

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



T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 69 ■ Sayı/Number 3 ■ Yıl/Year 2012

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY



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 69 ■ Sayı/Number 3 ■ Yıl/Year 2012

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND  
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

## TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

**Mustafa AKSOY, Başkan**  
Mustafa AKSOY, President

### EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

### EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Demet CANSARAN-DUMAN  
Yavuz UYAR

### YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Sühendan ADIGÜZEL  
Fatih BAKIR  
Mehmet Kürşat DERİCİ  
Mestan EMEK  
Arşun ESMER  
Sibel KARACA  
Pınar KAYNAR  
Özcan ÖZKAN  
Pınar ÜNAL  
Gerard A. van ZOELLEN

### TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Murat BAYRAM  
Murat DUMAN  
Zeynep KÖSEOĞLU  
Selahattin TAŞOĞLU

**TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU**  
PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY  
ANKARA-TÜRKİYE

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

**Tasarım - Dizgi / Design - Editing :**  
THSK / PHIT  
Destek Hizmetleri / Supportive Services  
Satınalma ve İdari İşler Daire Başkanlığı /  
Purchasing and Administrative Affairs  
Department

**Baskı ve Cilt / Press and Binding :**  
Kayıhan Ajans  
Hoşdere Cad. No: 201/9 Çankaya-ANKARA  
Tel: 0312 442 72 72  
e-posta: kayihanajans@gmail.com

**Yayın Türü / Type of Publication :**  
Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

**Basım Tarihi / Date of Publication :**  
Ekim 2012 / October 2012

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

## TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

### BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

Ahmet ÇARHAN, Türk Akreditasyon Kurumu, Ankara

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

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

Ali ALBAY, GATA, Ankara

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

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

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

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

Ayhan FİLAZİ, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

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

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

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

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

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

Berrin ESEN, RSHMB, Ankara

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

Celal GÖKÇAY, ODTÜ, Çevre Müh., Ankara

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

Daniel MOTLHANKA, Botswana College of Agriculture, Botswana

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gülner TARHAN, Ahievran Üniv., Sağlık MYO, Kırşehir

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

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

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

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

Iva CHRISTOVA, NCIPD, Sofia, Bulgaria

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

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

İsmail CEYHAN, RSHMB, Ankara

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

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

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

## TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

### BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

Mahinur AKKAYA, ODTÜ, Kimya Müh., Ankara

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nilay ÇÖPLÜ, RSHMB, Ankara

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

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

Orhan BAYLAN, GATA, Ankara

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

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

Paul HEYMAN, Queen Astrid Military Hospital, Belgium

Pauline MWINZI, Medical Research Inst., Kenya

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

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

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

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

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

Roberto Canete VILLAFRANCA, Centre for Hygiene, Cuba

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

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

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

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

Sıraç DİLBER, Karolinska Univ., Medical School, Sweden

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

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

Takashi AKAMATSU, Prof. Emeritus, Japan

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

Yesim ÖZBAŞ, Hacettepe Üniv. Gıda Müh., Ankara

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

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

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

## TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

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

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallar aranır:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11- Makale yazımında dikkat edilecek hususlar şunlardır:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12- Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

13- Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

Tel : (0312) 565 55 79

Faks : (0312) 565 54 55

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



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

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

Manuscripts are sought according to the following rules:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Key words should be given under Turkish and English.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Public Health Institution of Turkey

Tel : (0312) 565 55 79

Faks : (0312) 565 54 55

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

## YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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



## EDITORIAL POLICY

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

## CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

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

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi;

CABI Index		Ulrichsweb and Serials Solutions		ULRICHSWEB™ GLOBAL SERIALS DIRECTORY
Chemical Abstracts Service (CAS)		TURK MEDLINE		
DOAJ		Türkiye Atıf Dizini		
Index Copernicus		Genamics JournalSeek		
Google Scholar		NewJour		
Open J-Gate		TUBİTAK-ULAKBİM		
Academic Journals Database		BASE		
Scirus Scientific Database		Ovid LinkSolver		
Libsearch				

tarafından dizinlenmektedir.

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

## İLETİŞİM

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. Nu: 55

Tel: 0312 565 55 79

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

## CORRESPONDENCE

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

Refik Saydam Yerleşkesi 06100 Sıhhiye/ANKARA

Faks: 0312 565 54 55

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

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



## İÇİNDEKİLER

### Araştırma Makalesi

- 1. Metisiline dirençli stafilocok suşlarında tigesiklin etkinliğinin araştırılması** 121 - 126  
Ayşegül OPUŞ, Recep KEŞLİ, Muhammet Güzel KURTOĞLU, Asuman GÜZELANT, Elif Bilge UYSAL
- 2. *Squamarina lentigera* türlerinde usnik asit konsantrasyonunun antimikrobiyal aktivitesi** 127 - 134  
Demet CANSARAN-DUMAN, Mehmet Gökhan HALICI
- 3. Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocok'ların biyofilm üretimi ve DNaz aktivitelerinin belirlenmesi** 135 - 142  
Neslihan GÜNDOĞAN, Özlem ATAOL
- 4. Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının HPLC yöntemi ile belirlenmesi** 143 - 148  
Pınar KAYNAR, Meşkure CANPOLAT, Ayşe KAVAKLI, Esra Jale ÖZEROĞLU, Serdar Alp SUBAŞI
- 5. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi 2009-2011 yılı Tüberküloz Laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi** 149 - 154  
Nilgün ÖZBEY, Alper AKÇALI, Müşerref TATMAN OTKUN
- 6. Kütahya İl Sağlık Müdürlüğü bünyesinde çalışanlarda nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı ve metisilin direncinin araştırılması** 155 - 162  
Aysel GÜLBANDILAR, Emine Didem BEYHAN, Halil İbrahim KISA

### Olgu Sunumu

- 7. Pediatrik bir hastada *Salmonella paratyphi A*'nın neden olduğu bir akut hemorajik sistit olgusu** 163 - 168  
Erkan YULA, Özcan DEVECİ, Türkan TOKA-ÖZER, Alicem TEKİN, Melek İNCİ, Ali KARAKUŞ

### Derleme

- 8. Mikrosistin biosentez yollarının düzenlenmesi ve genetik mekanizmalar** 169 - 178  
Serap YALÇIN

## CONTENTS

### Original Article

- 1. Investigation of activity of tigecycline against methicillin-resistant staphylococci strains** 121 - 126  
Ayşegül OPUŞ, Recep KEŞLİ, Muhammet Güzel KURTOĞLU, Asuman GÜZELANT, Elif Bilge UYSAL
- 2. Antimicrobial activity of usnic acid on *Squamarina lentigera* lichen species** 127 - 134  
Demet CANSARAN-DUMAN, Mehmet Gökhan HALICI
- 3. Determination of biofilm production and DNase activity of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from meat samples** 135 - 142  
Neslihan GÜNDOĞAN, Özlem ATAOL
- 4. Quantitative determination of total vitamin C in enteral nutritional products by using HPLC** 143 - 148  
Pınar KAYNAR, Meşkure CANPOLAT, Ayşe KAVAKLI, Esra Jale ÖZEROĞLU, Serdar Alp SUBAŞI
- 5. Evaluation of Tuberculosis Laboratory results in Çanakkale Onsekiz Mart University Research and Education Hospital for 2009-2011** 149 - 154  
Nilgün ÖZBEY, Alper AKÇALI, Müşerref TATMAN OTKUN
- 6. Investigation of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and Meticilin Resistance in the Kutahya Health Directorate workers** 155 - 162  
Ayşel GÜLBANDILAR, Emine Didem BEYHAN, Halil İbrahim KISA

### Case Report

- 7. A case of acute hemorrhagic cystitis caused by *Salmonella paratyphi A* in a pediatric patient** 163 - 168  
Erkan YULA, Özcan DEVECİ, Türkan TOKA-ÖZER, Alicem TEKİN, Melek İNCİ, Ali KARAKUŞ

### Review

- 8. The regulation of microcystin biosynthesis pathways and genetic mechanisms** 169 - 178  
Serap YALÇIN



## Metisiline dirençli stafilocok suşlarında tigesiklin etkinliğinin araştırılması

### Investigation of activity of tigecycline against methicillin-resistant staphylococci strains

Ayşegül OPUŞ<sup>1</sup>, Recep KEŞLİ<sup>1</sup>, Muhammet Güzel KURTOĞLU<sup>1</sup>, Asuman GÜZELANT<sup>1</sup>, Elif Bilge UYSAL<sup>2</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Amaç Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve metisiline dirençli koagülaz negatif stafilocoklar (MRKNS) dünya genelinde önemli enfeksiyon etkenleridir. Vankomisin ve diğer glikopeptit antibiyotikler MRSA ve MRKNS ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılan belli başlı antibiyotiklerdir. Metisiline dirençli stafilocok suşlarının yüksek prevalansı, vankomisin kullanımında artışa yol açmıştır. Bu durum ise metisiline dirençli stafilocoklarda glikopeptitlere duyarlılığın azalmasına neden olmuştur. Vankomisine duyarlılığı azalmış olan MRSA suşlarının yol açtığı enfeksiyonların tedavi seçenekleri sınırlıdır. Tigesiklin MRSA ve/veya MRKNS' nin yol açtığı enfeksiyonların antimikrobiyal tedavileri için alternatif olarak göz önünde tutulmalıdır. Bu çalışmanın amacı tigesiklinin çeşitli kliniklerden izole edilen metisiline dirençli stafilocok suşlarına karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesidir.

**Yöntem:** Stafilocok suşları Ocak ve Aralık 2010 tarihleri arasında Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilmiştir. İzole edilen suşlar konvansiyonel metotlar ve tam otomatik bakteri identifikasyon ve duyarlılık sisteminin (Phoenix 100, BD, Sparks, USA) her ikisi kullanılarak tanımlanmıştır. Metisilin direnci disk difüzyon yöntemi

#### ABSTRACT

**Objective:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (MRCNS) are important cause of infections worldwide. Vancomycin and other glycopeptide antibiotics are mainstay of therapy for infections caused by MRSA and MRCNS. High prevalence of methicillin resistant staphylococci strains led to increased use of vancomycin. This situation caused to reduction of glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant staphylococci. Treatment options of infections due to MRSA with reduced susceptibility to vancomycin are limited. Tigecycline should be take into consideration as an antimicrobial therapeutic alternative for infecitons caused by MRSA and/or MRCNS. The aim of this study was to determine *in vitro* antimicrobial activity of tigecycline against methicillin-resistant staphylococci strains isolated from various clinical specimens.

**Method:** *Staphylococcus* strains isolated at the Microbiology Laboratory of Konya Education and Research Hospital in between January and December in 2010. The isolated strains were identified by using both conventional methods and fully automated bacteria identification and susceptibility system (Phoenix 100, BD, Sparks, USA). Methicillin resistance was determined

<sup>1</sup> Konya Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, KONYA

<sup>2</sup> Sivas Numune Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, SİVAS

İletişim / Corresponding Author : Recep KEŞLİ

Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, KONYA

Tel : +90 332 323 67 09-2039

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

Geliş Tarihi / Received : 15.07.2012

Kabul Tarihi / Accepted : 24.08.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.79553

Opuş A, Keşli R, Kurtoğlu MG, Güzelant A, Uysal EB. Metisiline dirençli stafilocok suşlarında tigesiklin etkinliğinin araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(3): 121-6.

(oksasilin 1 µg ve sefoksitin 30 µg diskleri) Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI) talimatlarına göre uygulanmış ve değerlendirilmiştir. İzole edilen suşlar için tigesiklinin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri E-test metodu (bio-Merieux Marcy l'Etoile, France) ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** Seksen beş dirençli stafilocok suşunda 35 (%41)'i *Staphylococcus aureus* ve 50 (%59)'si koagülaz negatif stafilocok olarak tanımlanmıştır. Otuz beş MRSA izolatu için tigesiklinin MİK değerleri şu şekilde bulunmuştur: MİK<sub>50</sub>: 0,094 µg/ml, MİK<sub>90</sub>: 0,5 µg/ml, 50 MRKNS izolatu için ise MİK<sub>50</sub>: 0,047 µg/ml, MİK<sub>90</sub>: 0,25. Bütün izolatların tamamı tigesikline duyarlı (%100) bulunmuştur.

**Sonuç:** Bu çalışmanın sonuçları tigesiklinin MRSA ve MRKNS izolatlarının her ikisine karşı etkili *in vitro* antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Tigesiklin, dirençli MRSA ve MRKNS etkenlerinin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde alternatif antibiyotiklerin tamamının dirençli olduğu durumlarda son seçenek olarak tercih edilebilir.

**Anahtar Sözcükler:** Tigesiklin, Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, Metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilocok, E-test.

and evaluated according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) instructions by using disc diffusion method (oxacillin 1 µg and cefoxitin 30 µg discs) Minimum inhibitory concentration (MIC) values of tigecycline for isolated strains were detected with E-test method (bio-Merieux Marcy l'Etoile, France).

**Results:** Of all the eighty five methicillin-resistant staphylococci strains 35 (41%) were identified as *Staphylococcus aureus* and 50 (59%) coagulase negative staphylococci. MIC values of tigecycline for the 35 MRSA isolates were MIC<sub>50</sub>: 0.094 µg/ml, MIC<sub>90</sub>: 0.5 µg/ml and for the 50 MRCNS isolates were MIC<sub>50</sub>: 0.047 µg/ml, MIC<sub>90</sub>: 0.25 µg/ml. All isolates (100%) were found to be sensitive to tigecycline.

**Conclusion:** Results of this study showed that tigecycline was effective *in vitro* antimicrobial activity against both MRSA and MRCNS isolates. Tigecycline may be preferred as a last choice in the treatment of resistant infections due to the MRSA and MRCNS that alternative antibiotics were all resistant.

**Key Words:** Tigecycline, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant coagulase negative staphylococci, E-test.

## GİRİŞ

Staphylococcus çok sayıda tür içeren, deri ve mukozalarda kolonize olabilen, değişik türleri ile farklı hastalıklar yapan önemli bir bakteri cinsidir; *Staphylococcus aureus* ise çok sayıdaki patojenik faktörü ile çeşitli doku ve organlarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilen bu cinse ait en önemli türdür. *Staphylococcus aureus* dışında kalan koagülaz negatif stafilocok (KNS) türleri ise, geçmişte sadece flora elemanı olarak kabul edilmişken; günümüzde özellikle hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında yer almış ve önemleri giderek artmıştır. Penisilin yaygın olarak kullanımının ardından kısa süre içinde penisilin direnci, metisilin kullanımından bir yıl sonra da metisilin direnci tanımlanmıştır

(1). MRSA suşları tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençlidir. Ayrıca beta-laktam dışı antibiyotiklerin çoğuna da direnç geliştirmiş olmaları nedeniyle bu etkenle oluşan ağır enfeksiyonların tedavisinde glikopeptid antibiyotikler ilk seçenek olmuştur (2).

Son yıllarda Vancomycin Intermediate *S. aureus*'lar (VISA) ve hetero-rezistan suşların oranlarında artış olması sonucu glikopeptid ilaçlara alternatif olabilecek başka anti-biyotiklere ihtiyaç duyulmuştur (3). Tigesiklin (GAR-936), klasik tetrasiklinlerin semi-sentetik analogu olan glisilsiklin grubunun ilk üyesidir (4). Tetrasiklinlerin temel çekirdeğindeki dokuz pozisyonunda yapılan N-alkyl-

glycylamido modifikasyonu bu yeni moleküle çok geniş bir antibakteriyel spektrum ve tetrasiklin direnç mekanizmalarına karşı dayanıklılık sağlamıştır. Bakterilerde tetrasiklin direncinden sorumlu iki farklı genetik mekanizmaya (ribozomal korunma ve efluks mekanizmaları) karşı dirençli olması en önemli özelliğidir (5). Gram pozitif ve gram negatif bakteriler, atipik bakteriler ve anaeroplara dâhil olmak üzere geniş bir etki alanına sahiptir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae* (PRSP), vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), genişletilmiş spektrumlu betalaktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi çoğul dirençli bakteriler de etki alanına girmektedir (6).

Bu çalışmada, klinik örneklerden soyutlanan metisiline dirençli 35 *S. aureus* (MRSA) ve 50 metisiline dirençli koagülaz negatif *Staphylococcus* (MRKNS) suşu olmak üzere toplam 85 metisilin dirençli stafilokok suşunun tigesikline direnci, E-test yöntemi ile araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Her hastaya ait sadece bir suş olmak üzere, Ocak ve Aralık 2010 tarihleri arasında Konya Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 85 MRSA ve MRKNS suşu çalışmaya alınmıştır. Bakteriler koloni morfolojisi, üreme ve Gram boyanma özelliği, katalaz ve koagülaz testleri gibi konvansiyonel yöntemler ve tam otomatik bakteri tanımlama ve duyarlılık sistemine (Phoenix 100, Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) ait Gram pozitif tanımlama panelleri kullanılarak tanımlanmıştır. Bakterilerin metisilin duyarlılık testleri, disk difüzyon yöntemi ile Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI) kriterlerine göre uygulanmış ve değerlendirilmiştir (7). Bu amaçla Müeller-Hington agarda (Mueller Hington Agar, Becton

Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) oksasilin diski (1 µg) ile çalışılmış, inhibisyon zon çapı ≤10 mm olanlar MRSA olarak tanımlanmadan önce bir kez de sefoksitin (30 µg) diski ile test edilmiştir. Tigesiklin aktivitesini değerlendirmek için E-test yöntemi kullanılmıştır. Çalışmaya alınan suşlar %5 koyun kanlı agara (Columbia Agar with 5% Sheep Blood, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) pasajlanmış, üreyen bakteri buyyon içinde süspanse edilerek McFarland 0,5 bulanıklık standardına ayarlanmıştır. Bakteri süspanسیونundan Mueller Hington besiyerine sürüntü ekim yapılarak E- test stripleri (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) yerleştirilmiş, 37 °C'de bir gecelik inkübasyonun sonunda inhibisyon zonunun E-test şerit kenarını kestiği noktadaki antimikrobiyal yoğunluğu MİK olarak belirlenmiştir. Çalışmada kalite kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29.213 kullanılmıştır (7). Sonuçlar Food and Drug Administration (FDA) önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir (Bu kuruluş tigesiklin için ≤2 µg/ml değerlerini duyarlı, ≥8 µg/ml değerlerini dirençli olarak kabul etmektedir) (8).

## BULGULAR

Çalışmada hem MRSA, hem de MRKNS suşları arasında tigesikline dirençli suşa rastlanamamıştır. Tigesiklinin 35 MRSA suşu için MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla 0,094 µg/ml ve 0,5 µg/ml, 50 MRKNS suşu için MİK<sub>50</sub>: 0,047 µg/ml, MİK<sub>90</sub>: 0.25 µg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 1).

**Tablo 1.** MRSA ve MRKNS suşlarında E-test yöntemi ile tigesiklinin MİK değerleri (µg/ml).

Tigesiklin	MRSA	MRKNS
MİK <sub>50</sub>	0,094	0,047
MİK <sub>90</sub>	0,5	0,25

## TARTIŞMA

Metisilin direncine sahip ve beta-laktamaz enzimi üreten *S. aureus* suşlarının oluşturduğu enfeksiyonların tedavisi son yıllarda giderek artan bir şekilde önemli sorunlar ortaya çıkarmaktadır (9). MRSA ve MRKNS suşlarında direncin artması, yakın zamana kadar gelişmesi beklenmeyen glikopeptid direncinin görülmesi (önce Japonya ve ABD’de) ve vankomisine azalmış duyarlılık gösteren suşların bildirilmesi yeni antibiyotiklere gereksinim olduğunun göstermiştir (10-12). Tigesiklin çoğul ilaç direnci gösteren mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli yeni antimikrobiyal ilaçlardır. Türkiye’de 2008 yılında klinik kullanıma girmiştir (8-9). Dünyada ve ülkemizde bu ilaçların Gram pozitif mikroorganizmalara etkinliğini belirleyen çok sayıda *in vitro* duyarlılık testi yapılmıştır. İspanya’da Betriu ve ark., linezolid ve tigesikline dirençli MRSA suşu saptamamışlar ve MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 1 ve 0,5 µg/ml olarak bulmuşlardır (13). Hope ve ark. bakteriyemilerden izole edilen MRSA ve MRKNS suşlarında tigesiklinin mükemmel etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir (14). Hoban ve ark., TEST (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial) programı bünyesinde 11 ülkeden, 6.792 Gram pozitif ve Gram negatif bakteri üzerinde değişik antibiyotiklerin *in-vitro* aktivitesini 348 MRSA suşunda linezolid ve tigesiklinin MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 2 ve 0,25 µg/ml olarak tespit etmişlerdir (15). The Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST) çalışması 2004 yılında ABD’de farklı coğrafi bölgelerden izole edilen 3.989 Gram negatif ve Gram pozitif klinik kökenin incelendiği ve tigesiklinin 13 farklı antibiyotikle *in vitro* etkinliğinin karşılaştırıldığı yeni bir çalışmadır. MRSA için MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri

4 µg/ml ve 0.5 µg/ml olarak bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre tigesiklinin metisilin ve vankomisin duyarlılığına bakılmaksızın *S. aureus* kökenlerine etkinliğinin çok iyi olduğu sonucuna varılmıştır. (16). Tunçkanat ve ark.’nın yaptığı bir çalışmada, tigesiklin MİK değer aralıkları, çalışmaya alınan 127 MRSA suşu için 0,032-1 µg/ml (MİK<sub>50</sub>: 0,25 µg/ml, MİK<sub>90</sub>: 0,75 µg/ml), MRKNS izolatları için ise 0,047-1 µg/ml olarak (MİK<sub>50</sub>: 0,25 µg/ml, MİK<sub>90</sub>: 0,5 µg/ml) saptanmıştır (17). Kao ve ark.’nın çalışmasında vankomisin MİK değeri 2’nin üzerinde olan 470 MRSA suşunda %100 oranında tigesiklin duyarlılığı saptanmıştır (18). Kaya ve ark. 60 MRSA suşundan sadece birinin tigesiklin MİK değerinin duyarlılık sınırı üzerinde olduğunu bildirmişlerdir (19). Öksüz ve ark., 2009’da gerçekleştirdiği 49 MRSA suşunda %2, 59 MRKNS suşunda %3 oranında direnç saptanmış ve suşların izole edildiği hastaların tedavisinde tigesiklin kullanılmadığından, antibiyotik kullanımına bağlı olmayan bir mekanizma ile örneğin MATE efluks pompası ailesi yoluyla direnç gelişmiş olabileceğini düşünmüşler (20). 2009’da García-Rodríguez JA ve ark.’nın İspanyada yaptığı çok merkezli bir çalışmada MRSA için MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri 0,125-0,25 µg/ml olarak bulunmuştur (21). Çalışmamızın sonuçları yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermiştir.

Sonuç olarak, tigesiklinin hastanemizde klinik örneklerden soyutlanan MRSA ve MRKNS suşlarına karşı etkin ve antimikrobiyal tedavide kullanılabilecek yeni bir alternatif antibiyotik olduğu düşünülmektedir. Ancak bu antibiyotiğe karşı da direnç gelişebileceği akıldan çıkartılmamalı kullanımı sırasında azami dikkat gösterilmeli ve sadece uygun endikasyonlarda tercih edilmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Sevgican E, Sınırtaş M, Özakin C, Gedikoğlu S. *Staphylococcus* türlerinde metisilin direncinin farklı yöntemlerle saptanması. *İnfeksiyon Dergisi*, 2009; 23: 63-8.
2. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). Philadelphia, Pennsylvania, Elsevier Churchill Livingstone, 2005; p. 2321-51.
3. Dowzicky MJ, Chmelařová E. Global *in vitro* activity of tigecycline and linezolid against Gram-positive organisms collected between 2004 and 2009. *Int J Antimicrob Agents*, 2011; 37(6): 562-6.
4. Petersen PJ, Jacobus NV, Weiss WJ, Sum PE, Testa RT. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of novel glycylycylamine, the 9-t-butylglycylamido derivate of minocycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother*, 1999; 43: 738-44.
5. Arslan U, Yüksekaya Ş, Işık F, Tuncer İ. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının linezolid ve tigesikline in-vitro duyarlılığı. *Ankem Derg*, 2006; 20: 210-3.
6. Sorlozano A, Gutierrez J, Roman E, de Dios Luna J, Roman J, Liebana J, et al. A comparison of the activity of tigecycline against multiresistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007; 58: 487-9.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Gür D: Çeviri editörü): Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları, Onsekizinci Bilgi Eki, M100-S18, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayını, İstanbul, 2008.
8. Noskin GA. Tigecycline: A new glycylycylamine for treatment of serious infections. *Clin Infect Dis*, 2005; 41: 303-14.
9. Pankey GA. Tigecycline. *J Antimicrob Chemother*, 2005; 56(3): 470-80.
10. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*, 1997; 40: 135-6.
11. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agent Chemother*, 2004; 48: 275-80.
12. Zhanel GG, Karlowsky JA, Rubinstein E, Hoban D. Tigecycline: A novel glycylycylamine antibiotic. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2006; 4: 9-25.
13. Betriu C, Rodriguez-Avial I, Sanchez BA, Gómez M, Alvarez J, Picazo JJ; Spanish Group of Tigecycline et al. *In vitro* activities of tigecycline (GAR-936) against recently isolated clinical bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002; 46: 892-5.
14. Hope R, Livermore DM, Brick G, Lillie M, Reynolds R. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteremias in the UK and Ireland, 2001-06. *J Antimicrob Chemother*, 2008; 62: 65-74.
15. Hoban DJ, Bouchillon SK, Johnson BM, Johnson JL, Dowzicky MJ. Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program) Group: *In vitro* activity of tigecycline against 6792 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the global tigecycline evaluation and surveillance trial (TEST Program, 2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005; 52: 215-27.
16. Bouchillon SK, Hoban DJ, Johnson BM, Johnson JL, Hsiung A, dowzicky MJ. *In vitro* activity of tigecycline against 3989 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the United States Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program; 2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005; 52: 173-9.
17. Tunçkanat F, Sarıbaş Z, Ercis S. Metisiline dirençli stafilocok klinik izolatlarında tigesiklin etkinliğinin araştırılması, 8. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Program ve Özet Kitabı s.216-7, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları No:57, İstanbul, 2008.
18. Kao TM, Wang JT, Weng CM, Chen YC, Chang SC. *In vitro* activity of linezolid, tigecycline, and daptomycin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates from adult patients. 2006-2008: Stratified analysis by vancomycin MIC. *J Microbiol Immunol Infect*, 2011; 20: in press.



19. Kaya O, Akçam FZ, Temel EN. *In vitro* activities of linezolid and tigecycline against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Microb Drugs Resist*, 2008; 14(2): 151-3.
20. Öksüz L, Gürler N. Klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli stafilocok suşlarının son yıllarda kullanıma giren antibiyotiklere *in vitro* duyarlılık sonuçları. *Ankem Derg*, 2009; 23(2): 71-7.
21. García CP, Juliet LC, Fernández VA, San Martín SM, Cifuentes DM, Porte TL, et al. Multicenter study on the monitoring of *in vitro* susceptibility to tigecycline in Santiago, Chile. *Rev Chilena Infectol*, 2009; 26: 220-6.

# *Squamarina lentigera* türlerinde usnik asit konsantrasyonunun antimikrobiyal aktivitesi

## Antimicrobial activity of usnic acid on *Squamarina lentigera* lichen species

Demet CANSARAN-DUMAN<sup>1</sup>, Mehmet Gökhan HALICI<sup>2</sup>

### ÖZET

**Amaç:** *Squamarina lentigera* liken türlerinden ekstre edilen usnik asitin *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* (RSKK 508), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Proteus mirabilis* (Pasteur Ens. 235), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* olmak üzere yedi bakteri türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi test edilmiş ve bu bakteriler üzerinde inhibisyon etkisi olan iki likenin usnik asit miktarları belirlenmiştir.

**Yöntem:** *S. lentigera*'ya ait 0,05 g tallusa 10 mL aseton eklenip bir saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her iki liken türünde bulunan usnik asidin antimikrobiyal aktivitesinin tespiti için agar difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Buna ek olarak, HPLC yöntemi kullanılarak bu liken türünün usnik asit miktarları belirlenmiştir. Ayrıca, liken ekstraktının kromatogramlarında alıkonma sürelerine göre oluşan pikler, standart usnik asidin alıkonma süreleri ile karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Bu çalışmada, *S. lentigera* türünün usnik asit ekstraktının aktif olduğu ayrıca *B. megaterium* ile *B. subtilis* bakterilerine karşı daha yüksek inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. *Squamarina lentigera*'dan elde edilen inhibisyon zon çapı standart

### ABSTRACT

**Objective:** Usnic acid extracted from *Squamarina lentigera* was tested for antimicrobial activities against seven bacteria including *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis* (RSKK 508), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Proteus mirabilis* (Pasteur Ens. 235), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and usnic acid concentrations of this lichen species was determined.

**Method:** 0.05 g of thalli of *S. lentigera* was added into 10 mL acetone and left for extraction at room temperature for 1 h. We used agar diffusion method for screening antimicrobial activity of usnic acid in this lichen species. In addition, the quantitative analysis of usnic acid in this lichen species was achieved by using HPLC. Identification of peaks in chromatograms of lichen extract is achieved by comparison of retention times with that of standart usnic acid.

**Results:** The usnic acid extracts of *S. lentigera* were effectively active lichen extracts, and showed the highest inhibition effect on *B. megaterium* and *B. subtilis*. When the inhibition zones obtained from *S. lentigera* was compared with that of standart antibiotic, *E. coli* seems to be more susceptible

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Tandoğan, ANKARA

<sup>2</sup> Erciyes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KAYSERİ

İletişim / Corresponding Author : Demet CANSARAN-DUMAN

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Tandoğan, ANKARA

Tel : +90 222 58 20-120

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

Geliş Tarihi / Received : 03.01.2012

Kabul Tarihi / Accepted : 18.08.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.74436

Cansaran-Duman D, Halıcı MG. *Squamarina lentigera* türlerinde usnik asit konsantrasyonunun antimikrobiyal aktivitesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(3): 127-34.

antibiyotik ile karşılaştırıldığında; liken ekstraktına en duyarlı bakterinin *E. coli* olduğu belirlenmiştir. Çalışılan liken türünün aseton ekstraktı, *S. aureus* hariç test edilen tüm Gram pozitif bakterilerin gelişmesini inhibe etmiştir. *B. subtilis*'in çalışılan liken türüne karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan aseton çalışmada kullanılan hiçbir bakteriye karşı etki göstermemiştir. *S. lentigera*'nın aseton ekstraktının usnik asit miktarları %2,47 olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** Çalışmamızın sonucunda; *S. lentigera* türlerinin önemli antimikrobiyal etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bu da bize usnik asit miktarı ile antimikrobiyal aktivite arasında bir korelasyon olduğunu ve usnik asit konsantrasyonunun artmasıyla antimikrobiyal aktivitenin de arttığını göstermiştir. Bu çalışma, medikal ve farmakolojik ürün olarak kullanılabilir *S. lentigera* türünün antimikrobiyal aktivitesinin ve usnik asit derişimlerinin belirlediği literatürdeki ilk makaledir.

**Anahtar Sözcükler:** Antimikrobiyal aktivite, HPLC, liken, usnik asit.

to the lichen extract. Acetone extract of examined lichen species inhibited the growth of all tested Gram positive bacteria, with the exception of *S. aureus*. *B. subtilis* seems to be sensitive to the acetone extracts of examined lichen species. The solvent controls did not show any activities against the bacteria. The amounts of usnic acid in the acetone extracts of *S. lentigera* were determined as 2.47%.

**Conclusion:** Our results demonstrating significant antimicrobial effects of *S. lentigera*, which are a contribution to the literature. This might explain the correlation between usnic acid concentration and antimicrobial activity. Results show an increase of antimicrobial activities by the increase of the amount of usnic acid concentration. The present study is the first paper on usnic acid concentration and antimicrobial activity of *S. lentigera*, which could be attracting for medicinal or pharmacological products.

**Key Words:** Antimicrobial activity, HPLC, lichen, usnic acid.

## INTRODUCTION

Lichens are products of symbiotic associations between a mycobiont (fungus) and photobiont(s) (algae and/or cyanobacteria) that comprise about 17,000 species. The organism consists of thalli-shaped fungal tissue in which the algal cells are located and, therefore, it can grow photosynthetically. There is specificity and selectivity in the association, and the thallus shape, physiology and nutritional dependencies are defined and stable (1). Lichens produce a diverse range of secondary metabolites such as depsides, depsidones, dibenzofurans and pulvinic acids. Lichens and their metabolites exert a wide variety of biological functions and have been used in perfumery, cosmetics, ecological applications, and pharmaceuticals. These compounds have attracted much attention in investigations because of their antimicrobial, antimycotic, antiprotozoal, antiproliferative, anti-inflammatory, analgesic and

antipyretic, antiviral, antibiotic, antioxidant, antitumor, allergenic and plant growth inhibitory activities (2, 3).

Usnic acid was isolated as a prominent secondary lichen metabolite by the German scientist Knop in 1844 (4). When extracted from the lichen, it is yellow and crystalline in appearance. Usnic acid [2,6 - diacetyl - 7,9 - dihydroxy - 8, 9b - dimethyl-dibenzofuran - 1,3 (2H, 9bH) - dione] exists in two enantiomers; (+) D-usnic acid and (-) L-usnic acid, indicating an R or S projection of the angular-CH<sub>3</sub> group at position 9b. The enantiomers have been identified as showing different biological activities (5). In addition, two other natural isomers-(+) and (-) isousnic acids [2,8 - diacetyl - 7,9 - dihydroxy - 6,9b - dimethyl-dibenzofuran - 1,3 (2H, 9bH) - dione] are also found in lichens (5).

Usnic acid has been identified in several species of such genera as *Alectoria*, *Cladonia*, *Dermatocarpon*, *Evernia*, *Flavoparmelia*, *Hypogymnia*, *Lecanora*, *Letharia*, *Parmelia*, *Platismatia*, *Protoparmeliopsis*, *Punctelia*, *Ramalina*, *Rhizoplaca*, *Squamarina*, *Xanthoparmelia*, *Umbilicaria* and *Usnea*. Usnic acid is a prominent secondary lichen metabolite that has been used for various purposes worldwide. Crude extracts of usnic acid or pure usnic acid have been marketed in the United States as dietary supplements to aid in weight loss. However, the USA Food and Drug Administration (FDA) received 21 reports of liver toxicity related to the ingestion of dietary supplements that contain usnic acid; this was prompted by the FDA to issue a warning about one such supplement, LipoKinetix, in 2001 (6).

The *in vitro* antimicrobial activities of usnic acid were evaluated in combination with five therapeutically available antibiotics, using checkerboard microdilution assay against methicillin-resistant clinical isolates strains of *S. aureus*. MIC90, MIC50, as well as MBC90 and MBC50. A synergistic action was observed in combination with gentamicin, while antagonism was observed with levofloxacin. The combination with erythromycin showed indifference, while variability was observed for clindamycin and oxacillin. Data from checkerboard assay were analysed and interpreted using the fractional inhibitory concentration index (FICI) and the response surface approach using the E-model. Discrepancies were found between both methods for some combinations. These could mainly be explained by the failure of FIC approach, being too much subjective and sensitive to experimental errors. These findings, beside confirm the well known antimicrobial activity of usnic acid, suggest, however, that this substance might be a good candidate for the individuation of novel templates for the development of new antimicrobial agents or combinations of drugs for chemotherapy (7).

Usnic acid has several interesting biological traits. It is an antibiotic and it also seems to exert

an antimitotic action. It has even been postulated that usnic acid can play a role as an environmental indicator, since its concentration varies according to the presence of toxic agents. A series of tests have been run on different biological systems such as fungi, yeasts, plant cells and neoplastic human cell cultures in order to make a general evaluation of the properties of usnic acid and to highlight any analogy between its effects on phylogenetically distant organisms. The obtained results confirm some of known properties of usnic acid and identify concentration ranges that are active against cells from different organisms. Furthermore, at low concentrations, the acid displays a capacity to stimulate cell metabolism in some of the biological systems tested (6).

In order to make a general evaluation of the biological activity of usnic acid, Cardarelli et al. investigated its effects on a number of widely different biological systems (8). These study concludes to interesting results concerning usnic acid's capacity to act as 1) an activator of the respiratory capacity of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Meyen yeasts, 2) a cytotoxic and anti-mitotic agent against mesophyll leaf protoplasts and cultured plant cells of *Nicotiana tabacum* L. (tobacco), and 3) a cytotoxic and antimitotic agent against human tumour cells. The inhibition of growth of the parasitic fungi *Fusarium moniliforme* J. Sheld. and of the germination of *Nicotiana tabacum* plantules has also been confirmed (8).

Usnic acid has also recently been discovered to have antiviral properties. In a cancer chemoprevention assay, (+)-usnic acid isolated from *Usnea longissima* Ach. was found to be significantly effective against tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus with an ED50 of 1.0 µg/mL (9). (+)-Usnic acid also inhibited the cytopathologic effects of herpes simplex type I and polio type1 viruses in the infected kidney cells of the African green monkey (10). In a clinical trial, the effect of an intravaginal formulation containing usnic acid and zinc sulfate as an adjuvant therapy to

radio surgical treatment was evaluated in 100 women with genital infections of human papilloma virus. The treatment significantly improved the time of re-epithelization one month after the radio surgery (10).

The study of lichens and lichen substances, in point of antibiotic view started in 1944, when Burkholder and Evans (11) published the first qualitative study of the antibiotic properties of lichens (12). Although several detailed studies on the lichen from Turkey concerning with its antimicrobial activities have recently been published (13-22), knowledge on the antimicrobial activities of several lichens are still necessary.

The aim of this study is to evaluate in vitro antimicrobial activities of the acetone extracts obtained from lichen *Squamarina lentigera* (Weber) Poelt against seven test bacteria and determine usnic acid concentration of them. To our knowledge there are no published reports on antimicrobial activity of the usnic acid content from *S. lentigera* against these seven test bacteria.

## MATERIAL AND METHODS

### Lichen material

*Squamarina lentigera* was collected Mersin, Çamlıyayla, east of Sebil village, 1200 m, 37° 08' 40" N, 34° 34' 36" E, 08/ 08/ 2009. Collected samples (each one 0.05 g) were dried at room temperature and foreign matter was removed prior to grinding.

### Determination of antimicrobial activity

**Test microorganisms:** *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* (RSKK 508), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Proteus mirabilis* (Pasteur Ens. 235), *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were obtained from the Refik Saydam National Type Culture Collection (RSSK) and Department of Biology at the Ankara University, Faculty of Science.

**Preparation of lichen extracts for antimicrobial activity:** Lichen extracts for antimicrobial activity

was isolated from lichen material according to protocol given by (22). Briefly, 0.05 g of dried thalli were putted into screw capped glass tubes. Extraction was performed by adding 10 ml of acetone and incubating for 1 h at room temperature. Chemicals used for extraction were obtained from Sigma and were of the highest purity. At the end of incubation period, tubes were centrifuged to remove lichen from supernatants. This extract was used in the experiments. To prevent evaporation of solvents, screw-capped glass tubes were kept in refrigerator and all discs were prepared from each lichen extract at one time to prove consistency of concentrations.

**Antimicrobial activity assays:** The agar disc diffusion method was used to screen antimicrobial activity of usnic acid in lichen species. The extracts (50 µl) were dried on 6 mm filter paper discs. In addition, control discs were prepared with solvents free of lichen extract in order to determine the antimicrobial activity of the solvent acetone. Tetracycline (30 µg/disc) was used as reference. For antimicrobial assays, all bacterial strains were grown in Nutrient Broth medium (Oxoid) for 24 h at 37°C. Then 0.1 ml of each culture of bacteria was spread on nutrient agar plate surfaces. After that, discs were placed onto agar petri plates and incubated. The inhibitory activity was indicated by clear zones around the discs and inhibition zone diameters were measured in mm after incubation for 24 h at 37°C (4). All tests were performed in triplicate.

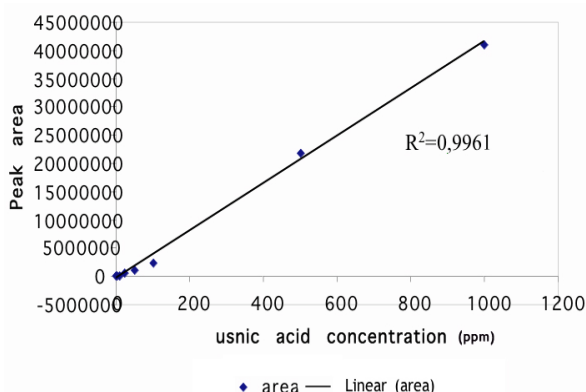
### Determination of HPLC analysis of the lichen samples

**Sample preparation for HPLC analysis:** HPLC analysis was performed according to the protocol defined by Cansaran-Duman (22). In particular, air-dried lichen was ground and 0.05 g sample was extracted in 10 ml acetone at room temperature. The extract was taken to darkness and stored at 4°C until HPLC analysis. Before analysis, extract was passed through 0.45 µm filters and then injected into the HPLC system in amounts of 20 µl.



**Standard and solvents:** All of the chemicals used in experiments were of HPLC grade from Sigma of highest purity. A stock solution of 1 mg/ml usnic acid was prepared in acetone. An appropriate dilution of this stock solution was made with acetone. All of the standards were placed in an autosampler and analyzed. Calibration curves for usnic acid were obtained with seven samples of various concentrations using linear regression analysis (Figure 1).

**Analytical conditions and apparatus:** A Thermo Finnigan HPLC System equipped with a Surveyor LC pump, Surveyor photodiode array detector, Surveyor autosampler and data processor (ChromQuest 4.01) were used. Reverse phase Shim-pack CLC-ODS (M), 5 µm particle size, in a 250 mm x 4.6 mm ID stainless steel column was used. Flow-rate was adjusted to 0.8 ml/min. For usnic acid detection at 245 nm, a mixture of methanol and phosphate buffer (pH 7.4) (70:30 v/v) was used as the mobile phase. Aliquots of the extracts (20 µl) were injected into the HPLC system. Each analysis was carried out in triplicate.



**Figure 1.** Standard calibration for the quantification of usnic acid by HPLC.

## RESULTS

In this study, *S. lentigera* was analysed by HPLC analysis and for its antimicrobial activities. For this purpose, usnic acid concentration of *S. lentigera* was screened for their antimicrobial effects on seven test bacteria. Table 1 summarizes the inhibition results

obtained with *S. lentigera* extract against the tested bacteria. The solvent controls did not show any activities against the bacteria.

The usnic acid extracts of *S. lentigera* were effectively active lichen extracts, and showed the highest inhibition effect on *B. subtilis* and *B. megaterium*. Extracts of *S. lentigera* were more susceptible to *E. coli* when compared to standard antibiotic. Acetone extract of examined lichen species inhibited the growth of all tested Gram positive bacteria, with the exception of *S. aureus*. *B. subtilis* seems to be sensitive to the acetone extracts of both lichen species.

Quantitative analysis of usnic acid in species *S. lentigera* was performed by using HPLC. Identification of peaks in chromatograms of lichen extracts was achieved by comparison of retention times with that of standart usnic acid. *S. lentigera* of representative chromatograms in shown in Figure 2. The amounts of usnic acid and retention times in the acetone extracts of examined lichen species is given in Table 2. The amount of usnic acid was found as 2.47% of the dry lichen weight in *S. lentigera*.

**Table 1.** Inhibition diameter zones (mm) on the tested bacteria of acetone extract of *Squamarina lentigera*

Tested Bacteria	Inhibition Diameter Zone	Control (Tetracycline)
<i>E. coli</i>	14±0.01	12±0.00
<i>E. faecalis</i>	7±0.01	30±0.00
<i>P. mirabilis</i>	13±0.01	8±0.00
<i>S. aureus</i>	-	40±0.00
<i>B. subtilis</i>	25±0.01	26±0.00
<i>B. megaterium</i>	23±0.01	20±0.00
<i>P. aeruginosa</i>	-	20±0.00

-: no inhibition

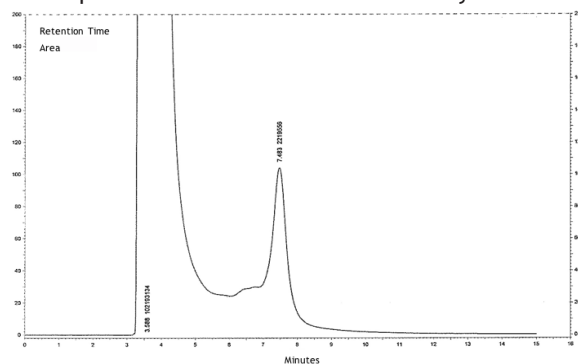
**Tablo 2.** Usnic acid content and retention time of acetone extracts of *Squamarina lentigera*

Acetone extracts of <i>Squamarina lentigera</i>	
Retention time (min.)	7.48
% of Usnic Acid in Dry Weight	2.47±0.01

## DISCUSSION

During the 1980s, interest in usnic acid as an antimicrobial agent was renewed because of increasing experience of multidrug resistance caused by overuse of synthetic antibiotics (23). It has been shown that both the optical enantiomers of usnic acid are active against Gram-positive bacteria and mycobacteria (24), and several research studies and clinical trials have confirmed the antibacterial properties of usnic acid (24). Usnic acid has been shown to suppress the growth of Gram-positive organisms that are mainly responsible for body odor. Ethoxydiglycol extracts of lichens containing 10% usnic acid on a wet weight basis have been demonstrated to have preservative potential in moisturizing cream (24). Other recent studies have shown that usnic acid is active against methicillin-resistant *S. aureus* (25, 26), and its potential use in the sterilization of surgical implants is being investigated (6, 27).

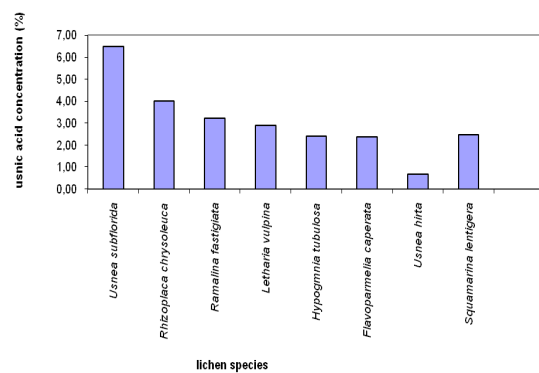
In our laboratory, several studies were accomplished on the antimicrobial activity of lichens

**Figure 2.** Analysis of usnic acid from *Squamarina lentigera* by HPLC. (A), solvent ( $t_R = 3.5$  min.); (B), usnic acid ( $t_R = 7.48$  min.)

collected from Turkey (16-22). According to these results, the highest usnic acid concentration was recorded in *Usnea subfloridana* Stirt. (6.49%) (19), *Rhizoplaca chrysoleuca* (Sm.) Zopf (4.00%) (21), *Ramalina fastigiata* (Pers.) Ach. (3.23%) (17), *Letharia vulpina* (L.) Hue (2.89%) (18), *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. (2.40%) (16), *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale (2.38%) (22) and *Usnea hirta* (L.) Weber ex F.H. Wigg. (0.68%) (20) (Figure 3). Comparing with the the present study, the usnic acid amounts of *S. lentigera* is found as 2.47% (Figure 3).

Compared with the antimicrobial activity of *R. chrysoleuca* (21), which shows the highest inhibition effects on *B. megatarium*, the inhibition zones of *S. lentigera* was less, those of *B. megatarium* was found to be more sensitive to *R. chrysoleuca* extracts.

Usnic acid and three other secondary lichen metabolite were isolated from *Punctelia subrudecta* (Nyl.) Krog collected on Palma of the Canary Islands in Spain. Compounds were purified by solvent extraction, silica gel column chromatography, and preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) consecutively. The structures of these four compounds were elucidated by one and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) experiments and mass spectrometric investigations. As a result, these compounds showed activity against important Gram-positive and Gram-negative

**Figure 3.** Usnic acid concentration (%) of some lichen species.

pathogens like mycobacteria and multiresistant staphylococci. This activity was combined with antiproliferative activity and cytotoxicity (28).

Several records are available on the studies of the antimicrobial activity of lichens in some provinces of Turkey. For example, according to Güllüce et al. (29) methanol extracts of *Parmelia saxatilis* (L.) Ach., *Platismatia glauca* (L.) W.L. Culb. & C.F. Culb., *Ramalina polymorpha* (Lilj.) Ach. and *Umbilicaria nylanderiana* (Zahlbr.) H. Magn. were shown to have antimicrobial and antioxidant activities on some test bacteria, fungi and yeast. As a result, all of the extracts from five different lichens species have an antimicrobial activity against at least some of these

bacteria species, and the extract of *R. pollinaria* was shown to have the highest antimicrobial activity, while *P. saxatilis* has the highest inhibition effect on *B. megaterium* and *B subtilis*.

As conclusion, the present study might explain a correlation between usnic acid concentration and antimicrobial activity. The higher the usnic acid concentration, the increased the antimicrobial activities. According to the best of our knowledge, this is the first report showing that usnic acid concentration and antimicrobial activity determination of both lichen species for medicinal or pharmacological products.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by Ankara University, BİTAUM. The author is thankful to Prof.Dr. Orhan ATAKOL for his support in every aspect of the study.

### REFERENCES

1. Miao V, Coffet-LeGal MF, Brown D, Sinnermann S, Donaldson G, Davies J. Genetic approaches to harvesting lichen products. Trends Biotech, 2001; 19: 349-55.
2. Boustie J, Grube M. Lichens-a promising source of bioactive secondary metabolites. Pl Gen Res, 2005; 3: 273-87.
3. Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. Appl Microbiol Biotechnol, 2001; 56: 9-16.
4. Knop W. Untersuchung über die Flechten. Justus Lieb Ann Chem, 1844; 49: 103-24.
5. Romagni JG, Meazza G, Nanayakkara NP, Dayan FE. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. FEBS Lett, 2000; 480: 301-5.
6. Guo L, Shi Q, Fang JL, Mei N, Ali AA, Lewis SM, et al. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. J Environ Sci Health Part C, 2008; 26: 317-38.
7. Segatore B, Bellio P, Setacci D, Brisdelli F, Piovano M, Garbarino JA, et al. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and  $\Delta E$ -model methods. Phytomedicine, 2011; 19 (3-4): 341-7.
8. Cardarelli M, Serinob G, Campanellac L, Ercoleo P, Nardoned FDC, Alesianid O, et al. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. CMLS Cell Mol Life Sci, 1997; 53: 667-72.
9. Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, et al. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1995; 43: 1388-90.
10. Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, Battaglia F, Foti E, Lopez R, et al. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by human papillomavirus. Minerva Ginecol, 1999; 51: 255-60.

11. Burkholder PR, Evans AW, McVeigh I, Thornton HK. Further studies on the antibiotic activity of lichens. Bull Torrey Bot Club, 1944; 72: 157-64.
12. Ahmadjian V, Hale ME. Methods of isolating and culturing lichen symbionts and thalli. In: Ahmadjian V, Hale ME, eds. The Lichens. London: Academic Press, 1973: 653-9.
13. Dülger B, Gücin F, Kara A, Aslan A. *Usnea florida* (L.) Wigg. likeninin antimikrobiyal aktivitesi. Turk J Biol, 1997; 21: 103-8.
14. Kırmızıgül S, Koz Ö, Aml H, İçli S, Zeybek U. Isolation and structure elucidation of novel natural products from Turkish lichens. Turk J Chem, 2003; 27: 493-500.
15. Tay T, Özdemir-Türk A, Yılmaz M, Türk H, Kıvanç M. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. Z Naturforsch, 2004; 59 (C): 384-8.
16. Cansaran-Duman D, Çetin D, Şimsek H, Çoplu N. Antimicrobial activities of the lichens *Hypogymnia vittata*, *Hypogymnia physodes* and *Hypogymnia tubulosa* and HPLC analysis of their usnic acid content. Asian J Chem, 2010; 22: 8, 6125-32.
17. Cansaran-Duman D, Atakol O, Halıcı MG, Aksoy A. HPLC analysis of the usnic acid in some *Ramalina* species from Anatolia and investigation of their antimicrobial activities. Pharma Biol, 2007; 45 (1): 77-81.
18. Duman Cansaran D. Farklı liken örneklerindeki usnik asit miktarlarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmesi ve antimikrobiyal aktiviteleri. Türk Hij Den Biol Derg, 2007; 64 (3): 17-21.
19. Cansaran-Duman D, Kahya D, Yurdakulol E, Atakol O. Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of Anatolia and antimicrobial activity. Z Naturforsch, 2006; 61 (C): 773-6.
20. Çetin D, Cansaran-Duman D. Türkiye'de bulunan farklı liken türlerinin usnik asit miktarlarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmesi. Sakarya Üni Fen Bil Enst Derg, 2006; 8 (2): 23-31.
21. Cansaran-Duman D, Çetin D, Halıcı MG, Atakol O. Determination of usnic acid in some *Rhizoplaca* species from the Middle Anatolia and their antimicrobial activities. Z Naturforsch, 2006; 61(1-2): 47-51.
22. Cansaran-Duman D. Türkiye'de bazı liken türlerindeki usnik asitin HPLC yöntemi ile değerlendirilmesi ve antimikrobiyal aktiviteleri. Türk Hij Den Biol Derg, 2009; 66 (4): 153-60.
23. Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften, 2002; 89: 137-46.
24. Ingolfsdottir K. Usnic acid. Phytochemistry, 2002; 61: 729-36.
25. Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K, Peters T, Marre R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. Antimicrob Agents Chemother, 1995; 39: 2541-3.
26. Elo H, Matikainen J, Pelttari E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Naturwissenschaften, 2007; 94: 465-8.
27. Francolini I, Norris P, Piozzi A, Donelli G, Stodley P. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. Antimicrob Agents Chemother, 2004; 48: 4360-5.
28. Ivanova V, Backor M, Dahse HM, Graefe U. Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*. Preparat Biochem Biotech, 2010; 40: 377-88.
29. Güllüce M, Aslan A, Sökmen M, Şahin F, Adıgüzel A, Agar G, et al. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nyländeriana*. Phytomedicine, 2006; 13: 515-21.

## Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokok'ların biyofilm üretimi ve DNaz aktivitelerinin belirlenmesi

### Determination of biofilm production and DNase activity of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from meat samples

Neslihan GÜNDOĞAN<sup>1</sup>, Özlem ATAOL<sup>1</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada Ankara ilindeki, çeşitli süpermarketlerden temin edilen dana kıyma ve tavuk but örneklerinde *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokok (KNS)'ların bulunma sıklığı ile bu izolatların biyofilm üretimi ve DNaz aktivitelerinin saptanması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** İncelenen 15 kıyma ve 15 tavuk örneğinden izole edilen *S. aureus* ve KNS'lerin cins ve tür düzeyindeki identifikasyonları standart biyokimyasal yöntemler ve API ID 32 Staph (Bio Merieux SA, Marcy-l'Etoile, France) bakteri tanımlama kiti kullanılarak yapılmıştır. Stafilokok türlerinin biyofilm oluşumları Congo Red Agar'da, DNaz aktiviteleri DNaz Agar'da belirlenmiştir.

**Bulgular:** İncelenen kıyma örneklerinden 6 (%10,7)'si *S. aureus*, 50 (%89,3)'si KNS olmak üzere toplam 56 stafilokok izolatı elde edilmiştir. Tavuk örneklerinde toplam 41 KNS izolatı saptanmış fakat bu örneklerden *S. aureus* izole edilememiştir. DNaz aktivitesi kıymadan izole edilen *S. aureus* izolatlarının tamamında (%100),

#### ABSTRACT

**Objective:** In this study, it was aimed to evaluate calf minced meat and chicken drumsticks samples purchased from different supermarkets in Ankara, Turkey for the presence of coagulase positive staphylococci (CPS) and coagulase negative staphylococci (CNS) and to determine their biofilm production and DNase activity.

**Method:** *S. aureus* and CNS, isolated from 15 minced meat and 15 chicken drumstick samples, were analyzed by conventional biochemical tests and API ID 32 Staph (Bio Merieux SA, Marcy-l'Etoile, France) identification kits to identify for genus and species of these isolates. Biofilm formation of isolates that was investigated by using Congo Red agar method. DNase activity of these isolates were evaluated on DNase agar.

**Results:** Total of 56 isolates of *Staphylococcus* spp. which consist of 6 (10.7%) *S. aureus* and 50 (89.3%) CNS were found from minced meat samples. A total of 41 CNS isolates isolated from chicken samples whereas, *S. aureus* were not isolated from these samples. All of *S. aureus* (100%) and 58% of CNS isolates from minced

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

İletişim / Corresponding Author : Neslihan GÜNDOĞAN

Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Teknikokullar, ANKARA

Tel : +90 312 202 11 94

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

Geliş Tarihi / Received : 11.01.2012

Kabul Tarihi / Accepted : 24.08.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.03880

Gündoğan N, Ataol Ö. Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokok'ların biyofilm üretimi ve DNaz aktivitelerinin belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(3): 135-42.

KNS'lerin %58 'inde pozitif bulunmuştur. Tavuktan izole edilen KNS'lerin %70,7 'sinin DNaz pozitif bulunmuştur. Biofilm üretimi kıymadan izole edilen *S. aureus* izolatlarının %50 'sinde, KNS'lerin % 18'sinde tespit edilmiştir. Tavuktan izole edilen KNS'lerin %41.5 'inde biyofilm üretimi saptanmıştır.

**Sonuç:** Stafilocok türlerinin etlere kontaminasyonun bu gıdaların hazırlanması sırasındaki zayıf sanitasyon ve çapraz kontaminasyonun göstergesi olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada izolatların büyük bir oranda biyofilm oluşturdıkları ve DNaz aktivitesine sahip oldukları gözlenmiştir. DNaz aktivitesi olan ve biyofilm oluşturabilen stafilocok türlerinin kontaminasyon ile gıda zincirine girebileceğinin gıda üreticileri tarafından dikkate alınması gerektiği, bu nedenle de hijyenik ve koruyucu önlemlerin alınması gerektiği düşüncesindedir.

**Anahtar Kelimeler:** Stafilocok, et, tavuk, biyofilm, DNaz

meat and 70.7% of CNS isolates from chicken samples were positive for DNase activity, respectively. In this study, 50% of *S. aureus* and 18% of CNS from minced and 41.5% of CNS isolates from chicken samples produced biofilm, respectively.

**Conclusion:** These results suggests the contamination of meat and chicken samples by *Staphylococcus* spp. indicates poor personnel hygiene and cross contamination during the production process. In this study, we showed that a large proportion of isolates had biofilm production and DNase activity. We suggest that contamination of staphylococci in different levels of the food chain should always be considered carefully. The food producers should be aware that controlling biofilm formation and DNase activity by staphylococci. Therefore, strict hygienic and preventative measures should be taken.

**Key words:** *Staphylococcus* spp., meat, chicken, biofilm, DNase

## GİRİŞ

Micrococcaceae familyasından olan stafilocok türleri doğada çok yaygın bir şekilde toprakta, suda, havada, bitkilerde ve bunların dışında insan ve hayvanların derileri üzerinde ve mukoz membranlarında doğal florayı oluşturan mikroorganizmalardır. Patojen stafilocok türleri hem insan hem de hayvan sağlığını önemli ölçüde tehdit etmektedir (1). Meme içi iltihabı olarak bilinen mastitis etkeni olan stafilocoklar Staphylococcaceae familyasında yer alıp, çeşitli iltihaplı enfeksiyöz hastalıklara yol açmakla beraber insanlarda menenjit, septisemi, artrit, dermatit, endokardit ve eklem romatizmalarına neden olmaktadır (1). *Staphylococcus* genusu içerisinde yer alan *Staphylococcus aureus* türü yüksek toksisiteli ve bağırsaklarda etkili olan

enterotoksinleri nedeni ile insanlar için potansiyel patojen bir mikroorganizmadır (2). *S. aureus*'un gıdalarda bulunmasının diğer bir önemi de indikatör mikroorganizma olarak fonksiyonudur. Gıdalarda bu bakterinin varlığı genellikle gıda üretiminde çalışan personelin deri, ağız ve solunum yollarından kaynaklanan kontaminasyonun göstergesi olarak dikkate alınmaktadır (3). Koagülaz negatif stafilocoklar (KNS) uzun süredir kommensal ve kontaminant bakteriler olarak değerlendirilmelerine karşın, son yıllarda yapılan çalışmalar bazı KNS türlerinin enterotoksin üretebildiğini ayrıca insanlarda patojenik etkilerinin olduğunu göstermiştir (4). Çeşitli kaynaklardan izole edilen stafilocokların *in vivo* ve *in vitro* olarak



ürettikleri ortama konakçı üzerine etkili olan peptidoglikan, kapsuler susbstantlar, clumping faktör ve protein-A gibi sellüler;  $\alpha$  toksin,  $\beta$  hemolizin,  $\gamma$ -hemolizin, epidermolitik toksin, pirojenik toksin, leukosidinler, stafilokoagülaz, enterotoksinler, bakteriyosin, lizozim, nükleazlar (DNaz ve RNaz), hyaluronidaz ve slime faktör gibi ekstrasellüler maddeler salgıladıkları gösterilmiştir (5).

Bu maddelerden biyofilm ve DNaz gibi ekstrasellüler maddelerin stafilokokların patojenitesi ile yakından ilişkisi olduğu düşünülmekte ve stafilokokların tanımlanmalarında virulans faktörleri olarak yararlanılmaktadır (5). Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarid matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye veya bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur (6). Biyofilm üretildiği bakteriye antibiyotiklerden, dezenfektanlardan, kimyasallardan korunma gibi birçok avantaj sağlar (7). Bazı araştırmalar biyofilm üreten bakterilerin üretmeyenlere göre antibiyotiklere daha dirençli olduğunu göstermiştir (8). Stafilokokların biyofilm oluşturma özellikleri sayesinde tıbbi aletlere, gıda işletmelerindeki ekipmanlara, tezgah yüzeylerine tutunabildikleri ve çapraz kontaminasyonla gıdalara bulaşabildikleri gösterilmiştir (6, 7, 9). Tüm bu önemli özelliklerinden dolayı araştırmamızda Ankara'da satışa sunulan kıyma ve tavuk örneklerinden stafilokokların izolasyon ve tanımlanmaları yapılarak biyofilm üretimleri ve DNaz aktiviteleri araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Örnek Alma ve Örneklerin Analize Hazırlanması

Bu çalışma kapsamında Ankara İlindeki çeşitli marketlerden temin edilen 15 dana kıyma ve 15 tavuk but örneği ile çalışılmıştır. 25 g et örneği steril koşullarda tartılarak, 225 ml steril tamponlanmış peptonlu su ile homojenizatörde

(Stomacher 400) 10 dakika süre ile homojenize edildikten sonra  $10^{-3}$  kadar dilüsyonları hazırlanmıştır.

### Stafilokok İzolasyonu ve Tanımlanması

Homojenize edilerek ekime hazırlanmış dilüsyonlardan steril pipetlerle alınan 0,1 ml'lik örnekler %5 egg yolk tellurite emülsiyon (Oxoid SR 0054) ilave edilmiş Baird Parker Agar (BPA; Oxoid CM 0275) besiyerine dragalsky özesi ile yayılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda gri ve siyah renkli koloniler şüpheli stafilokok kolonileri olarak değerlendirilmiştir. Bu şüpheli koloniler yeniden taze BPA'ya pasajlanarak,  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edilmiş ve saf kültürleri elde edilmiştir. Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, oksidasyon fermentasyon (O/F glukoz) pozitif olan koloniler stafilokok cinsi olarak tanımlanmıştır. Stafilokok suşlarına tüpte koagülaz testi yapıldıktan sonra suşlar koagülaz pozitif (KPS) ve koagülaz negatif (KNS) stafilokok olarak gruplandırılmıştır. Stafilokok türlerinin identifikasyonları API ID 32 Staph (Bio Merieux SA, Marcy-l'Etoile, France) bakteri tanımlama kitleri ile yapılmıştır. Çalışmamıza referans suş olarak *S. aureus* ATCC 297.213 suşu kullanılmıştır.

### Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Tanımlaması yapılan stafilokok türlerinin biyofilm oluşumları Kongo red agarda (sucrose 50 g [SIGMA], brain heart infusion broth [OXOID], 37 g, agar 10 g, Kongo red [SIGMA] 0.8 g, distile su 1000ml) belirlenmiştir.  $37^{\circ}\text{C}$  de 24 saat inkübasyon sonunda siyah renkli koloniler biyofilm pozitif, pembe-kırmızı renkli koloniler biyofilm negatif kabul edilmiştir (8). Biyofilm pozitif kontrol suşu olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35.984 ve biyofilm negatif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 suşu kullanılmıştır.

### DNaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Stafilokokların DNaz aktiviteleri DNaz Agar (Oxoid CM32)'da test edilmiştir. İzolatlar DNaz agara çizgi



tarzında ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra üreyen koloniler üzerine 1 N HCl dölülerek etrafında açılan zon oluşumu DNaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (8).

## BULGULAR

Araştırmamızda materyal olarak kullanılan et örneklerinden (kıyma ve tavuk but) izole edilen stafilocok türleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Kıyma örneklerinden toplam 56 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatların altısı (%10,7) *Staphylococcus aureus*, 50 (%89,3)'si koagülaz negatif stafilocok (KNS) olarak belirlenmiştir. KNS türlerinin 36 (%64,3)'sı *S. xylosus*, yedisi (%12,5) *S. hominis*, üçü (%5,3) *S. capitis*, ikisi (%3,6) *S. epidermidis* ve ikisi (%3,6) *S. cohnii* olarak belirlenmiştir. Tavuk örneklerinden toplam 41 izolat elde edilmiş olup bu izolatların hepsi KNS türlerine aittir. Bu türlerin 13 (%31,7)'ü *S. simulans*, 10 (%24,4)'u *S. cohnii*, dokuzu (%22,0) *S. capitis*, altısı (%14,6) *S. hominis*, ikisi (%4,9) *S. auricularis*, biri (%2,4) *S. haemolyticus* dur. Tavuk örneklerinden *S. aureus* ve KNS türlerinden *S. xylosus* ve *S. epidermidis* izole edilememiştir. Kıyma örneklerinden de *S. simulans*, *S. auricularis* ve *S. haemolyticus* izole edilememiştir.

Kıyma ve tavuk örneklerinden izole edilen stafilocok türlerinin DNaz aktiviteleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Kıyma örneklerinden DNaz pozitif toplam 35 (%62,5) stafilocok izolatı elde edilmiş olup, bunların altısı (%100) *S. aureus*, ikisi (%100) *S. epidermidis*, altısı (%86) *S. hominis*, ikisi (%67) *S. capitis*, biri (%50) *S. cohnii* ve 18 (%50)'i *S. xylosus*'dur.

Tavuk örneklerinden toplam 29 (%70,7) DNaz pozitif stafilocok izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların üçü (%50) *S. hominis*, yedisi (% 78) *S. capitis*, sekizi (%80) *S. cohnii*, dokuzu (%69,2) *S. simulans*, biri (%50) *S. auricularis* ve biri (%50) *S. haemolyticus*'dur.

**Tablo 1.** Et örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin dağılımları

Stafilocok türleri	Kıyma		Tavuk but	
	n	%*	n	%
<i>S. aureus</i>	6	10,7	-	-
<i>S. xylosus</i>	36	64,3	-	-
<i>S. hominis</i>	7	12,5	6	14,6
<i>S. capitis</i>	3	5,3	9	22,0
<i>S. epidermidis</i>	2	3,6	-	-
<i>S. cohnii</i>	2	3,6	10	24,4
<i>S. simulans</i>	-	-	13	31,7
<i>S. auricularis</i>	-	-	2	4,9
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	1	2,4
<b>TOPLAM</b>	<b>56</b>	<b>100</b>	<b>41</b>	<b>100</b>

n: izolat sayısı

\*: yüzde değerleri toplam izolat sayısına göre alınmıştır

**Tablo 2.** Et örneklerinden izole edilen DNaz pozitif Stafilocok türlerinin dağılımları

Stafilocok türleri	Kıyma		Tavuk but	
	n	%	n	%
<i>S. aureus</i>	6	17,2	-	-
<i>S. epidermidis</i>	2	5,7	-	-
<i>S. hominis</i>	6	17,2	3	10,3
<i>S. capitis</i>	2	5,7	7	24,1
<i>S. cohnii</i>	1	2,9	8	27,6
<i>S. xylosus</i>	18	51,4	-	-
<i>S. simulans</i>	-	-	9	31,0
<i>S. auricularis</i>	-	-	1	3,5
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	1	3,5
<b>TOPLAM</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>29</b>	<b>100</b>

n: izolat sayısı

Kıyma örneklerinden toplam 12 (%21,4), tavuk örneklerinden toplam 17 (%41,5) biyofilm pozitif izolat elde edilmiştir. Stafilocok türlerinin biyofilm oluşumları Tablo 3’de gösterilmiştir. Kıyma örneklerinde 3 *S. aureus* (%50), bir *S. epidermidis* (%50), bir *S. hominis* (%14) ve yedi *S. xylosus* (%19) izolatında biyofilm üretimi saptanmıştır. Tavuk örneklerinde de üç *S. hominis* (%50), bir *S. capitis* (%11,1), dört *S. cohnii* (%40) ve dokuz *S. simulans* (%69,3) izolatında biyofilm üretimi gözlenmiştir.

**Tablo 3.** Et örneklerinden izole edilen biyofilm pozitif Stafilocok türlerinin dağılımları

Bakteri Adı	Kıyma		Tavuk but	
	n	%	n	%
<i>S. aureus</i>	3	25	-	-
<i>S. epidermidis</i>	1	8,3	-	-
<i>S. hominis</i>	1	8,3	3	17,7
<i>S. capitis</i>	-	-	1	5,9
<i>S. cohnii</i>	-	-	4	23,5
<i>S. xylosus</i>	7	58,4	-	-
<i>S. simulans</i>	-	-	9	52,9
<i>S. auricularis</i>	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-
<b>TOPLAM</b>	<b>12</b>	<b>100</b>	<b>17</b>	<b>100</b>

n: izolat sayısı

## TARTIŞMA

İnsan ve sıcak kanlı hayvanların deri ve mukozal membranlarında, toz ve toprak gibi çevresel ortamlarda bulunan *S. aureus* ve KNS’ler; etlerin kesimi, parçalanması, depolanması sırasında uygun olmayan hijyenik koşullarda hazırlanan bir çok gıdaya bulaşabilirler (10). Araştırmamızda kıyma örneklerinden %10,7 oranında *S. aureus* izole edilirken,

tavuk örneklerinden *S. aureus* izole edilememiştir. Schlegelova ve ark., çalıştıkları et örneklerinden %52,2 oranında *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir (11). Çıtak ve Duman Ankara’da yaptıkları bir çalışmada toplam 105 tavuk örneğinden 195 stafilocok izolatı elde etmiş olup, 92 (%47,2)’sini *S. aureus* olarak tanımlamışlardır (12). Güven ve ark., Eskişehir ve Kütahya bölgesinde *S. aureus*’u et ürünlerinden %48,7 oranında izole etmişlerdir (13)

Gündoğan ve ark., çalıştıkları 150 et ve tavuk örneklerinin 80 (%53,3)’ninden *S. aureus* izole ettiklerini belirtmişlerdir (14). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar çalışmamızın sonuçlarından oldukça yüksektir.

Önceleri derinin normal florasında bulunan KNS’lerin zararsız etkenler olduğu düşünülse de günümüzde bu bakterilerin insan ve hayvanlarda önemli bazı hastalıkların etkeni fırsatçı patojenler oldukları bilinmektedir (1). Diğer taraftan, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. carnosus* gibi bazı KNS türlerinin fermente etlerdeki lipoliz, proteoliz ve lezzet gelişiminde rol aldıkları bilinmekte ve güvenli kabul edilmektedirler (15). Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar bazı KNS türlerinin stafilocok enterotoksinleri üretebildiğini göstermiştir (16). Araştırmamızda kıyma örneklerinden 36 (%64,3) *S. xylosus*, yedi (%12,5) *S. hominis*, üç (%5,3) *S. capitis*, iki (%3,6) *S. epidermidis* ve 2 (%3,6) *S. cohnii* olmak üzere toplam 56 KNS, tavuk but örneklerinden de 13 (%31,7) *S. simulans*, 10 (%24,4) *S. cohnii*, dokuz (%22) *S. capitis*, altı (%14,6) *S. hominis*, iki (%4,9) *S. auricularis* ve bir (%2,4) *S. haemolyticus* olmak üzere toplam 41 KNS izole edilmiştir. Çıtak ve Duman tavuk örneklerinden 103 (%52,8) KNS izolatı tanımladıklarını bildirmişlerdir (12). Addis ve ark., ise 200 peynir örneğinden 19 (%9,5) KNS izole etmişlerdir (17). Marino ve ark., tüketime hazır hayvansal gıdalar ile yaptıkları bir araştırmada *S. saprophyticus*’u (%23,7) dominant tür olarak izole ederlerken, *S. epidermidis*, *S. pasteurii*, *S. sciuri*, *S. xylosus* ve *S. warneri* türlerini

daha az sıklıkla izole etmişlerdir (15). Sawant ve ark., çığ süt örneklerinden izole ettikleri 168 KNS izolatının %36 *S. chromogenes*, %22 *S. epidermidis*, %22 *S. hyicus*, %10 *S. simulans*, %4 *S. warneri*, %2 *S. hominis* ve %1 *S. intermedius*, *S. sciuri*, *S. xylosus* olarak tanımlamışlardır (18).

İzolasyon oranları ve izole edilen türler bakımından bizim sonuçlarımız ile yukarıdaki bazı araştırmacıların sonuçları arasındaki farklılığın çalışılan örnek sayısı, çeşidi, işletmelerin hijyenik koşulları ve gıdaların depolama sürelerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

DNaz aktivitesinin belirlenmesinin patojenik stafilocokların normal flora üyelerinden ayrılması bakımından önem taşıdığı belirtilmektedir (19). Devriese ve Oeding, *S. aureus*'ların koagülaz ve DNaz oluşturmaları arasında sıkı bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir (19). Araştırmamızda kıyma örneklerinden izole edilen *S. aureus*'ların tamamında (%100), KNS'lerin %58'inde, tavuk örneklerinden izole edilen KNS'lerin %70,7'sinde DNaz aktivitesi tespit edilmiştir. Sonuçlarımıza benzer şekilde Mastunga ve ark., sütlerden izole ettikleri 58 *S. aureus* izolatının tamamında DNaz aktivitesi tespit etmişlerdir (20). Gündoğan ve ark., çığ süt, pastörize süt ve dondurma örneklerinden izole ettikleri 110 *S. aureus* izolatının %94,5'inde DNaz aktivitesi tespit etmişlerdir (21). Çıtak ve ark; çığ sütlerden izole ettikleri 704 *S. aureus* izolatının %93,6'ında, 147 koagülaz negatif stafilocok izolatının %10,2'sinde DNaz aktivitesinin bulunduğunu göstermişlerdir (22).

Biyofilm, bakterileri konakçının savunma hücrelerinden, antibiyotiklerden, çeşitli kimyasal ve

dezenfektanlardan koruyan ekzopolisakkarit yapıda bir bariyerdir (6). Gıda endüstrisi bakımından bakteri biyofilmleri büyük önem taşımaktadır. Bakterilerin gıda üretiminin yapıldığı yüzeylere yapışması ve biyofilm oluşturmaları birçok gıda patojeninin veya gıdalarda bozulmalara neden olan bakterilerin gıdalara kontaminasyonuna yol açabilmektedir (6, 7).

Araştırmamızda kıyma örneklerinden izole edilen *S. aureus*'ların %50'sinde, KNS'lerin %18'inde biyofilm üretimi tespit edilirken, tavuk örneklerinden izole edilen KNS'lerin ise %41,5'inde biyofilm üretimi tespit edilmiştir. Sonuçlarımıza benzer şekilde Vasudevan ve ark., mastitisli ineklerden izole ettikleri 35 *S. aureus* izolatının, 24 (%68,6)'ünde biyofilm üretimi tespit etmişlerdir (23). Gündoğan ve ark; çığ süt, pastörize süt ve dondurma örneklerinden izole edilen *S. aureus*'ların %52,7'sinin slime ürettiklerini bildirmişlerdir (21). Çalışma sonuçlarımızdan farklı olarak Çıtak ve ark., çığ sütlerden izole ettikleri *S. aureus*'ların %5,1'inde, KNS'lerin %42,2'sinde biyofilm üretimi olduğunu belirtmişlerdir (22).

Sonuç olarak, tüketime sunulan et ve tavuk örneklerinden stafilocok türlerinin izolasyonları bu bakterilerin gıda üretiminin herhangi bir aşamasında gıdalara kolaylıkla kontamine olabildiğini göstermektedir. Bu izolatların DNaz ve biyofilm üretebilme kapasiteleri, halk sağlığı açısından risk oluşturabilir veya gıdalarda bozulmalara neden olarak ekonomik kayıplara neden olabilir. Bu nedenle gıdaların üretiminden tüketiciye ulaşana kadar geçen bütün aşamalarda gerekli hijyen ve sanitasyon kurallarına uyulması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase negative *Staphylococcus*. Clin Microb Rev, 2005; 7:117-40.
2. Normanno G, Salandra L, Dambrosio A, Quagila N, Corrente M. Occurrence, characterization and antimicrobial resistant of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. Int J Food Microbiol, 2007; 115: 290-96.
3. Acco M, Ferreira FS, Henriques JAP, Tondo EC. Identification of multiple-resistant strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. Food Microbiol, 2003; 20: 489-93.
4. Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Junior JPA. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. Braz J Microbiol, 2006; 37: 70-4.
5. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (Ed): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore U S A, 1986; 1000-80.
6. Schlegelova J, Babak V, Holasova M, Dendis M. The biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* isolates in raw materials, foodstuffs and on contact surfaces in processing plants. Folia Microbiol, 2008; 53(6): 500-4.
7. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, et al. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 2004; 72: 2177-85.
8. Gündoğan N, Çıtak S, Turan E. Slime production, Dnase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. Food Cont, 2006; 17: 389-92.
9. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol, 1985; 22: 996-1006.
10. Abulreesh HH. Multidrug-resistant staphylococci in the environment. Int Con Biotechnol Environ Man, 2011; 18: 1-6.
11. Schlegelova J, Napravnikova E, Dendis M, Horvath R, Benedik J, Babak V, et al. Beef carcass contamination in slaughterhouse and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates of selected microbial species. Meat Sci, 2004; 66: 557-65.
12. Çıtak S, Duman T. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* from raw chicken samples in Turkey: Prevalence and antimicrobial resistance. J Food Agri Environ, 2011; 9(1): 156-58.
13. Güven K, Mutlu, MB, Gülbandır A, Çakır P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. J Food Safety, 2010; 30: 196-212.
14. Gündoğan N, Yücel N, Çıtak S, Devren A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. Meat Sci, 2005; 69: 807-10.
15. Marino M, Frigo F, Bartolomeoli I, Maifreni M. Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. J Appl Microbiol, 2010; 110: 550-61.
16. Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Götz F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. Int J Food Microbiol, 2008; 127: 246-51.
17. Addis M, Pal M, Kyule MN. Isolation and Identification of *Staphylococcus* species from Ethiopian Cottage Cheese (Ayib) in Debre Zeit, Ethiopia. Vet Res, 2011; 4(1): 13-7.
18. Sawant AA, Gillepe BE, Oliver SP. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. Vet Microbiol, 2009; 134: 73-81.
19. Devriese L A, Oeding P. Coagulase and heat-resistant nuclease producing *Staphylococcus epidermidis* strains from animals. J Appl Bacteriol, 1975; 39: 197-207.
20. Mastunga J, Kamata S, Kakuchi N, Uchida K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* peracute, acute and chronic bovine mastitis. J Vet Med Sci, 1993; 297-300.

21. Gündoğan N, Çıtak S, Turan E. Slime production, Dnase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. Food Cont, 2006; 17: 389-92.
22. Çıtak S, Varlık O, Gündoğan N. Slime production and DNase activity of staphylococci isolated from raw milk. J Food Safety, 2003; 23: 281-8.
23. Vasudevan P, Nair MKM, Annamali T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet Microbiol, 2003; 92: 179-85.

# Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının HPLC yöntemi ile belirlenmesi\*

## Quantitative determination of total vitamin C in enteral nutritional products by using HPLC

Pınar KAYNAR<sup>1</sup>, Meşküre CANPOLAT<sup>1</sup>, Ayşe KAVAKLI<sup>1</sup>,  
Esra Jale ÖZEROĞLU<sup>1</sup>, Serdar Alp SUBAŞI<sup>1</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Belli bir beslenme gereksinimi bulunan hastaların diyetlerini düzenlemek amacıyla tıbbi gözetim altında kullanılan özel olarak üretilmiş veya formüle edilmiş enteral beslenme ürünleri; suda çözünen vitaminler ile yağda çözünen vitaminleri içermektedirler. Suda çözünen vitamin grubu içinde yer alan vitamin C bir başka adıyla askorbik asit, pek çok vücut fonksiyonu için önemli bir vitamindir. Bu çalışmada, söz konusu ürünlerdeki toplam vitamin C miktarının tayinine yönelik olarak UV dedektörü (280 nm) ile kolay, spesifik, duyarlı yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) yönteminin uygulanabilirliğini tespit etmek amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Toplam 28 adet enteral beslenme ürünündeki toplam vitamin C miktarının belirlenmesi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Kromatografik sistem; C-18 kolon (250x4,60 mm-5µ) ve 280 nm'ye ayarlı UV dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 1 ml/dak akış hızında heksansülfonik asit sodyum tuzu içeren tampon ve metanol (98:2) kullanılmıştır. Enteral beslenme ürünlerinde belirlenen toplam vitamin C miktarı ile ürün etiketlerinde beyan edilen miktarlar arasındaki ilişki bağımsız gruplarda T-testi kullanılarak, istatistiksel yönden değerlendirilmiştir.

### ABSTRACT

**Objective:** Enteral nutritional products intended for the dietary management of patients and require to be used under medical supervision are specially processed or formulated. These products contain water soluble and fat soluble vitamins. The vitamin C (ascorbic acid) which is one of the water soluble vitamins is a important vitamin for many body functions. The aim of this study is to determine the applicability of UV detection (280 nm) method by the simply, specific and sensitive high pressure liquid chromatography (HPLC) for quantitative estimation of total vitamin C levels in enteral nutritional products.

**Method:** HPLC method was used for quantitative determination of total vitamin C in total 28 enteral nutritional products. The chromatographic system was done on a C18 column (250x4.60 mm-5 µ) with UV detection at 280 nm. Buffer containing hexanesulphonic acid sodium salt and methanol (98:2) was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. In statistical evaluation; the relationship between the values determined for enteral nutrition products and the values declared on the labels of the products was made according to independent samples T-Test.

\* Bu çalışma, Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri-III. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu'nda (22-25 Haziran 2011, Ankara-TÜRKİYE) poster olarak sunulmuştur.

<sup>1</sup> Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Tüketici Güvenliği ve Sağlık Etkileri Araştırma Müdürlüğü, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Pınar KAYNAR

THSK, Tüketici Güvenliği Lab. Daire Bşk., Merkez Tüketici Ürünleri Mik. Laboratuvarı, ANKARA

Tel : +90 312 565 52 06

E-posta / E-mail : pinar.kaynar@thsk.gov.tr

Geliş Tarihi / Received : 24.01.2012

Kabul Tarihi / Accepted : 24.08.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.80037

Kaynar P, Canpolat M, Kavaklı A, Özeroğlu EJ, Subaşı SA. Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının HPLC yöntemi ile belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(3): 143-8.

**Bulgular:** Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarı HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve toplam vitamin C miktarı 3,9-52,20 mg/100 ml arasında bulunmuştur. İstatistiksel değerlendirme ile bulunan değerlerin ürün etiketlerinde beyan edilen değerlere uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Toplam vitamin C'nin alıkonma süresi yaklaşık beş dakika olarak tespit edilmiştir. Dedeksiyon limiti (LOD) ise 0,005 mg/100 ml olarak saptanmıştır.

**Sonuç:** Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının belirlenmesinde HPLC-UV yönteminin kullanılabilceği görülmüş ve yöntemin duyarlı olması, uygulama süresi ile kolaylığı açısından avantajlı olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, bu ürünler için beyan edilen vitamin C miktarının doğruluğu onaylanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Enteral beslenme, diyet formülasyon, vitamin C (askorbik asit), HPLC

**Results:** HPLC method was used for quantitative determination of total vitamin C in enteral nutritional products. The values of total vitamin C of the products ranged from 3.9 to 52.20 mg/100 ml. In the statistical evaluation, it was observed that the values determined for enteral nutrition products were similar to the values declared on the labels of the products ( $p>0.05$ ). The retention time of vitamin C was determined as ca. five min. It was also found that the detection of limit (LOD) is 0.005 mg/100 ml.

**Conclusion:** It was showed that HPLC-UV can be applied for the quantitative determination of total vitamin C levels in enteral nutritional products. This had the advantages of improved simplicity, sensitivity and shorter application times. Also, it is approved that the values of total vitamin C declared on the labels of these products are accurate.

**Key Words:** Enteral nutrition, diet formulation, vitamin C (ascorbic acid), HPLC

## GİRİŞ

Enteral beslenme ürünleri; bireyin iştahsızlık, çeşitli hastalık ve/veya ameliyat gibi nedenlerle ağız yolu ile yeterli besin alamadığı durumlarda, besin alınımını takviye etmek ve/veya tüm besin öğeleri gereksinimini karşılamak için kullanılan ürünler olarak ifade edilmektedir (1). Enteral beslenme ürünlerinin içeriğinde vücut metabolizması için gerekli olan suda çözünen vitaminler ve yağda çözünen vitaminler bulunmaktadır. C vitamini (askorbik asit) suda çözünebilen vitaminlerden olup, vücudun kendisi tarafından üretilmeyen bir vitamindir (2). Vitamin C tayinine yönelik titrimetrik, kolorimetrik, kinetik, enzimatik, spektrofotometrik ve kromatografik gibi birçok yöntem kullanılmaktadır (3-8). Spesifik, duyarlılık, uygulama süresi ve kolaylığı açısından birçok avantajlara sahip olan yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) yönteminin kullanımının günümüzde arttığı görülmektedir. HPLC yöntemi ile yapılan çalışmalarda; UV, floresans, diod dizi, elektrokimyasal, refraktif indeks, kütle ve amperometrik gibi çeşitli dedeksiyon sistemleri kullanılmaktadır (9-12).

Bu çalışmada; enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının tayininde UV dedektör kullanılan HPLC yönteminin uygulanabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Yöntemin uygulanabilirliğini test etmek amacıyla 2009 yılında, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı - Tüketici Güvenliği ve Sağlık Etkileri Araştırma Müdürlüğü'ne bağlı laboratuvarlarda 28 adet enteral beslenme ürünü çalışılmıştır. Enteral beslenme ürünlerinin analizinde aşağıdaki cihaz-ekipman, standart ve kimyasaldan yararlanılmıştır.

### Cihaz ve Kimyasallar

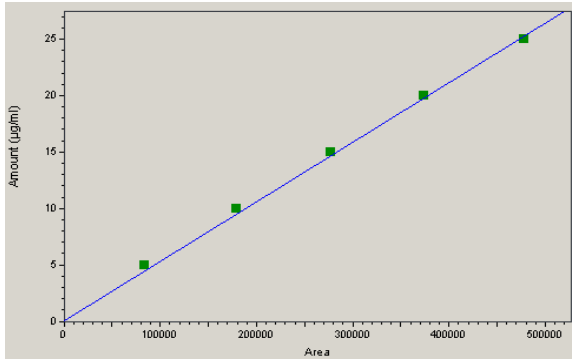
(a) **HPLC:** SpectraSystem P1000 model yüksek basınç pompası, SpectraSystem AS3000 model enjeksiyon bloğu ve SpectraSystem UV 1000 kullanılmıştır.

(b) **Analitik Kolon:** 250 x 4,60 mm-5µ boyutlarında ters faz C18 kolon (Phenomenex) kullanılmıştır.



(c) **Mobil Faz:** Akış hızı 1 ml/dak olan ve hekzansülfonik asit sodyum tuzu içeren tampon ile metanol (98:2) mobil faz olarak kullanılmıştır. Mobil faz günlük hazırlanmış ve kullanılmadan önce 0,45 µ filtreden geçirilmiştir.

(d) **Vitamin C Standart Çözeltilisi:** Vitamin C stok çözeltisi günlük olarak 0,25 mg/ml konsantrasyonda %3 metafosforik asit (Merck) içerisinde hazırlanmıştır. Stok çözeltiden asetonitril (Merck) içeren çözücü ile seyreltmek suretiyle 0,005, 0,010, 0,015, 0,020 ve 0,025 mg/ml konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi, konsantrasyona karşılık pik yüksekliği baz alınarak hazırlanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Vitamin C standart çözeltilerine ait kalibrasyon eğrisi

#### Örnek Hazırlanması

Toplam 28 adet enteral beslenme ürün örneğinden 0,005-0,025 mg/ml olacak şekilde tartımlar yapılmış ve son hacimlere %3 metafosforik asit ile tamamlanmıştır. Tamamlanmış çözeltiden uygun miktarlarda alınarak asetonitril içeren çözücü ilave edilmiştir. Daha sonra örnek 0,45 µ por çapındaki filtreden geçirilmiş ve filtratın 50 µl'si kolona enjekte edilmiştir. Ayrıca, dedeksiyon limiti (LOD) tayini için az olan konsantrasyonda örnek hazırlanarak kolona enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların standart sapmasının üç katı olarak LOD değeri hesaplanmıştır.

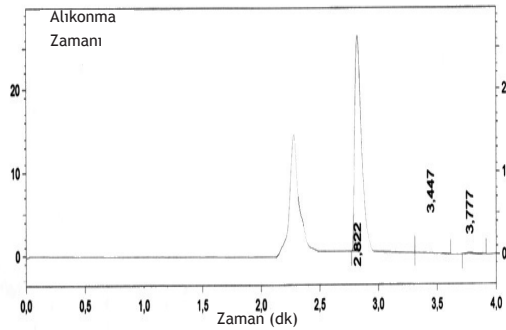
#### İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda; enteral beslenme ürünlerinin etiketlerinde beyan edilen vitamin C miktarı ile belirlenen vitamin C miktarının normal dağılıma uygunluğu kontrol edilmiş ve bağımsız gruplarda T-testine (independent samples T-test) göre etiket değeri ile saptanan miktar arasındaki fark araştırılmıştır. Bu fark,  $p < 0,05$  olduğunda anlamlı kabul edilmiştir.

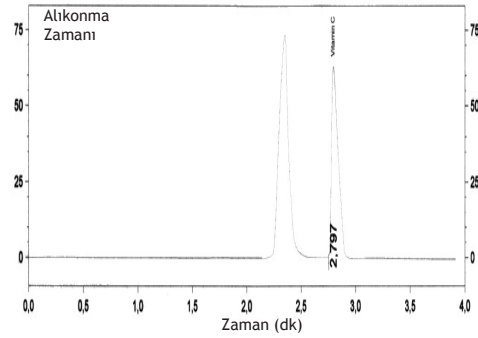
#### BULGULAR

Bu çalışmada; 28 adet enteral beslenme örneğindeki toplam vitamin C miktarı HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Yöntemin doğrusal cevap aralığı 0,005-0,025 mg/ml olarak bulunmuştur. Vitamin C yaklaşık beş dakikalık bir elusyon süresinde analiz edilmiş ve dedeksiyon limiti (LOD) 0,005 mg/100 ml olarak saptanmıştır. Tablo 1'de 28 adet enteral beslenme ürün örneğinde saptanan toplam vitamin C miktarı ile beyan edilen etiket değerleri verilmiştir. Şekil 2 (a)'da vitamin C standart çözeltisi kromatogramı ve (b)'de enteral beslenme ürün örneğine (E19) ait vitamin C kromatogramı gösterilmiştir. Enteral beslenme ürünlerinin etiket değeri ile saptanan miktar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ).

0,005-0,025 mg/ml standart konsantrasyon aralığı için pik yüksekliği ile konsantrasyon arasındaki korelasyon katsayısı  $r = 0,999$  olarak saptanmıştır ( $n = 5$ ) (Şekil 1). Enteral beslenme ürün örneklerindeki toplam vitamin C miktarının 3,9-52,20 mg/100 ml arasında olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen değerlerin, ürün etiketlerindeki değerlere uygunluk gösterdikleri belirlenmiştir (Tablo 1). Çalışmamızda, bağımsız gruplarda T-testine (independent samples T-test) göre enteral beslenme ürünlerindeki etiket değeri ile saptanan miktar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ).



Şekil 2 (a). Vitamin C standart çözeltisi kromatogramı



Şekil 2 (b). Enteral beslenme ürününe ait (E19) vitamin C kromatogramı

Tablo 1. Enteral beslenme ürünlerinde saptanan toplam vitamin C miktarı ile etiket değerleri (mg/100 ml).

Enteral Beslenme Ürünün Kodu	Saptanan Değer	Etiket Değeri
E1	30,22	30,00
E2	18,01	18,00
E3	16,44	17,00
E4	7,38	7,00
E5	3,90	3,80
E6	18,80	18,00
E7	7,75	7,00
E8	8,12	8,00
E9	15,45	15,00
E10	6,89	6,70
E11	15,22	15,00
E12	12,00	12,00
E13	12,87	12,00
E14	5,14	5,00
E15	43,82	43,00
E16	5,39	5,00
E17	10,02	10,00
E18	12,80	11,00
E19	9,34	9,10
E20	4,98	5,00
E21	52,00	50,00
E22	5,59	5,00
E23	13,40	12,00
E24	16,12	15,00
E25	14,06	13,00
E26	19,11	18,80
E27	15,25	15,00
E28	4,00	4,60

## TARTIŞMA

Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarı yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) kullanılarak tespit edilmiştir. Bu ürünlerdeki toplam vitamin C miktarı 3,9-52,20 mg/100 ml arasında bulunmuş ve bulunan değerlerin ürün etiketlerinde beyan edilen değerlere uygunluk gösterdikleri belirlenmiştir. Kaynar ve ark. (13) söz konusu ürünlerdeki vitamin B2 miktarının belirlenmesi için HPLC kullanmışlardır. Friel ve ark. (14) ise enteral ve parenteral beslenme alan prematüre bebeklerde vitamin C, riboflavin, tiyamin ve piridoksin vitaminlerin durumlarını belirlemek için yaptıkları çalışmada; kolorimetrik ölçüm yanında yüksek basınçlı sıvı kromatografisinden yararlanmışlardır. Yapılan başka bir çalışmada da meyve suları, meyve-sebze püreleri ve bebek mamalarındaki toplam vitamin C miktarının belirlenmesi için HPLC-UV kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda, elde edilen vitamin C miktarının beyan edilen değerlere oldukça yakın olduğu saptanmıştır (15). Bebek mamalarındaki askorbik asit ve dehidroaskorbik asitin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada da yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemi kullanılmıştır. İncelenen bu ürünlerdeki toplam vitamin C miktarının etiketleri üzerinde beyan edilen değerlerden daha yüksek olduğu bulunmuştur (16). Fontannaz ve ark. (17) zenginleştirilmiş gıda ürünleri, premiks ve duomikslerdeki toplam askorbik asit (AA) miktarı için HPLC-UV yöntemini

geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemin bu tipteki farklı gıda ürünlerindeki askorbik asit (vitamin C) miktarını belirlemek için uygulanabileceğini ve zenginleştirilmiş gıda ürünlerindeki iso askorbik asit varlığının kontrolü için tavsiye edilebileceğini belirtmişlerdir. Çeşitli meyvelerdeki askorbik asidin belirlenmesi için de HPLC-UV yöntemi kullanılmış ve bu yöntemin kolay ve ucuz olmasından dolayı seçilebileceği ifade edilmiştir (18). Sanchez ve ark. (19) ise yeşil bezelyelerdeki (*Phaseolus vulgaris* L.) vitamin C'nin belirlenmesi için spektrofotometri yöntemi ile HPLC-UV kromatografik yöntemi karşılaştırmışlar ve HPLC-UV'nin daha uygun bir yöntem olduğunu belirlemişlerdir. Vinci ve ark. (20)'da farklı egzotik meyvelerdeki askorbik asit

seviyelerini HPLC metot ile belirlemişler ve 20-90 mg/100g arasında yüksek seviyede askorbik asit içerdiklerini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızın sonucunda; enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının belirlenmesi amacıyla HPLC-UV kullanılabileceği tespit edilmiştir. Bu metodun; duyarlılığı, uygulama süresi ve kolaylığı açısından avantajlı bir yöntem olduğu görülmüştür. Ayrıca, enteral beslenme ürünlerinin üzerinde beyan edilen vitamin C miktarının doğruluğu onaylanmış ve bu ürünlerle beslenen bireylerin günlük vitamin C alımı açısından sorun veya komplikasyon yaşamayacakları düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Arslan P. Enteral beslenme ürünleri. In: Sağlık Bakanlığı. Gıda Denetçi Eğitim Materyali. 1. Basım. Ankara: Aydoğdu Ofset Baskı, 1998: 515-6.
2. Özden H, Çelik C. Vitamin C'nin metabolik ve klinik önemi, yeni yaklaşımlar. T Klin Tıp Bilimleri, 1993; 13: 200-10.
3. Okiei W, Ogunlesi M, Azeez L, Obakachi V, Osunsanmi M, Nkenckor G. The voltammetric and titrimetric determination of ascorbic acid levels in tropical fruit samples. Int J Electrochem Sci, 2009; 4: 276-87.
4. Sultan SM, Abdennabi AM, Suliman FE. Flow injection colorimetric method for the assay of vitamin C in drug formulations using tris, 1-10-phenanthroline-iron (III) complex as an oxidant in sulfuric acid media. Talanta, 1994; 41 (1): 125-30.
5. Sultan SM, Walmsley AD. Simultaneous kinetic method for the determination of vitamin C, citrate and oxalate employing the kalman filter. Analyst, 1997; 122: 1601-4.
6. Danielczuk J, Pietrzykowski R, Zieliński W. Comparative study of the enzymatic method for determination of vitamin C with routine methods according to ISO. Pol J Food Nutr Sci, 2004; 13/54 (1): 41-6.
7. Bajaj KL, Kaur G. Spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in vegetables and fruits. Analyst, 1981; 106: 117-20.
8. Hernanz A. High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in serum using paired-ion chromatography and UV spectrophotometric detection. J Clin Chem Clin Biochem, 1988; 26 (7): 459-61.
9. Ertaş E. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi tekniği uygulamaları eğitim notları. Gebze: TÜBİTAK MAM Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü. 2004; 1-34.
10. Speek AJ, Schrijver J, Schreurs WHP. Fluorometric determination of total vitamin C in whole blood by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. J Chromatogr B, 1984; 305 (1): 53-60.
11. Heudi O, Kilinc T, Fontannaz P. Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultraviolet detection: application to polyvitaminated premixes. J Chromatogr A, 2005; 1070 (1-2): 49-56.
12. Gazdik Z, Zitka O, Petrlova J, Adam V, Zehnalek J, Horna A, et al. Determination of vitamin C (ascorbic acid) using high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. Sensors, 2008; 8: 7097-112.

13. Kaynar P, Canbolat M, Bingöl M, Polat A. Enteral beslenme ürünlerindeki vitamin B<sub>2</sub> miktarının HPLC ile belirlenmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2007; 64 (3): 5-9.
14. Friel JK, Bessie JC, Belkhole SL, Edgecombe C, Steele-Rodway M, Downton G, et al. Thiamine, riboflavin, pyridoxine and vitamin C status in premature infants receiving parenteral and enteral nutrition. *J Pediatr Gastr and Nutr*, 2001; 33: 64-9.
15. Gökmen V, Acar J. HPLC ile gıdalardaki toplam vitamin C miktarının saptanması. *Gıda San Derg*, 1995; 39: 19-20.
16. Behrens WA, Madere R. Ascorbic and dehydroascorbic acid content of infant formula. *J Food Compos and Anal*, 1989; 2 (1): 48-52.
17. Fontannaz P, Kiliç T, Heudi O. HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chem*, 2006; 94 (4): 626-31.
18. Odriozola-Serrano I, Hernández-Jover T, Martín-Belloso O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem*, 2007; 105 (3): 1151-8.
19. Sanchez-Mata FC, Camara-Hurtado M, Diez-Marques C, Torija-Isasa ME. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur Food Res Techn*, 2000; 210 (3): 220-5.
20. Vinci G, Botrè F, Mele G, Ruggieri G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. *Food Chem*, 1995; 53: 211-4.

## Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi 2009-2011 yılı Tüberküloz Laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi\*

### Evaluation of Tuberculosis Laboratory results in Çanakkale Onsekiz Mart University Research and Education Hospital for 2009-2011

Nilgun ÖZBEY<sup>1</sup>, Alper AKÇALI<sup>1</sup>, Müşerref TATMAN-OTKUN<sup>1</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Çanakkale İlinde tüberküloz kültür çalışmalarına 2009 yılında ilk olarak Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda başlanmıştır. Bu çalışma ile laboratuvarımızda elde edilen verilerin sunulması ve mikobakteri tanısında kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Mikobakteri kültürü için laboratuvarımıza gönderilen klinik örnekler Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak, mikroskopik olarak değerlendirilmiş; Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri ve BACTEC MGIT 960 (*Mycobacteria* Growth Indicator Tube, Becton Dickinson, ABD) sıvı bazlı kültür sistemi tüplerine ekilmiştir. Üreme görülen kültür tüplerinde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) tanımlaması ve istem yapıldığında streptomisin (STR), izoniazid (INH), rifampisin (RF), etambutol (ETM) duyarlılıkları çalışılmıştır. Aseptik koşullarda toplandığı düşünülen vücut sıvıları dekontamine edilmeden direkt olarak, diğer örnekler ise önce dekontaminasyon ve sonra konsantrasyondan ekim yapılmıştır.

**Bulgular:** Laboratuvarımıza 667 hastadan toplam 1.048 örnek gönderilmiştir. 54 hastaya ait 71'i MTBK, yedisi tüberküloz dışı mikobakteri olmak üzere toplamda

#### ABSTRACT

**Objective:** Tuberculosis microbiological laboratory diagnosis was firstly started in year 2009, in Microbiology Laboratory of Onsekiz Mart University Research and Education Hospital in Çanakkale. We aimed at this study to present our laboratory data and to evaluate the methods which were used for the diagnosis of micobacteria.

**Method:** Samples sent to our laboratory for tuberculosis culture were stained by Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) method and evaluated microscopically. After processing of samples, each sample was inoculated to Löwenstein-Jensen medium (LJ) and BACTEC MGIT 960 (*Mycobacteria* Growth Indicator Tube, Becton Dickinson, USA) liquid based medium. If suspected growth was detected, *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) typing was made and if requested antituberculosis drug susceptibility for streptomycin (STR), isoniazid (INH), rifampicin (RF) and ethambutol (ETM) tested. Samples from normally sterile body sites cultured directly, others were firstly decontaminated and concentrated.

**Results:** During the study period 1.048 samples from 667 patient has been processed. Seventy eight samples (7.44%) from 54 patients were found positive

\* Bu çalışma; 12-16 Kasım 2011 tarihlerinde Antalya'da düzenlenen I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresinde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

<sup>1</sup> Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ÇANAKKALE

İletişim / Corresponding Author : Nilgün ÖZBEY

Çanakkale Onsekiz Mart Üni., Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, ÇANAKKALE

Tel : +90 286 263 59 50-4009

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

Geliş Tarihi / Received : 03.02.2012

Kabul Tarihi / Accepted : 24.08.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.47124

Özbeğ N, Akçalı A, Tatman-Otkun M. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi 2009-2011 yılı Tüberküloz Laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(3): 149-54.

78 örnekte (%7,44) BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) sistemi ile üreme saptanmıştır. LJ besiyerinde 64'ü MTBK, dördü tüberküloz dışı mikobakteri olmak üzere toplamda 68 örnekte üreme saptanmıştır. BACTEC MGIT 960 sisteminde üremenin saptanabildiği süre ortalama 11,8 gün ( $\pm 7,45$  SS) olarak tespit edilmiştir. EZN boyamasında 49 örnekte asidorezistan basil görülmüştür. Bu örneklerin 42 (%86)'sinde üreme saptanabilmiştir. 54 hastanın 25'inin izolatında ilaç duyarlılığı çalışılmıştır. Altı izolatta en az bir ilaca direnç saptanırken en yüksek oranda STR direnci görülmüştür. Beş örnekte STR direnci, üç örnekte INH direnci, bir örnekte de ETM direnci saptanmıştır. Üç örnekte aynı anda STR ve INH direnci saptanmıştır. RF dirençli MTBK saptanmamıştır.

**Sonuç:** Bu çalışma ile Çanakkale ilindeki tüberküloz laboratuvarına ait ilk bulgular sunulmuştur. BACTEC MGIT 960 otomatize sıvı bazlı tüberküloz kültür sistemi ile yapılan kültür ve ilaç duyarlılık testleri katı besiyerinden daha kolay ve hızlı olarak gerçekleştirilmektedir. Tüberküloz tanısında kültür duyarlılığının mikroskopiden fazla olduğu, ancak erken tanı konulabilmesi nedeni ile duyarlılığı düşük olmasına rağmen mikroskopik incelemenin rutin olarak kültür ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, kültür, antitüberküloz duyarlılık

by BACTEC MGIT system: 71 of them MTBC and seven of them were mycobacteria other than tuberculosis (MOTT). By LJ medium 64 MTBC and 4 MOTT strain, totally 68 mycobacterium were isolated. Mean time for detecting positive culture by MGIT 960 was 11.8 days ( $\pm 7.45$  SD). With EZN stain, 49 samples were detected as acido resistant bacilli and only 42 (86%) of them were positive by culture. Antituberculosis drug susceptibility was evaluated at isolates of 25 from 54 patients. A resistance to at least one of the drugs were detected in six isolates. It is found that five isolates were resistant to STR, three were resistant to INH and one was resistant to ETM. Three isolates were resistant to both STR and INH. Rifampicin resistance was not detected in MTBC.

**Conclusion:** With this study we presented first tuberculosis laboratory findings from our province, Çanakkale. Tuberculosis microbiological culture and antituberculosis susceptibility tests can be made using Bactec MGIT 960 system which is easier and faster than solid media culture. In tuberculosis diagnosis sensitivity of culture is higher than microscopical evaluation. It was concluded that although microscopic examination has low sensitivity, for early detection of tuberculosis both culture and staining should be used together for routine detection of tuberculosis.

**Key Words:** *Mycobacterium tuberculosis*, culture, antituberculosis susceptibility

## GİRİŞ

Tüberküloz hastalığı tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen gerek dünyada gerekse ülkemizde hala ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2011 yılında çıkardığı Küresel Tüberküloz Kontrolü Raporuna göre dünyada 2010 yılında 8,8 milyon yeni vaka ortaya çıkmıştır. 2010 yılında tüberkülozdan hayatını kaybeden toplam 1,45 milyon hastadan 350 bini HIV pozitif, 1,1 milyonu HIV negatifdir. Raporda verem savaşı dispanseri kayıtlarına göre Türkiye'nin 2010 yılında yeni vaka sayısı 15.183 olarak

bildirilmiştir. DSÖ tüberküloz insidans hesabında yeni ve nüks vaka sayılarının toplamını kullanmakta olup 2010 yılında Türkiye'de insidans 15.879'dur (1).

Tüberküloz etkeni *Mycobacterium tuberculosis* kompleksin klasik metodlar ile tanımlaması ve antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının belirlenmesi uzun zaman gerektirdiği için hızlı ve güvenilir yöntemler geliştirilmektedir. Ülkemizde kullanım alanı bulmuş olan kültür sistemleri;

**Radyometrik Esaslı Sistemler:** BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, ABD) sistemi,

**Floresan Esaslı Sistemler:** BACTEC *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (Becton Dickinson, ABD) sistemi ve BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson, ABD) sistemi, Kolorimetrik Esaslı Sistem: BacT/ALERT MB (MB/BacT) (BioMerieux, Fransa) sistemi,

**Katı Özellikte Kolorimetrik Esaslı Sistem:** MYCOLOR TK kültür (Salubris A.Ş., İstanbul) sistemidir (2-4).

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (ÇOMÜ) Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Çanakkale İlinde mikobakteri kültürü, tiplendirilmesi ve antimikrobiyal duyarlılık testi yapılabilen tek laboratuvardır. İlimiz tüberküloz verilerini içeren daha önceden yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda çeşitli klinik materyalden izole edilen mikobakterilerin tanımlanması, antitüberküloz duyarlılık oranlarının belirlenmesi ve mikobakteri laboratuvar tanısında kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

ÇOMÜ Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 1 Ocak 2009-30 Haziran 2011 tarihleri arasında tüberküloz ön tanısı ile gönderilen örnekler ve sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir. Gönderilen klinik örnekler Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanmış, Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri ve BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) sıvı bazlı kültür sistemi tüplerine ekimi yapılarak takip edilmiştir. Üreme olanlarda üreticinin önerilerine göre *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) tanımlaması ve istem yapıldığında streptomisin, izoniazid, rifampisin, etambutol duyarlılıkları çalışılmıştır. Mikobakteri yönünden incelemek amacı ile laboratuvara gönderilen balgam, bronş lavaj sıvısı (BAL), akciğer dışı abse aspirat sıvısı, trakeal aspirat, idrar gibi klinik örnekler dekontaminasyon ve konsantrasyondan sonra; beyin-omurilik sıvısı (BOS), eklem sıvısı, plevra sıvısı, perikard sıvısı, doku biyopsi örneği, asit gibi aseptik koşullarda toplandığı düşünülen vücut

sıvıları ise dekontamine edilmeden direkt olarak ekimleri yapılmış ve preparatları hazırlanmıştır. Örneklerin dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemleri Mycoprosafe (Salubris A.Ş., İstanbul) veya TDC (RTA Laboratuvarları, İstanbul) hazır ticari kitleri kullanılarak yapılmıştır. Ekim sonrası inkübe edilen LJ tüpleri günlük olarak üreme olup olmadığı kontrol edilerek üreyen kolonilerden EZN boyama yapılmıştır. Ekim yapılan MGIT tüpleri de 42 güne kadar inkübe edilerek, pozitif sinyal veren MGIT tüplerinden EZN boyama yapılmıştır. Yapılan boyamalarda ARB saptandığında, LJ'deki kolonilerden veya MGIT tüplerinden alınan örnek ile pNBA (para-nitro-benzoik asit) kullanılarak BACTEC MGIT 960 sistemi ile MTBK tanımlanması yapılmıştır. MTBK olarak değerlendirilen suşların antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık testleri BACTEC MGIT 960 sistemi ile streptomisin (STR; 1,0 µl/ml), isoniazid (INH; 0,1 µl/ml), rifampisin (RF; 1,0 µl/ml), etambutol (ETM; 5,0 µl/ml)'e karşı duyarlılıkları üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen örnekler toplam 667 hastadan gönderilmiştir. Hastaların 479'u erkek, 188'i kadın, en küçüğü altı yaşında, en büyüğü 92 yaşında olan hastaların yaş ortalaması 57,9 ± 16,08 SS olarak tespit edilmiştir. 667 hastadan toplam 1048 örnek çalışmaya alınmıştır. Örneklerin 631'i balgam, 240'ı BAL, 87'si plevra sıvısı, 20'si idrar, 16'sı perikard sıvısı, 14'ü akciğer dışı abse aspirat sıvısı, 11'i trakeal aspirat, 10'u BOS, 10'u doku biyopsi örneği, sekizi eklem sıvısı, biri asittir (Tablo 1). EZN boyamada 49 örnekte asidorezistan basil (ARB) görülmüştür. Bu örneklerin 42 (%86)'sinde üreme saptanabilmiştir. Kültür ile üreme saptanan 78 örneğin 36 (%46)'sında EZN ile ARB tespit edilememiştir (Tablo 2). 71 MTBK, yedisi tüberküloz dışı mikobakteri olmak üzere toplamda 78 örnekte (%7,44) BACTEC MGIT 960 sistemi ile üreme saptanmıştır. LJ besiyerinde 64'ü MTBK, dördü tüberküloz dışı mikobakteri olmak



üzere toplamda 68 örnekte üreme gözlenmiştir. Üremelerden yedisi (%9) akciğer dışı örneklerdendir. BACTEC MGIT 960 sisteminde üremenin saptanabildiği süre değerlendirildiğinde, minimum iki, maksimum 37 gün (ortalama  $11,8 \text{ gün} \pm 7,45 \text{ SS}$ ) olduğu belirlenmiştir. 54 hastaya ait materyalde üreme saptanabilmiş ve antitüberküloz ilaç duyarlılığı istemi yapılan 25 hastanın izolatında çalışılmıştır. Hastaların anti-tüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları incelendiğinde %24'ünde en az bir ilaca direnç saptanırken en yüksek oranda direnç STR'de görülmüştür. Beş örnekte STR direnci, üç örnekte INH direnci, bir örnekte de ETM direnci tespit edilmiştir. RF dirençli MTBK saptanmamıştır. İki ilaca dirençli üç MTBK tespit edilmiş, bunlar streptomisin ve izoniazide dirençli olarak bulunmuştur. Üç ilaca dirençli MTBK saptanmamıştır (Tablo 3).

### TARTIŞMA

Tüberküloz hastalığı; ilaçla tedavisi mümkün olan bir hastalık olmasına karşın, halen tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olarak varlığını korumaktadır. Tüberkülozdan korunmanın en etkin yolu hastalığın erken teşhisi ve uygun tedavi yöntemi uygulanmasıdır. Tüberkülozun ön tanısı klinik ve radyolojik verilere dayanmakla birlikte, kesin tanı laboratuvar yöntemleri ile olmaktadır. Laboratuvar tanısı, etkenin hasta örneklerinde gösterilmesi ve izolasyonu ile sağlanır (5).

Laboratuvarımızda tüberküloz tanısında; EZN boyama ile ARB aranması ve kültür testleri kullanılmaktadır. Kültür işlemleri LJ besiyeri ve BACTEC MGIT 960 sistemi ile çalışılmaktadır. Mikroskopik inceleme tüberküloz tanısında basit, hızlı, ucuz ve özgül bir yöntem olması nedeniyle hastalığın endemik olduğu ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroskopik inceleme öncesinde uygulanan boyama yöntemleri: EZN boyama yöntemi, Kinyoun boyama yöntemi ve auramin-rodamin floresan boyama yöntemidir (6). Çalışmamızdaki verilere bakıldığında, üreme saptanan

**Tablo 1.** Tbc şüphesiyle gelen örneklerin materyal türüne göre dağılımı

Materyal	Sayı	%
Balgam	631	60.2
BAL	240	22.9
Plevra sıvısı	87	8.4
İdrar	20	1.9
Perikard sıvısı	16	1.5
Akciğer dışı abse aspirat sıvısı	14	1.4
Trakeal aspirat	11	1.1
BOS	10	0.9
Doku biyopsi örneği	10	0.9
Eklem sıvısı	8	0.7
Asit	1	0.1
<b>Toplam</b>	<b>1.048</b>	<b>100</b>

**Tablo 2.** EZN boyama ile kültür sonuçlarının karşılaştırılması

	Kültür Pozitif	Kültür Negatif	Toplam
EZN Boyama ARB Pozitif	42	7	49
EZN Boyama ARB Negatif	36	963	999
<b>Toplam</b>	<b>78</b>	<b>970</b>	<b>1.048</b>

**Tablo 3.** Antibiyogram yapılan *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi suşlarının antitüberküloz ilaçlara direnç durumu (n=25)

Antitüberküloz ilaç	Dirençli suş	%
Streptomisin	2	8
Etambutol	1	4
Streptomisin+İzoniazid	3	12
<b>Toplam dirençli suş</b>	<b>6</b>	<b>24</b>

örneklerin %54'ünde EZN ile ARB saptanabilmiştir. Perincek ve ark. (7) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 2005-2007 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada EZN ile ARB saptama oranını %58,2, Kurtoğlu ve ark. (8) Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Eylül 2008-Mayıs 2010 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada bu oranı %46,8 olarak bulmuşlardır. 2009

Türkiye geneli tüberküloz verilerine göre EZN ile ARB saptama oranı %70 olarak bildirilmiştir (9). Mikroskopik incelemede ARB görülebilmesi için hasta örneğinde en az 5.000/ml kadar bakteri bulunması gerekmektedir. Mikroskopik incelemenin duyarlılık oranlarındaki farklılıklar, kullanılan boyama yöntemi, inceleme yapılan mikroskobun kalitesi, örneğin türü, yaymanın kalınlığı, boyama sırasında dekolorizasyon süresi ve incelemeyi yapan kişinin bu konudaki tecrübesinden kaynaklanmaktadır. Mikroskopik inceleme duyarlılığının artması çoklu örnek alımıyla mümkün olmaktadır. Kültür duyarlılığı direkt boyama duyarlılığından yüksek olduğu için tanıda mikroskopik inceleme ile kültürün birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Ancak kültürden sonuç almak uzun bir süre gerektirdiğinden mikroskopik inceleme duyarlılığı düşük olduğu halde en sık kullanılan yöntemdir (2,10).

Tüberküloz tanısında kültür yöntemleri altın standart olma özelliğini korumaktadır. Bu amaçla yumurta bazlı veya agar içerikli katı besiyerleri ve sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. Hızlı tanı sağlayabilmek amacıyla sıvı besiyerlerinin otomatize ve yarı otomatize cihazlarda kullanıldığı çeşitli sistemler geliştirilmiştir (6). Kültür yönteminde üreme pozitifliği için örneğin ml'sinde en az 10 canlı basilin bulunması yeterlidir. Kültür yönteminin diğer önemli avantajları, mikroskopi ile ayrımı yapılamayan MTBK- tüberküloz dışı mikobakteri ayrımını yapabilme, ilaç duyarlılığı belirleme ve genotiplendirme gibi ek testler yapılabilmesine imkan sağlamalarıdır. Kültür amacıyla günümüzde en yaygın olarak kullanılan katı besiyeri LJ besiyeri, sıvı kültür sistemleri BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, ABD), MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD), MB\Bact ALERT (BioMerieux, Fransa)' dir. Bu sistemlerde kültür 1-3 hafta kadar sürmektedir (2,10).

Çalışmamızı kapsayan yaklaşık iki buçuk yıllık süre içerisinde tüberküloz ön tanısıyla gönderilen 1.048 örnekten 78 (%7,44)'inde BACTEC MGIT 960 sistemi ile 68 (%6,49)'inde LJ besiyeri ile üreme saptanmıştır. Bu farklılık sıvı bazlı sistemlerin az sayıda basil

içeren örneklerde izolasyon şansını artırabildiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) sistemi ile pozitiflik saptanma süresi literatürdeki diğer çalışmalara benzer şekilde ortalama 11,8 ( $\pm 7,45$  SS) gün olarak belirlenmiştir (2,10).

BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerin dibinde silikona gömülü oksijen ile bileşik halde bulunan fenatrolin rutenyum klorid pentahidrat adında floresans veren bir indikatör bulunmaktadır (11, 12). Tüp içinde bulunan oksijenin varlığı fluoresansı engeller. Mikobakteriler üredikçe tüpteki oksijenin kullanılmasına bağlı olarak indikatör serbest kalmakta ve floresan açığa çıkmaktadır. Saptanan floresan cihaz tarafından otomatik olarak ölçülmekte ve sonuçlar verilmektedir. BACTEC MGIT 960 sisteminin kısa sürede sonuç vermesinin yanında en önemli avantajları, radyoaktif madde kullanılmaması ve iğne veya benzeri riskli gereçlere ihtiyaç duyulmamasıdır (13). MYCOLOR TK (Salubris A.Ş., İstanbul) kültür sisteminin 2011 yılı içinde sıvı bazlı besiyeri kullanan modeli de piyasaya sürülmüştür. Bu sistemin BACTEC MGIT 960'a alternatif olarak değerlendirilmesi için hızla karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Mikobakterilerin antitüberküloz ilaçlara karşı artan direnci, tedavinin etkili bir şekilde yapılabilmesini engellemekte ve dolayısıyla duyarlılık testlerinin yapılmasını gerekli hale getirmektedir. Dünya genelinde yapılmış pek çok çalışmada en sık direncin INH'ye karşı olduğu bildirilmektedir. Ancak bazı ülkelerde RF, STR ve ETM de ilk sırayı alabilmektedir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda INH (14) ve STR (15) ilk sırada olarak bildirilmiştir. Bu durumun INH ve STR'nin tedavi ve profilakside en fazla kullanılan ilaçlar olmalarına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Türkiye Verem Savaşı 2011 Raporu'nda, 2009 yılı tüm hastaları değerlendirmesinde INH direnci %13,1, RF direnci %6,5, ETM direnci %4,7, STR direnci %8,5 bildirilmiştir (9). Bizim çalışmamızda; üreme olan örneklerde antibiyogram istemi yapılmadığı için sadece 25 üremede anti tüberküloz duyarlılık testi çalışılmıştır. Test edilen ilaçlardan en yüksek direnç beş şuşta saptanan STR direnci olarak bulunmuştur. İlaç

direnci farklılıklarının nedeni hastaların demografik özellikleri, ilaç kullanım özellikleri ya da ilaç duyarlılık testlerinde kullanılan yöntemler ile ilgili olabilir.

Sonuç olarak bu çalışma ile ilimizdeki ilk tüberküloz kültür ve antitüberküloz ilaç duyarlılık verileri elde edilmiştir. Tüberküloz tanısında boyalı preparatların mikroskopik incelemesi kolay ve hızlı bir yöntem olmasına rağmen düşük duyarlılığa sahiptir. Kültür ise boyalı preparatın mikroskopik

incelemesine göre oldukça duyarlıdır. BACTEC MGIT 960 otomatize sıvı bazlı tüberküloz kültür sistemi ile kültür çalışmaları ve ilaç duyarlılıkları kolay ve hızlı bir şekilde çalışılabilmektedir. Tüberküloz tanısında kültür duyarlılığının mikroskopiden fazla olduğu, ancak kültür işlemleri sonuçlanana kadar hastaların erken tanı ve takibinde duyarlılığı düşük olmasına rağmen mikroskopik incelemenin rutin olarak kültür ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Testlerin çalışılmasında ve takibindeki emeklerinden dolayı Bio. Ümit KARADELİ ve tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. WHO report, 2011. Global tuberculosis control; (WHO/HTM/TB/2011.16).
2. Parrish NM, Carroll KC. Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. J Clin Microbiol, 2011; 49 (3): 772-6.
3. Özakin C, Gedikoğlu S. Tüberküloz tanısında tüberküloz laboratuvarının rolü: Tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde rutin laboratuvar yöntemlerinin değeri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. 12-13 Haziran, Samsun. 2003.
4. Karadağ A, Tokaç M, Güvenli A, Sünbül M, Günaydın M, Saniç A. Klinik örneklerden izole edilen tüberküloz basili kompleksinin majör antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. ANKEM Dergisi, 2004; 18 (4): 189-92.
5. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye'de tüberküloz. ANKEM Dergisi, 2007; 21 (2): 76-80.
6. Alp A. Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. Hacettepe Tıp Dergisi, 2011; 42: 28-33.
7. Perincek G, Tabakoğlu E, Otkun M, Özdemir L, Özdemir B. *Mycobacterium tuberculosis* üremesi saptanan akciğer tüberkülozlu hastaların antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. Türk Toraks Dergisi, 2011; 12: 111-3.
8. Kurtoğlu MG, Yüksekaya Ş, Özdemir M, Baysal B. Bir eğitim ve araştırma hastanesinin mikobakteriyoloji laboratuvarında direkt preparat ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması. Selçuk Üniversitesi Tıp Dergisi, 2011; 27 (2): 69-72.
9. Türkiye'de Verem Savaşı 2011 Raporu. T.C. Sağlık Bakanlığı, Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı. Ankara. 2011.
10. Aslan G. Tüberküloz tanısında yeni yaklaşımlar. I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. 12-16 Kasım, Antalya. 2011; 84-91.
11. Chan DS, Choy MY, Wang S, Sng LH. An evaluation of the recovery of mycobacteria from urine specimens using the automated *Mycobacteria* Growth Indicator Tube system (BACTEC MGIT 960). J Med Microbiol, 2008; 57: 1220-2.
12. Yüce A. Tüberküloz kültürü ve basil tür tayini. In: Bilgiç H, Karadağ M, eds. Tüberküloz. İstanbul. Aves Yayıncılık, 2010; 92-109.
13. Watterson SA, Drobniewski FA. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. J Clin Pathol, 2000; 53: 727-32.
14. Ekşi F, Zer Y, Karslığıl T, Bayram A, Balcı İ. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi suşlarının majör antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 2009; 39 (3-4): 89-93.
15. Karabay O, Otkun M, Akata F, Karlıkaya C, Tugrul M, Dündar V. Antituberculosis drug resistance and associated risk factors in the european section of Turkey. Ind J Chest Dis All Sci, 2004; 46 : 171-7.

# Kütahya İl Sağlık Müdürlüğü bünyesinde çalışanlarda nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı ve metisilin direncinin araştırılması

## Investigation of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and Meticilin Resistance in the Kütahya Health Directorate workers

Aysel GÜLBANDILAR<sup>1</sup>, Emine Didem BEYHAN<sup>1</sup>, Halil İbrahim KISA<sup>1</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, Kütahya İl Sağlık Müdürlüğü bünyesinde çalışanların nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı ve metisiline direncin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** İzole edilen izolatların identifikasyonu için geleneksel biyokimyasal testler ve antibiyotik duyarlılık testleri kullanılmıştır.

**Bulgular:** Çalışma kapsamına alınan toplam 597 kişiden 51 (%8,54)'inde taşıyıcılık belirlenmiştir. Taşıyıcıların oranları şöyle dağılım göstermektedir: (%7,55) hemşire, ebe, sağlık memuru; (%9,42) diğer sağlık çalışanları ve (%11,2) doktorlar. Test edilen izolatlarda metisilin direnci saptanamamıştır. Vankomisine karşı direnç belirlenememiştir. İzolatların sırasıyla %100'ü basitrasin'e, %90,19'u seftazidime, %88,23 ile penisilin G'ye ve %82,35'i de oflaksaksin ile %82,35'i nalidiksik asite karşı dirençli oldukları belirlenmiştir.

**Sonuç:** Yapılan bu çalışma, sağlık çalışanlarındaki *S. aureus* taşıyıcılık oranlarının belirlenmesinde, nozokomiyal stafilocok enfeksiyonlarına karşı alınması gereken önlemler ve uygulanabilecek tedavi yöntemleri hakkında değerli bilgiler vererek,

### ABSTRACT

**Objective:** In this study, it is aimed to investigate the nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and meticilin resistance amongst the workers of the Kütahya Province Directorate.

**Method:** For the identification of isolated strains were used conventional biochemical tests and for phenotyping antibiotic susceptibility tests.

**Results:** A total of 597 people included in the study, of which 51 (8.54%) were determined as carriers. The distribution of carrier were found as (7.55%) are nurses, midwives and health officers; (9.42%) are health staff and the remaining (11.2%) are identified as doctors, respectively. Methicillin resistance has not been determined in the isolates tested. A resistance against the vancomycin has not been detected. As a result of the tests, it is observed that 100% of isolates are resistant to bacitracin, 90.19% to ceftazidime, 88.23% to penicillin G and 82.35% to ofloxacin and 82.35% nalidixic acid.

**Conclusion:** With this study, in determining the rate of carriage of *S. aureus*, amongst the employees in health sector the measures have to be taken against the noso-comial staphylococcus infections and by giving

<sup>1</sup> Kütahya İl Sağlık Müdürlüğü, Halk Sağlığı Laboratuvarı, KÜTAHYA

İletişim / Corresponding Author : Aysel GÜLBANDILAR

Kütahya İl Sağlık Müdürlüğü, Halk Sağlığı Laboratuvarı, KÜTAHYA

Tel : +90 274 223 63 45

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

Geliş Tarihi / Received : 13.01.2012

Kabul Tarihi / Accepted : 25.09.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.26122

Gülbandılar A, Beyhan ED, Kisa Hİ. Kütahya İl Sağlık Müdürlüğü bünyesinde çalışanlarda nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı ve metisilin direncinin araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(3): 155-62.

bu mikroorganizmaya karşı ortak korunma ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** *Staphylococcus aureus*, nazal taşıyıcılık, antibiyotik direnci, fenotiplendirme, metisilin.

valuable information about the treatment methods a contribution will be made to the development of common protection and treatment methods against this microorganism.

**Key Words:** *Staphylococcus aureus*, nasal carriage, antibiotic resistance, phenotyping, methicillin.

## GİRİŞ

*Staphylococcus aureus* insanlarda birçok enfeksiyona neden olan bir bakteridir. Çevre şartlarına dayanıklı olduklarından doğada çok yaygındırlar. İnsanlarda enfeksiyon yapan patojen stafilocokların kaynağı yine insanlardır (1). Doğal olarak en fazla burun ve boğaz boşluğunda, insan ve hayvan dışıklarında, ciltte abseli yaralarda ve sivilcelerde yoğun olarak; ayrıca gıdalarda ve gıda işletmelerinde, elle gıda hazırlayanlarda, hastane personeli ve hastane ortamlarında da yaygın olarak bulunurlar. Burunda nazal yerleşimli stafilocoklar, taşıyıcılarla çevreye yayılarak tehlike oluşturabilirler (1- 4).

Günümüzde *S. aureus*'un bir çok antibiyotiğe direnç gösteren izolatlarının ortaya çıkması çoğu hastane için önemli bir sorun haline gelmiştir. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları ile oluşan enfeksiyonlar ciddi ve tedavisi güç olabilmektedir. Bu nedenle, hem coğrafik bölgeler arasında hem de aynı bölgede değişkenlik gösteren MRSA izolatlarının araştırılması önem arz etmektedir. MRSA taşıyıcıları, bulunduğu hastane ortamı ve yoğun bakım birimlerinde bu bakterilerin yayılımını kolaylaştırmaktadırlar. Bu nedenle özellikle sağlık çalışanlarında MRSA taşıyıcılığının takibinin yapılması hastane enfeksiyonlarının kontrolü programlarının önemli bir parçasıdır (5-12).

Başlangıçta penisiline duyarlı olan *S. aureus*'un 1950'li yıllarda yaygın antibiyotik kullanımıyla birlikte beta laktamaz üreten kökenlerinde artış saptanmıştır. Beta laktamaza dirençli

penisilinlerin kullanıma girmesi direnç problemini bir süre için çözmüşse de, 1960'lı yıllardan itibaren MRSA, özellikle hastane patojeni olarak ortaya çıkmıştır (13, 14). Metisilin direncinin klinikteki önemi metisilin dirençli izolatların aynı zamanda eritromisin, sefalosporinler, karbapenemler, tetrasiklin, klindamisin, aminoglikozid, kinolonlar gibi bir çok antibiyotiğe de direnç göstermesidir (13, 15).

Özellikle nazal *S. aureus* taşıyıcılığının riskli hasta grubunda enfeksiyon gelişimine ve epidemilere yol açtığı bilinmektedir. Hastane personeli el teması ile bulunduğu ortamda bu mikroorganizmaların taşınması ve yayılmasında büyük rol oynar. Cerrahi birimlerde yatan hastalar, hemodiyaliz hastaları ve toplum kaynaklı pnomoni hastaları taşıyıcılık esnasında gelişebilecek *S. aureus* enfeksiyonları açısından riskli grubu oluştururlar (5-10).

Bu çalışmada Kütahya İl Sağlık Müdürlüğü'nün bünyesinde çalışan farklı meslek gruplarında görev yapan kişilerin nazal taşıyıcılığı araştırılmıştır. İzole edilen *Staphylococcus aureus* bakterileri tanımlama testlerinden sonra fenotiplendirme için antibiyotik duyarlılık testlerine alınarak, metisilin direnci araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 1-27 Mayıs 2009 tarihleri arasında Kütahya İl Sağlık Müdürlüğü bünyesinde çalışanlar başta olmak üzere merkeze bağlı sağlık ocakları, Halk Sağlığı Laboratuvarı ile Gediz, Simav,

Tavşanlı, Pazarlar, Şaphane ilçelerindeki Sağlık Grup Başkanlıkları'na ve Sağlık Ocakları'na bağlı çalışanlarda gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla toplam 597 sağlık çalışanından burun kültürü örneği alınarak, nazal taşıyıcılığın belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kişilerin meslek gruplarına göre sırasıyla dağılımı; ebe 148, hemşire 120, sağlık memuru 76, doktor 62, hizmetli 49, memur 34, çevre sağlığı teknisyeni 23, laborant 20, veri hazırlama memuru 16, tıbbi sekreter 12, şöför sekiz, acil tıp teknikeri yedi, biyolog altı, kimya mühendisi dört, teknisyen yardımcısı dört, ayniyat saymanı dört, kimyager iki, ve sıtma işçisi ikidir.

Çalışmaya dahil edilen sağlık çalışanlarının kendileri ve aile bireylerinde özellikle son altı ay içerisinde hastanede yatma öyküsü ve stafılakok enfeksiyonlu bir kişiyle temas öyküsü olup olmadığı sorgulanmıştır. Nazal *S.aureus* taşıyıcılığı ve metisiline direncin araştırılması amacıyla yapılan çalışmalar İl Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Bu amaçla çalışanların bir kısmından direkt laboratuvara gelerek, diğer çalışanların ise iş yerlerine bizzat gidilerek steril pamuklu eküvyonlu çubuklarla burun kültürü örnekleri alınmış ve alınan örnekler laboratuvara getirilerek işlemlere devam edilmiştir. *S. aureus* olarak idendifiye edilen kökenlerin metisilin ve diğer antibiyotiklere duyarlılığı Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine göre, KIRBY-BAUER disk diffüzyon yöntemi ile araştırılmıştır (16).

Çalışmamızda referans olarak *S. aureus* NRRL B 767 izolatu kullanılmıştır (17).

Sağlık çalışanlarının burun kültürü örnekleri daha önce yapılan çalışmalarda önerildiği gibi alınmıştır (18 - 20). Kişilerin burun mukozası örnekleri steril pamuklu eküvyonlarla alınarak %5'lik koyun kanlı agar besiyerine ekim yapılmış ve petriyeler laboratuvara getirilerek ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası beta hemoliz yapan kolonilerden Baird-Parker agara ekim yapılmış, 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek, gri siyah renkli ve etrafında 2-5

mm berrak bir zon oluşmuş (Lesitinaz pozitif) parlak renkteki koloniler seçilerek identifikasyon testlerine geçilmiştir (2, 19-21). İzolatlara identifikasyon için Gram boyama, katalaz, koagülaz, pigment, lesitinaz, hemoliz ve üreaz testi uygulanmıştır. Koloni yapılarının seçiminde, Gram boyama sonucunda mor renkli, salkım görünümünde koklardan oluşan koloniler pozitif kabul edilmiştir (4, 22, 23).

İzolatların antibiyotiklere duyarlılıkları Mueller hinton agar (MHA) (Merck) besiyerinde disk diffüzyon yöntemiyle incelenmiştir (7, 8, 10, 12). Çalışmamızda; fusidik asid (10 mg, Oxoid), sefaklor (30 mg, Oxoid), seftazidim (30 mcg, Bioanalyse), eritromisin (15 mcg, Bioanalyse), gentamisin (10 mcg, Bioanalyse), nalidiksik asit (30 mg, Oxoid), netilmisin (30 mcg, Bioanalyse), oflaksaksin (5 mg, Oxoid), penisilin G (10 U, Oxoid), trimethoprim, (25 mg, Oxoid) vankomisin (30 mg, Oxoid), basitrasin (0,04 U, Bioanalyse) ve klindamisin (2 mg, Oxoid) antibiyotikleri kullanılmıştır.

Bu amaçla önce tüm izolatlar öze ile %5'lik koyun kanlı agar besiyerine ekim yapıp 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası taze kültürden steril eküvyonla 1,8 ml izotonik %0,9 NaCl solüsyonu doldurulmuş, tüp içerisine aktararak dilue edilmiştir. Mc Farland No: 0,5 (108 cfu/ml) bulanıklığına ayarlanmıştır. MHA besiyeri yüzeyine eküvyon ile inokülasyon yapılmıştır. Yüzey kuruduktan sonra değişik antibiyotik diskleri yerleştirilerek bir gece inkübasyona bırakıldı bir sonraki gün diskler etrafında oluşan zon çapları ölçülmüştür. Elde edilen zon çapları CLSI tarafından önerilen zon tablosu ile karşılaştırılarak duyarlı, orta derece duyarlı ve dirençli olarak değerlendirilmiştir (16).

## BULGULAR

Çalışmada toplam 597 kişiden 51 (%8,54)'inde taşıyıcılık belirlenmiştir. Taşıyıcıların oranları şu şekilde dağılım göstermektedir: %7,55 hemşire, ebe, sağlık memuru; %9,42 diğer sağlık çalışanları ve %11,2 doktorlar.



İzolatların Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile CLSI standartlarına göre toplam 13 antibiyotığe karşı duyarlılık testleri yapılmıştır. Test edilen izolatlarda metisilin direnci saptanmamıştır. Vankomisin'e karşı direnç belirlenmemiştir. İzolatların sırasıyla %100'nün basitrasine %90,19'unun seftazidime, %88,23'ünün penisilin G'ye ve %82,35'inin oflaksaksin ile %82,35'i de nalidiksik asite karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur.

**Tablo 1.** *S.aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotik kodu	D*(%)	ODD (%)	R (%)
Fusidic Asit	45 (88,23)	4 (7,84)	2 (3,92)
Cefaklor	40 (78,43)	6 (11,76)	5 (9,80)
Eritromisin	35 (68,62)	12 (23,53)	4 (7,84)
Gentamisin	32 (62,75)	16 (31,37)	3 (5,88)
Nalidiksik Asit	2 (3,92)	7 (13,72)	42 (82,35)
Netilmisin	37 (72,54)	4 (7,84)	10 (19,60)
Oflaksaksin	6 (11,76)	3 (5,88)	42 (82,35)
Penisilin G	5 (9,86)	1 (1,96)	45 (88,23)
Trimethoprim Sulfametoksazol	8 (80,39)	5 (11,76)	38 (7,84)
Vankomisin	51 (100)	- (0)	- (0)
Basitrasin	- (0)	- (0)	51 (100)
Seftazidim	- (0)	5 (9,80)	46 (90,19)
Klindamisin	35 (68,62)	8 (15,68)	8 (15,68)

D : Hassas, ODD : Orta Derecede Duyarlı, R : Dirençli, % : yüzde oran

Yapılan biyokimyasal testler sonucunda NRRL B 767 referans izolatı dahil incelenen toplam izolatın tamamında gram boyama, hemoliz, katalaz, koagülaz, lesitinaz aktivitesi, pozitif olarak bulunmuştur. İzolatların 22'sinin altın sarısı, 16'sının krem rengi, 13'ünün beyaz pigment oluşturduğu belirlenmiştir.

## TARTIŞMA

*S. aureus*, yumuşak doku enfeksiyonları, toksik şok sendromu, solunum sistemi enfeksiyonları, endokardit, besin zehirlenmesi, septik artrit, osteomyelit, menenjit, sepsis ve bakteriyemi gibi bir çok enfeksiyonun birincil etkenidir (13, 24). Ayrıca hastane enfeksiyonlarında da ilk sıralarda yer alan fırsatçı bir patojendir. Tüm yaş gruplarında enfeksiyonlara neden olabilir ve her ortamda bulunabilir. Enfekte kişiler ve sağlıklı taşıyıcılar bu mikroorganizmayı yayabildikleri için belli servisler, ameliyathaneler ve gıda işletmeleri için özel bir tehlike arz ederler. *S. aureus*, son yıllarda cerrahi yara enfeksiyonlarının en sık görülen etkeni olarak tanımlanmıştır (5, 8).

Hayatı tehdit eden nozokomiyal enfeksiyonlardan en sık soyutlanan etkenlerin başında gelen stafilokoklar, antibiyotiklere karşı gittikçe artan dirençleri sebebiyle gerek hastanelerde ve gerekse toplum kökenli enfeksiyonlarda büyük bir sağlık sorunu haline gelmiştir (5, 8, 13, 24). Özellikle kişisel temas ile yayılmakta, daha seyrek olarak da hava yolu ve kontamine eşyalar ile temas sonucu bulaşmaktadır. Hastane ortamında bakterinin enfekte kişiden sağlık personelinin elleri ve giysileri ile aktarılması önemli bir bulaşma yoludur (13, 24).

Yetişkinlerde burun, *S. aureus*'un en yoğun bulunduğu bölgelerden biridir. Nazal taşıyıcılık oranı genel popülasyonda %10-40 arasında değişmektedir. Bu gibi kişiler kendileri ve başkaları için de enfeksiyon riski açısından tehlike kaynağıdır (1).

Gerek enfeksiyonlara yol açmadaki patojenitesi ve gerekse gıdalarda meydana getirdiği zehirlenmeler sebebiyle üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir.

Çalışmamızda toplam 51 *S. aureus* izolatı biyokimyasal testlere tabii tutularak tanımlanmıştır. Taşıyıcıların oranları; %7,55 hemşire, ebe, sağlık memuru, %11,2 doktor ve %9,42 diğer sağlık çalışanları olarak belirlenmiştir. Bu sonuç doktorlar arasında *S. aureus* taşıyıcılığının en yüksek olduğunu göstermektedir.



Saçılık (25), değişik hastanelerden topladığı izolatların tümünün vankomisine duyarlı olduğunu, MSSA izolatlarının %91,70'inin penisilin G'ye dirençli olduklarını bildirmiştir.

Bozkurt ve ark. (26) Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi personelinde nazal *S. aureus* taşıyıcılığı ile metisiline direnç oranlarını araştırdıkları çalışmada *S. aureus* taşıyıcılık oranını doktorlarda %19,7, hemşirelerde %15,7, hastabakıcılarda %25,3, yardımcı sağlık teknisyenlerinde %26,9 ve mutfak çalışanlarında %22,7 olarak belirlemişlerdir. MRSA oranı ise %5,9 olarak bulunmuştur. MSSA'ların ise %100'ü teikoplanine, vankomisine, mupirosine, %95'i klindamisine, %92'si siprofiloksasine, %87'si gentamisine, %86'sı eritromisine duyarlı bulunmuştur.

Marım ve ark. (27), Denizli'de nazal *S. aureus* taşıyıcılığı ile ilgili yaptıkları araştırmada personelde taşıyıcılık oranını %6,7 olarak bulmuşlar ve izole ettikleri suşlarda metisilin direncine rastlamamışlardır. Taşıyıcılık oranı açısından klinik olarak ameliyathane personelinde meslek grubu olarak sağlık memurlarında ve cinsiyet olarak da erkekte daha yüksek olarak gözlenmiştir.

Hızel ve ark. (28), Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde görevli 219 sağlık personelinin 34 (%15)'ünde nazal *S. aureus* taşıyıcılığı belirlerken bunların 29'unun MSSA, 5'inin MRSA olduğunu ve 100 hasta yakınının ise %10'unun 5 MSSA, 5 MRSA nazal *S. aureus* taşıyıcısı olduğunu belirlemişlerdir.

Gülbandılar (29), gıda elleyicilerinden (aşçı, fırıncı, pastacı vb.) ve halkla direkt temas eden esnaf gruplarından (berber, kuaför gibi) burun kültürleri olarak *S. aureus* taşıyıcılığını araştırmış ve toplam 217 kişide burun taşıyıcılığı belirlemiştir. Tüm izolatlarda vankomisin, teikoplanin, ve mupirosine karşı direnç bulunamazken, izolatların penisilin G'ye karşı ise %91,74 oranında dirençli oldukları saptanmıştır.

Kardaş ve ark. (30), Kars Yöresi hastanelerinde yaptıkları çalışmada izolatlarda vankomisin ve mupirosine karşı direnç belirleyemediklerini, tüm

izolatlarının penisilin G'ye karşı %100 dirençli olduklarını beyan etmişlerdir. Ayrıca eritromisin, klindamisin ve tetrasikline karşı hem orta derecede duyarlılık hem de direnç belirlerken, siprofloksasin, fusidik asit, rifampisin, gentamisin, trimethoprim-sulfametaksazol ve oflaksaksin antibiyotiklerine karşı direnç durumu belirlememişlerdir.

Yaptığımız bu çalışmada izolatların sırasıyla %90,19'u seftazidime, %88,23' ile penisilin G'ye ve %82,35'i de oflaksaksin ile %82,35'i nalidiksik asite karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. Adı geçen çalışmalarda belirtilen vankomisine karşı bulunan duyarlılık oranları ile penisilin G'ye karşı bulunan dirençlilik oranları bizim çalışma sonuçlarımızla benzer bulunmuştur.

Görüldüğü gibi farklı merkezlerde ve farklı gruplarda yapılan çalışmalarda birbirinden farklı oranlar bildirilmiştir. Yurtdışında yapılan benzer çalışmalarda ise yine gruplar arasında farklılıklar belirtilmiştir.

Zanelli ve ark. (31), İtalya da yaptıkları çalışmada nazal taşıyıcılık oranını %30,5 olarak belirlerken; Kluytmans ve ark. (32), tarafından yapılan çalışmada bu oranı normal popülasyonda %19-%55,1, hemodiyaliz hastalarında ise %30,1-%84,4 olarak belirlemişlerdir.

Prassana ve Thomas (33); farklı yıllarda yaptıkları çalışmalarda antibiyotik kullanımının artmasıyla birlikte antibiyotiklere karşı duyarlılığın azaldığını bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada araştırmacılar vankomisin ile yaptıkları çalışmalarda 1995 yılında %1,4 oranında orta derecede duyarlılık belirlerlerken, 1996'da bu oranın %1,1'e düştüğünü bildirmişlerdir. Çalışmalarında elde ettikleri bulgularla gelecekte *S. aureus* izolatları arasında vankomisine direncin gelişebileceği yönünde tahminde bulunmuşlar ve bu direncin genetik ve mikrobiyolojik çalışmalarla doğrulanacağını belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, Kütahya İli Sağlık Müdürlüğü'ne bağlı olarak çalışan personelin burunlarında *S. aureus* taşıyıcılık oranlarının yüksek oranda bulunmayışı sevindiricidir. Elde edilen sonuçlara

göre bazı antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç belirlenmiştir. Penisilin-G'ye karşı yüksek direnç olması bu antibiyotiğin hayvan ve insanlarda tedavi amacıyla çok yaygın kullanıldığının göstergesidir. Sağlık çalışanlarının daha titiz davranmaları gerektiği ve ayrıca gelişigüzel antibiyotik kullanımını önleyici politikaların geliştirilmesi gerekliliği aşıkardır.

Nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinin zamanla antibiyotiklere direnç gösterebilmesi, gittikçe

artan tedavi maliyetleri ve ölüm oranları gibi nedenlerle önem kazandığı günümüzde özellikle sağlık çalışanları bu fırsatçı patojen bakterilerin bulaşmasında rol oynayabileceğinden *S. aureus*'un yaptığı enfeksiyonların önlenmesi için personelde taşıyıcılık durumu farklı aralıklarla izlenmeli, gerekli eğitim sağlanmalıdır. Bütün bu çalışmaların yapılması enfeksiyonların ve epidemilerin önlenmesinde önemli bir adım olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Hacıbektaşoğlu A, Eyigün CP, Özsoy, MF. Gıda Elleyicilerinde Burun ve Boğaz Portörlüğü. Mikrobiyol Bült, 1993; 27: 62-70.
2. Tunail N. Mikrobiyal enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar. In: Tunail N, eds. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Ün. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü Yayını. Ankara. Sim Matbaacılık, 2000: 82-8.
3. Vural H, Öztan A. Effects of starter culteres on growth of *Staphylococcus aureus* in fermented meat products. Gıda, 1993; 18(4): 259-63.
4. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir, 2000.
5. Pesavento G, Ducci B, Comodo N, Lo Nostro A. Antimicrobial resistance orofile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Food Control, 2007; 18(3): 196-200.
6. Dupeyron C, Campillo B, Bordes M, Faubert E, Richardet JP, Mangeney N. A clinical trial of mupirocin in the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a digestive disease unit. J Hospital Infect 2002; 52: 281-7.
7. Millar MR, Walsh TR, Linton CJ, Zhang S, Leeming JP, Bennett PM. Carriage of antibiotic-resistant bacteria by healthy children. J Antimicrob Chemother 2001; 47: 605-10.
8. Öncül O, Erdemoğlu A, Özsoy MF, Altunay H, Ertem Z, Çavuşoğlu Ş. Hastane personelinde nasal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı. Klinik Derg, 2002; 15(3): 74-7.
9. Aiello AE, Cimiotti J, Della-Latta P, Larson EL. A comparison of the bacteria found on the hands of 'homemakers' and neonatal intensive care unit. J Hospital Infect, 2003; 54: 310-5.
10. Gündüz T, Akgül S, Yılmaz S. Hemodiyaliz hastalarında ve çalışanlarında nasal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı. Med J Kocatepe, 2005; 6: 13-5.
11. Mir N, Sanchez M, Baquero F, Lopez B, Calderon C, Canton R. Soft salt-mannitol agar-cloxacillin test: A highly specific bedside screening test for detection of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 1998; 36(4): 986-9.
12. Çelik İ, Cihangiroğlu M, Sevim E, Çabalak M, Akbulut A. Sağlık çalışanlarının burunlarından izole edilen koagülaz pozitif ve negative Stafilkoklar metisilin direnci ve slime pozitifliği. Fırat Tıp Derg, 2005; 10(3): 1-4.

13. Livermore DM. Antibiotic resistance in Staphylococci. Inter J Antimicrob Agents, 2000; 16; 3-10.
14. Gould IM, The clinical significance of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hospital Infect, 2005; 61: 277-82.
15. Avkan V. *Staphylococcus aureus* Prevelansı ve Methicillin Direnci. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı, Şişli Etfal Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji. İstanbul, 1997.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twentieth Informational Supplement, M100-S20, CLSI, Wayne, PA (2010).
17. Demirci F, Güven K, Demirci B, Dadandı M.Y, Baser K.H.C. Antibacterial activity of two phlomis essential oils against food pathogens. Food Control, 2008; 19:1159-64.
18. Tondo EC, Guimaraes MCM, Henriques JAP, Ayub MAZ. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. Can J Microbiol, 2000; 46: 1108-13.
19. Lee JH. Methicillin (Oxacilin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animal and their potential transmission to humans. Appl Environ Microbiol, 2003; 69(11): 6489-94.
20. Güzel İA. Tavuk Etlerinin, Kesim İşleminin Değişik Aşamalarında *Staphylococcus aureus* ile Kontaminasyon Derecesinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 1998.
21. Baird RM, Lee WH. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. Inter J Food Microbiol, 1995; 26: 15-24.
22. Novak FR, Almeida JAG, Warnken MB, Ferreira-Carvalho BT, Hagler AN. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human milk. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000; 95(1): 29-33.
23. Rodgers JD, McCullagh JJ, McNamee PT, Smyth JA, Ball HJ. Comparison of *Staphylococcus aureus* recovered from personnel in a poultry hatchery and in broiler parent farms with those isolated from skeletal disease in broiler. Vet Microbiol, 1999; 69: 189-98.
24. Yakupoğulları Y, Gündüz A, Özcan M, Doğukan M, Seyrek A, Yılmaz M. *Staphylococcus aureus* suşlarının siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin duyarlılıkları. Fırat Tıp Derg, 2006; 11(1): 45-7.
25. Saçılık SC. Türkiye'deki Klinik Örneklerden Elde Edilen Patojenik *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 1998.
26. Bozkurt H, Bayram Y, Güdücüoğlu H, Berktaş M, Y.Y.Ü. Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi personelinde nazal *S. aureus* taşıyıcılığı ile metisiline direnç oranlarının araştırılması. Van Tıp Derg, 2007; 14(2): 52-6.
27. Marım F, Taban Ö, Ergin Ç. Pamukkale Üniversitesi Sağlık, Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde görevli personelde nazal *S. aureus* taşıyıcılığının araştırılması. Pamukkale Tıp Derg, 2009; 2(1): 20-3.
28. Hızal S, Şanlı C, Kaygusuz S, Tunç A. Kırıkkale Üniversitesi hastane personeli ile hasta ziyaretçilerinde nazal *S. aureus* taşıyıcılığı. Van Tıp Derg, 2005; 12(2): 140-4.
29. Gülbandır A. Kütahya yöresinde gıda elleyicilerinde burun mukozasındaki *S. aureus* bakterisinin tanımlanması. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Derg, 2009; 18: 1-6.
30. Kardaş F, Şahin M. Kars ili hastane çalışanlarında nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı ve metisilin direncinin araştırılması. FÜ Sağ Bil Tıp Derg, 2009; 23 (2): 71-5.
31. Zanelli G, Sansoni A, Zanchi A, Cresti S, Pollini S, Rossolini GM, Cellesi C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community a survey from central Italy. Epidemiol Infect, 2002; 129: 417-20

32. Kluytmans J, Belkum AV, Verburg H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms and associated risk. Clin Microbial Rev, 1997; 10: 505-20.
33. Prasanna M, Thomas C. A profile of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection in the burn center of the Sultanate of Oman. Burns, 1998; 24: 631-6.

## Pediyatrik bir hastada *Salmonella paratyphi A*'nın neden olduğu bir akut hemorajik sistit olgusu\*

### A case of acute hemorrhagic cystitis caused by *Salmonella paratyphi A* in a pediatric patient

Erkan YULA<sup>1</sup>, Özcan DEVECİ<sup>2</sup>, Türkan TOKA-ÖZER<sup>3</sup>, Alicem TEKİN<sup>4</sup>, Melek İNCİ<sup>1</sup>, Ali KARAKUŞ<sup>5</sup>

#### ÖZET

*Salmonella* türlerinin neden olduğu üriner sistem enfeksiyonu (ÜSE) oldukça nadir görülen bir klinik durumdur. Yedi yaşında erkek bir hasta; alt karın ağrısı, idrar yaparken yanma ve ağrı, bulantı ve ateş yükselmesi şikayeti ile hastanemize başvurmuştur. Fizik muayenesinde hastanın vital bulgularının normal olduğu saptanmış ancak abdominal muayene ile bilateral suprapubik hassasiyet bulunduğu belirlenmiştir. Laboratuvar tetkiklerinde; hemoglobin miktarı 12,9 g/dL, eritrosit sayısı 4,8 milyon/mm<sup>3</sup>, lökosit sayısı 11.800/mm<sup>3</sup>, trombosit sayısı 275.000/mm<sup>3</sup>, C-reaktif protein düzeyi 30,2 mg/L, serolojik olarak paratyphi A "O" antikorunu (1/160) ve paratyphi A "H" antikorunu (1/320) pozitifliğinin bulunduğu belirlenmiştir. İdrar mikroskopisinde ise hematüri görülmüş ve lökosit esteraz pozitif bulunmuştur. İdrar kültürü çalışılmış ve kültürden elde edilen izolat konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmıştır. İdrar kültürü sonucu *Salmonella* spp. olarak bildirilmiş ve antiserumlarla yapılan ileri tanımlamalarda izolatin *Salmonella paratyphi A* olduğu tespit edilmiştir. Radyolojik görüntüleme sonuçları normal bulunmuştur.

#### ABSTRACT

It is a very rare medical condition that Urinary tract infection (UTI) caused by *Salmonella* species. Seven-year-old boy admitted to our hospital with complaint of lower abdominal pain, burning and pain during urination (dysuria), nausea and increased fever. The patient had normal vital signs but abdominal examination revealed bilateral suprapubic tenderness. In the laboratory, it was found the amount of hemoglobin 12.9 g/dL, red blood cell count 4.8 million/mm<sup>3</sup>, white blood cell count 11.800/mm<sup>3</sup>, platelet count 275.000/mm<sup>3</sup>, level of C-reactive protein 30.2 mg/L, serologically *S. paratyphi A* "O" antibody (1/160) and *S. paratyphi A* "H" antibody (1/320) positivity. Urine examination showed gross hematuria and leukocyte esterase was positive. Urine culture was performed and isolate obtained urine culture was identified with conventional methods. Result of urine culture was reported as *Salmonella* species and isolate was determined as *Salmonella paratyphi A* by using anti-sera during the advanced identification. Results of radiological imaging were found normal. The patient was diagnosed

\* Bu olgu sunumu; "4<sup>th</sup> Eurasia Congress of Infectious Diseases, June 01-05 2011, Sarajevo-Bosnia&Herzegovina" kongresinde poster bildiri olarak sunulmuştur.

<sup>1</sup> Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, HATAY

<sup>2</sup> Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ABD, DİYARBAKIR

<sup>3</sup> Kızıltepe Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, MARDİN

<sup>4</sup> Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, DİYARBAKIR

<sup>5</sup> Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Acil Tıp ABD, HATAY

İletişim / Corresponding Author : Erkan YULA

Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, HATAY

Tel : +90 326 229 10 00-3428

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

Geliş Tarihi / Received : 16.01.2012

Kabul Tarihi / Accepted : 24.08.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.17894

Yula E, Deveci Ö, Toka-Özer T, Tekin A, İnci M, Karakuş A. Pediyatrik bir hastada *Salmonella paratyphi A*'nın neden olduğu bir akut hemorajik sistit olgusu. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(3): 163-8.

Hastaya *S. paratyphi A*'nın neden olduğu hemorajik sistit tanısı konulmuş ve hasta yedi gün boyunca seftriakson tedavisi olarak tam iyileşme göstermiştir. Sonuç olarak; *Salmonella* türlerinin endemik olduğu bölgelerde *S. paratyphi A*'nın akut hemorajik sistit vakalarında etken olabileceği düşünülmelidir.

**Anahtar Sözcükler:** Üriner sistem enfeksiyonu, *Salmonella paratyphi A*, Hemorajik sistit.

as acute hemorrhagic cystitis caused by *S. paratyphi A* and received ceftriaxone treatment for seven days and had a full recovery. We conclude that in case of acute hemorrhagic cystitis, *S. paratyphi A* should be considered as causative agent in endemic areas.

**Key Words:** Urinary tract infection, *Salmonella paratyphi A*, Hemorrhagic cystitis.

## GİRİŞ

*Salmonella* türleri çoğunlukla kendi kendini sınırlayan ve klinik olarak sıklıkla gastroenterit tablosu ile seyreden enfeksiyonlara yol açan Enterobacteriaceae ailesi üyesi Gram negatif basillerdir. Bu mikroorganizmalar, bağışıklık sistemi tam olarak olgunlaşmamış süt çocuklarında veya baskılanmış kişilerde bakteriyemi ve çeşitli ekstraintestinal organ tutulumları gibi daha ağır klinik tablolarla karşımıza çıkabilmektedir. Ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada; en sık izole edilen suşlar *Salmonella serovar enteritidis* ve *Salmonella paratyphi B* olarak bildirilmiştir (1). Tüm dünyada enfeksiyonlara neden olan *Salmonella* türlerinin idrar yolu enfeksiyonlarına yol açması oldukça nadir görülen bir klinik tablodur. *Salmonella* türlerine bağlı üriner sistem enfeksiyonlarının çoğu üst üriner sistem (üreter ve böbrek) kökenli olduğu belirtilmektedir. Hastaların çoğunun malignensi veya solid organ transplantasyonu gibi altta yatan bir bağışıklık yetmezliği veya önceden var olan böbrek taşı, hidronefroz, anatomik anomali gibi patolojilere sahip oldukları da söylenmiştir (2-5). *S. typhimurium*'un renal transplantlı hastalarda en çok izole edilen *Salmonella* türü olduğu da tespit edilmiştir (2). *Salmonella* türlerinin neden olduğu akut hemorajik sistit ise oldukça nadir görülen ve genellikle dizüri, hematüri ve suprapubik bölgede hassasiyet ile kendini

gösteren, prognozu iyi olan bir hastalıktır. Sistit olgularında daha çok idrarda *Salmonella*'ların M form izolatlarının bulunduğu ve bu izolatların çoğunlukla *S. paratyphi B* olduğu bildirilmiştir (6). Akut hemorajik sistit, pediatrik yaş grubunda nadir görülen bir hastalıktır ve daha çok adenovirüs, *Escherichia coli* ve kemoterapötik ilaçlarla ortaya çıkan ve daha çok kız çocuklarını etkileyen bir tablodur.

Bu çalışmamızda, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde *S. paratyphi A*'nın akut hemorajik sistit tablosunda etken olarak bildirildiği ilk vakayı ortaya koymak amaçlanmıştır.

## OLGU

Kızıltepe Devlet Hastanesine, 2011 yılında başvuran yedi yaşındaki erkek hastanın yaklaşık bir haftadır devam eden karın ağrısı, idrar yaparken ağrı ve yanma, koyu renkli idrar çıkarma, halsizlik, bulantı ve ateş yükselmesi şikayetleri olmuş ve bir dış merkezde ampirik olarak altı gün boyunca sefoksitin kullanmasına rağmen şikayetlerinde herhangi bir düzelme olmamıştır. Geçirilmiş parazit enfeksiyonu (*Giardia intestinalis*) dışında özgeçmişinde dikkate değer bir özellik bulunmayan hastanın ailesinde benzer şikayetlerin (gastrointestinal enfeksiyon semptomları, ishal, kabızlık, bulantı-kusma öyküsü)

olmadığı, kalabalık bir aile ortamı ve düşük sosyo-ekonomik düzeye sahip olduğu öğrenilmiştir. Yapılan fizik muayenesinde ise genel durumu iyi, bilinci açık, vücut ısısı 38,1 °C, nabız sayısı 100 atım/dak, solunum sayısı 26/dak, arteriyel kan basıncı 110/70 mm Hg olarak ölçülmüştür. Hastanın bulantı dışında herhangi bir gastrointestinal semptomu olmayıp, tıbbi öyküsünde daha önce geçirilmiş bir salmonellozis hikayesi de bulunmamaktadır. Hastanın boy ve vücut ağırlığının normal sınırlarda olduğu belirlenmiştir. Yapılan sistemik muayenesinde suprapubik bölgede derin palpasyonla artan hassasiyet tespit edilmiştir. Diğer sistemlerin muayenesinde herhangi bir özellik gözlenmemiştir.

Laboratuvar incelemesinde; tam kan sayımı (hemogram), eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif protein, rutin biyokimyasal parametreler, pelvik radyografi, periferik yayma, Gruber-Widal tüp aglütinasyon testi, IgG, IgA, IgM, IgE, C3, C4 düzeylerine bakılmış ve tam idrar tetkiki yapılmıştır. Tetkik sonuçlarında; hemoglobin miktarı 12,9 g/dL, eritrosit sayısı 4,8 milyon/mm<sup>3</sup>, lökosit sayısı 11.800/mm<sup>3</sup>, trombosit sayısı 275.000/mm<sup>3</sup>, MCV 77,6 fL, RDW-CV %15,3, periferik yaymada %71 polimorfonükleer lökosit, %4 çomak, %4 monosit, %21 lenfosit mevcut oluşu atipik hücre ve toksik granülasyon görülmemiş; trombositler kümeler halinde ve normal morfolojiye sahiptir. Eritrosit sedimentasyon hızı 27 mm/sa, C-reaktif protein düzeyi 30,2 mg/L, biyokimyasal parametrelerden elektrolitler, karaciğer fonksiyon testleri (ALT, AST, GGT, LDH), bilirubin, kan üre azotu (BUN), kreatinin, ürik asit, protein, albumin ve tokluk glukoz değerleri normal sınırlarda tespit edilmiştir. Tam idrar tetkikinde; pH 5,0, dansite 1.026, hemoglobin (++++), protein (+++), bol eritrosit ve lökosit mevcut; C3, C4, IgG, IgA, IgM ve IgE değerleri normal sınırlarda görülmüştür. İmmün yetmezlikle ilgili bir bulguya rastlanılmamış ve ELISA yöntemi ile HIV negatif olarak tespit edilmiştir.

Hematüri nedeniyle yapılan radyolojik

görüntüleme tetkiklerinde (direkt radyografi ve ultrasonografi) mesane duvar kalınlığında görülen artış dışında başka bir anomali ve patoloji rapor edilmemiştir.

İdrar mikroskopisinde bol miktarda eritrosit (hematüri) görülen ve idrar sedimentinin biyokimyasal incelemesinde lökosit esterazı pozitif bulunan hastadan uygun şartlarda alınan orta akım idrar örneğinden idrar kültürü çalışılmıştır. İdrar örneği %5 koyun kanlı agar ve Eosin-Methylene Blue (EMB) agar (Oxoid) besiyerlerinin yüzeyine 4 mm çapında 0.01 mL idrar taşıyabilen standart öze kullanılarak kantitatif olarak inoküle edilmiştir. Besiyerleri 35±2 °C'de 18-24 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası EMB agarda üreyen Gram negatif ve laktöz negatif koloniler konvansiyonel yöntemler ile fenotipik olarak tanımlanmıştır. Suş tanımlanmasında; EMB agar, Hektoen Enteric Agar, Triple Sugar Iron Agar test besiyeri ile IMVIC testleri, üre hidrolizi, lizin dekarboksilasyon testleri kullanılmıştır. Fenotipik tanımlama sonucu *Salmonella* spp. olarak bildirilmiştir. Polivalan *Salmonella* antiserumları (RSHM Antiserumları, Ankara) ile yapılan ileri serolojik aglütinasyon sonucu izolat *S. paratyphi* A olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, hastadan alınan serum örneğinde çalışılan Gruber-Widal tüp aglütinasyon testinde de paratyphi A "O" antikoru (PAO, RSHM Febril Antijenleri, Ankara) ve paratyphi A "H" antikoru (PAH, RSHM Febril Antijenleri, Ankara) sırayla 1/160 ve 1/320 titrede pozitif olarak bulunmuştur. Eş zamanlı olarak alınan dışkı ve kan kültürlerinden bakteri izole edilmemiştir.

Suşun antibiyotik duyarlılık testi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre çalışılmıştır (7). Elde edilen sonuçlara göre amikasin, sefazolin, sefoksitin ve gentamisin dirençli iken ampisilin-sülbaktam, sefepim, seftriakson, sefotaksim, seftazidim, ertapenem, levofloksasin, meropenem, piperasilin-tazobaktam, trimetoprim-sülfametoksazol duyarlı olarak tespit edilmiştir.



Yapılan incelemeler neticesinde ayırıcı tanı göz önünde bulundurularak hastaya *S. paratyphi A*'ya bağlı akut hemorajik sistit tanısı konulmuş ve yedi gün süreyle parenteral seftriakson tedavisi uygulanmıştır. Tedavi sonrası alınan kontrol idrar kültüründe üreme olmaması, tam idrar tetkikinde parametrelerin normale dönmesi, kontrol ultrasonografisinde mesane duvarının normal kalınlıkta izlenmesi ve hastanın klinik bulgularının düzelmesi üzerine hasta tam şifa ile taburcu edilmiştir.

### TARTIŞMA

*S. paratyphi A*, Gram negatif basillerden enterik ateş (tifo) etkeni olan üç patojen türünden biridir. Etken, kontamine su ve gıdalar ile bulaşmaktadır. Mideyi geçerek ince bağırsaklara ulaşan bakteri epitelyal hücrelere penetre olmakta, makrofajlar tarafından fagosite edilerek retiküloendotelial dokulara yayılmakta ve çeşitli klinik manifestasyonlara yol açmaktadır. *S. paratyphi A*'nın tanısında altın standart kan, dışkı, idrar ve/veya kemik iliğinden elde edilen pozitif kültürlerdir. Mikroorganizma enfektif endokardit, perikardit, trombozis, osteomyelit, menenjit, hepatit ve pankreatit olgularından nadiren izole edilmiştir. Literatürde çok nadir olarak renal abse, sistit ve nefrolitiazis olgularında da etken olarak bildirilmiştir (3-5). Akut hemorajik sistit, çocuklarda genellikle kendi kendini sınırlayan, iyi prognozlu bir hastalıktır ve sıklıkla karın ağrısı, dizüri, makroskobik hematüri, sık ve ağrılı idrar yapma şikayetlerine neden olmaktadır. Hastaların ancak %46-53'ünde etken mikroorganizma tespit edilebilmektedir (8). Akut hemorajik sistitin en sık bakteriyel etkeni *E. coli*'dir. *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis* ve *Klebsiella* spp. türleri de izole edilmiştir. Kültür negatif olgularda en sık etkenlerin adenovirus tip 11 ve 21 olduğu bildirilmiştir (8, 9). *Salmonella* enfeksiyonlarında üriner sistem tutulumu oldukça nadirdir ve hastaların yaklaşık %0,6-1,7'sinde idrarda *Salmonella* türleri

izole edilmiştir (6). *Salmonella* türleri arasında akut hemorajik sistit nedeni olarak sıklıkla *S. typhi* ve *S. paratyphi B* etken olarak bildirilmektedir (6, 10).

Aydemir ve ark. (11), ülkemizde *S. paratyphi B*'nin etken olduğu akut hemorajik sistit olgusunu bildirmişlerdir. Bu vakada da çocuk hastada immün yetmezlikle ilgili bir bulgu bulunamamış ve etken dışkıdan izole edilmemiştir. D'Cruz ve ark. (4) ise herhangi bir predispozan faktöre sahip olmayan 17 yaşında bir erkek hastada renal abseden, başka bir çalışmada da 37 yaşında nefrolitiazisli ancak tifo öyküsü olmayan bir hastada *S. paratyphi A* bulunmuştur (12). *Salmonella*'ların etken olduğu tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu bulunan ve böbrek taşı ile geçirilmiş tifo öyküsüne sahip 72 yaşındaki kadın hastada diğer koliform bakterilerle birlikte *S. paratyphi B* de belirlenmiştir (13). Leung ve ark. (14) herhangi bir predispozan faktöre sahip olmayan ve immünolojik parametreleri normal 4 yaşındaki bir erkek hastada *S. stanleyville*'nin etken olduğu üriner sistem enfeksiyonu (ÜSE) olgusu bildirmişlerdir. Tena ve ark. (15) 1990-2005 yılları arası non-tifoid salmonellaların etken olduğu bakteriyüri olan 19 olgu bildirmişlerdir. Yaş ortalamaları 62,5 olan hastaların 12'si sistit, 6'sı piyelonefrit tanısı almışken bir hastanın asemptomatik olduğu belirlenmiştir. Bildirdikleri olgu serisinde ise 14 hastada (%73,6) çeşitli kronik hastalıklar, sekizinde diabetes mellitus, yedi hastada immünsüpresif tedavi tespit edilmiştir. Ek olarak sekiz hastada (%42,1) ürolojik anomalilerin olduğunu saptamışlar ve 19 vakanın 16 (%84,2)'sında etken olarak *S. enteritidis* izole edilmiştir. Sundukları olgu serisi ile non-tifoid *Salmonella*'ların etken olduğu ÜSE'lerin çoğunlukla yaşlı, diabetes mellitus gibi kronik hastalığı bulunan, altta yatan ürolojik anomalileri ve immünsüpresyonu olan hastalarda meydana geldiğini vurgulamışlardır. Çalışmamızda herhangi bir ürolojik anomali ve immünolojik problemi olmayan, tamamen sağlıklı bir erkek

çocukta gelişen hemorajik sistit tablosunda, idrar kültüründen izole edilen ve tanımlanan *S. paratyphi* A etken olarak kabul edilmiştir. Anemnezde tifo öyküsü bulunmamasına rağmen Gruber-Widal tüp aglütinasyon testi ve *Salmonella* türlerine özgül antiserumlarla yapılan lam aglütinasyon testi olumlu sonuç vermiştir.

Sonuç olarak, *Salmonella* türlerinin neden olduğu üriner sistem enfeksiyonu mikroorganizmanın endemik

olarak bulunduğu bölgelerde bile nadiren görülmesine rağmen kültürde laktoz negatif bakteriler izole edildiğinde *Salmonella* türlerinden de şüphelenmek gerekmektedir. Ayırıcı tanı konulduktan sonra ÜSE'nin *Salmonella* türlerine bağlı olduğu kabul edilirse, hastada sistemik enfeksiyon varlığı ve muhtemel taşıyıcılık durumunun tespiti için ileri bakteriyolojik çalışmalar da mutlaka yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Levent B, Sezen F, Güleşen RK ve UEPLA Çalışma Grubu. Ulusal enterik patojenler laboratuvar sürveyans ağı (UEPLA): 2007-2008 yıllarına ait suşların değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2009; 66 (2) (Ek 2): 25-7.
2. Cohen JI, Bartlett JA, Corey GR. Extra-intestinal manifestations of *Salmonella* infections. Medicine (Baltimore), 1987; 66 (5): 349-88.
3. Nakaya Y, Shiota S, Sakamoto K, Iwase A, Aoki S, Matsuoka R, et al. Double infection with *Giardia lamblia* and *Salmonella paratyphi* A associated with acute renal failure. Intern Med, 1998; 37 (5): 489-92.
4. D'Cruz S, Kochhar S, Chauhan S, Gupta V. Isolation of *Salmonella paratyphi* A from renal abscess. Indian J Pathol Microbiol, 2009; 52 (1): 117-9.
5. Abbott SL, Portoni BA, Janda JM. Urinary tract infections associated with nontyphoidal *Salmonella* serogroups. J Clin Microbiol, 1999; 37 (12): 4177-8.
6. Wuthe HH, Aleksic S, Podschun R, Scheer-Sievers A. Urinary tract infection due to a mucoid (M) form of *Salmonella*. A new transformation from M form into T1 form. Zentralbi Bakteriologie, 1992; 277 (1): 74-9.
7. Anonymous. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
8. Lee HJ, Pyo JW, Choi EH, Ha IS, Cheong HI, Choi Y, et al. Isolation of adenovirus type 7 from the urine of children with acute hemorrhagic cystitis. Pediatr Infect Dis J, 1996; 15 (7): 633-4.
9. Manikandan R, Kumar S, Dorairajan LN. Hemorrhagic cystitis: a challenge to the urologist. Indian J Urol, 2010; 26 (2): 159-66.
10. Arad E, Naschitz J, Yeshurun D. Hemorrhagic cystitis as a presenting symptom of acute infection with *Salmonella typhi*. Harefuah, 1996; 130 (12): 815-6.
11. Aydemir C, Tanır G, Akın A, Tanır G, Yüksek M, Lüleci T, et al. *Salmonella paratyphi* B'nin neden olduğu bir akut hemorajik sistit olgusu. Türk Pediatr Ars, 2003; 38 (3): 1-3.
12. Al-Otaibi FE. Isolation of *Salmonella paratyphi* A from a patient with nephrolithiasis. Saudi Med J, 2003; 24 (4): 406-8.
13. McLarty E, Dance D. Adverse effects of being a "healthy carrier". Lancet, 1999; 353 (9171): 2246-7.

14. Leung AKC, Kao CP, Robson WLM. Urinary tract infection due to *Salmonella stanleyville* in an otherwise healthy child. J Natl Med Assoc, 2005; 97 (2): 281-3.
15. Tena D, González-Praetorius A, Bisquert J. Urinary tract infection due to non-typhoidal *Salmonella*: report of 19 cases. J Infet, 2007; 54 (3): 245-9.

# Mikrosistin biyosentez yollarının düzenlenmesi ve genetik mekanizmalar

## The regulation of microcystin biosynthesis pathways and genetic mechanisms

Serap YALÇIN<sup>1</sup>

### ÖZET

Oksijenik fotosentetik bakteriler grubunda yer alan, sucul ve karasal çevrede çok yaygın bir yaşam alanı bulunan siyanobakteriler (Mavi-yeşil alg) farklı morfolojik yapıya sahiptirler. Siyanobakteriler, bir kısmı oldukça etkili toksin olan ribozomal olmayan peptidler, poliketidler ve alkaloidleri içeren biyoaktif sekonder metabolit üretebilmektedirler. Toksik siyanobakterilerin yaygın bir şekilde bulunması insan ve hayvan sağlığı için risk oluşturmaktadır. Siyanobakterial toksinler veya siyanotoksinler insanlarda karaciğer kanseri, dermal kontakt irritasyonlar, gastroenterit gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Siyanotoksinler nörotoksinler, hepatotoksinler, sitotoksinler ve dermatotoksinler olmak üzere dört ana sınıfa ayrılırlar. Fakat yapısal olarak birbirlerinden oldukça farklıdır. Geçtiğimiz on yıl içerisinde dört temel siyanotoksinin: mikrosistin, nodularin, saksitoksin ve silindrospermopsin biyosentez yollarını biyokimyasal ve genetik olarak tanımlanmıştır. Mikrosistinlerin, insan ve hayvan intoksikasyonlarını içeren birçok vakadan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu derleme ile mikrosistin biyosentez yollarını, kimyasal, genetik ve toksikolojik özelliklerin açıklanmaya çalışılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Siyanobakteri, mikrosistin, toksin

### ABSTRACT

The cyanobacteria (blue-green algae), as they are commonly named, comprise a diverse group of oxygenic photosynthetic bacteria that inhabit a wide range of aquatic and terrestrial environments, and display incredible morphological diversity. Cyanobacteria produce bioactive secondary metabolites, including alkaloids, polyketides and non-ribosomal peptides, some of which are potent toxins. The common occurrence of toxic cyanobacteria causes problems for health of animals and human. Cyanobacterial toxins or cyanotoxins are responsible diseases such as liver cancer, dermal contact irritations and gastroenteritis in humans. The cyanotoxins divide four major classes: the neurotoxins, hepatotoxins, cytotoxins, and dermatotoxins. However, this toxins are quite variety. The biosynthesis pathways of the four major cyanotoxins: microcystin, saxitoxin, nodularin and cylindrospermopsin, have been interpreted as biochemical and genetical in the past decade. Microcystins have been implicated in several cases of animal and human intoxications. This review summarizes biosynthesis pathways of microcystin, chemistry, genetic and toxicology.

**Key Words:** Cyanobacteria, microcystin, toxin

<sup>1</sup> Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, KIRŞEHİR

**İletişim / Corresponding Author:** Serap YALÇIN

Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, KIRŞEHİR

Tel : +90 386 712 41 69

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

Geliş Tarihi / Received : 16.03.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 24.08.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.48343

Yalçın S. Mikrosistin biyosentez yollarının düzenlenmesi ve genetik mekanizmalar. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(3): 169-78.

## GİRİŞ

Siyanobakteriler fotosentetik bakterilerin büyük çoğunluğunu oluştururlar. Siyanobakterilerin ilk olarak yaklaşık 3.5 milyon yıl öncesinde var oldukları bilinmektedir. Morfolojik olarak siyanobakterilerin farklı türleri bulunabilmektedir. Siyanobakteriler ekoloji, insan sağlığı ve endüstri alanlarında önemli mikroorganizmalardır (1). Siyanobakterilerin tahminen 150 cinsi, zararlı toksin üretebilme özelliğine sahiptir. Siyanobakteriler tarafından üretilen bu toksinler dört katogoride sınıflandırılmaktadır: 1. nörotoksinler, 2. hepatotoksinler, 3. sitotoksinler ve 4. dermatotoksinler (irritan toksinler) (2, 3). Bu derleme kapsamında, insan sağlığı üzerinde son derece önemli bir hepatotoksin olan mikrosistin üzerine odaklanılmış olup ve son on yıl içinde mikrosistin tanımlanan biyosentez yolları ayrıntılı bir şekilde açıklanmaya çalışılmıştır.

## MİKROSİSTİN

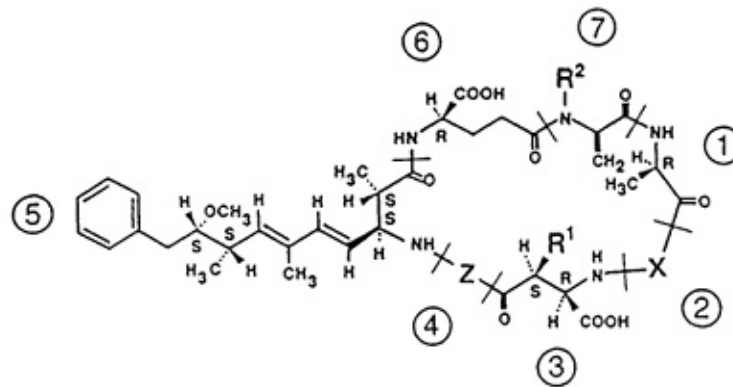
Siyanobakterilerden *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Chroococcus* ve *Nostoc* cinsleri heptapeptid yapısında bir hepatotoksin olan mikrosistin içermektedir. *Microcystis aeruginosa* gibi mikrosistin üreten türler yaygın dağılıma sahiptir ve insan sağlığı için önemli tehdit oluşturmaktadır (4).

## MİKROSİSTİNİN KİMYASAL YAPISI

Mikrosistinler, siyanobakterilerde bulunan toksinlerin yapısal olarak farklı ve en büyük grubunu oluştururlar. Yaklaşık 90 mikrosistin izoformunun, metilasyon, hidroksilasyon, epimerizasyon derecesi, peptid sekansı ve toksisitesi tanımlanmıştır (5, 6). Siklik peptid olan mikrosistinler tip 1 ve tip2A ökaryotik protein fosfatazların etkili inhibitörleridir. Mikrosistinler siklo yapısına sahiptir (-Adda-D-Glu-Mdha-D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z) (5, 7). Genel yapıda X ve Z çeşitli L formunda bulunan aminoasitleridir. Adda, 3-amino-9-metoksi-2,6,8,-trimetil-10-fenil-4,6,-dekadienoik asit, D-MeAsp, 3-metilaspartik asit ve Mdha ise N-metil-dehidroalanin'dir (5,7). Mikrosistinlerin genel yapısı Şekil 1' de gösterilmektedir.

## MİKROSİSTİNİN TOKSİKOLOJİK ETKİSİ

İnsanlarda mikrosistin zehirlenmesi sonucu görülen en önemli işaret karaciğer hasarıdır. 1996 yılında Brezilya'da 131 hastanın 116'sında kusma, kaslarda zayıflık gibi rutin zehirlenme belirtileri fark edilmiş, bu hastaların 100'ünde akut karaciğer hasarı gelişirken, 52'sinde "Caruaru Sendromu" olarak tanımlanan semptomlar belirlenmiştir. Bun semptomun sebebi klorlama ve filtreleme işlemi uygulanmamış sulara



**Siklo-(D-Ala<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-Glu<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>)**

Şekil 1. Mikrosistin yapısı. Mikrosistin siklik heptapeptiddir. Mikrosistinde iki değişken amino asit X ve Z olarak gösterilmektedir. En yaygın izoformu mikrosistin-LR (MA: 995. 17) dir.

karışan siyanotoksinlerin tüketilmesi sonucu meydana gelmiştir. Yapılan analizler sonucunda sulara tespit edilen mikrosistinler, aynı zamanda hastaların kanında ve karaciğerinde de bulunmuştur (8 - 10).

Gürbüz ve ark. (11), Türkiye’de Kovada gölünde yaptıkları çalışmada mikrosistin seviyesinin aylara göre değişiklik göstermesinden dolayı, insan sağlığı açısından sürekli bu suların kontrol altında tutulması gerektiğini rapor etmişlerdir. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC) ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre farelerde kilogram başına ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ) 0,04  $\mu\text{g}$  karaciğer toksisitesi meydana getirmektedir. İçme sularında tolere edilebilir günlük doz mikrosistin-LR için 1,5  $\mu\text{g}/\text{L}$  dir. Siyanotoksin zehirlenmeleri içme sularına karışan toksinler nedeniyle evcil hayvanlarda da rapor edilmiştir. Amerikanın farklı eyaletlerinde [(California (12), Colorado (13), Georgia (14), Michigan (15), Mississippi (16), Oklahoma (17), Wisconsin (18), Saskatchewan] ve Kanada (19, 20)’da mikrosistinler nedeniyle evcil hayvanlarda zehirlenmeler belirlenmiştir. Mikrosistinler litrede ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) birkaç mikrogram gibi küçük dozlarda dahi balıklar üzerinde toksik etki meydana getirmektedir. Tablo 1’de çeşitli balık türlerine uygulanan mikrosistin farklı dozlarının karaciğer ve böbrekler üzerine subletal etkisi görülmektedir (21-25).

Mikrosistin besinlerle alındığında organik anyon transport proteinleri ile karaciğere taşınır ve protein

fosfataz 1 ve 2A’nın inhibisyonu ile toksisitesini göstermektedir (26 - 28). Protein fosfatazın inhibisyonu yapısal filamentlerin aşırı fosforilasyonuna, hücre iskeleti degradasyonuna ve hepatik yapının bozulmasına yol açmaktadır (29 - 32). Hepatositlerde meydana gelen büzülme ve küçülmeler karaciğer dokularında hasara neden olmaktadır. Bu bölgesel doku hasarı, organ yıkımı ve hemorajik şok ile sonuçlanmaktadır (30).

Mikrosistin bütün isoformları için, toksisite dereceleri tespit edilmiştir. Örneğin en yaygın form olan mikrosistin-LR’nin, farelerde LD 50 değeri 50  $\mu\text{g}$  iken, nadir görülen mikrosistin-RR için öldürücü doz 600  $\mu\text{g}$ ’dan daha fazladır (33, 34). Aynı zamanda bu toksinlerin öldürücü olmayan dozlarına bile maruziyetin kanser oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir (33, 34). Çeşitli çalışmalarda mikrosistin kronik maruziyeti sonucu farelerde ve ratlarda deri ve akciğer kanseri oluşumu gözlenmiştir (35, 36). Epidemiyolojik veriler insanlarda hepatosellüler karsinom gibi uzun dönemli etkilerin varlığını desteklemektedirler (37, 38).

### MİKROSİSTİN BİYOSENTEZİ VE GENETİK YAPISI

Mikrosistin, ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) ve poliketid sentaz (PKS) içeren çok işlevli enzim kompleksi tarafından sentezlenmektedir. McyS gen bölgesi tarafından kodlanan biyosentez

**Tablo 1.** Balıklarda subletal oral mikrosistin dozlarının etkisi

Balık	Doz ( $\mu\text{g MC}/\text{kg}$ )	Doz sayısı	Maruziyet zamanı (Gün)	Toplam Doz ( $\mu\text{g MC}/\text{kg}$ )	Subletal Etki	Ref.
Sazan (Yetişkin)	2.5	16	16	40	Yaygın karaciğer hasarı	(21)
Sazan (Yetişkin)	50	28	28	1,400	Ağır karaciğer hasarı	(22)
Sazan (Genç)	400	1	1	400	Ağır karaciğer ve böbrek hasarı	(23)
Alabalık	550	8	4	4,400	Ağır karaciğer hasarı	(24)
Levrek	1,150	8	4	9,200	Ağır karaciğer hasarı	(25)

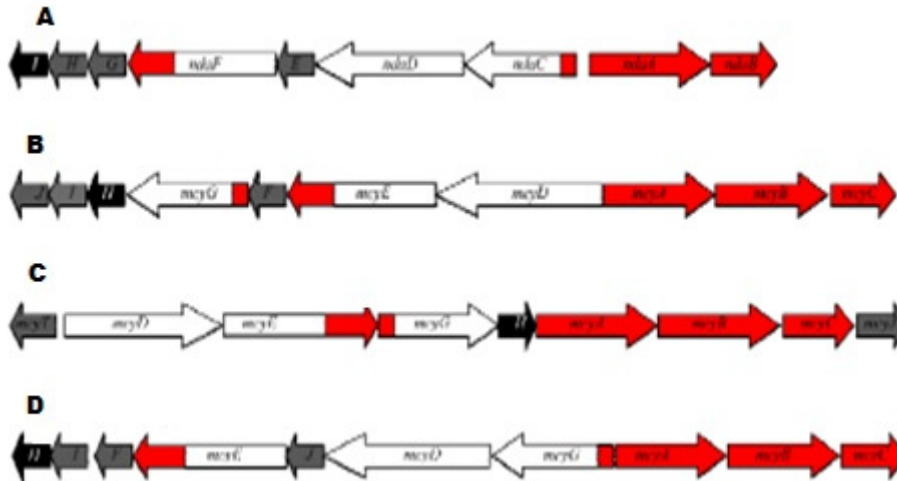
enzimleri *Microcystis*, *Anabaena*, ve *Planktothrix* gibi çeşitli siyanobakteri türlerinde karakterizedir (39-41) (Şekil 2). *Microcystis aeruginosa* PCC7806' da, *mcyS* gen kümesi 55kb'dır ve *mcyA-C* and *mcyD-J* olmak üzere sentezlenen iki operonda 10 gen içermektedir. Bu iki operondan en geniş olan gen bölgesi *mcyD-J*, PKS enzimi (*McyD*), NRPS ve PKS enzimleri (hibrit enzim) (*McyE* and *McyG*), toksinlerin taşınmasında rol alan enzimleri (*McyH*), daha küçük bir operon olan *mcyA-C* ise NRPS enzimlerini kodlanmaktadır (*McyA-C*) (39) (Şekil 3).

Homolog enzimler ve biyoinformatik analizlere bağlı Adda'nın oluşumu, *mcyD-G* ve *J* genleri tarafından kodlanan enzimler ile meydana gelmektedir. Hibrit NRPS/PKS enzimi (*McyG*) Adda biyosentezinin ilk basamağında rol almaktadır. NRPS enziminin, fenilasetatı aktive etmesi başlangıç hipotezi olarak belirlenmesine rağmen, A-PCP'nin biyokimyasal karakterizasyonu, sınıflandırılmış fenilpropanoidlerin aktive edilmesi ve PCP yüklenmesi ile meydana gelmektedir (42). Aktivasyonun ardından fenilpropanoidlerin başlatıcı ünitesi çeşitli malonil-CoA uzama basamakları ve C-metilasyon, redüksiyon, dehidrasyon ile devam eder ve *McyD*, E ve G' nin PKS modülleri ile katalizlenir. Aminotransferaz enzimi,

Adda biyosentezinin son aşamasında poliketid'i  $\beta$ -amino aside dönüştürür. İkinci hibrit PKS/NRPS enziminin ise NRPS modülünün aktivasyonda ve Adda ile D-Glu kondensasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (4).

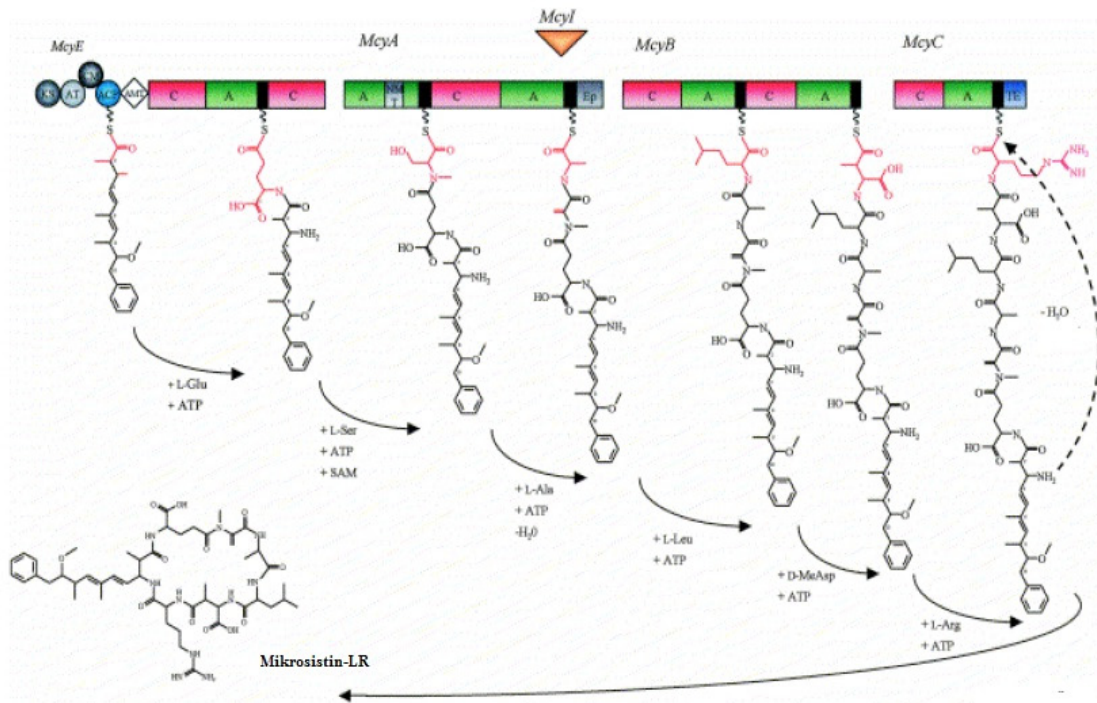
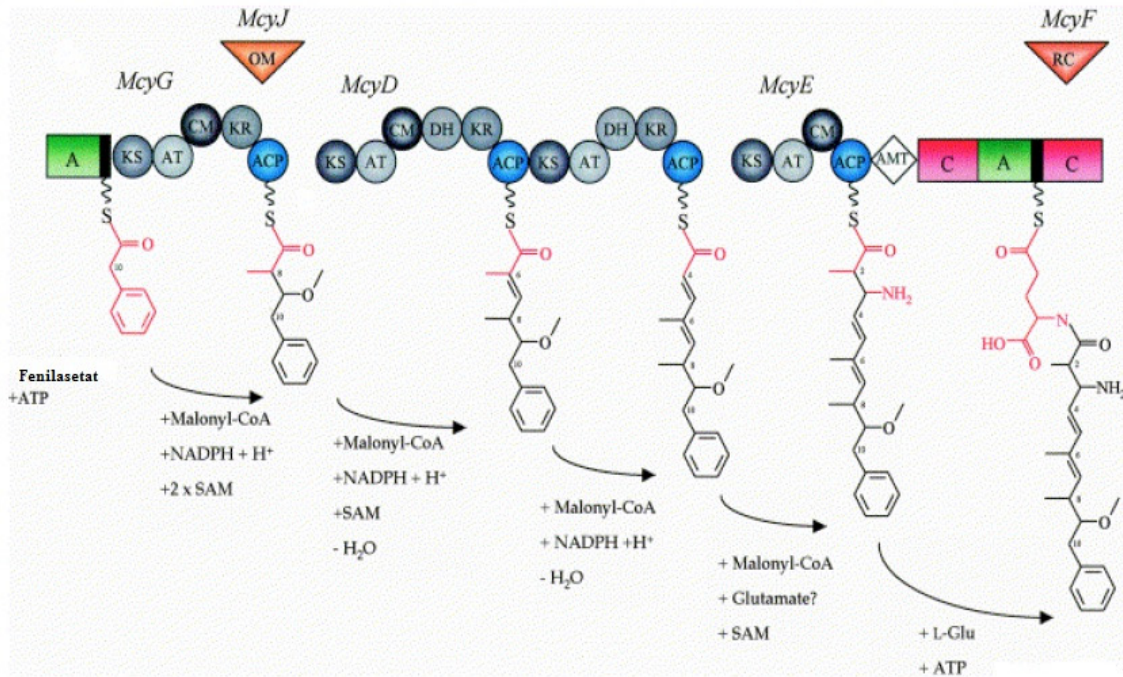
*Mcy F* ORF geninin, mikrosistin L-Glu kalıntılarının epimerizasyonundan sorumlu glutamat rasemaz enzimini kodladığı tahmin edilmektedir (39, 43). Yapılan çalışmalar *McyF*'nin Asp rasemaz olarak rol oynadığını ileri sürmektedir (44). *Planktothrix agardhii*' deki mutagenез çalışmaları, Adda üretimin monofonksiyonal enzim (*McyJ*) tarafından O-metilasyon basamağının katalizlendiği bildirmektedir (40).

Mikrosistin biyosentez yolağında kalan diğer biyosentetik enzimler spesifik aktivasyonda, modifikasyonda ve lineer peptid zincirinde aminoasit substratlarının kondensasyonunda görev almaktadır. İlk olarak *McyA*, D-ala'nın eklenmesinin ardından zincire L-Ser'ni eklemektedir. Bu basamak L-Leu ve D-MeAsp kalıntılarının (*McyB*), L-Arg (*McyC*) eklenmesi ile son peptid ürünün salınımını takip etmektedir. Kalan tek enzim 2-hidroksi-asit dehidrojenaz (*McyI*), 3-metilmalat'ın 3-metiloksalasetat'a dönüşümü ile mikrosistin siklik yapısı içinde, D-metilaspertat üretimini gerçekleştirmektedir (45).



Şekil 2. Çeşitli siyanobakterilerde hepatotoksin gen kümeleri. (A) *N. spumigena*, (B) *M. aeruginosa*, (C) *P. agardhii*, ve (D) *Anabaena* sp. 90'da mikrosistin ve nodularin gen kümeleri poliketid sentaz (beyaz), non-ribosomal peptid sentetaz (kırmızı), özel enzimler (gri) ve ABC taşıyıcılarını (siyah) kodlamaktadır (4).





**Şekil 3.** Mikrosistin model formasyonu (McyA-E,G). Beyaz dikdörtgen PKS veya NRPS'yi göstermektedir. Aminotransferaz kare şeklinde gösterilmektedir. ORF, McyJ, F ve I, aktivitesi üçgen ile belirtilmektedir. Kısaltmalar: A, aminoasil adenilasyon; ACP, açil taşıyıcı protein; AMT, aminotransferaz; AT, açiltransferaz; C, kondenzasyon; CM, C-metiltransferaz; DH, dehidratasyon; Ep, epimerizasyon; KR, ketoasil redüktaz; KS, β-ketoasil sentaz; NM, N-metiltransferaz; OM, O-metiltransferaz; RC, rasemaz; TE, tiyoesteraz. NRPS tiyolasyon motifi siyah ile gösterilmektedir (4, 22).

ABC taşıyıcı genin ise (*mcyH*), mikrosistinlerin taşınmasında görev aldığı bilinmektedir (46). Bu toksinler tilakoid lokalizasyonundan (47, 48) ya da yüksek ve kırmızı ışığa maruziyet ile büyüme durumunda toksinin dışarı atılmasından sorumlu olabilmektedir (49).

*M. aeruginosa*, *P. agardhii* (40) ve *Anabaena* sp. (41)'nin *mcyS* gen kümeleri üzerine yapılan çalışmalar toksin biyosentez prosesinin benzer olduğunu ancak, siyanobakterilerin farklı türleri arasındaki *mcyS* genlerinin diziliminde değişiklikleri göstermişlerdir (39). *M. aeruginosa* ve *Anabaena* sp. *mcyS* kümeleri iki operon arasında dizilmiştir ancak bu iki tür arasında bu operonlar içinde genlerin diziliş sırası farklılık göstermektedir. *P. agardhii*'de *mcyS* kümeleri *mcyF* ve *mcyI* içermeyen kendine özgü düzene sahiptir. Aynı zamanda *P. agardhii*'de *mcyS* gen kümeleri *mcyT* adı verilen gen içermektedir. Bu gen promotör bölgede yer almakta ve tip II tiosteraz enzimini kodladığı düşünülmektedir. *M. aeruginosa*, *P. agardhii* ve *Anabaena* sp.'de *mcyS*' in özelliği siyanobakterilerde hepatotoksin biyosentezini ve orijinini anlamak için önemlidir. Transpozaz enzimlerinin tanımlanması ile ilişkili, *mcyS* ve *ndaS* (nodularin) gen kümeleri ve yapılan filogenetik analizler çeşitli mikrosistin izoformlarının ve *mcyS* gen kümelerinin sporadik dağılımından sorumlu rekombinasyon olayları ve gen transferi teorisine izin vermektedir (39, 50, 51).

Nitrojen, fosfor, iz elementler, büyüme sıcaklığı, ışık ve pH gibi çevresel ve fiziksel faktörlerin siyanobakterilerde hepatotoksin üretimini etkilediği düşünülmektedir (52 - 58). Ancak bazı çalışmalarda bu konu tam olarak standardize edilmemiştir. Toksin düzenleme çalışmalarının çoğu direk olarak hücrel toksin ölçümü üzerine odaklanırken, Tillett ve ark. moleküler seviyede *mcy* gen kümelerinin tanımlanmasının daha yakından incelenmesine imkan vermektedir (49). Kaebnick ve ark., farklı ışık dereceleri altında *mcyB* ve *mcyD*'nin transkripsiyonu ölçmek için "RNase protection assay" kullanmışlardır. Yüksek ışık yoğunluğunda ve kırmızı ışık yoğunluğunda artan transkripsiyon seviyesini birbiri ile ilişkili

bulurken, mavi ışıkta ise transkripsiyon seviyesi azalmaktadır. İlginç olarak, koyu- hafif ışıkta (0 ve 16  $\mu\text{mol}$  foton  $\text{m}^{-2}$   $\text{s}^{-1}$ ), ve orta-yüksek ışık (31 ve 68  $\mu\text{mol}$  foton  $\text{m}^{-2}$   $\text{s}^{-1}$ ) aralığında meydana gelen transkripsiyonun arttığını göstermişlerdir (59). Alternatif transkripsiyon başlama bölgeleri farklı ışık yoğunlukları altında kültürlenmiş hücrelerde her iki operon için tanımlanmıştır. Örneğin düşük ışık yoğunluğu altında poliketid ve *mcyD*-J, merkez promotör (*mcyD*)'den polisistronik mesaj (*mcyDEFGHIJ*)'ın bir parçası olarak transkribe edilirken, yüksek ışık yoğunluğu altında genler alternatif promotör bölgesinden sentezlenmektedir. Yüksek ışık yoğunluğu altında alternatif promotör transkripsiyonun artmasına izin vermektedir (*mcyB* ve *mcyD*). Diğer özel enzimlerin (*mcyF*, G, H, I ve J) çoğu ise kendine özgü promotörlere sahiptir.

Beslenme içeriği ve sıcaklık gibi diğer faktörler *mcyS* ekspresyonunu ve toksin biyosentezini etkilediği gösterilmiştir. Örneğin, Sevilla ve ark., (58) *M. aeruginosa* PCC7806'de *mcyS* ekspresyonu ve toksin biyosentezi üzerine demir (Fe) nin etkisini araştırmışlardır (58). Real time PCR restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP), southern ve dot blot hibridizasyon, sekans ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) analizleri, mikrosistin biyosentez genlerinin tanımlanması, mikrosistin-LR'nin sentezinin ölçümü için kullanılmaktadır (60-64). Bu çalışmanın sonucu demirden eksik beslenmenin, *mcyD* transkripsiyonda artışa neden olduğunu desteklemektedir (58).

Xu ve ark. (65), insan WRL-68 hücre hatlarına uyguladıkları Mikrosistin-LR'nin (10 $\mu\text{g}$ /L) karaciğer miRNA ekspresyonunda değişikliklere neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Mikrosistin-LR etkisinin karaciğer metalloproteinase -2/-9 gen ifadesini değiştirdiği ve kanser hücre göçünü de uyardığı yine son zamanlarda yapılan çalışmalar arasındadır (66).

Proteomiks çalışmalarında Zebrafish'lerde intraperitoneal olarak Mikrosistin (0,5 LD<sub>50</sub>) (2.000  $\mu\text{g}$ /kg) verilmesinden sonra 24 protein

üzerine yapılan analizleri sonucu iskelet yapısı, oksidatif stres, glikolizis metabolizması, kalsiyum iyon bağlanamsı ve diğer biyolojik fonksiyonlarda değişiklikler gözlemlenmiştir. Aynı zamanda testislerde hasar ve dişi zebrafish'lerin üreme sisteminde oksidatif stresten dolayı hasar meydana gelmiştir (67).

## SONUÇ

Mikrosistinler, biyosentezi açıklanan ilk siyanobakteri toksinleridir. Mikrosistinin yaklaşık

90 izoformunun toksisite seviyeleri literatürlerde açıklanmıştır (52, 68, 69). Günümüzde özellikle karaciğer kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünde mikrosistinlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Hücre kültürü ve deney hayvanlarındaki çalışmalar sonucunda mikrosistinlerin genetik mekanizmalarının-yolaklarının belirlenmesi ve sistemik etkilerinin araştırılmasına devam edilmektedir. Bu tür çalışmalar sonucunda elde edilen veriler zehirlenmelerin, çeşitli organ ve doku hasarlarının ve kanser tedavilerinin başarılı bir şekilde ilerlemesinde önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000; 64(3): 573-606.
2. Pilotto L, Hobson P, Burch MD, Ranmuthugala G, Attewell R, Weightman W. Acute skin irritant effects of cyanobacteria (blue-green algae) in healthy volunteers. *Aust N Z J Public Health*, 2004; 28(3): 220-4.
3. Botes D, Wessels P, Kruger H, Runnegar M, Santikarn S, Smith R, Barna J, Williams D. Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *J Chem Soc*, 1985; 1: 2747-2748.
4. Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs*, 2010; 8(5):1650-80.
5. Moore RE, Chen JL, Moore BS, Patterson GML, Carmichael WW. Biosynthesis of microcystin-LR. Origin of carbons in the Adda and Masp units. *J Am Chem Soc*, 1991; 113: 5083-4.
6. Welker M, Von Dohren H. Cyanobacterial peptides nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 2006; 30: 530-63.
7. Ziegler K, Diener A, Herpin C, Richter R, Deutzmann R, Lockau W. Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin). *Eur J Biochem*, 1998; 254: 154-9.
8. Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CE, Antunes MB, de Melo Filho DA, Lyra TM, Barreto VS, Azevedo SM, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med*, 1998; 338: 873-8.
9. Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncol*, 2006; 7(8): 628-9.
10. Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicol*, 2002; 27:181-182: 441-6.
11. Gürbüz F, Metcalf JS, Karahan AG, Codd GA. Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. *Sci Total Environ*, 2009; 15: 407(13): 4038-46.
12. DeVries SE, Galey FD, Namikoshi M, Woo JC. Clinical and pathologic findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) intoxication in a dog. *J Vet Diagn Invest*, 1993; 5(3): 403-8.

13. Puschner B, Galey FD, Johnson B, Dickie CW, Vondy M, Francis T, Holstege DM. Blue-green algae toxicosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 1998; 1;213(11): 1605-7.
14. Frazier K, Colvin B, Styer E, Hullinger G, Garcia R. Microcystin toxicosis in cattle due to overgrowth of blue-green algae. *Vet Hum Toxicol*, 1998; 40(1): 23-4.
15. Fitzgerald SD, Poppenga RH. Toxicosis dueto microcystin hepatotoxins in three Holstein heifers. *J Vet Diagn Invest*, 1993; 5(4): 651-3.
16. Kerr LA, McCoy CP, Eaves D. Blue-green algae toxicosis in five dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, 1987; 1;191(7): 829-30.
17. Short SB, Edwards WC. Blue-green algae toxicoses in Oklahoma. *Vet Hum Toxicol*, 1990; 32(6): 558-60.
18. Galey FD, Beasley VR, Carmichael WW, Kleppe G, Hooser SB, Haschek WM. Blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) hepatotoxicosis in dairy cows. *Am J Vet Res*, 1987; 48(9): 1415-20.
19. Dillenberg HO, Dehnel MK. Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Can Med Assoc J*, 1960; 83(22): 1151-4.
20. Senior VE. Algal poisoning in Saskatchewan. *Can J Comp Med Vet Sci*, 1960; 24(1): 26-31.
21. Carbis CR, Mitchell GF, Anderson JW, McCauley I. The effects of microcystins on the serum biochemistry of carp, *Cyprinus carpio* L., when the toxins are administered by gavage, immersion and intraperitoneal routes. *J Fish Diseases*, 1996; 19(2): 151-9.
22. Li XY, Chung IK, Kim JI, Lee JA. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol*, 2004; 15: 44(8): 821-7.
23. Fischer WJ, Dietrich DR. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000; 164(1): 73-81.
24. Tencalla FG, Dietrich DR, Schlatter C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 1994; 30(3): 215-24.
25. Ibelings BW, Bruning K, de Jonge J, Wolfstein K, Pires LM, Postma J, Burger T. Distribution of microcystins in a lake foodweb: No evidence for biomagnification. *Microb Ecol*, 2005; 49(4): 487-500.
26. Runnegar MT, Gerdes RG, Falconer IR. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicol*, 1991; 29: 43-51.
27. Runnegar M, Berndt N, Kaplowitz N. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995; 134: 264-72.
28. Dawson RM. The toxicology of microcystins. *Toxicol*, 1998; 36: 953-62.
29. Eriksson JE, Toivola D, Meriluoto JA, Karaki H, Han YG, Hartshorne D. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; 173: 1347-53.
30. Sahin A, Tencalla FG, Dietrich DR, Mez K, Naegeli H. Enzymatic analysis of liver samples from rainbow trout for diagnosis of blue-green algae-induced toxicosis. *Am J Vet Res*, 1995; 56: 1110-5.
31. Krishnamurthy T, Carmichael WW, Sarver EW. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicol*, 1986; 24: 865-73.
32. Dittmann E, Börner T. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005; 203(3):192-200.
33. Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe MF, Harada K, Ichihara A, Carmichael WW, Fujiki H. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1990; 116: 609-14.
34. Nishiwaki S, Fujiki H, Suganuma M, Nishiwaki-Matsushima R, Sugimura T. Rapid purification of protein phosphatase 2A from mouse brain by microcystin-affinity chromatography. *FEBS Lett*, 1991; 279: 115-8.
35. Falconer IR. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ Toxicol Water Qual*, 1991; 6: 177-84.
36. Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1992; 118: 420-4.



37. Yu S. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 1995; 10: 674-82.
38. Tanabe Y, Sano T, Kasai F, Watanabe MM. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (mcy) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC Evol Biol*, 2009; 9:115.
39. Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Dohren H, Borner T, Neilan BA. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol*, 2000; 7: 753-64.
40. Christiansen G, Fastner J, Erhard M, Borner T, Dittmann E. Microcystin biosynthesis in planktothrix: genes, evolution, and manipulation. *J Bacteriol*, 2003; 185: 564-72.
41. Rouhiainen L, Vakkilainen T, Siemer BL, Buikema W, Haselkorn R, Sivonen K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl Environ Microbiol*, 2004; 70: 686-92.
42. Hicks LM, Moffitt MC, Beer LL, Moore B, Kelleher NL. Structural characterisation of in vitro and in vivo intermediates on the loading module of microcystin synthetase. *ACS Chem Biol*, 2006; 1: 93-102.
43. Nishizawa T, Asayama M, Shirai M. Cyclic heptapeptide microcystin biosynthesis requires the glutamate racemase gene. *Microbiology*, 2001; 147: 1235-41.
44. Sielaff H, Dittmann E, Tandeau De Marsac N, Bouchier C, Von Dohren H, Borner T, Schwecke T. The mcyF gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from *Microcystis aeruginosa* encodes an aspartate racemase. *Biochem J*, 2003; 373: 909-16.
45. Pearson LA, Barrow KD, Neilan BA. Characterization of the 2-hydroxy-acid dehydrogenase McyI, encoded within the microcystin biosynthesis gene cluster of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *J Biol Chem*, 2007; 282: 4681-92.
46. Pearson LA, Hisbergues M, Borner T, Dittmann E, Neilan BA. Inactivation of an ABC transporter gene, mcyH, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl Environ Microbiol*, 2004; 70: 6370-8.
47. Shi L, Carmichael WW, Miller I. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Arch Microbiol*, 1995; 16: 7-15.
48. Young FM, Thomson C, Metcalf JS, Lucocq JM, Codd GA. Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *J Struct Biol*, 2005; 151: 208-14.
49. Kaebnick M, Neilan BA, Borner T, Dittmann E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol*, 2000; 66: 3387-92.
50. Mikalsen B, Boison G, Skulberg OM, Fastner J, Davies W, Gabrielsen TM, Rudi K, Jakobsen KS. Natural variation in the microcystin synthetase operon mcyABC and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J Bacteriol*, 2003; 185: 2774-85.
51. Tooming-Klunderud A, Mikalsen B, Kristensen T, Jakobsen KS. The mosaic structure of the mcyABC operon in *Microcystis*. *Microbiology*, 2008; 154: 1886-99.
52. Sivonen K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1990; 56: 2658-66.
53. Lukac M, Aegerter R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 1993; 31: 293-305.
54. Van der Westhuizen AJ, Eloff JN. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta*, 1985; 163: 55-9.
55. Song L, Sano T, Li R, Watanabe M, Liu Y, Kaya K. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycol Res*, 1998; 42: 19.
56. Davis TW, Berry DL, Boyer GL, Gobler CJ. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, 2009; 8 : 715-25.
57. Tonk L, Visser PM, Christiansen G, Dittmann E, Snelder EO, Wiedner C, Mur LR, Huisman J. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl Environ Microbiol*, 2005; 71: 5177-81.

58. Sevilla E, Martin-Luna B, Vela L, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environ Microbiol*, 2008; 10: 2476-83.
59. Kaebernick M, Dittmann E, Borner T, Neilan BA. Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Appl Environ Microbiol*, 2002; 68: 449-55.
60. Meissner K, Dittmann E, Borner T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol Lett*, 1996;135: 295-303.
61. Dittmann E, Meissner K, Borner T. Conserved sequences of peptide synthetase genes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Phycologia*, 1996; 35: 62-7.
62. Neilan BA, Dittmann E, Rouhiainen L, Bass RA, Schaub V, Sivonen K, Borner T. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J Bacteriol*, 1999; 181: 4089-97.
63. Kurmayer R, Kutzenberger T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69: 6723-30.
64. Kurmayer R, Dittmann E, Fastner J, Chorus I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb Ecol*, 2002; 43: 107-8.
65. Zhang Z, Zhang XX, Qin W, Xu L, Wang T, Cheng S, Yang L. Effects of microcystin-LR exposure on matrix metalloproteinase-2/-9 expression and cancer cell migration. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012; 77: 88-93.
66. Xu L, Qin W, Zhang H, Wang Y, Dou H, Yu D, Ding Y, Yang L, Wang Y. Alterations in microRNA expression linked to microcystin-LR-induced tumorigenicity in human WRL-68 Cells. *Mutat Res*, 2012; 18: 743(1-2): 75-82.
67. Zhao S, Xie P, Li G, Jun C, Cai Y, Xiong Q, Zhao Y. The proteomic study on cellular responses of the testes of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to microcystin-RR. *Proteomics*, 2012; 12(2): 300-12.
68. Srivastava A, Choi GG, Ahn CY, Oh HM, Ravi AK, Asthana RK. Dynamics of microcystin production and quantification of potentially toxigenic *Microcystis* sp. using real-time PCR. *Water Res*, 2012; 1: 46(3): 817-27.
69. Cantor GH, Beckonert O, Bollard ME, Keun HC, Ebbels TM, Antti H, Wijsman JA, Bible RH, Breaux AP, Cockerell GL, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Integrated histopathological and urinary metabolomic investigation of the pathogenesis of Microcystin-LR toxicosis. *Vet Pathol*, 2012; in press.

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

Dear Editor,

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

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

(...)1) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

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

(...)2) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

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

(...)3) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

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

(...)4) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

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

(...)5) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

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

Not / Note : 1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)  
2. Formu aşağıdaki adrese faks/posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below by faks or mail or deliver personally.

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU / PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

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

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

Tel/Phone : +90 312 565 55 79

Faks/Fax : +90 312 565 54 55

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





