mümkündür (17). Yeterli seyreltmeler ile, birçok reaksiyon standart bir eğriye ihtiyaç duymadan Poisson istatistikleri kullanılarak şablon bir DNA içermeden ölçüm gerçekleştirilir (19). Bu yeni metot analizin daha uygulanabilir ve tekrarlanabilir olmasına olanak sağlar (28).

Droplet dijital PZR (ddPZR), teorik olarak tek bir hedef molekülün saptanabilmesine olanak sağladığından dolayı hassasiyeti yüksek olan bir metottur (18). ddPZR son derece düşük frekanslı durumlarda bile efektif çalışır (29).

PZR verimliliğinin hesaplanması için seyreltme eğrilerine ve mutlak ölçüm için DNA standartlarına gerek yoktur (18). dPZR hedef RNA miktarı çok düşük olsa bile gen ekspresyonunun saptanmasına olanak sağlar (27).

Harici standartların kullanılması qPZR'da analitik performans ölçmede merkez noktadır. Harici kalibratörlere dPZR'da gerek duyulmaması ve enzim inhibisyonuna yol açacak maddelere karşı tolerans sahibi olması, nükleik asit kantifikasyonunda kullanılmasının temel sebebidir (26, 30). Her iki teknoloji de nükleik asitlerinin keşfinde aynı floresan kimyasını kullansa bile; dPZR dinamik diziyi eş zamanlı etkileyerek aynı anda kalıbın çoğaltılması için partikül sayımına izin vererek daha kesin bir ölçüm sağlayabilmektedir. dPZR teknolojisindeki son gelişmeler reaksiyon bölümlerinin binlerden milyonlara kadar olmasıyla ölçeklenebilir bir ortam sağlar (20). Sonuç olarak dPZR, qPZR'a göre daha üstün hassasiyet göstermekte olup, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik açısından da nükleik asit ölçüm imkanı sunmaktadır. Lakin düşük maliyetli olması açısından Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR günümüzde hala en çok kullanılan nükleik asit ölçüm yöntemidir (15). Teknik ön amplifikasyon adımına gerek kalmadan



Şekil 3. dDroplet dijital PZR'ın çalışma prensibi (20)

nükleik asitlerin izlerini tespit etmede son derece güçlüdür böylece tahlile özgü önyargılı bir giriş önlenmiş olur (31).

Analitik kesinliğine karşılık gelen katsayı "coefficient" varyasyon değeri, qPZR'a göre dPZR için önemli ölçüde daha düşük olduğu gösterilmiştir (15). Dahası, kalıp bölmeleri azaltılarak arka plandaki DNA ve kirleticilerin seviyeleri düşürülür, pozitif reaksiyon bölümlerinin sinyal sesi arttırılmış ve böylece algılama hassasiyeti arttırılmış olmaktadır (32).

Kullanım Alanları

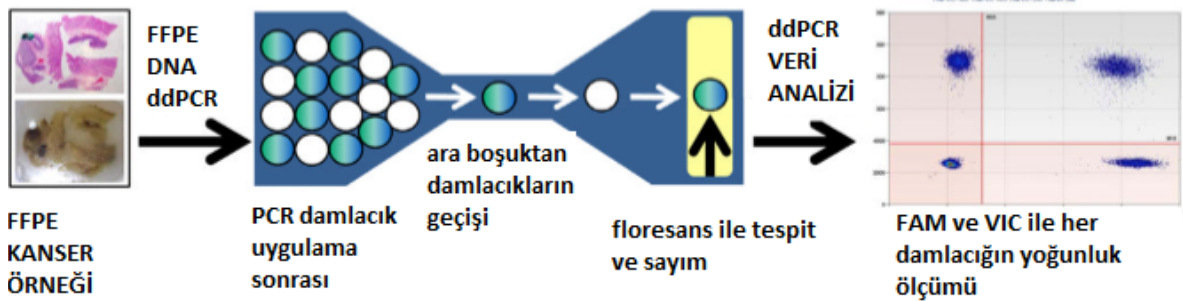
dPZR tekniğinin kullanım alanlarından bahsedecek olursak; heterojen tümörlerde ya da genetik kökenli hastalıklarda nadir allel tespitlerinde (33), periferel vücut sıvılarını kullanarak solid tümörlerin likit biyopsisinde (34), invaziv olmayan prenatal tanıda (20), viral yük tespitinde (35), gen ekspresyonunda, heterojen örneklerde kopya sayısı varyasyonlarında (36) (Şekil 5), kısıtlı miktardaki örneklerin analizinde, örneğin FFPE örnekleri ve tek hücre gen ekspresyonu gibi, dizileme öncesi DNA kalite testlerinde (26, 37) (Şekil 4), gıda alanında Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO) (38) tespitinde kullanılmaktadır.

Örneğin Şekil 4'te görüldüğü üzere; DNA, daha önceden arşivlenmiş bir kanser numunesinden elde edilir. Formalin ile parafin bloğa fikse edilen mide adenokarinoma örneği beraberindeki lekeli bölüm ile gösterilmiştir. DNA izolasyonundan sonra damlacık PZR belirli bir gruba ait PZR primerleri ve floresan

probu ile yapılmaktadır. PZR sonrası emülsiyon damlacıkları iki renkli bir detektöre açılan kılcalın içine doğru tek tek akar; hedef ve referans genler için pozitif damlacıklar 6-FAM ve VIC gibi farklı boyalarla kopya sayısı kantitatif olarak sayılabilir. Bir boya kontrol bölümüne özgüdür ve diğer bölümleri ölçer. Mevcut örnek, eğer tümör hücrelerinin sadece küçük bir kısmını içeriyorsa bile anormal genomik amplifikasyonları algılamak için ddPZR kullanarak FFPE tümör örneklerinde genomik amplifikasyonları ölçmek için güçlü bir çözüm geliştirilmiştir. ddPZR metodunda genomik DNA'dan nanogram miktarda olması yeterlidir, böylece nadir numuneleri bile çalışılması kolaylaşmıştır. Hindson ve arkadaşları tarafından açıklandığı gibi ddPZR metodu belirli genomik etkinliklerin son derece hassas ve spesifik olarak saptanması için örneğin emülsifiye edilmesini içerir (44).

Verimli çalışma platformları içinde dPZR'yi güçlü potansiyele dönüştürmek için, tek bir molekül büyütmesi süreci son derece istikrarlı bir ortamda gerçekleşmelidir. Platformun seçimi özellikle kesinlik derecesi, sonuç, sistem ve tahlillerdeki maliyete bağlıdır (15).

İlk nesil dPZR platformları mikroakışkan kanallar içeren çiplere dayanmaktadır (39). Hedef molekül gerçek zamanlı olarak izlenebilir böylece yanlış pozitif reaksiyonlar her bir reaksiyonunun büyütme (amplifikasyon) eğrisinden çıkarılabilir. Yüksek hassasiyet ve kesinlik için dijital platformların daha



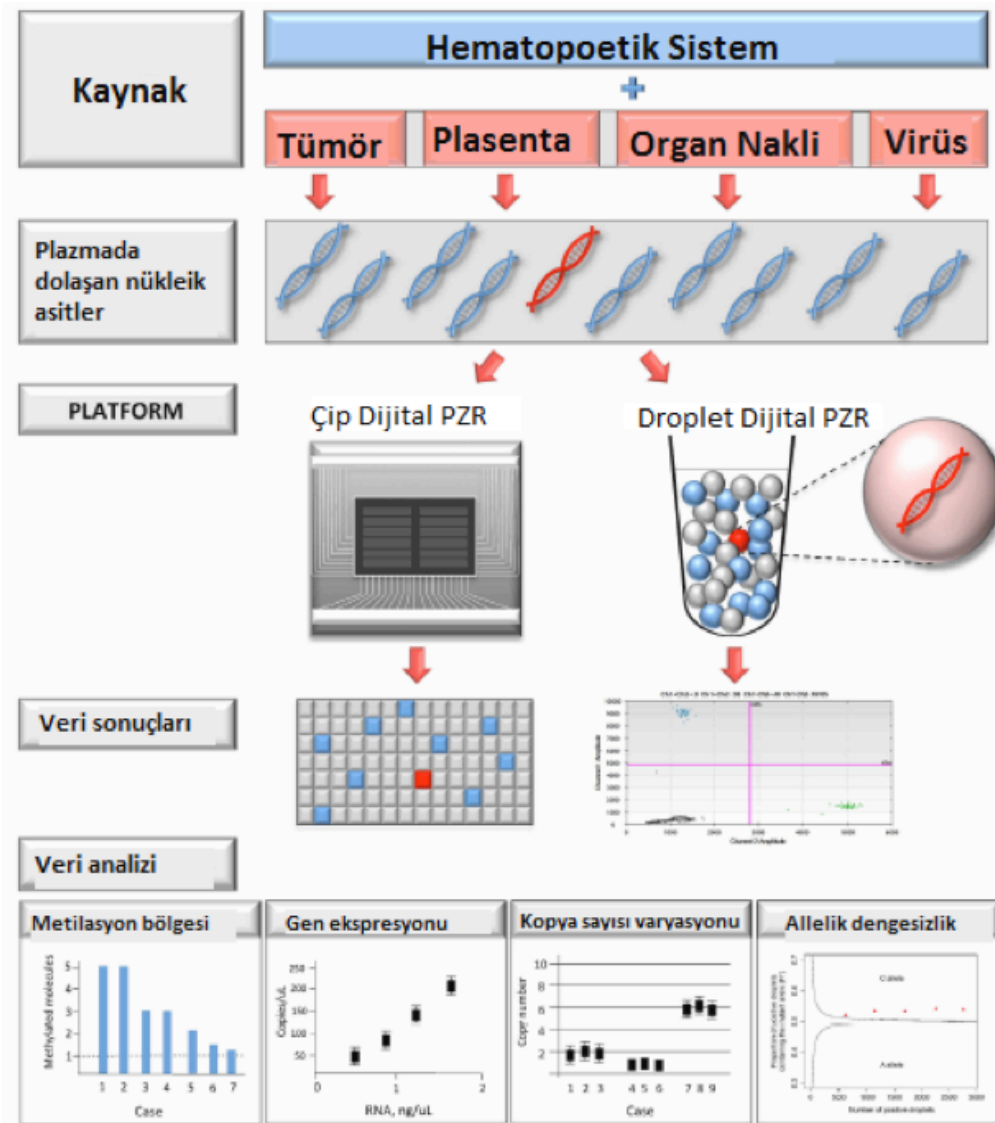
Şekil 4. Formalinde sabitlenmiş ve parafine yerleştirilmiş (FFPE) kanser doku örneklerinin amplifikasyon analizinde droplet dijital PZR'nin genel çalışma prensibi (44)

çok sayıda numaralandırılmasına ihtiyaç vardır. Bu nedenle, şirketler her dPZR reaksiyonunu yağda sulu damlacıkların içinde PZR okuma bitiş noktası ile birleştiren sistemlerini başlatmışlardır. Bu platformlar Gerçek Zamanlı PZR ölçümü gerçekleştiremiyor olmalarına rağmen çok büyük sayıdaki reaksiyon bölümlerinin birbirine benzer ebattaki dinamik değerleri çarpıcı bir artışa yol açmıştır (25). Sysmex Inostics tarafından sağlanan beaming dijital PZR

teknolojisi (boncuk, emülsiyon, amplifikasyon ve manyetik) klonal manyetik parçacıkların varlığında nükleik asitleri çoğaltmaya ve sitometri akışı kullanılarak da miktarı değerlendirmeye olanak sağlar (40). Bu dPZR stratejisi, özellikle kanser araştırmalarında geniş kullanım alanı bulmuştur (15).

Örneğin Şekil 3'te görüldüğü üzere;

a) Örnekler ve damlacık oluşturma yağı sekiz kanallı damlacık jeneratör kartuşu içine yüklenir.



Şekil 5. Dolaşan nükleik asit araştırmasında çip veya droplet dijital PZR teknolojisinin şematik gösterimi (15)

b) 1 nl'lik damlacıklar halinde örneğin ve yağın akışıyla vakum işlemi gerçekleşir. İki dakikadan az bir süre içerisinde, sekiz örnek 20.000 damlacıklı sekiz sete dönüşür.

c) Satbilize olan damlacıklar 96'luk wellplate'lere aktarılır.

d) Droplet PZR'nin çoğaltma basamağından son aşamaya kadar (3.545 döngü) termal döngü işlemleri gerçekleşir.

e) Her bir kuyucuktan çekilen damlacıklar plaka okuyucuya yüklenir, saniyede yaklaşık 1.000 adet geçecek şekilde iki renkli dedektörden geçirilir.

f) Damlacıklar floresan genliklerine göre pozitif ve negatif olarak atanır. Her kanal içerisindeki pozitif ve negatif damlacıklar, %95 Poisson güven aralığında olmak üzere, hedef ve referans DNA dizilerinin konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılır (20) (Şekil 3).

dPZR'nin klinikte RNA biyobelirteçlerinin saptanmasında ve miktarının belirlenmesinde kullanışlı olabileceği belirtilmiştir (27). dPZR'nin analitik gücü bir kopya başına 100.000 yabanıl tip dizinin altında tek bir nükleotid varyantının algılanmasını sağlar (41).

Meme kanseri hücre hattı ile ilgili araştırmalar, HER2 gen kopya sayısı varyasyonunda ince kat farklılıklarının saptanmasında qPZR'a kıyasla dPZR'nin daha üstün hassasiyet ve duyarlılık gösterdiği rapor edilmiştir (36). Dijital PZR kolorektal kanser ve meme kanseri olan hastalarının plazmasındaki belirli bir lokusun metilasyon durumunun değerlendirilmesi için kullanılmıştır (42, 43).

1999 yılında kolorektal kanser ile ilişkili ras onkogen mutasyon miktarının belirlenmesi için Vogelstein ve Kinzler öncü bir çalışma yaparak dPZR'nin klinik çalışmaya yardımcı bir program olabileceğini vurgulamıştır (23). Ancak zahmetli oluşu klinik ortamda rutin kullanımını engellemiştir. Böylece pratik gelişimine odaklanması yönünde çalışmalar yapılması gerektiği belirtilmiştir. Daha sonra mevcut

geliştirilen platformların pratikliği kolaylaştırılmış ve birçok klinik alanda kullanımı sağlamıştır (20).

Viroloji ve bakteriyoloji alanında, Cytomegalovirus (CMV), Hepatit B virüs, HIV-1 virüs, metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* tespitinde ve viral yükün ortaya konmasında dPZR kullanılmıştır (49, 50-52). HIV-1 için yapılabilen düşük düzeydeki viral yük tespiti retroviral tedaviye faydalı olabileceğine işaret etmektedir (53-55).

Mikroakışkan çipler kullanılarak mikrodropletler sayesinde binlerce ya da milyonlarca reaksiyon dijital PZR ile ayrı ayrı bir örnek halinde incelenir. ddPZR örnekleri nanolitreden pikolitreye kadar minimize edilmiş hacimlerde çalışmaya olanak sağlamıştır. Reaksiyon PZR'nin son noktasına ulaştığında; damlalar ilgili hedef dizinin kopyalarını içermeyebilir ya da bazı kopyalarını içerir (27). ddPZR spesifik virüslerin düşük kopyalarının saptanmasında kullanışlı olabilir (21).

ddPZR yüksek miktardaki örneklerin ölçümüne de uygulanabilir. ddPZR yaklaşık 45 dakika numunenin işlenmesine ve sonrasında numune sayısına bağlı droplet okuma vakti olarak 1-2 saat daha ek süreye ihtiyaç duyar (21).

Kantitatif Dijital PZR Deneylerinin Yayınlanabilmesi İçin Gerekli Olan Minimum Bilgi (dMIQE) Kuralları

Dijital PZR için ilk ticari platform 2006 yılından beri piyasada olmasına rağmen, zaten iyi kurulmuş bir qPZR ile karşılaştırıldığında klinik ortamda tam potansiyele sadece başlangıçta sahip olduğu gösterilmiştir. Klinik uygulama içinde dPZR uygulanması yolundaki ilk adım farklı laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirliği geliştirmek için deneysel ayrıntıları bildiren bir çerçeve sağlayan dMIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PZR Experiments) kuralları yayınlanarak alınmıştır (45). MIQE kurallarını içeren kontrol listesi, qPZR analizlerinin geliştirilmesi, verilerin tekrarlanabilmesi ve karşılaştırılabilmesi amacıyla

2009 yılında yayımlanmıştır. Tüm öğeler temel olanlar (E-Esansiyel) ya da isteğe bağlı olanlar (İ-isteğe bağlı) şeklinde kategorize edilmiştir (45).

Sonuç

Dijital PZR yeni uygulamalar ve araştırmalar için gelişmekte olan yeni bir PZR tekniği olarak karşımıza çıkmıştır. Güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik düzeyi oldukça yüksek bir yöntemdir. Çok düşük hacimlerde ve tek molekül konsantrasyonunda çalışılabildiğinden dolayı, yöntem yüksek hassasiyet gerektirmektedir. Deney tasarımı yapılmadan önce tek bir hedef olduğundan emin olunmalıdır. Birden çok hedef olduğu takdirde ise, her hedef farklı bir kuyucukta işlem görür (46).

Nadir allel tespiti durumunda, yanlış pozitiflerin oranı oldukça önemlidir. Çok oldukları takdirde gerçek pozitiflerin sayısını maskeleyebilirler. Kalıbın başlangıç konsantrasyonu da oldukça önemlidir, numunenin uygun seyreltilmesi bu konsantrasyona göre belirlenir. Daha önce de bahsettiğimiz gibi dijital PZR teknolojisinde, standart eğriye gerek duyulmadan DNA parçaları arasında hassas moleküler ölçümler gerçekleştirilebilir, yüksek özgüllük hassasiyeti görülür ve yüksek tekrarlanabilirlik mümkündür. dPZR'nin en büyük gücü kalibratör referansa ihtiyaç duymadan,

kantitatif ölçümler ile hassas bir şekilde doğrudan sayım yapabilmektedir (46).

Araştırmacılar dPZR'nin potansiyeli hakkında istekli olmalarına rağmen, deney tasarımında dikkatli olunması hususunda uyarıda bulunmaktadır. Teknolojinin olgunlaşmış olgunlaşmayacağı, maliyetin de azalması azalmayacağı şu an birçok araştırmacı için merak konusudur. Şu an az miktarda uygulama alanı olsa da yarın çok daha fazla kullanım sahasının olması beklenmektedir (47). Gelişmiş dizileme yöntemi ile dPZR'nin diğer PZR yöntemlerinin yerini alabileceğini söyleyebiliriz, fakat bunun ne zaman gerçekleşeceğini tahmin etmek zordur (31).

Bu tartışmalar üzerine, bu derlemede dPZR'nin bilinirliğini ülkemiz bilim camiasında arttırmak, bu tekniğin gıda ve sağlık alanlarında nadir allel tespiti ve düşük düzey genetik analizlerde uygulanmasının teşvik edilmesi amaçlanmıştır. İlgili teknolojinin kabul edilebilirliğini arttırmak ancak bu tekniğin kullanımının yaygınlaştırılması ile mümkündür. Laboratuvar çalışmalarında kullanımda olan moleküler teknikler tek başına bütün sorularımıza cevap verememektedir. Metotlar birbirinin tamamlayıcıları durumundadır. Dolayısı ile dPZR, kullanım alanlarında hassasiyeti yakalamak isteyenlere daha doğrulayıcı bir yaklaşım sağlayabilecektir.

Tablo 1. Tüm kullanıcılar için Kantitatif Dijital PZR deneylerinin yayınlanabilmesi için gerekli olan minimum bilgi (dMIQE) kuralları listesi (45)

Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi	Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi
Deneyel Tasarım		Deneyel Tasarım	
Deney ve kontrol gruplarının tanımlanması	E	Örneğin hacmi veya kütlesi	E
Her grup içindeki numaralar	E	Mikro ya da makrodiseksiyon	E
Analizler merkezi labda mı yoksa araştırmacının kendi labında mı gerçekleştirilecek?	İ	İşleniş prosedürü	E
Güç analizi	İ	Eğer dondurulma varsa-nasıl ve hangi hızda?	E
Örnek tanımı	E	Fikse edilecekse, ne ile ve hangi hızda?	E
		Örneğin saklanma koşulları ve süresi	E

Tablo 1. Devam

Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi	Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi
Nükleik asit ekstraksiyonu		dPZR hedef bilgisi	
Miktar tayini-Gereçler/Yöntem	E	Sekansın katılım numarası	E
Saklama koşulları: sıcaklık, konsantrasyon, süre, tampon çözelti	E	Amplikon konumu	İ
DNA veya RNA miktar tayini	E	Amplikon uzunluğu	E
Kalite/bütünlük, cihaz/yöntem	E	BLAST vs gibi veritabanlarındaki özgüllük ekranı	E
Kalıbın yapısal bilgisi	E	Pseudogenler, retropseudogenler veya diğer homologları	İ
Kalıp modifikasyonu (sindirim, sonikasyon, preamplifikasyon, vs)	E	Sekans hizalama	İ
Kalıp iyileştirme (İlk ısıtma ya da kimyasal denatürasyon)	E	Amplikonun ikinci yapı analizi ve GC içeriği	İ
Seyreltmenin engellenmesi	E	Ekzon veya intron tarafından oluşturulan her primerin konumu (varsa)	E
RNA örneğinde DNA kontaminasyonun değerlendirilmesi	E	Nerede uygundur, hangi ek varyantlar hedeflenmiştir?	E
DNAaz ile muamelenin detayları	E	dPZR Oligonükleotitleri	
Kullanılan reaktiflerin üreticisi ve katalog numaraları	İ	Primer dizileri ve/veya amplikon içerik dizisi	E
Nükleik asitlerin saklama koşulları: sıcaklık, konsantrasyon, süre, tampon çözelti	E	RTPrimerDB (real-time PZR primer ve prob veritabanı)	İ
RT (Eğer gerekliyse)		Prob dizileri	İ
cDNA oluşturma yöntemi ve konsantrasyonu	E	Konum ve kimlik değişimleri	E
Bir ya da iki-basamak protokolü	E	Oligonükleotitlerin üreticisi	İ
Reaksiyon başına kullanılan RNA miktarı	E	Pürifikasyon yöntemi	İ
Reaksiyon bileşenlerinin ve koşullarının ayrıntıları	E	dPZR Protokolü	
RT verimliliği	İ	Reaksiyon koşullarının tamamlanması	E
RT ile birlikte ve RT olmadan ölçülen tahmini kopyalar	İ	Reaksiyon hacmi ve RNA/cDNA/DNA miktarı	E
Reaktiflerin üreticisi ve katalog numaraları	İ	Primer, (Prob), Mg ²⁺ ve dNTP konsantrasyonları	E
Reaksiyon hacmi (2 basamaklı RT reaksiyonu için)	İ	Polimeraz kimliği ve konsantrasyonu	E
cDNA'nın saklanma koşulları: sıcaklık, konsantrasyon, süre ve tampon çözelti	İ	Tampon/Kit katalog numaraları ve üreticileri	E
		Tampon çözeltinin kimyasal içeriği	İ
		İlaveler (SYBR gren I, DMSO, vs)	E

Tablo 1. Devam

Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi	Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi
dPZR Protokolü		Veri analizi	
Plate/Tüp katalog numaraları ve üreticileri	i	Bölüm başına ortalama kopya (veya eşdeğeri)	E
Tam termodöngüleme parametreleri	E	dPZR analiz programı (kaynağı, versiyonu)	E
Reaksiyon kurulumu	i	Uyumsuz tanımlama ve düzen	E
Gravimetrik ya da hacimsel seyreltmeler (manuel/robotik)	i	Kalıp olmayan kontrollerin sonuçları	E
Hazırlanan total PZR reaksiyon hacmi	i	Ek veri olarak pozitiflerin ve negatif test sonuçlarının örnekleri	E
Bölüştürme sayısı	E	Referans genlerin sayısının ve seçiminin gerekçesi, uygunluğu	E
Bireysel bölüştürme hacmi	E	Yöntemin normalizasyonu ve tanımı	E
Ölçülen bölüştürme hacimleri	E	Biyolojik kopyaların uyumu ve sayısı	i
Bölüştürme hacmi değişiklikleri/SD	i	Tekniksel kopyaların basamağı (RT veya dPZR) ve sayısı	E
Kontrollerin kapsamlı ayrıntıları ve uygun kullanımı	E	Tekrarlanabilirlik	E
dPZR gereçlerinin üreticisi	E	Çoğaltılabilirlik	i
dPZR test sonucu kontrolü		Deneysel varyans	E
Deney için optimizasyon verileri	i	Analiz için kullanılan istatistiksel yöntemler	E
Özgünlük (nadir mutasyonlar, patojen dizileri vs ölçülürken)	E	RDML kullanılarak verileri gönderme (Real-time PZR Data Markup Language)	i
Kalibrasyon kontrolünün saptama limiti	i		

Tüm öğeler temel olanlar (E-Esansiyel) ya da isteğe bağlı olanlar (i-isteğe bağlı) olarak kategorize edilmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 1990; 262: 56-61, 64-5.
2. Bottero MT, Civera T, Nucera D, Rosati S, Sacchi P, Turi RM. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats', and sheeps' milk in dairy products. *Int Dairy J*, 2003; 13: 277-82.
3. Garibyan L, Avashia N. Polymerase Chain Reaction. *J Investig Dermatol*, 2013; 133 (3): e6.
4. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*, 1991; 252: 1643-51.
5. Gibbs RA, DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Chemistry Anal Chem*, 1990; 62 (13): 1202-14.
6. Arnheim N, Erlich H. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annu Rev Biochem*, 1992; 61: 131-56.
7. Sharkey DJ, Scalice ER, Christy KG, Atwood SM, Daiss JL. Antibodies as thermolabile switches: High temperature triggering fort he polymerase chain reaction. *Biotechnol*, 1994; 12: 506-509.
8. Elizabeth G. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*, 2007; 8: 481-8.
9. Klein D. Quantification using real-time PCR tecnology: Applications and limitations. *Trends Mol Med*, 2002; 8: 257-60.
10. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and potential use in clinical diagnosis. *Clin Science*, 2005; 109: 365-79.
11. Karataş M. Moleküler Biyoloji. Nobel Akademik Yayıncılık. 2012; 288-90.
12. Santagati S, Garnier M, Carlo P, Violani E, Picotti GB, Maggi A. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Br Res Prot*, 1997; 1 (3): 217-23
13. Auckenthaler R, Risch M. Do Multiplex PCR techniques displace classical cultures in microbiology? *Ther Umsch*, 2015; 72 (2): 77-85.
14. Karlen Y, McNair A, Perseguers S, Mazza C, Mermod N. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 2007; 8: 131.
15. Hudecova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin Biochem*, 2015; 142 (15): 9.
16. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*, 1992; 13: 444-9.
17. Kim TG, Jeong SY, Cho KS. Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014; 98 (13): 6105-13.
18. Jahn M, Vorpahl C, Türkowsky D, Lindmeyer M, Bühler B, Harms H, et al. Accurate determination of plasmid copy number of flow sorted cells using droplet digital PCR. *Anal Chem*, 2014; 86 (12): 5969-76.
19. Wiencke JK, Bracci PM, Hsuang G, Zheng S, Hansen H, Wrensch MR, et al. A comparison of DNA methylation specific droplet digital PCR (ddPCR) and real time qPCR with flow cytometry in characterizing human T cells in peripheral blood. *Epigenetics*, 2014; 9 (10): 1360-5.
20. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*, 2011; 83: 8604-10.
21. Sze MA, Abbasi M, Hogg JC, Sin DD. A comparison between droplet digital and quantitative PCR in the analysis of bacterial 16S load in lung tissuesamples from control and COPD GOLD 2. *PLoS One*, 2014; 9(10): e110351.
22. Bhat S, Herrmann J, Armishaw P, Corbisier P, Emslie KR. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Anal Bioanal Chem*, 2009; 394: 457-67.
23. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 9236-41.

24. Zhou W, Galizia G, Lieto E, Goodman SN, Romans KE, Kinzler KW, et al. Counting alleles reveals a connection between chromosome 18q loss and vascular invasion. *Nat Biotechnol*, 2001; 19: 78-81.
25. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem*, 2012; 84: 1003-11.
26. White RA, Blainey PC, Fan HC, Quake SR. Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC Genomics*, 2009; 10: 116.
27. Takahashi K, Yan IK, Kim C, Kim J, Patel T. Analysis of extracellular RNA by digital PCR. *Front Oncol*, 2014; 4: 129.
28. Usmani-Brown S, Lebastchi J, Steck AK, Beam C, Herold KC, Ledizet M. Analysis of β -cell death in type 1 diabetes by droplet digital PCR. *Endocrinology*, 2014; 155 (9): 3694-8.
29. White TB, McCoy AM, Streva VA, Fenrich J, Deininger PL. A droplet digital PCR detection method for rare L1 insertions in tumors. *Mob DNA*, 2014; 5 (1): 30.
30. Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, Jerome KR. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clin Chem*, 2013; 59: 1670-2.
31. Whale AS, Cowen S, Foy CA, Huggett JF. Methods for applying accurate digital PCR analysis on low copy DNA samples. *PLoS One*, 2013; 8: e58177.
32. Weisenberger DJ, Trinh BN, Campan M, Sharma S, Long TI, Ananthnarayan S, et al. DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight. *Nucleic Acids Res*, 2008; 36: 4689-98.
33. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip*, 2011; 11 (13): 2156-66.
34. Chen WW, Balaj L, Liau LM, Samuels ML, Kotsopoulos SK, Maguire CA, et al. BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013; 2: e109.
35. White RA, Quake SR, Curr K. Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus. *J Virol Methods*, 2012; 179 (1): 45-50.
36. Whale AS, Huggett JF, Cowen S, Speirs V, Shaw J, Ellison S, et al. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Res*, 2012; 40: e82.
37. Didelot A, Kotsopoulos SK, Lupo A, Pekin D, Li X, Atochin I, et al. Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples. *Clin Chem*, 2013; 59 (5): 815-23.
38. Dobnik D, Spilsberg B, Bogožalec Košir A, Holst-Jensen A, Žel J. Multiplex quantification of 12 European Union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction. *Anal Chem*, 2015; 87 (16): 8218-26.
39. Spurgeon SL, Jones RC, Ramakrishnan R. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS One*, 2008; 3: e1662.
40. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 8817-22.
41. Heyries KA, Tropini C, Vaninsberghe M, Doolin C, Petriv OI, Singhal A, et al. Megapixel digital PCR. *Nat Methods*, 2011; 8: 649-51.
42. Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, et al. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol*, 2009; 27: 858-63.
43. Weisenberger DJ, Trinh BN, Campan M, Sharma S, Long TI, Ananthnarayan S, et al. DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight. *Nucleic Acids Res*, 2008; 36: 4689-98.
44. Nadauld L, Regan J, Miotke L, Pai RK, Longacre TA, Kwok SS et al. Quantitative and Sensitive Detection of Cancer Genome Amplifications from Formalin Fixed Paraffin Embedded Tumors with Droplet Digital PCR. *Transl Med (Sunnyvale)*, 2012; 2(2): .

45. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem*, 2013; 59 (6): 892-902.
46. Manoj P. Droplet digital PCR technology promises new applications and research areas. *Mitochondrial DNA*, 2016; 27 (1): 742-6.
47. Baker M. Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, 2012; 9(6): 541.
48. Pavšič J, Žel J, Milavec M. Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2016; 408 (1): 107-21.

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE



TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU / PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

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

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

Makale Türü/Article Type:

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

Makale Başlığı/Article Entitled :

Sayın Editör,

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

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

Dear Editor,

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

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

(...1) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...2) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...3) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...4) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...5) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

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

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

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU / PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

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

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

Tel/Phone : +90 312 565 55 79

Faks/Fax : +90 312 565 55 91

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

