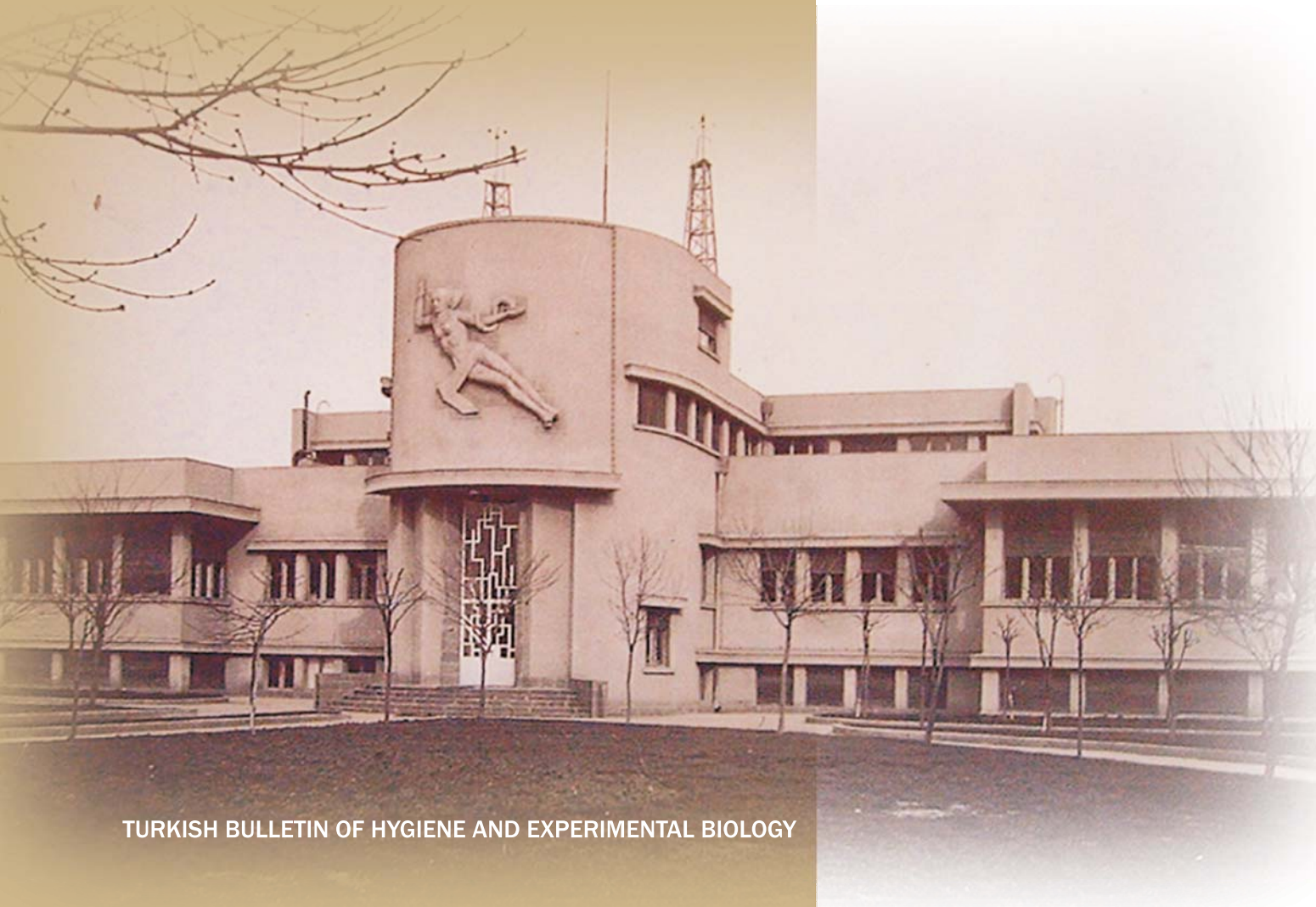




T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 65 ■ Sayı/Number 2 ■ Yıl/Year 2008





T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI

ISSN 0377-9777
e - ISSN 1308-2523

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 65 ■ Sayı/Number 2 ■ Yıl/Year 2008

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Türk Hij Den Biyol Derg

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

Sahibi

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı adına
Başkan Doç. Dr. Mustafa ERTEK

EDİTÖR

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN

THDBD YAYIN KURULU

EDİTÖR YARDIMCILARI

Canan BAYAR
Selçuk KILIÇ

YAYIN KURULU

Sühendan ADIGÜZEL
Cahit BABÜR
Bekir ÇELEBİ
Arşun ESMER
Sibel KARACA
Nesrin KARACA
Ayşe PEKER ÖZKAN
Saime ŞAHİNÖZ
Serpil TURHAN
Pınar ÜNAL

TEKNİK KURUL

Murat DUMAN
Hüseyin GÖL
Zeynep KÖSEOĞLU

ER YAYIN KURULU

EDİTÖR

Ayşegül GÖZALAN

EDİTÖR YARDIMCILARI

Demet KURTOĞLU
Figen SEZEN SEVİMLİ
Berna SEZGİN

REFİK SAYDAM HIFZISSIHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI
REFİK SAYDAM NATIONAL HYGIENE PRESIDENCY
ANKARA - TÜRKİYE

Senede üç defa çıkar
The bulletin is issued three times a year

YAYINEVİ

 RNA

Grafik Tasarım
RNA Multimedia

İletişim

4. Cadde 70. Sokak 2/8
Çankaya/ANKARA

Tel: 0312 482 82 66(pbx)

Faks: 0312 482 76 29

e-posta: info@rnasaglik.com.tr

Baskı ve Cilt

Pulat Basımevi

ANKARA

Tel: 0312 256 60 02

pulatbasimevi@hotmail.com

Yayın Türü

Yerel Süreli Yayın

Basım Tarihi

Kasım 2008

TÜRK HİJYEN ve DENEYSSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

YAZI İNCELEME KURULU/EDITORIAL BOARD

- Adem KILIÇ, Gebze YTE, Kocaeli
Adil ALLAHVERDİYEV, Yıldız Tek. Üniv., Kimya Fak., İstanbul
Ahmet KART, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara
Ali ALBAY, GATA, Ankara
Alper AKÇALI, 18 Mart Üniv., Tıp Fak., Çanakkale
Aşkın YAŞAR, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara
Ayhan FİLAZİ, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara
Aykut ÖZKUL, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara
Ayşen GÜNEL ÖZCAN, Kırıkkale Üniv., Tıp Fak., Kırıkkale
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, RSHM, Ankara
Bülent ALTEN, Hacettepe Üniv., Fen Fak., Ankara
Celal GÖKÇAY, ODTÜ, Çevre Müh., Ankara
Cemal ÇEVİK, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara
Cumhur ÇÖKMÜŞ, Ankara Üniv., Fen Fak., Ankara
Çağatay GÜLER, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara
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., USA
Ender YARSAN, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara
Fatih KÖKSAL, Çukurova Üniv., Tıp Fak., Adana
Gönül ŞAHİN, Hacettepe Üniv., Eczacılık Fak, Ankara
Hakan LEBLEBİCİOĞLU, 19 Mayıs Üniv., Tıp Fak., Samsun
Haluk VAHABOĞLU, Kocaeli Üniv., Tıp Fak., Kocaeli
Hasan AYÇİÇEK, GATA, Ankara
Hürrem BODUR, Numune Eğ. & Arş. Hast., Ankara
Işıl MARAL, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara
İrfan EROL, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara
Kosta Y. MUMCUOĞLU, Hebrew Üniv., Israel
Levent AKIN, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara
M.Koray SAKAR, Hacettepe Üniv., Eczacılık Fak., Ankara
Mahinur AKKAYA, ODTÜ, Kimya Müh., Ankara
Mehmet Ali ONUR, Hacettepe Üniv. Fen Fak., Ankara
Metin KORKMAZ, Ege Üniv., Tıp Fak., İzmir
Murat GÜLMEZ, Kafkas Üniv., Vet. Fak., Kars
Murat GÜNAYDIN, 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
Nejat AYDIN, Ankara Üniv., Vet. 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
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
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
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 yazılarda aşağıdaki kurallar aranır:

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

- Yazının başlığı kısa olmalı ve büyük harfle yazılmalıdır.
- Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.
- Akademik unvan kullanılmadan meslek unvanı belirtilebilir.
- Makale birden fazla yazar tarafından yazılmış ise, aynı ünite de çalışan yazarların soyadları sonuna aynı miktarda yıldız konur.
- Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse dipnot olarak belirtilmelidir.
- Makale, kongre/sempozyumda sunulmuşsa mutlaka sunum türü ile birlikte belirtilmelidir.

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

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

4-Yazılar bir zorunluluk olmadıkça "miş'li geçmiş" zaman edilgen kip ile yazılmalıdır.

5-A4 kağıtların yalnız bir yüzü kullanılmalı, kenarlardan 3'er cm boşluk bırakılmalıdır. 12 punto Times New Roman yazı karakteri kullanılmalı, 2 satır aralığı (double space) bulunmalıdır.

6-Metinlerin tamamı 3,5" diskete veya CD'ye kopyalanmış olarak ve basılmış üç nüsha ile bir zarf içinde gönderilmelidir. İliştirilen bir üst yazıda metnin tüm yazarlarca okunduğu ve onaylandığı, yazıların yayına kabul edilmesi halinde telif hakkının dergiye devredileceği belirtilmelidir.

7-Yayımlanmış gereçleri yeniden basmak veya deney konusu olan insanların fotoğraflarını kullanmak için alınan izinler, insanlar üzerinde ilaç kullanarak yapılan klinik araştırmalarda ilgili "Kurum Etik Kurul Onayı" ve gönüllülerden yazılı bilgilendirme ile olur alındığına dair belgeler birlikte gönderilmelidir.

8-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 kalın yazılmalıdır. İngilizce makalelerde Türkçe Başlık ve Özet bulunmalıdır.

Türkçe Özet: Amaç, Yöntem, Bulgular ve Tartışma alt başlıklarından oluşmalıdır (yapılandırılmış özet) ve en az 100, en fazla 250 sözcük içermelidir.

İngilizce Özet (Abstract): Başlığı İngilizce olmalıdır. Türkçe Özet bölümünde belirtilenleri birebir karşılayacak şekilde yapılandırılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Türkçe ve İngilizce Özetlerin altında verilmelidir. Anahtar kelime sayısı 3-8 arasında olmalı ve Index Medicus Medical Subject Headings'de (MeSH) yer alan sözcükler kullanılmalıdır.

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.

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: Gerekli görülüyorsa Kaynaklar bölümünden hemen önce belirtilmelidir.

Kaynaklar: Metnin içinde geçiş sırasına göre numaralandırılmalıdır. Numaralar, parantez içinde cümle sonlarında verilmelidir. Kaynakların yazılımlı mutlaka aşağıdaki örnekler uygun olmalıdır:

Kaynak bir dergi ise: 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 üçünü yazıp et al. "ve arkadaşları" eklenmelidir) Makalenin başlığı, Derginin Index Medicus'a uygun kısaltılmış ismi, Yıl; Cilt (Sayı): İlk ve son sayfa numarası.

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 Parazitol Derg.* 2001; 25 (3): 234-5.

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

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

Kaynak bir kitap ise: Yazar(lar)ın Soyadı Adının baş harf(ler)i. Kitabın Adı. Kaçınca basım olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı.

Örnek: Eisen HN. Immunology: an Introduction to Molecular and Cellular Principles of the Immune Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974: 406.

Kaynak kitabın bir bölümü ise: Bölüm yazar(lar)ının Soyadı, Adının başharf(ler)i. Bölüm başlığı. In: Editör(ler)in Soyadı, Adının başharf(ler)i ed/eds. Kitabın Adı. Kaçınca basım olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı: Bölümün ilk ve son sayfa numarası.

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

Kaynak bir web adresi ise: Web adresi, bilgiye ulaşın tarih belirtilmelidir.

Şekil ve Tablolar: Her tablo (şekil, grafik, fotoğraf) 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 olmalıdır. Baskı kalitesinin artırılması için gerekli olduğu durumlarda fotoğrafların orijinal halleri talep edilebilir. Maksimum 127x173 mm ebadında, kaliteli, parlak kağıda basılmış olan fotoğrafların arkasına makale başlığı ve şekil numarası yazılıp ayrı bir zarf içinde yazıya eklenmelidir.

b) **Derleme türü yazılarda**; yazar sayısı ikiden fazla olmamalı ve yazar daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olmalıdır. Derlemelerde İngilizce özet, İngilizce ve Türkçe anahtar sözcükler bulunmalıdır.

c) **Olgu sunumlarında** Türkçe ve İngilizce başlık ve özet, anahtar sözcükler yer almalı, giriş, olgu ve tartışma bölümleri bulunmalıdır. Olgu sunumlarında metin yedi sayfayı, kaynak sayısı 20'yi aşmamalıdır.

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

9- Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

10- Yazılar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

11-Yazılar aşağıdaki adrese gönderilmeli veya elden teslim edilmelidir.

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

1)Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı yayınıdır.

2)Dergide Mikrobiyoloji, İmmünoloji, 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 ve derleme türündeki makaleler yayımlanır.

3)Dergi dört ayda bir çıkar ve üç sayıda bir cilt tamamlanır.

4)Dergide, daha önce başka yerde yayınlanmamış ve yayınlanmak üzere başka bir dergide inceleme aşamasında olmayan makaleler yayımlanır.

5)Dergi Yayın Kurulu ve Bilimsel Danışma Kurulu tarafından uygun görülen yazılar, konu ile ilgili üç Bilimsel Danışma Kurulu Üyesinden ikisinin olumlu görüşü alındığında yayımlanmaya hak kazanır. Bu kurulların, yazının içeriğini değiştirmeyen her türlü düzeltme ve kısaltmaları yapma yetkileri vardır.

6)Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlarına aittir.

7)Dergide yayınlanan yazıların yayın hakkı Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne aittir. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

YAZAR İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

- Makalenin yayınlanması ile ilgili dilekçe yazıldı.
- Bütün yazarlarca isim sırasına göre imzalanmış telif hakkı devir formu eksiksiz olarak dolduruldu.
- Özetler, tablolar, kaynaklar vb. dahil olmak üzere metnin tamamı çift aralıklı yazıldı.
- 12 punto ya da 3 mm boyutunda Times New Roman karakteri ile yazıldı.
- Metin sayfanın yalnız bir yüzüne yazılarak her bir kenardan 3 er cm boşluk bırakıldı.
- 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 (<250) kontrol edildi.
- Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (Mesh'e uygun) verildi.
- Tüm kısaltmalar gözden geçirildi ve standart olmayan kısaltmalar düzeltilti.

- Metin içinde geçen orijinal Latince mikroorganizma isimleri italik olarak yazıldı.
- Tablolar yazım kurallarına uygun olarak ve her biri ayrı bir sayfada verildi.
- Kimyasal formüller ve grafikler yazım kurallarına uygun olarak ve her biri ayrı bir sayfada olacak şekilde hazırlandı.
- Fotoğraf boyutları maksimum 127x173 mm olup, arkasına makale başlığı ve şekil numaraları yazıldı.
- 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 noktalama- lar yazım kurallarına uygun hale getirildi.
- Makale üç kopya olacak şekilde hazırlandı ve disket/ CD'ye kopyalandı.
- Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız:
 - * Etik kurul onayı alındı.
 - * Bilimsel kuruluş ve/veya fon desteği belirtildi.
 - * Kongre/Sempozyumda sunumu ve sunum türü belirtildi.

YAZARLARIN DİKKATİNE

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi' nin yeniden yapılanması nedeniyle, 2007 yılından itibaren geçerli olmak üzere bazı değişiklikler yapılmıştır. Bu nedenle yazarlarımızın makale gönderirken "yeni yazım kuralları ve yayın ilkelerine" göre yazılarını hazırlamaları son derece önemlidir. Yazarlarımız için "telif hakkı devir formu" örneği derginin arka sayfasında sunulmuştur. Her türlü soru, öneri ve şikayetleriniz için Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi İletişim ve Halkla İlişkiler Koordinatörlüğü ile irtibata geçebilirsiniz ve bilgi alabilirsiniz.

İLETİŞİM

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi
Yayın ve Dokümantasyon Müdürlüğü
Cemal Gürsel Caddesi No: 18
06100 Sıhhiye/ANKARA

Tel: +90 0312 458 23 64

Faks: +90 0312 458 24 08

e-posta: turkhijyen@rsh.gov.tr

http: www.rsh.gov.tr

İÇİNDEKİLER

Araştırma makalesi

- 1. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Koagülaz Negatif Stafilokokların Tiplendirilmesi ve Metisilin Direnci** 61-66
Nimet YİĞİT, Ayşe Esin AKTAŞ, Funda DOĞRUMAN-ALP, Ahmet AYYILDIZ
- 2. Zoonotik Enfeksiyonlardan Q Ateşi, Listerioz, Toksoplazmoz ve Kistik Ekinokkoz'un Risk Grubunda Seroprevalansının Araştırılması** 67-73
Bekir ÇELEBİ, Cahit BABÜR, Selçuk KILIÇ, Ahmet ÇARHAN, Berrin ESEN, Mustafa ERTEK
- 3. Trichomonas vaginalis Saptanmasında Direkt Mikroskopî İle İn-vitro Kültürünün Karşılaştırılması** 75-80
Gülden SÖNMEZ TAMER, Nevrim DÜNDAR, Şeyda ÇALIŞKAN, Emek DOĞER
- 4. Malatya İlinde Belediyede Çalışan Temizlik İşçilerinin Toxoplasmosis ve Listeriosis Seropozitifliği Yönünden Değerlendirilmesi** 81-85
Tuncay ÇELİK, Ülkü KARAMAN, Bekir ÇELEBİ, Ayşe TURAN, Cahit BABÜR, Nilgün DALDAL

Derleme

- 5. Enterokok Türlerinde Glikopeptid Grubu Antibiyotiklere Direncin Moleküler Mekanizmaları ve Gen Aktarım Yolları** 87-96
Arzu ÇÖZLERİ, Cumhuri ÇÖKMÜŞ
- 6. Akrep Antivenom Üretimi** 97-108
Özcan ÖZKAN

CONTENTS

Original Article

- 1. Identification of Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Blood Cultures and Determination of their Methicillin Resistance** 61-66
Nimet YİĞİT, Ayşe Esin AKTAŞ, Funda DOĞRUMAN-ALP, Ahmet AYYILDIZ
- 2. Investigation of Q fever, Listeriosis, Toxoplasmosis and Cystic Echinococcosis Seroprevalence in Risk Group** 67-73
Bekir ÇELEBİ, Cahit BABÜR, Selçuk KILIÇ, Ahmet ÇARHAN, Berrin ESEN, Mustafa ERTEK
- 3. Comparison of Direct Microscopy and In-Vitro Cultures in Detection of *Trichomonas vaginalis*** 75-80
GülDen SÖNMEZ TAMER, Nevrin DÜNDAR, Şeyda ÇALIŞKAN, Emek DOĞER
- 4. Evaluation of the Municipality Dustmen in Terms of Toxoplasmosis and Listeriosis Seropositivity in Malatya** 81-85
Tuncay ÇELİK, Ülkü KARAMAN, Bekir ÇELEBİ, Ayşe TURAN, Cahit BABÜR, Nilgün DALDAL

Review

- 5. Molecular Mechanisms of Resistance to Glycopeptide Antibiotics in *Enterococcus* Species and Modes of Gene Transfer** 87-96
Arzu ÇÖZLERİ, Cumhur ÇÖKMÜŞ
- 6. Scorpion Antivenom Production** 97-108
Özcan ÖZKAN

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KOAGÜLAZ NEGATİF STAFİLOKOKLARIN TIPLENDİRİLMESİ VE METİSİLİN DİRENCİ

Identification of Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Blood Cultures and Determination of their Methicillin Resistance

Nimet YİĞİT¹, Ayşe Esin AKTAŞ², Funda DOĞRUMAN-AL³, Ahmet AYYILDIZ²

¹Atatürk Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri MYO.,
Tıbbi Laboratuvar Bölümü,
ERZURUM

²Atatürk Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik
Mikrobiyoloji Abd.,
ERZURUM

³Gazi Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Abd.,
ANKARA

İletişim:
Nimet YİĞİT
Atatürk Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri
Meslek Yüksek Okulu,
Tıbbi Laboratuvar Bölümü,
Aziziye Araştırma
Hastanesi Binası
Yenişehir / ERZURUM
Gsm : 0533 467 87 17
Faks : 0442 315 60 44
e-posta: nimyigit@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Koagülaz negatif stafilocoklar (KNS) klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık izole edilen bakteri gruplarından biridir. Tıpta uygulanan invaziv teknikler ve prostetik cihaz kullanımının artmasından dolayı bu bakterilerin hastane kaynaklı bakteriyemilerde önemi artmaktadır. Bu çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen toplam 50 KNS suşunun tür düzeyinde tanımlanması ve metisilin direncinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İzole edilen suşların tür tayini API STAPH tiplendirme sistemi, metisilin direnci disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Bulgular: KNS suşları API STAPH tiplendirme sistemi ile 10 tür olarak sınıflandırılmıştır. *Staphylococcus epidermidis* (%36), *S. choromogenes* (*S. hyicus* subs. *chromogenes*) (%12) ve *S. haemolyticus* (%10)'un en sık bulunan türler olduğu belirlenmiştir, beş izolatın ise tiplendirilmesi yapılamamıştır. Suşların 20 (%40)'inde metisiline direnç saptanmıştır.

Sonuç: Koagülaz negatif stafilocoklar kan kültürlerinden sıklıkla izole edilmekte ve metisilin dirençleri artmaktadır. Klinik önemi olan KNS'lerin tiplendirilmesi ve metisilin dirençlerinin belirlenmesi özellikle hastane kaynaklı bakteriyemiler açısından önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Koagülaz negatif stafilocok, tiplendirme, metisilin direnci

ABSTRACT

Objective: As a group, the coagulase-negative staphylococci (CNS) are among the most frequently isolated bacteria in the clinical microbiology laboratories. They are becoming increasingly important as causative agents of hospital-acquired bacteraemia, with the increasing use of prosthetic devices and other invasive technologies in medical institutions. In this study, the aim was to identify the species level of 50 strains of CNS from isolated blood cultures and to determine their susceptibility against methicillin.

Method: The strains were identified using by API STAPH identification system. The 50 CNS strains were evaluated for susceptibility against methicillin by disk diffusion method.

Results: The CNS strains were classified into ten species by the API STAPH system. *Staphylococcus epidermidis* (36%), *S. choromogenes* (*S. hyicus* subs. *chromogenes*) (12%) and *S. haemolyticus* (10%) were the most frequent species and five of isolates were not identified. The rate of resistance to methicillin were 20 (40%) in these strains.

Conclusion: Coagulase-negative staphylococci (CNS) are common isolates from blood cultures, and an increasing proportion is now methicillin resistant. The need for species identification of clinically significant CNS and the methicillin resistance must be emphasized.

Key Words: Coagulase negative staphylococci (CNS), identification, methicillin resistance

GİRİŞ

Günümüze kadar 40 stafilokok türü tanımlanmıştır. Önceleri stafilokok cinsi içinde sadece *Staphylococcus aureus* patojen olarak tanımlanmakta, koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) ise nadir patojen ve daha çok fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak bilinmekteydi. KNS'ler cildin normal florası içinde yer alan bakteriler olup, genellikle konakla selim ilişkiler içinde saprofit olarak bulunmaktadır (1). Ancak cilt travması, intravenöz kateter kullanılması gibi invaziv girişimlerde ve şant sistemleri, yapay kalp kapakçığı, eklem protezi bulunması durumunda bu yabancı cisimlerin yüzeyine yapışabilme, immün sistemden kaçabilme veya bu sistemi kırabilme yeteneklerine bağlı olarak çoğalmakta ve konağı zarara uğratabilecek ürünleri oluşturarak enfeksiyon meydana getirmektedirler (2, 3).

Günümüzde KNS'ler hastane kaynaklı bakteriyemilerin başlıca nedenidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda KNS'lerin hastanelerde en sık görülen beş enfeksiyon etkeninden biri olduğu belirlenmiş ve özellikle kan kültürlerinden *Escherichia coli* ve *S. aureus*'tan sonra sıklıkla izole edilmeye başlanmıştır (2-4). Özellikle hastane ortamlarında yoğun antibiyotik kullanımının bir sonucu olarak metisiline dirençli KNS'ler enfeksiyon etkeni olarak izole edilmektedir. KNS'lere bağlı enfeksiyonlardaki beklenmeyen artış ve antibiyotiklere gösterdikleri direnç bu bakterilerin tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ile ilgili çalışmaların da artmasına neden olmuştur (4, 5).

Önemli insan patojenleri haline gelen KNS'lerin tiplendirilmesi ve antimikrobiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi, enfeksiyonların tedavisinde de klinik açıdan oldukça önem taşımaktadır. KNS'lerin tiplendirilme yöntemleri arasında biyotiplendirme, serotiplendirme, antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi, faj tiplendirilmesi, DNA hibridizasyon çalışmaları sayılabilir. Son zamanlarda stafilokok türlerinin ayrımında kullanılmak üzere geliştirilmiş, biyokimyasal testlere ve yağ asiti analizlerine dayalı

ticari sistemler kullanıma sunulmuştur. API STAPH Ident System, mikrobiyal identifikasyon sistem (MIS) ve Micro Scan gibi ticari otomasyon sistemleri hızlı tanı amacıyla kullanılmaktadır ve bu sistemler koagülaz negatif stafilokokların tür düzeyinde tanısını olanaklı kılmaktadır (6-9).

Bu çalışmada, laboratuvarımızda kan kültürlerinden izole edilen KNS'lerin tiplendirilmesi ve metisilin dirençlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na değişik kliniklerden gönderilen ve BACTEC (Becton-Dickinson 9240) otomotize kan kültür sisteminde inkübasyona bırakılarak, pozitif sinyal alınan kültür şişelerinden %5 koyun kanlı agar ve EMB (Eozin Metilen Blue) agar besiyerlerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir. Koloni yapısı, boyanma özellikleri ve mikroskopik görünümü stafilokoklar ile uyumlu olan plaklar ayrılarak katalaz testi ile streptokoklardan, basitrasin deneyi ile mikrokoklardan ayrımı yapıldı. Stafilokok olarak belirlenen suşlara tüp koagülaz testi uygulanarak koagülaz pozitif ve negatif olanlar saptanmıştır. Koagülaz negatif olarak belirlenen 50 stafilokok suşunun, API STAPH (bio-Mérieux, France) tiplendirme sistemi kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda tür düzeyinde tanımlanmaları yapılmıştır.

Tanımlanan suşların metisilin direnci disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu işlem için 50 KNS suşundan Mcfarland 0,5 bulanıklığına denk gelen süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlar Mueller-Hinton agar besiyerlerine yayılarak ve üzerlerine metisilin diskleri (5mg Oxoid) yerleştirilerek 35°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonrasında zon çapları ölçülerek sonuçlar değerlendirilmiştir. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standartlarına göre zon çapı >14 mm olanlar metisiline duyarlı, zon çapı 10-13 mm olanlar orta duyarlı, zon

çapı <9 mm olanlar dirençli olarak değerlendirilmiştir (10).

BULGULAR

Çalışmamızda, 50 KNS suşu izole edilmiş bunların 18'i *S. epidermidis*, altısı *S. hyicus subs. chromogenes*, beşi *S. haemolyticus*, dördü *S. cohnii*, üçü *S. lentus*, üçü *S. hominis*, ikisi *S. saprophyticus*, ikisi *S. xylosum*, biri *S. capitis* ve biri *S. lugdunensis* olarak tiplendirilirken beşi tanımlanamamıştır. İzole edilen 50 KNS suşunun tür dağılımı ve yüzdeleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Bu çalışmada, en yüksek metisilin direnci *S. lentus* ve *S. saprophyticus* suşlarında, en düşük metisilin direnci ise *S. hyicus subs. chromogenes* suşlarında bulunmuştur. İdentifiye edilen 50 suşun 20 (%40)'si metisiline dirençli olup, dirençli suşların türlere göre dağılımı Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 1. İdentifiye edilen 50 KNS suşunun türlere göre dağılımı

KNS türleri	sayı	yüzde
<i>S. epidermidis</i>	18	36.0
<i>S. hyicus subs. chromogenes</i>	6	12.0
<i>S. haemolyticus</i>	5	10.0
<i>S. cohnii</i>	4	8.0
<i>S. lentus</i>	3	6.0
<i>S. hominis</i>	3	6.0
<i>S. saprophyticus</i>	2	4.0
<i>S. xylosum</i>	2	4.0
<i>S. capitis</i>	1	2.0
<i>S. lugdunensis</i>	1	2.0
Tanımlanamayan	5	10.0
Toplam	50	100.0

TARTIŞMA

Damar içi kateter enfeksiyonları, bakteriyemiler, cerrahi bölge enfeksiyonları, prostetik kapak endokarditleri, vasküler greft enfeksiyonları, prostetik

Tablo 2. 50 KNS suşunun metisilin direnç oranları

KNS suşları	Metisilin direnci	
	Sayı	Yüzde*
<i>S. epidermidis</i> (n:18)	9	50.0
<i>S. hyicus subs. chromogenes</i> (n:6)	1	16.6
<i>S. haemolyticus</i> (n:5)	2	40.0
<i>S. cohnii</i> (n:4)	1	25.0
<i>S. lentus</i> (n:3)	3	100.0
<i>S. hominis</i> (n:3)	1	33.3
<i>S. saprophyticus</i> (n:2)	2	100.0
<i>S. xylosum</i> (n:2)	0	0
<i>S. capitis</i> (n:1)	0	0
<i>S. lugdunensis</i> (n:1)	0	0
Tanımlanamayan (n:5)	1	20.0
Toplam (n:50)	20	40.0

*Yüzdeler satır yüzdesidir

eklem enfeksiyonları, kronik ambulator periton diyalizi ile ilişkili enfeksiyonlar, düşük doğum ağırlıklı bebeklerdeki yenidoğan enfeksiyonları, nötrojenik hastalarda enfeksiyonlar, KNS'lerin etken olarak sık görüldüğü enfeksiyonları oluşturmaktadır (1-3). KNS'lerin florada yaygın dağılımı ve bunların göreceli olarak yoğun oluşu klinik yorumlamayı güçleştirmektedir. KNS ile oluşan enfeksiyonların klinik tablosunun iyi bilinmesi gerekliliğinin yanı sıra klinik örnekten izole edilen KNS'lerin tür veya tiplerinin belirlenmesinin bu tür enfeksiyonlarda önem taşıdığı belirtilmektedir (4, 5).

KNS'ler içinde en sık izole edilen enfeksiyon etkeni *S. epidermidis* olup, hastane kaynaklı KNS bakteriyemilerin %74-92'sinden sorumludur. *S. epidermidis* enfeksiyonları, hastanın florasından ya da hastane personelinin taşınması ile cerrahi bölgenin kontaminasyonu sonucu ortaya çıkmanın yanı sıra ortopedik aygıt, intravenöz kateter, prostetik kalp kapakçığı, santal sinir sistemi şanti, periton diyaliz kateteri gibi girişimler ile gelişebilmektedir (2, 11, 12).

Ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalarda, klinik örneklerden *S. epidermidis* izole edilme oranı %36-44 arasında bildirilmiştir (1-7, 11-17). Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilen 50 KNS suşunun

18 (%36)'i *S. epidermidis* olarak tanımlanmış olup ilk sırada yer almaktadır.

Tiplendirme yöntemlerinin rutinde uygulanabilir hale gelmesi ile birlikte *S. epidermidis* dışındaki KNS'lerin tanımlanması ve bu suşların enfeksiyon etkeni olarak saptanma sıklığındaki artış dikkat çekmektedir. Bunlar arasında *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii* ve *S. simulans* sayılabilmektedir (1-7). KNS'ler içinde *S. haemolyticus*'un %2,1-24 arasında değişen oranlarda izole edildiği ve enfeksiyon etkeni olarak bazı çalışmalarda ikinci sıklıkla saptandığı belirtilmiştir (1-7, 11-17). Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilen 50 KNS suşunun 5 (%10)'i *S. haemolyticus* olarak tanımlanmış olup üçüncü sıklıkta izole edilmiştir.

S. saprophyticus önemli bir üropatojen olup ayrıca yara enfeksiyonu ve sepsis olgularından da izole edilmektedir. Değişik çalışmalarda kültürlerden *S. saprophyticus* izole edilme sıklığı %0,7-42,3 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (1-7, 11-17). Çalışmamızda *S. saprophyticus* %4 oranında izole edilmiştir.

S. lugdunensis ilk kez 1988 yılında tanımlanan koagülaz negatif stafilocok olup önemli bir fırsatçı patojendir. *S. lugdunensis* enfeksiyon etkeni olarak izole edilme oranının %1,1-7,1 arasında değiştiği belirtilmektedir. *S. cohnii* ise daha az sıklıkta izole edilen diğer bir KNS türü olup enfeksiyon etkeni olarak izolasyon oranları %0,2-2,5 arasında değişmektedir (1-7, 11-17). Bu çalışmada 50 KNS suşunun biri (%2) *S. lugdunensis*, dördü ise (%8) *S. cohnii* olarak tiplendirilmiştir.

S. chromogenes (*S. hyicus* subs. *chromogenes*)'in sıkça rastlanmayan nadir insan patojeni olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda bu türün %12 gibi yüksek bir oranda izole edilmesi dikkat çekicidir. *S. capitis*, *S. lentus*, *S. hominis*, *S. xylosus* ise daha az sıklıkta izole edilen KNS türleri içinde yer almaktadır.

KNS'ler üzerinde yapılan duyarlılık çalışmalarında, *S. aureus* türlerinden daha yüksek metisilin di-

renci gösterdikleri belirlenmiştir. Nozokomiyal KNS izolatlarının %60'ı metisiline dirençli olarak tespit edilmiştir (5, 18).

S. aureus gibi, insanlardan izole edilen KNS'lerin de yaklaşık %80-90'ı indüklenebilir beta laktamaz üretmektedir. Direnç mekanizmasında düşük afiniteli bir penisilin bağlayan protein (PBP-a) rol oynamaktadır. Bu proteini kodlayan mecA geni bu fenotipin bütün stafilocok izolatlarında ortaktır. Metisiline dirençli *S. epidermidis* türlerinin büyük bir çoğunluğu eritromisin, klindamisin ve gentamisine de direnç kazanmış durumdadır. *S. epidermidis* ve *S. haemolyticus* türlerinde glikopeptitlerin ve teikoplaninin MIC değerlerinde yükselme olduğu gözlenmektedir. Bu durum KNS'lerde çoklu ilaç direnç potansiyeli olduğunu göstermektedir (5, 18).

Ülkemizde KNS'de metisilin direncinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, Gün ve ark. (13) *S. epidermidis*'de %22,3, *S. saprophyticus*'da %20, *S. hominis*'de %10 oranında metisilin direnci belirlerken; *S. haemolyticus*, *S. capitis* ve *S. cohnii*'de metisilin direnci belirleyemediklerini bildirmişlerdir. Diler ve ark. (19) *S. epidermidis*'de %24, *S. saprophyticus*'da %20, *S. haemolyticus*'da %29, *S. hominis*'de %26, *S. cohnii*'de %37, *S. xylosus*'da %40, *S. lugdunensis*'de %34, *S. capitis*'de %28 ile tiplendirilemeyen KNS'lerde %33 oranında metisilin direnci belirlemişlerdir. Kocabeyoğlu ve ark. (20) *S. epidermidis*'de %32,6, *S. saprophyticus*'da %6,8 ve *S. haemolyticus*'da %11,1 oranında metisilin direnci saptamışlardır. Çavuşoğlu ve ark. (21) KNS'larda metisilin direncini %14 olarak, Diler ve ark. (19) *S. epidermidis*'te metisilin direncini %43,2, *S. saprophyticus*'da %40 oranında tespit etmişlerdir. Öğünç ve ark. (22) ise 124 KNS türünün %43,5'inde metisilin direnci belirlemişlerdir.

Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilerek tiplendirilen 50 KNS türünün 20 (%40)'inde metisilin direnci saptanmıştır. Direncin tiplere göre dağılımı *S. epidermidis*'de %50, *S. haemolyticus*'da %40, *S. cohnii*'de %25, *S. lentus*'da %100, *S. hominis*'de %33,3, *S.*

chromogenes'de %16,6 ve tiplendirilemeyen KNS'lerde %20 oranlarında saptanmıştır. Çalışmamızda da, diğer çalışmalarla uyumlu olarak yüksek oranlarda metisilin direnci olduğu belirlenmiştir.

Koagülaz negatif stafilokokların patojenik rollerini açıklamak güçtür. KNS'lerin isimlendirilmesi patojenik rollerini anlamayı sağlamakta ve epidemiyolojik çalışmalara yardımcı olmaktadır. Bu suşların antibiyotik duyarlılık paternleri birbirinden farklı ve direnç geliştirme potansiyelleri de oldukça yüksektir. Bu nedenle KNS türlerinin tanımlanması ve direnç durumunun belirlenmesi önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Akpaka PE, Christian N, Bodoaik NC, Smikle MF. Epidemiology of coagulase-negative Staphylococci isolated from clinical blood specimens at the university hospital of the West Indies. West Indian Medical Journal 2006; 55 (3):170-73.
2. Cunha RS, Sinzato YK, Silveira VA. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz 2004; 99(8): 855-60.
3. Shittu A, Lin J, Morrison D, Kolawole D. Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative staphylococci from nasal samples of medical personnel and students. J Med Microbiol 2006; 55: 317-24.
4. Minto Mce, Barelli C, Martinez R, Darini C. Identification and medical importance of coagulase-negative staphylococci species. Sao Paulo Med J 1999; 117(4):175-78.
5. Pal N, Ayyagari A. Species identification and methicillin resistance of coagulase negative staphylococci from clinical specimens. Indian J Med Res 1989; 89: 300-5.
6. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E, Öcalmaz Ş, Seber E. *Staphylococcus aureus*'un identifikasyonunda kullanılan üç metodun değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2004;34: 211-14.
7. Kireççi E, Aktaş AE. Stafilokok suşlarının gaz kromatografi metoduyla tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2004;34: 215-19.
8. Perry JD, Rennison C, Butterworth LA, Hopley ALJ, Gould FK. Evaluation of *S. aureus* ID a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41:5695-98.
9. Renenberg J, Rieneck JK, Gutschik E. Evaluation of Staph ID 32 system and Staph-Zym system for identification of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1995; 33:1150-53.
10. Clinical And Laboratory Institute (Çeviri Editör Gür D.): Antibiyotik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Onbeşinci Bilgi Eki, M100-S15; CLSI: Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2005.
11. Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. Microb Infect 2002;4:481-89.
12. Bannerman TL, Kleeman KT, Kloos WE. Evaluation of the vitek system gram-positive identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1993; 31:1322-25.
13. Gün H, Kısa Ö, Başustaoğlu AC ve ark. İdrardan izole edilen koagülaz negatif stafilokokların tiplendirilmesi, patojeniteleri ve antibiyotik duyarlılıkları. Gata Bülteni 1994; 36:311-16.
14. Akan ÖA, Özalp M, Şener B ve ark. Stafilokokların biyokimyasal tiplendirilmesi ve bilgisayar kullanımı. Mikrobiyol Bül 1992; 26: 103-7.
15. Kaymakçı G, Özbal Y. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokokların biyokimyasal özelliklerine göre tiplendirilmesi. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal Of Infection) 1997; 11 (2):107-11.
16. Fındık D, Tuncer İ, Kadioğlu G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen koagülaz negatif stafilokokların tiplendirilmesi ve slime faktör üretiminin araştırılması. Mikrobiyol Bül 1996; 30:19-24.
17. Bengisun JS, Palabıyıkolu İ. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 200 stafilokok suşunun tiplendirilmesi ve fusidik asit duyarlılıklarının in vitro değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1999; 29:44-6.
18. Peters G, Eiff CV and Herrmann M. Variable pattern of coagulase-negative staphylococci with causative agents in infections. Current Opinion In Infectious Diseases, 1995;8 (Suppl 1).
19. Diler M, Altanlar N, Emekdaş G. ve ark. Hastane ortamı ve cihazlardan izole edilen stafilokok suşlarında oksasilin, fusidik asit, mupirosin ve değişik diğer antibiyotiklere direncin araştırılması. XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-9 Ekim 1998 Antalya.

20. Kocabeyoğlu Ö, Koşar EY, Yenkök Z ve ark. Klinik örneklerden izole edilen stafilocok suşlarında metisilin direnci. *Ankem Derg* 1994; 8 (2):98.
21. Çavuşoğlu Ş, Sakarya S, Keskin K ve ark. Klinik örneklerden izole edilen stafilocoklar ve çeşitli gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının disk difüzyon yöntemiyle araştırılması. *ANKEM Dergisi* 1993; 7(2):75.
22. Öğünç D, Vural T, Çolak D ve ark. Klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli koagülaz negatif stafilocok suşlarının antibiyotiklere direnç özellikleri. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 1998; 12 (2):157-60.

ZOONOTİK ENFEKSİYONLARDAN Q ATEŞİ, LİSTERİOZ, TOKSOPLAZMOZ VE KİSTİK EKİNOKOKKOZ'UN RİSK GRUBUNDA SEROPREVALANSININ ARAŞTIRILMASI

Investigation of Q fever, Listeriosis, Toxoplasmosis and Cystic Echinococcosis Seroprevalence in Risk Group

Bekir ÇELEBİ, Cahit BABÜR, Selçuk KILIÇ, Ahmet ÇARHAN, Berrin ESEN, Mustafa ERTEK

¹Refik Saydam Hıfzıssıhha
Merkezi Başkanlığı,
ANKARA

İletişim:
Bekir ÇELEBİ
Refik Saydam Hıfzıssıhha
Merkezi Başkanlığı,
Salgın Hastalıklar Araşt. Müd.,
Cemal Gürsel Cad. No:18,
06100, Sıhhiye/ANKARA
Tel : 0 312 458 24 74
Faks : 0 312 458 24 08
e-posta: bekir.celebi@rshm.gov.tr
vetbekir@yahoo.com

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, Ankara ilinde zoonotik enfeksiyonlar için risk grubu olduğu düşünülen evcil hayvan kliniği ile uğraşan veteriner hekimler ve teknisyenlerinde, gönüllü hayvan severlerde Q ateşi, listerioz, toksoplazmoz ve kistik ekinokokkoz'un seroprevalansını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: 88'i veteriner hekim, 25'i veteriner teknisyeni, 14'ü gönüllü hayvan sever ve kontrol grubu olarak 20'si sağlık çalışanı olmak üzere alınan 147 serum örneği Q ateşi için İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT), listerioz için Osebold Aglütinasyon Testi (OAT), toksoplazmoz için Sabin Feldman Dye Testi (SFDT) ve kistik ekinokokkoz için İndirekt Hemaglütinasyon testi (IHA) ile incelenmiştir.

Bulgular: 88 veteriner hekimin 27 (%30,6)'si, 25 veteriner teknisyenin sekizi (% 32), 14 gönüllü hayvan severin dördü (%28,5) ve 20 kontrol grubunun biri (%5) *Coxiella burnetii* IgG antikorları yönünden seropozitif bulunmuştur. Veteriner hekimlerin OAT ile 27 (%30,6)'sinde, veteriner teknisyenlerinin dokuzunda (%36), gönüllü hayvan severlerin üçünde (%21,4) ve 20 kontrol grubunun birinde (%5) *Listeria* yönünden seropozitiflik belirlenmiştir. *Toxoplasma gondii* antikorları yönünden, veteriner hekimlerin %28,4'ünün, veteriner teknisyenlerinin %16'sının, gönüllü hayvan severlerin %50'sinin ve kontrol grubunun (%30) seropozitif olduğu saptanmıştır. Bir veteriner hekimde IHA testi ile 1/128 titrede kistik ekinokokkoz antikoruna varlığı bulunmuştur.

Sonuç: Ankara ilinde pet kliniği ile uğraşan veteriner hekimler ve teknisyenlerinde, gönüllü hayvan severlerde Q ateşi ve listerioz seroprevalansı yüksek olarak saptanmış ve kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Bu nedenle, risk grubunda olduğu düşünülen meslek çalışanları, zoonotik enfeksiyonlar yönünden bilinçlendirilmeli ve bölgede bu enfeksiyonların epidemiyolojik özellikleri araştırılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Q ateşi, listerioz, toksoplazmoz, kistik ekinokokkoz, seroprevalans.

ABSTRACT

Objective: This study was carried out to determine seroprevalence of Q fever, listeriosis, toxoplasmosis and cystic echinococcosis among pet veterinarians, veterinary technicians and animal lovers who are in close contact with animals.

Method: A total of 127 sera consisting of 88 veterinarians, 25 veterinary technicians and 14 animal lovers were tested for Q fever by using Indirect Fluorescence Antibody Test (IFAT), for listeriosis by Osebold Agglutination Test (OAT), for toxoplasmosis by Sabin Feldman dye test (SFDT), for cystic echinococcosis by Indirect Hemagglutination Test (IHA).

Results: Twentyseven out of 88 (30.6%) veterinarians, eight out of 25 (32%) veterinary technicians, and four out of 14 (28.5%) animal lovers and one out of 20 (%5) control group were found to be positive for the presence of *C. burnetii* IgG antibodies. By using OAT, listeriosis seropositivity were determined for 27 out of 88 (30.6%) veterinarians, nine out of 25 (36%)

veterinary technicians, three out of 14(21.4%) animal lovers and one out of 20 control group. SFDT results showed that 28, 4% of veterinarians, 16% of veterinary technicians, 50% of animal lovers and 6 out of 20 (%30) control group were positive. Only one serum sample belong to veterinarians was seropositive at 1/128 titer for cystic echinococcosis by IHA test.

Conclusion: In this study, it was determined that there was a high seroprevalence for Q fever and listeriosis between pet veterinarians, veterinary technicians and animal lovers who works in Ankara province and the result was statistically significant when compared with the control group ($P<0,05$). This study suggests that people, especially those who are close contact with animals, should be warned and informed about zoonotic infections. In addition, further studies should be performed to elucidate epidemiology of mentioned zoonotic infections in this region.

Key Words: Q fever, listeriosis, toxoplasmosis, cystic echinococcosis, seroprevalence.



GİRİŞ

Q ateşi, listerioz, toksoplazmoz ve kistik ekinokokkoz; hayvanları ve insanları etkileyen önemli zoonotik enfeksiyonlardır. Q ateşi; *Coxiella burnetii*'nin insalarda oluşturduğu ve tüm dünyada yaygın olarak görülen sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır (1). *Rickettsiaceae* ailesinin bir üyesi olan *C.burnetii*, vahşi ve evcil memeliler, kuşlar ve kene gibi artropotlar olmak üzere geniş bir rezervuara sahiptir. Hastalığın insana bulaşmasında en önemli rezervuarlar; koyun, keçi ve sığır gibi çiftlik hayvanlarıdır (2). Ancak seroepidemiolojik çalışmalarda köpekler ve kedilerde *C.burnetii* seropozitifliği yüksek bulunmuş ve bazı Q ateşi salgınlarında köpek ve kedilerin rezervuar olduğu ortaya konulmuştur (3-6). Etken, çiğ veya pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile sindirim sisteminden, deri ve mukozalardan veya kontamine tozların inhalasyonu ile insana bulaşmaktadır. *C.burnetii*'nin insanlara bulaşmasında en önemli yol inhalasyondur (1,2). Q ateşi genellikle mesleki bir hastalık olarak kabul edilmektedir ve çiftlik hayvanları ile temastaki kişiler, enfekte hayvanlarla çalışan laboratuvar personeli ve veteriner hekimler yüksek riskte olan meslek grupları olarak tanımlanmaktadır (7,8).

Listeria monocytogenes; doğada yaygın olarak bulunmasına rağmen listerioz insanlarda genellikle sporadik olarak görülmektedir (9). Enfekte hayvanların dışkı, süt ve uterus içeriğiyle çıkardığı etkenlerin oral yolla alınımını takiben endostoz ile intestinal epitelyum hücrelerine girmektedir. Bakterinin mononükleer fagositler hücreler içinde yaşama

yeteneği kan yolu ile yayılımını sağlamaktadır. Etken karaciğer, dalak, kemik iliği gibi organlara yerleşirken santral sinir sistemine organotropizim göstermektedir (10). *L.monocytogenes* enfeksiyon riskinin daha yüksek olduğu veteriner hekimler, tarım ve hayvancılıkla uğraşanlarda listerioz, asemptomatik seyirli veya deri ve gözde lokal enfeksiyon şeklinde de görülmektedir (11).

Toksoplazmoz; hücre içi bir protozoon olan *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu önemli bir zoonozdur. İnsanlar, memeli hayvanlar ve kanatlılar ara konak, kediler ise hem ara hem de son konak olarak rol oynarlar. Etken, insanlara çiğ veya az pişmiş etlerin tüketilmesi, kedi dışısındaki ookistler ile kontamine olmuş sebze ve meyvelerin yeterince yıkanmadan yenilmesi sonucu bulaşmaktadır (12). Toksoplazmoz genellikle asemptomatik veya hafif semptomlarla seyirli klinik tablo ortaya koyar fakat hamilelerde genellikle ilk trimesterde ciddi konjenital enfeksiyonlara yol açar (13).

Ekinokokkoz, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis* ve *Echinococcus vogeli*'nin oluşturduğu; sıklıkla karaciğer ve akciğerde olmak üzere birçok doku ve organa yerleşebilen paraziter zoonotik bir hastalıktır. Parazitin erişkin şekli, kesin konak olan köpekgillerin bağırsağında bulunur ve dışkılamaları ile parazit yumurtaları çevreye yayılır. İnsanların (ara konak) kontamine besinleri sindirim yoluyla almaları sonucu parazit yumurtaları içindeki onkosfer (embriyo) bağırsak duvarından geçerek karaciğer ve akciğer başta olmak üzere diğer organlara yerleşerek ekinokokkoza neden olur.

E.granulosus larvalarının (metasestodunun) neden olduğu kistik ekinokokkoz halen dünyada ve Türkiye'de önemli bir halk sağlığı sorunudur (14,15).

Bu çalışmada Ankara Bölgesinde, zoonotik enfeksiyonlar yönünden risk gruplarını oluşturduğu düşünülen evcil hayvan kliniği işleten veteriner hekimlerde, veteriner teknisyenlerinde ve gönüllü hayvan severlerde Q ateşi, listerioz, toksoplazmoz ve kistik ekinokokkoz'un seroprevalansının saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 88'i veteriner hekim, 25'i veteriner teknisyeni, 14'ü hayvan sever ve kontrol grubu olarak 20'si sağlık çalışanı olmak üzere toplam 147 kişiden kan örneği alınmıştır.

C. burnetii Faz II'ye karşı oluşan IgG antikorlarının saptanması amacıyla Indirect Fluorescence Antibody Test (IFAT) (Vircell SL, Granada, İspanya) kullanılmıştır. Geçirilmiş enfeksiyon veya temas göstergesi olarak IgG antikorları için $\geq 1:16$ titreler pozitif kabul edilmiştir (16). Akut Q ateşi açısından Faz II IgG $\geq 1:64$ titreler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Osebold yönteminde kullanılan test antijenleri, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü (SHAM) Laboratuvarlarında hazırlanmıştır. İlk olarak, çapraz reaksiyonların önlenmesi amacıyla *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) suşundan tüm hücre antijenleri elde edilmiştir. *L.monocytogenes* 1/2a, 1/2b, 3c, 4ab, 4c ve 4d suşlarından ayrı ayrı antijenleri hazırlanarak, bu antijenlerin birleştirilmesiyle *L.monocytogenes* ortak antijen havuzu elde edilmiştir (17). Serum örneklerinin *S.aureus* antijeniyle absorpsiyonu takiben *L.monocytogenes* antijeniyle aglütinasyon testi yapılmıştır. 1/100 ve üzerindeki titrelerde, en az iki (++) sonuç veren aglütinasyon pozitif olarak kabul edilmiştir.

Serum örneklerindeki anti-*T. gondii* antikorları Sabin Feldman Boya Testi (SFDT) ile çalışılmıştır. SFDT'de; Swiss-Albino tipi üç-dört haftalık sağlıklı beyaz fareler, aktivatör serum olarak *T.gondii* anti-

koru olmayan ve magnezyum, properdin, C₂, C₃, C₄ gibi faktörlerden zengin insan serumu ile canlı antijen olarak, *T.gondii* RH suşunun farelerin periton sıvısından elde edilen 48 saatlik pasajları kullanılmıştır.

Serumlar 56°C'de 30 dakika inaktive edildikten sonra, serum fizyolojik ile 1/4, 1/16, 1/64, 1/256 ve 1/1024 olarak sulandırılmış ve bu sulandırmalardan 25 µl yan tüplere geçilmiştir. 25 µl aktivatör serum içerisinde canlı *T.gondii* takizoitlerinden X40 objektif ile her mikroskopi sahasında ortalama 25 adet olacak şekilde ayarlanmış antijen, yan tüplerdeki serum sulandırmaları üzerine ilave edilmiştir. Tüpler, 37 °C su banyosunda 50 dakika inkübe edildikten sonra aynı miktar alkali metilen mavisi eklenmiş ve 37 °C'deki su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Sonuçlar, ışık mikroskobunda (X40 büyütme ile) *T.gondii* trofozoitlerinin boya alma durumlarına göre değerlendirilmiştir. Bir mikroskop sahasında bulunan takizoitlerden %50'sinden fazlasının boya almadığı sulandırmalar Toksoplazmoz yönünden pozitif olarak değerlendirilmiş ve $\geq 1:16$ titreler pozitif kabul edilmiştir (18).

127 serum örneğinde anti-*Echinococcus granulosus* IgG antikorları IHA (Behring-Almanya) testi ile çalışılmıştır. IHA testinde $\geq 1/64$ dilüsyonlar pozitif olarak kabul edilmiştir.

Tüm istatistiksel değerlendirmeler "SPSS 15 for Windows Programı" ile bilgisayarda yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesinde Pearson kare ve Fisher kesin testleri kullanılmıştır.

BULGULAR

İncelenen 127 örneğin 39 (%30,7)'unda *C. burnetii* faz II antijenine karşı gelişen IgG saptanmıştır. Gruplara göre seropozitiflik incelendiğinde ise veteriner hekimlerin 27'si (%30,6), veteriner teknisyenlerinin sekizi (%32), gönüllü hayvan severlerin dördü (% 28,5) ve kontrol grubunun biri (%5) pozitif olarak bulunmuştur. Gruplar ile kontrol grubu arasındaki seropozitiflik yönünden fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Tablo 1).

Tablo 1. Risk gruplarında OAT ile tespit edilen Listerioz antikor titreleri

Risk Grubu	Pozitif		Titre					
	n	%	1: 16	1: 32	1: 64	1: 128	1: 256	1: 512
Vet. Hekim (n: 88)	27	30.6 ^a	12	6	6	2	-	1
Vet. Hekim (n: 25)	8	32 ^a	3	2	2	1	-	-
Hayvansever (n: 14)	4	28.5 ^a	2	-	1	-	-	1
Kontrol grubu (n: 20)	1	5 ^b	-	-	-	-	1	-
Toplam (n: 147)	40	27.2	17	8	9	3	1	2

^{a,b}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır p<0.05

OAT ile veteriner hekimlerin 27'sinde (%30,6), veteriner teknisyenlerinin dokuzunda (%36), gönüllü hayvan severlerin üçünde (%21,4) ve kontrol grubunun birinde (%5) *Listeria* yönünden seropozitiflik belirlenmiştir. Gruplar ile kontrol grubu arasında seropozitiflik yönünden fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Tablo 2).

Toxoplazma yönünden gruplarına göre seropozitiflik oranları incelendiğinde; veteriner hekimlerin %28,4'ünde, veteriner teknisyenlerinin % 16'sında, gönüllü hayvan severlerin % 50'sinde ve kontrol grubunun %30'unda pozitiflik saptanmıştır. Gruplar ile kontrol grubu arasındaki seropozitiflik yönünden fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 3).

Kistik ekinokokoz antikoruna yönünden 147 örneğin biri (%0,7) 1/128 titrede pozitif olarak belirlenmiştir. Pozitif örnek veteriner hekime ait olup, veteriner hekimlerin %1,1 Kistik ekinokokoz yönünden pozitif olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Zoonotik enfeksiyonlar çeşitli meslek gruplarını etkileyen potansiyel halk sağlığı problemleridir ve hayvancılık açısından önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle, zoonotik enfeksiyonların gerek insanlarda gerekse de hayvanlarda insidans ve prevalansının belirlenmesi önem taşımaktadır.

Dünyada risk gruplarında Q ateşinin prevalansını

Tablo 2. Risk gruplarında IFAT ile tespit edilen Q ateşi seropozitifliği ve titre dağılımı

Risk Grubu	Pozitif		Titre		
	n	%	1: 100	1: 200	1: 400
Vet. Hekim (n: 88)	27	30.6 ^a	20	7	-
Vet. Hekim (n: 25)	9	36 ^a	8	1	-
Hayvansever (n: 14)	3	21.4 ^a	2	1	-
Kontrol grubu (n: 20)	1	5 ^b	1	-	-
Toplam (n: 147)	40	27.2	31	9	-

^{a,b}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır p<0.05

Tablo 3. Risk gruplarında SFDT ile tespit edilen Toksoplazmoz seropozitifliği ve titreleri.

Risk Grubu	Pozitif		Titre		
	n	%	1: 16	1: 64	1: 256
Vet. Hekim (n: 88)	25	28.4	13	8	4
Vet. Hekim (n: 25)	4	16	1	2	1
Hayvansever (n: 14)	7	50	5	1	1
Kontrol grubu (n: 20)	6	30	4	2	-
Toplam (n: 147)	42	29	23	13	6

saptamak amacıyla az sayıda çalışma yapılmıştır. *C. burnetii* faz II'ye karşı gelişen antikorlar veteriner hekimlerde Kanada'da %49, İngiltere'de %20, İsviçre'de %25,7 ve Japonya'da %22,7 olarak bulunmuştur (4, 7, 8). Türkiye Kılıç ve ark. (19) Hatay ilinde çalışan veteriner hekimlerde bu oranı %28,6, Ergönül ve ark. (20), veteriner hekimlerde Aydın'da % 7 ve Tokat'ta %8, Çetinkaya ve ark. (21), Elazığ'da veteriner hekimlerde %7,7, Özgür ve ark. (22), İstanbul'da veteriner hekimlerde % 26, veteriner sağlık teknisyenlerinde %80 ve veteriner fakültesi öğrencilerinde %33,3, oranında seroprevalans bildirmişlerdir.

Çalışmamızda evcil hayvan kliniğinde çalışan veteriner hekimlerde Q ateşi seropozitiflik oranı %30,6 olarak bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen seropozitiflik oranları; Elazığ, Aydın ve Tokat illerinde veteriner hekimlerde elde edilen seroprevalans oranlarından daha yüksektir. Diğer çalışmalarda $\geq 1/64$ ve $\geq 1/80$ gibi hastalık tanısı için kullanılan titrelerin risk grubu için de kullanılması bu çalışmalardan elde edilen seroprevalans değerlerinin daha düşük bulunmasına neden olmuş olabilir. Ayrıca bu farklılık coğrafik yapıya bağlı olarak hayvan yetiştirme koşullarına, hayvanlardaki prevalans oranlarına, mesleki uygulama özelliklerine, kullanılan serolojik yöntem ve tanısal titre değerlerine de bağlı olabilir.

L.monocytogenes enfeksiyon riskinin daha yüksek olduğu veteriner hekimler, tarım ve hayvancılıkla uğraşanlarda listerioz, asemptomatik seyirli veya deri ve gözde lokal enfeksiyon şeklinde görülmektedir (11). Regan ve ark (23), Visser (24) veteriner

hekimlerde *L.monocytogenes*'e bağlı deri lezyonlarına ilişkin bildirimlerde bulunmuşlardır. Kılıç ve ark. (25) Ankara ili mezbahalarında çalışan personelde listerioz seroprevalansı belirlemek için yaptıkları çalışmada, çalışanların %42,2'sinde seropozitiflik belirlemişler ve bu gruptaki altı veteriner hekimin hiç birinde listeria seropozitifliği belirlenmemiştir. Bu çalışmada veteriner hekimlerin 27 (%30,6)'sinde, veteriner teknisyenlerinin dokuzunda (%36) *Listeria* seropozitifliği saptanmıştır.

Q ateşi ve *Listeria* seropozitifliği yönünden kontrol grubu ile gruplarımız arasında yapılan karşılaştırımda istatistiki açıdan anlamlı bir farkın bulunması, pet kliniği ile uğraşan veteriner hekimlerin, teknisyenlerin ve pet hayvanları ile yakın temas halinde olan hayvan severlerin Q ateşi ve *Listeria* yönünden risk gruplarını oluşturduklarını ortaya koymaktadır.

Toksoplazmoz, insan sağlığını tehdit eden ve genellikle asemptomatik seyirli zoonotik bir enfeksiyondur (12). Kanada'da Shuhaiber ve ark.(26) veteriner hekimlerin %14,2 sinde, DiGiacomo ve ark (27) veteriner hekimlerin %13,7'sinde, veteriner teknisyenlerin %45,3'ünde *Toxoplasma* seropozitifliği bildirmişlerdir. Gökekmerdan ve ark. (28) hayvan ve hayvan ürünleri ile ilişkisi olan meslek gruplarında toksoplazmozun yaygınlığının daha yüksek olduğu bildirilmiş ve Elazığ Bölgesindeki veteriner hekimlerde *Toxoplasma* seropozitifliğini %53,2 olarak bulunmuşlardır. Kılıç ve ark. (19) Hatay ilindeki veteriner hekimlerin %42,9'u seropozitif olarak saptamışlardır.

Bu çalışmada veteriner hekimlerin %28,4'ünde seropozitiflik bulunması, Elazığ ve Hatay Bölgesine göre daha düşük seropozitifliğin bölgesel gıda tüketim alışkanlıklarındaki farklılıktan veya bölge hayvanlarındaki prevalans farklılığından kaynaklanabilir. Yılmaz ve ark.(29) Ankara'da kan donörlerinde belirlediği %42,5'lik toksoplazma seropozitifliği ile bu çalışmada belirlenen gönüllü hayvan severlerdeki %50'lik seropozitiflik arasındaki oran farkı fazla olmamakla birlikte gönüllü hayvan severlerin hayvanlarla temaslarında daha dikkatli olması gerektiğini ortaya koymaktadır.

İnsan sağlığını tehdit eden ve ülke ekonomisinde zarara yol açan kistik ekinokokkozun epidemiyolojisinde bölgenin iklimi, hayvanların bakım ve beslenme koşulları, halkın kültür seviyesi etkili olmakta bu nedenle değişik bölgelerden farklı oranlar bildirilmektedir (30,31). Ülkemizde kistik ekinokokkozun hızını saptamak amacıyla Kayseri Yöresinde yapılan çalışmada 2242 olguda ELISA ve IFA yöntemi kullanılarak %2,7 oranında pozitiflik saptandığı belirtilmiş, Western Blot doğrulama testi ile pozitiflik oranı %0,9 olarak tespit edilmiştir. (31). Manisa Yöresinde taşınabilir ultrasound (US) cihazı ve serolojik yöntemlerle 630 ilkökul öğrencisi taranmış, öğrencilerin %0,3'ünde US, %8,9'unda ELISA ve %10,1'inde IHA ile pozitiflik saptanmıştır. Olguların %4,3'ünde ELISA ve IHA ile pozitiflik saptandığı bildirilmiş, bu durumun antijen sunumuna, antijen antikor reaksiyonuna ve immünglobülinlerin farklı izotiplerinin belirlenmesine bağlı olabileceği belirtilmiştir (30). Kılıç ve ark.(32) veteriner hekimlerde yaptıkları serolojik çalışmada ELISA ile %2,15'lik Echinococcus-IgG seropozitifliği belirlemişler ve Western Blot ile doğrulamışlardır. Aynı örneklerde IHA ile seropozitiflik belirleyememişlerdir. Çalışmamızda 88 veteriner hekime ait örnekten birinde (%1,1) IHA ile seropozitiflik belirlenmiştir.

Çalışmamızda, Ankara İlindeki risk gruplarında Q ateşi ve listeriaz seroprevalansının yüksek olarak bulunması ve kontrol grubu ile aralarındaki farkın

istatistiksel olarak anlamlı bulunması nedeniyle, risk grubunu oluşturan meslek çalışanlarının zoonotik enfeksiyonlar yönünden bilinçlendirilmesi ve bölgede zoonotik enfeksiyonların epidemiyolojik özelliklerinin aydınlatılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev 1999;12:518-553.
2. McQuiston JH, Childs JE. Q fever in humans and animals in the United States. Vector Borne and Zoonotic Diseases 2002; 2: 179-191.
3. Torina A, Caracappa S. Dog tick-borne diseases in Sicily. Parassitologia. 2006 ;48(1-2):145-7.
4. Komiya T, Sadamasu K, Kang MI, Tsuboshima S, Fukushi H, Hirai K. Seroprevalence of Coxiella burnetii infections among cats in different living environments. J Vet Med Sci. 2003 ;65(9):1047-8
5. Marrie TJ, MacDonald A, Durant H, Yates L, McCormick L. An outbreak of Q fever probably due to contact with a parturient cat. Chest. 1988;93(1):98-103.
6. Buhariwalla F, Cann B, Marrie TJ. A dog-related outbreak of Q fever. Clin Infect Dis. 1996 ;23(4):753-5.
7. Behymer, D, Riemann HP. Zoonosis update, *Coxiella burnetii* infection. JAVMA 1989; 194:764-767.
8. Marrie TJ, Fraser J. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among veterinarians and slaughterhouse workers in Nova Scotia. Can Vet J 1985; 26: 181-4.
9. Armstrong D. L.monocytogenes Infections. In; Alfred SE, Philip SB, eds. Bacterial infections of humans epidemiology and control. 2nd ed. New York: Plenum Publish Co. 1991:187-193.
10. Lorber B. Listeriosis. Clin Infect Dis 1997;24:1-11.
11. McLauchlin J, Low JC. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. Vet Rec. 1994;135(26):615-617.
12. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis in animals and man. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1988:1-220.
13. Merdivenci A. Medikal Protozooloji, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları 2.basım, 1981- İstanbul.

14. Amman RW, Eckert J. Cestodes: Echinococcus. Gastroenterol Clin North Am 1996; 25: 655-689.
15. Yazar S, Altintas N. Serodiagnosis of cystic echinococcosis in Turkey. Helminthologia 2003; 40 (1): 9-13.
16. Htwe KK, Yoshida T, Hayashi S et al. Prevalence of Antibodies to Coxiella burnetii in Japan. J Clin Microbiol 1993;31(3): 722-723.
17. Osebold J, Aalund O, and Chrips CE, 1965. Chemical and immunological composition of surface structures of Listeria monocytogenes. J. Bacteriol., 89: 84-89.
18. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microbial indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (Toxoplasma). Science 1948;108: 660:663.
19. Kılıç S, Altıntaş Ö, Çelebi B, Pınar D, Babür C. Hatay İlinde Risk gruplarında Q Ateşi Bruselloz ve Toksoplazmoz Seroprevalansının Araştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg 2007;64(1); 16-21.
20. Ergönül Ö, Zeller H, Kılıç S, Kutlu M, Kutlu M, Cavusoglu S, Esen B, Dokuzoğuz B Zoonotic infections among veterinarians in Turkey: Crimean-Congo hemorrhagic fever and beyond. Int J Infec Dis 2006;10(6):465-69.
21. Çetinkaya B, Kalender H, Ertaş HB et al. Seroprevalence of Coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. Vet Rec 2000; 146: 131-136.
22. Özgür NY, Hasöksüz M, Yılmaz H, İkiz S, Ilgaz A. Risk grubundaki insanlarda Coxiella burnetii antikorlarının araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1996; 26:109-113.
23. Regan EJ, Harrison GA, Butler S, McLauchlin J, Thomas M, Mitchell S. Primary cutaneous listeriosis in a veterinarian. Vet Rec. 2005;13;157(7):207.
24. Visser IJ. Pustular dermatitis in veterinarians following delivery in domestic animals; an occupational disease. Ned Tijdschr Geneesk. 1996 : 1;140(22):1186-90.
25. Kılıç S, Babür C, Dinçer Ş, Afacan G, Esen B. Ankara İli Mezbahaları Çalışanlarında Anti-Listeria monocytogenes "O" Antikorlarının Araştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg 2003;60(1); 1-8.
26. Shuhaiber S, Koren G, Boskovic R, Einarson TR, Soldin OP, Einarson A. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection among veterinary staff in Ontario, Canada (2002): implications for teratogenic risk. BMC Infect Dis. 2003; 23;3:8.
27. DiGiacomo RF, Harris NV, Huber NL, Cooney MK. Animal exposures and antibodies to Toxoplasma gondii in a university population. Am J Epidemiol. 1990; 131 (4):729-33.
28. Gökekmerdan A, Kalkan A, Kizirgil A, Demirdağ K, Özkekelikçi A: Elazığ yöresinde hayvancılıkla ilgili meslek gruplarında anti-Toxoplasma antikorlarının araştırılması, Türk Parazitoloj Derg 1999;23:15.
29. Yılmaz GR, Babür C, Kılıç S, Taylan Ozkan A, Beyaz E, Karakoç AE. Investigation of Toxoplasma gondii antibodies in blood donors by Sabin-Feldman Dye Test. Mikrobiyol Bul. 2006;40(4):375-81.
30. Özkol M, Kilimcioğlu A, Girginkardeşler N, Balcıoğlu İC, Şakru N, Korkmaz M, Ok ÜZ,. Adiscrepancy between cystic chinococcosis confirmed by ultrasound and seropositivity in Turkish children. Acta Trop, 2005;93: 213-216.
31. Yazar S, Yaman O, Çetinkaya F, Şahin I,. Cystic echinococcosis in central Anatolia, Turkey. Saudi Med J, 2006;27: 205-209.
32. Kılıç S, Al FD, Çelebi B, Babür C. Veteriner Hekimlerde Kistik Ekinokokkozis Seroprevalansının Araştırılması. Turk Parazitoloj Derg. 2007;31(2):109-11.

Trichomonas vaginalis SAPTANMASINDA DİREKT MİKROSKOPİ İLE İN-VİTRO KÜLTÜRÜN KARŞILAŞTIRILMASI

Comparison of Direct Microscopy and In-Vitro Cultures in Detection of *Trichomonas vaginalis*

Gülden SÖNMEZ TAMER¹, Devrim DÜNDAR¹, Şeyda ÇALIŞKAN^{1,2}, EMEK DOĞER²

¹Kocaeli Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
KOCAELİ

²Kocaeli Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Kadın Hastalıkları ve
Doğum Anabilim Dalı,
KOCAELİ

İletişim:
Gülden SÖNMEZ TAMER
Kocaeli Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Eski İstanbul Yolu 10. Km.
41380 Umuttepe/KOCAELİ
Tel : 0 262 303 74 46
Faks : 0 262 303 70 03
e-posta: guldensonmez@hotmail.com

ÖZET

Amaç: *Trichomonas vaginalis*'in tanısı; direkt mikroskopik inceleme ile hareketli trofozoitlerin görülmesiyle, çeşitli kültür yöntemleriyle, serolojik ve moleküler yöntemlerle konulmaktadır. Bu çalışmada, vajinal akıntı örneklerinde *T. vaginalis*'in saptanmasında direkt mikroskopik inceleme ile iki farklı kültür yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Anormal vajinal akıntı şikayeti ile Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvuran ve yaşları 18-48 arasında değişen 128 kadın çalışmaya alınmıştır. Steril pamuk eküvyon yardımı ile arka forniksten alınan örnekler direkt mikroskopik olarak inceleme; ayrıca cystein pepton liver maltose (CPLM) ve tripticase yeast extract maltose (TYM) besiyerlerine ekilmiştir. Ekim yapılan tüplerin 1., 2., 3., 4. ve 7. günlerde kontrolleri yapılmış, optimal üreme günleri saptanmış ve üç yöntemin performans kriterleri belirlenmiştir.

Bulgular: İncelenen 128 hastanın 12 (%9.37)'sinde *T. vaginalis* pozitifliği görülmüştür. Bu 12 olgunun tamamı TYM besiyerinde üremiş olduğundan TYM besiyeri altın standart olarak kabul edilmiştir. CPLM besiyerinde 12 pozitif olgunun dokuzu saptanabilmiştir. Duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla %75, %10, %100 ve %97 olarak belirlenmiştir. Direkt mikroskopik incelemeyle ise 12 pozitif olgunun yedisi görülmüştür. Bu yöntemin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %58, %100, %100 ve %96 olarak bulunmuştur. CPLM besiyerinde üremeyen bir örnek mikroskopik incelemede pozitif saptanmıştır. Optimal üreme süresinin CPLM besiyeri için iki, TYM besiyeri için ise dört gün olduğu gözlenmiştir.

Sonuç: trikomoniyazis tanısında direkt mikroskopik inceleme kolay ve ucuz bir metod olmasına rağmen kültür daha duyarlı bir yöntemdir. *T. vaginalis*'in laboratuvar tanısında erken sonuç alındığı için TYM besiyerinin kullanılmasının, laboratuvar çalışmalarında ise CPLM besiyerinin tercih edilmesinin uygun olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Trichomonas vaginalis*, tanı, kültür

ABSTRACT

Objective: *Trichomonas vaginalis* diagnosis is made by identifying motile unicellular flagellates by direct microscopic examination of wet mount slides, by using different culture media and serological and molecular methods. In this study, it is aimed to compare wet mount microscopy with two different culture methods for the detection of *T. vaginalis* in swab specimens.

Method: A total of 128 women, ages between 18-48 with abnormal vaginal discharge who applied to Obstetrics and Gynecology Department were enrolled in this study. The samples of vaginal secretions from the posterior fornix collected on a sterile cotton tipped swab. The samples taken from posterior fornix by using sterile cotton-tipped swap were examined by using wet-mount preparations and culturing on cystein pepton liver maltose (CPLM) medium and tripticase yeast extract maltose (TYM) medium. The culture tubes inoculated by aliquots of

secretions into each medium had been read on 1., 2., 3., 4. and 7. days, optimal days had been determined and the performance of the three methods had been evaluated.

Results: Of the 128 patients 12 (9.37%) had positive results for *T. vaginalis*. TYM medium is accepted as gold standart, since all those 12 positive cases were detected in TYM medium. CPLM medium detected only 9 of these 12 positive cases. Sensitivity, spesificity, positive and negative predictive values were determined as 75%, 10%, 100% and 97% respectively. Wet mount examination detected only 7 of the 12 positive cases. Sensitivity, spesificity, positive and negative predictive values were found as 58%, 100%, 100% and 96% respectively. One CPLM negative case was positive in wet mount examination. Optimal growth observed in two days for CPLM and four days for TYM medium.

Conclusion: Although vaginal saline wet mount is an easy and low-cost technic in diagnosis of Trichomoniasis, culture is more sensitive than the direct examination. It is concluded that TYM medium is superior to CPLM medium for growth of *T. vaginalis* because of its rapidity, CPLM medium should be preferred for studies performed in the laboratory.

Key Words: *Trichomonas vaginalis*, diagnosis, culture



GİRİŞ

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*) viral etkenler hariç, seksüel yolla bulaşan patojenler arasında en sık görülen mikroorganizmadır. Yıllık insidans 170 milyonun üzerindedir (1). *T. vaginalis*; fagositöz veya osmoz yolu ile lökositler, diğer vücut hücreleri, bakteriler ve vajinanın glikojeni ile beslenir. trikomoniyazisin inflamatuvar pelvik hastalık, üreme fonksiyon bozuklukları, erken membran rüptürü ve düşük doğum ağırlığına neden olduğu bilinmektedir (2). Bu hastalıkta parazit kaynağı enfeksiyonlu kadın ve erkeklerdir. Prevalansı %3-40 arasında değişmektedir (3). Enfeksiyonlu hastaların ancak %12'sinde tipik klinik bulgular olduğundan klinikte trikomoniyazis atlanabilmektedir (2, 3). Klinik bulgulara göre kadında veya erkekte, idrar ve üreme yollarının çeşitli hastalıkları ile karışabilir.

Trikomoniyazisin laboratuvar tanısı için direkt mikroskopik inceleme, çeşitli boyama yöntemleri (Giemsa, acridine orange [AO] florasan boyama, Papanicolaou ve Diff-Quik boyaları), kültür, lateks aglütinasyon, ELISA ve moleküler teknikler kullanılmaktadır (4-7).

Bu çalışmada anormal vajinal akıntısı olan kadınlardan alınan vajinal sekresyon örnekleri direkt mikroskopi ile incelenmiş ve iki farklı sıvı besiyerine ekim yapılarak bu yöntemlerin *T. vaginalis* tanısındaki farklılıkları karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Nisan-Ekim 2003 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine anormal vajinal akıntı şikayeti ile başvuran 128 kadın hasta alınmıştır. Spekulum ile yapılan jinekolojik muayene sırasında steril pamuk eküvyon yardımıyla arka forniksten üç adet vajinal sekresyon örneği alınmıştır. İlk örnek 1 ml steril serum fizyolojik içine alınmış ve mikroskopik inceleme yapılmıştır. Direkt mikroskopik inceleme için bir damla örnek lam üzerine alınmış ve lamelle kapatılarak hazırlanan preparat X400 ışık mikroskopunda incelenmiştir. Diğer iki örnek ise TYM (tripticase yeast extract maltose) ve CPLM (cystein pepton liver maltose) besiyeri içeren farklı tüplere ekilmiştir. TYM ve CPLM besiyerleri laboratuvarda hazırlanarak her tüpe 6 ml olacak şekilde yerleştirilmiş ve otoklavlanarak +4°C'de saklanmıştır (2, 8, 9). Ekim yapılmadan önce sıvı besiyerleri 37°C'ye ısıtılmış ve her tüpe 0,5 ml inaktive insan serumu, 1000U/ml penisilin, 1 mg/ml streptomisin, 1 mg/ml triflukan eklendikten sonra yine 37°C'de inkübe edilmiştir. Yedi gün boyunca 24 saat ara ile her tüpten alınan örnekler thoma lamında sayılarak ortalama değerler alınmış, üreme yoğunluğu ve canlılıkları bu şekilde kontrol edilmiştir.

Duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler TYM besiyeri altın standart alınarak yapılmıştır.

BULGULAR

Olguların yaş ortalaması $32,1\pm 4,3$ (17-51 yaş arası) olarak bulunmuştur. *T. vaginalis* 128 örneğin 12 (9,37%)'sinde saptanmıştır. Bunların tamamı TYM besiyerinde, dokuzu (7,03%) ise CPLM besiyerinde üremiştir. Direkt mikroskopik incelemede 12 pozitif olgunun yedisi (5,46%) görülmüştür. CPLM besiyerinde negatif bir örnek ise direkt mikroskopik incelemede pozitif olarak değerlendirilmiştir. *T. vaginalis*'in kültürde üremesi sekiz gün boyunca izlenmiş, optimal üreme CPLM besiyerinde ikinci, TYM besiyerinde dördüncü günde gözlenmiştir. Üreme ve canlılık kontrollerinin sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. CPLM ve TYM'de üreyen canlı *T. vaginalis* sayısı / ml

Gün	Canlı <i>T. vaginalis</i> sayısı / ml	
	CPLM Besi yerinde	TYM Besi yerinde
1	1.20×10^5	1.8×10^5
2	6.8×10^5	2.2×10^5
3	5.3×10^4	7.1×10^4
4	2.3×10^3	8.4×10^4
5	1×10^2	5×10^4
6	-	3.1×10^2
7	-	1×10^2
8	-	-

TYM besiyeri altın standart olarak alınmış; duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla CPLM besiyerinde %75, %10, %100 ve %97; direkt mikroskopik incelemede ise %58, %100, %100 ve %96 olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA

Trikomoniyazisin laboratuvar tanısı genellikle mikroskopik inceleme, boyama yöntemleri ve kültürle konulmaktadır (9,10). Direkt mikroskopik inceleme, ilk uygulanan ve halen en sık kullanılan yöntemdir. Kültür ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %35-80 arasında bildirilmektedir (11,12). Bu yöntemin basit ve ucuz olması avantajları yanında bazı dezavantajları da vardır. *T. vaginalis* dış ortamdan etkilendiğinden, mikroskopisine mümkün olduğunca çabuk bakılması gereklidir. Trikomonastlar dış ortamda hareketlerini ve kamçılarını kaybedebilirler, morfolojileri değişebilir ve lökositlerden ayırımı zorlaşabilir. Giemsa ve akrinin oranj (AO) boyama yöntemlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür. Kültür yöntemleri ise *T. vaginalis* tanısında daha değerlidir ve %95 oranında tanı konabilmektedir (9). Kültür için örnek az sayıda trofozoid içeriyorsa yalancı negatiflik olabilir. Ayrıca örneğin laboratuvara taşınma sırasında canlı trofozoidlerin azalması da kültürün duyarlılığını olumsuz olarak etkilemektedir.

Gelbart ve ark. (13) direkt inceleme ile TYM ve CPLM besiyerlerini karşılaştırmışlardır. TYM besiyerinin direkt inceleme ve CPLM besiyerinden daha üstün olduğunu görmüşlerdir. Çalışmamızda da benzer bir sonuca ulaşılmıştır. Trikomoniyazisin açısından 917 örneğin incelendiği bir çalışmada kültür ile %19,0, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) %17,1, direkt mikroskopik inceleme ile %2,7 pozitif sonuç alınmış ve kültür ve PCR sonuçlarının benzer olduğuna dikkat çekilmiştir (14).

Türkiye'de bu konu ile ilgili çalışmalara bakarsak; Akısu ve ark. (15) akıntı şikayeti ile başvuran 100 hastanın vajinal akıntı örneklerini direkt mikroskopik incelemeyle, besiyerine ve hücre kültürüne ekim yöntemiyle araştırmışlar. Direkt mikroskopik bakıda dört örnekte (%4) *T. vaginalis*'e rastlamışlar ve örneklerden üçünün hem hücre kültürü (%3) ve hem de in vitro besiyerinde (%3) ürediklerini ve trikomoniyazisin tanısında direkt mikroskopik bakının diğer yöntemlerden daha iyi bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada

mikroskopik inceleme ile 12 pozitif örneğin ancak yedisinde *T. vaginalis* saptanabilmektedir. Atambay ve ark. (16) CPLM besiyerine insan, at ve koyun serumları ekleyerek *T. vaginalis*'in üreme süreleri ve yoğunluklarını karşılaştırmışlar; insan serumunun daha ekonomik ve uygun olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada da insan serumu kullanılmıştır. Akhan ve ark. (17) *T. vaginalis* görülme sıklığını direkt mikroskopik inceleme ve kültürle 168 olguda (90 semptomatik ve 78 asemptomatik kadında) araştırmışlar ve enfeksiyon sıklığını %6 olarak bulmuşlardır. Enfeksiyonun semptomatik ve asemptomatik olgularda aynı oranda görüldüğü, direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığının %60 olduğu bildirilmiştir. Adiloğlu ve ark. (18) *T. vaginalis* sıklığını mikroskopik inceleme, Giemsa, AO boyaları ve modifiye Diamond (MD) ve modifiye tiyoglukolatlı (MT) besiyerleri kullanarak 269 kadında araştırmışlar; toplam 34 olguda (%12,6) *T. vaginalis* saptamışlardır. Yöntemlerin duyarlılığı MD'de %94,1, mikroskopik incelemede %76,5, MT besiyerinde %70,6, Giemsa boyama ile %58,8, AO boyama ile %41,2 olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada toplam 917 vajina akıntı örneğinin mikroskopta incelenmesi sonucunda 35 (% 3,8) 'inde *T. vaginalis* saptanmış, bunlardan 34 (% 3,7)'ü CPLM besiyerinde yapılan kültürde üretilmiştir (19). Kilimcioğlu ve ark. (20) vajinal akıntı şikayeti olan 300 kadından alınan örnekleri trikomoniyazis açısından direkt mikroskopik bakı ve Diamond, tiyoglukolat, TYM ve CPLM besiyerlerine ekerek değerlendirilmişler. *T. vaginalis* Diamond ve TYM besiyerinde 24 saat sonra 1.2×10^4 /ml yoğunluğa ulaşırken, tiyoglukolat ve CPLM besiyerlerinde daha düşük yoğunlukta üredikleri saptanmıştır. Buna karşılık tiyoglukolat ve CPLM besiyerlerinde yedinci güne kadar *T. vaginalis*'lerin canlılığını sürdürdükleri gözlenmiştir. *T. vaginalis*'in laboratuvar tanısında, erken sonuç alındığı için Diamond ve TYM besiyerlerinin kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varmışlardır.

Tanrıverdi ve ark. (21) vajinal akıntısı olan 120 kadından alınan örnekleri kültür, direkt mikroskopta inceleme (DMİ) yöntemi ve dot-immunobinding assay (DİBA) ile incelemişler. DMİ ile 6 (% 5,0), kültürle 12 (% 12) ve DİBA ile 12 (% 12) kadında *T. vaginalis* saptanmıştır. Kültür referans yöntem olarak alındığında, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla; DMİ'de % 50, % 100 ve DİBA yönteminde % 91,7, % 99,3 olarak belirlenmiştir.

Suay ve ark. (22), 300 hayat kadını trikomoniyazis yönünden direkt mikroskopi ve kültür yöntemleriyle araştırmışlar, direkt mikroskopik yöntemle 121 (% 40,3), kültür yöntemiyle (TYM) 217 (% 72,3), pozitif sonuç elde etmişlerdir. Yazar ve ark. (23) 1613 vajinal örneği direkt mikroskopik yöntemle ve CPLM besiyerine ekim yapılarak incelemişler, 248 (%15,37)'inde *T. vaginalis* saptamışlardır. Her üç yöntemle 212 hastada parazit bulunurken, 36 hastada sadece CPLM kültür yöntemi ile parazit saptanmıştır.

Bu çalışmada 128 hastanın 12 (%9,37)'sinde *T. vaginalis* pozitifliği görülmüştür. TYM besiyerinde 12 örnek, CPLM besiyerinde ise 12 pozitif örneğin dokuza pozitif olarak saptanmıştır. Duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla %75, %10, %100 ve %97 olarak belirlenmiştir. Direkt mikroskopik inceleme ise 12 pozitif olgunun yedisini saptayabilmiştir. Duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla %58, %100, %100 ve %96 olarak bulunmuştur.

Sonuçlarımız diğer çalışmalarla uyumludur ve *T. vaginalis* infeksiyonlarının tanısında kültürün hala en güvenilir yöntem olduğunu göstermektedir (24-26). Anormal vajinal akıntısı olan kadınlarda trikomoniyazis taramasında kültür, özellikle de TYM besiyeri, direkt mikrobiden daha iyi sonuç vermektedir.

Sonuç olarak; trikomoniyazis tanısında direkt mikroskopik inceleme ve kültür yöntemlerinin birlikte kullanılması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. WHO. An overview of selected curable sexually transmitted diseases. In: Global programme on AIDS; 1995: 2-27.
2. Fouts AC, Kraus SJ. *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. J Infect Dis, 1980;176:289-92.
3. Çulha G, Görür S, Helli A, Akçin S, Kiper AN. Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniğine başvuran üretritli erkek olgularda *Trichomonas vaginalis* sıklığı. Türk Hij Den Biyol Derg, 2008; 1: 37-41.
4. Levett PN. A comparison of five methods for the detection of *Trichomonas vaginalis* in clinical specimens. Med Lab Sci, 1980; 37:85-8.
5. Isenberg HD. Parasite culture: *Trichomonas vaginalis*. In: Isenberg HD., editor. Clinical microbiology procedures handbook. Washington, DC: ASM Press; 1994: 7.9.3.1-3.
6. Adu-Sarkodie Y, Opoku BK, Danso KA, Weiss HA, Mabey D. Comparison of latex agglutination, wet preparation, and culture for the detection of *Trichomonas vaginalis*. Sex Trans Infect, 2004;80:201-3.
7. Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT, Gaydos CA. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. J Clin Microbiol, 1998;36:3205-10.
8. Taylor AER, Baker JR. Cultivation. In: Trichomonads Parasitic in Humans. Ed. BM Honigsberg Springer, New York. 1989: 91-111.
9. Mcmillan A. Laboratory Diagnostic Methods And Cryopreservation Of Trichomonads. In: Trichomonads Parasitic in Humans. Ed. BM Honigsberg. Springer, New York. 1989:299-310.
10. Kurth A, Whittington LHW, Golden MR, Thomas KK, Holmes KK, Schwabke JR. Performance of a new rapid assay for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol, 2004; 42(7): 2940-45.
11. Patel SR, Wiese W, Patel SC, Ohl C, Byrd JC, Estrada CA. Systematic review of diagnostic test for vaginal trichomoniasis. Infect Dis Obstet Gynecol, 2000;8:248-57.
12. McCann JS. Comparison of direct microscopy and culture in the diagnosis of trichomoniasis. Br J Vener Dis, 1974;50:450-2.
13. Gelbart SM, Thomason JL, Osypowski PJ, James JA, Hamilton PR. Comparison of Diamond's medium Modified and Kupferberg medium for detection of *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol, 27:1095-1096.
14. Churakov AA, Kulichenko AN, Suvorov AP, Glybochko PV, Kutyrev VV. Comparative assessment of the diagnostic value of the laboratory diagnostic methods for trichomoniasis. Med Parazitol, 2005(3):22-5.
15. Akısu Ç, Aksoy Ü, Özkoç S, Orhan V. *Trichomonas vaginalis*'in tanısında direkt mikroskopik bakı, in vitro kültür, hücre kültürünün araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 2002;26(4): 377-380.
16. Atambay M, Karaman Ü, Aycan ÖM, Daldal N. Farklı Serumların *Trichomonas vaginalis*'in CPLM besiyerinde üreme süresine ve yoğunluğuna etkisi. Türkiye Parazitol Derg, 2002; 26(4):374-376.
17. Akhan S, Akhan S, Özsüt H, Dilmener M. Semptomatik ve asemptomatik *Trichomonas vaginalis* enfeksiyonu tanısında kültür ve direkt preparatın karşılaştırılması. Mn-Klinik Bilimler& Doktor, 2001; 7(5): 695-697.
18. Adiloğlu AK, Önde U, Acar N. *Trichomonas vaginalis* tanısında direkt mikroskopik inceleme, Giemsa, akrinin oranj ve iki kültür yönteminin karşılaştırılması. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi (Flora), 2000;5(1):61-66.
19. Yücel A, Polat E, Çepni İ, Öztaş Ö, Kayım H, Tırak Ç. Baltalı poliklinik hastalarıyla hayat kadınlarından alınan vagina akıntısı örneklerinde *Trichomonas vaginalis*'in mikroskopta ve kültürdeki incelenmesinden çıkan sonuçlar. Türkiye Parazitol Derg, 1998;22(2):129-132.
20. Kilimcioğlu A, Laçın S, Girginkardeşler N, Değerli K, Özbilgin A. Trichomoniasis tanısında direkt mikroskopi ve kültür yöntemlerinden Diamond, Thioglucoolate, TYM, CPLM besiyerlerinin karşılaştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 1998; 22(3): 239-242.
21. Tanrıverdi S, Özcan K. Vajinal akıntıdan *Trichomonas vaginalis* saptanması için kullanılan üç yöntemin karşılaştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 1997; 21 (4): 372-376.
22. Suay A, Yayla M, Mete Ö, Elçi S. Üç hayat kadınında direkt mikroskopi ve kültür yöntemleriyle *Trichomonas vaginalis* ve buna bağlı olarak trichomoniyaz'ın araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 1995; 19(2):171-173.

23. Yazar S, Dağcı H, Aksoy Ü, Üstün Ş, Akısu Ç, Ak M, Daldal N. İzmir'de vaginal akıntılı kadınlarda *Trichomonas vaginalis* sıklığı. İnönü Üniv Tıp Fakültesi Derg, 2002;9(3):159-161.
24. Lawing LF, Hedges SR, Schwebke JR. Detection of trichomoniasis in vaginal and urine specimens from women by culture and PCR. J Clin Microbiol, 2000;38:3585-8.
25. DeMeo LR, Draper DL, McGregor JA. Evaluation of a deoxyribonucleic acid probe for the detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal secretions. Am J Obstet Gynecol, 1996;174:1339-42.
26. Garber GE, Sibau L, Ma R, Proctor EM, Shaw CE, Bowie WR. Cell culture compared with broth for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol, 1987;25:1275-9.

MALATYA İLİNDE BELEDİYEDE ÇALIŞAN TEMİZLİK İŞÇİLERİNİN TOXOPLASMOSIS VE LİSTERİOSIS SEROPOZİTİFLİĞİ YÖNÜNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Evaluation of the Municipality Dustmen in Terms of Toxoplasmosis and Listeriosis Seropositivity in Malatya

Tuncay ÇELİK¹, Ülkü KARAMAN², Bekir ÇELEBİ³, Ayşe TURAN⁴, Cahit BABÜR³, Nilgün DALDAL¹

¹İnönü Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı,
MALATYA

²Halk Sağlığı Laboratuvarı
Müdürlüğü,
MALATYA

³Refik Saydam Hıfzısıhha
Merkezi Başkanlığı,
Salgın Hast. Araşt.Müd.,
Paraziter ve Zoonotik Hast.
Laboratuvarı,
ANKARA

⁴Fırat Üniversitesi,
İstatistik Bölümü,
ELAZIĞ

İletişim:
Ülkü KARAMAN
Halk Sağlığı Laboratuvarı
Müdürlüğü,
MALATYA
Gsm: 0 505 6487190
e-posta: ulkukaraman@yahoo.com

ÖZET

Amaç: Ülkemizde de görülen listeriosis ve toxoplasmosis bölgenin coğrafik konumuna, sosyokültürel yapısına ve beslenme şekline göre farklı oranlarda görülmektedir. Çalışmada Malatya ili merkez belediyesinde zoonoz hastalıkları açısından risk grubu olduğu düşünülen 150 temizlik personelinde listeriosis ve toxoplasmosis seroprevalansının saptanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Araştırmada listeriosis tanısı için Aglütinasyon Yöntemi ve toksoplazmosis tanısı için Sabin Feldman Dye Testi kullanılmıştır.

Bulgular: Yapılan değerlendirmede çalışan 150 personelin 14 (%16)'ünde Listeriosis ve 37'sinde (%24,6) anti-*Toxoplasma gondii* antikoruna tespit edilmiştir. Antikor titreleri açısından da listeriosisde çöp toplayıcı ve süpürgecilerde seropozitiflik yüzdesi yüksek bulunmuştur. Toxoplasmosisde de süpürgeci olarak çalışanlarda seropozitiflik diğer gruplara göre yüksektir.

Tartışma: Risk grubunu oluşturan meslek çalışanlarına zoonotik enfeksiyonlarla ilgili bilgilendirme, bulaşma ve korunma yolları yönünden halk sağlığı eğitim programlarının uygulanması ve bölgede bu enfeksiyonların epidemiyolojik özelliklerinin aydınlatılması için daha ileri araştırmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Belediye işçileri, listeriosis, toxoplasmosis

ABSTRACT

Objective: The prevalence of listeriosis and toxoplasmosis in Turkey varies according to the geography, socio-cultural profile, and dominant nutrition habits of the region. The purpose of the present study is to determine the listeriosis and toxoplasmosis seroprevalence among 150 dustmen working in Malatya municipality who are considered to be a risk group in terms of zoonotic diseases.

Method: Agglutination test and Sabin Feldman dye test were used to determine listeriosis and Toxoplasmosis, respectively.

Results: The evaluation revealed that out of 150 dustmen 14 (16 %) were infected with Listeriosis and 37 (24.6 %) with anti-*Toxoplasma gondii* antigen. The rate of seropositivity for listeriosis among garbage collectors and sweepers was found to be high. The seropositivity for toxoplasmosis among sweepers was also higher than the other groups.

Conclusion: Finally, it was concluded that the workers in this risk group should be informed about zoonotic infections, given some public health training programs about the ways of contagion and protection, and further researches should be carried out for better clarification of the epidemiology of such infections.

Key Words: Dustmen working, listeriosis, toxoplasmosis

GİRİŞ

Listeriosis ve toxoplasmosis insanları etkileyen önemli zoonotik enfeksiyonlardır (1,2). *Listeria monocytogenes* enfekte hayvanların dışkı, süt ve uterus içeriğiyle çıkardığı etkenlerin oral yolla alınımını takiben endositoz ile intestinal epitelyum hücrelerine girmektedir. Bakterinin mononükleer fagositer hücreler içinde yaşama yeteneği kan yolu ile yayılımını sağlamaktadır. Etken karaciğer, dalak, kemik iliği gibi organlara yerleşir (1-3). *L. monocytogenes* enfeksiyonu asemptomatik seyirli veya deri ve gözde lokal enfeksiyon şeklinde görülmektedir (4).

Paraziter enfeksiyonlarının epidemiyolojisi birçok faktörden ötürü farklılıklar gösterir. Parazitlerde bulaş yolu genellikle fekal-oral yolla gerçekleşmektedir. Parazitlerin bulaşmasında rol oynayan yumurta veya kistleri ise enfektivitelerini uzun süre koruyabilmektedirler (5).

Toxoplasma gondii insan ve diğer birçok evcil ve yabani kediler ve yabani hayvan türünü enfekte edebilme yeteneğine sahip olup, kediler son konak olarak bilinmektedir. Etken, insanlara çiğ veya az pişmiş etlerin tüketilmesi ve kedi dışısındaki oostidler ile kontamine olmuş sebze ve meyvelerin yeterince yıkanmadan yenilmesi sonucu bulaşmaktadır (1).

Çalışmada Malatya İli Merkez Belediyesinde zoonoz hastalıkları açısından risk grubu olduğu düşü-nülen 150 temizlik personelinin de listeriosis ve toxoplasmosis seroprevalansının saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya 2004 yılında Malatya/Merkez Belediyesinde 6-15 yıl arasında çalışan 72 süpürgeci, 54 çöp toplayıcı ve 24 şoför olmak üzere 150 temizlik işçisi alınmıştır. İşçilerin yaş ortalamaları 40,86 dır.

Personelden alınan kanlar serumlarından ayrılmış ve çalışılncaya kadar -20°C de saklanmıştır.

Listeriosis tanısında aglütinasyon yönteminde kullanılan test antijenleri, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü (SHAM) laboratuvarlarında

hazırlanmıştır. İlk olarak, çapraz reaksiyonların önlenmesi amacıyla *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) suşundan tüm hücre antijenleri elde edilmiştir. *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b, 3c, 4ab, 4c ve 4d suşlarından ayrı ayrı antijenleri hazırlanarak, bu antijenlerin birleştirilmesiyle *L. monocytogenes* ortak antijen havuzu elde edilmiştir (6). Serum örneklerinin *S. aureus* antijeniyle absorsiyonunu takiben *L. monocytogenes* antijeniyle aglütinasyon testi yapılmıştır. Pozitiflik 1/100 ve üzerindeki titrelerde en az iki (++) sonuç veren aglütinasyon durumunda kabul edilmiştir.

Serum örneklerindeki anti-*T. gondii* antikoları Sabin Feldman Boya Testi (SFBT) ile çalışılmıştır. SFBT'de; aktivatör serum olarak *T. gondii* antikoru olmayan ve magnezyum, properdin, C₂, C₃ ve C₄ gibi faktörlerden zengin insan serumu kullanılmıştır. Ayrıca Swiss-Albino tipi üç-dört haftalık sağlıklı beyaz farelere *T.gondii* RH suşu pasajlanmış ve 48 saat sonra elde edilen canlı antijenler de kullanılmıştır.

Serumlar 56°C'de 30 dakika inaktive edildikten sonra, serum fizyolojik ile 1/4, 1/16, 1/64, 1/256 ve 1/1024 oranlarında sulandırılmış ve bunlardan 25 µl alınarak yan tüplere geçilmiştir. Her mikroskopi sahasında X 400'lik büyütmede ortalama 25 adet canlı *T.gondii* takizoitleri olacak şekilde 25 µl aktivatör serum içinde hazırlanan antijen, yan tüplerdeki serum sulandırılmalarının üzerine eklenmiştir. Daha sonra tüpler 37°C su banyosunda 50 dakika inkübe edilmiştir. Tüplerin üzerine aynı miktar alkali metilen mavisi eklenmiş ve 37°C su banyosunda tekrar 10 dakika bekletilmiştir. Sonuçlar, ışık mikroskobunda (X 40 büyütme ile) *T. gondii* trofozoitlerinin boya alma durumlarına göre değerlendirilmiştir. Bir mikroskop sahasında bulunan takizoitlerden %50'den fazlasının boya almadığı sulandırılmalar toksoplazmosis yönünden pozitif olarak değerlendirilmiş ve ≥1:16 titreler pozitif olarak kabul edilmiştir (7).

İstatistiksel analizler SPSS 15.0 for Windows ile gerçekleştirilmiş ve sonuçların değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanılmıştır. P<0.05 değeri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

Sabin-Feldman Boya Testi ile yapılan incelemede 150 personelin 37 (%24,6)'sinde anti-*T. gondii* antikor tespit edilmiştir (Tablo 1). Toksoplazmosis seropozitifliği açısından görev grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir ($X^2=7.750$, serbestlik derecesi (df)=2, $P=0.021$). İşçilerin 14 (%16)'ü de listeriosis yönünden seropozitif olup, antikor titreleri ile meslek grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($X^2=10.667$, serbestlik derecesi (df)=1, $P=0.001$). Dört işçi ise hem listeriosis hem de toksoplazmosis açısından seropozitif bulunmuştur. Tespit edilen Toksoplazmosis ve Listeriosis antikor titrelerinin dağılımları Tablo 1 ve Tablo 2' de verilmiştir.

TARTIŞMA

Zoonotik enfeksiyonlardan olan listeriosis, asemptomatik seyirli veya deri ve gözde lokal enfeksiyon şeklinde görülmektedir (8). Listeriosis prevalansı ile ilgili olarak Kılıç ve ark (9) Ankara İli Mezbahalarında çalışan personelde %42,2 seropozitiflik belirlenmişlerdir. Çalışmada da belediye işçilerinde %16 oranında seropozitiflik saptanmıştır. Ayrıca listeriosis antikor titreleri açısından meslek grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir. Araştırmada çöp toplayıcı ve süpürgecilerde seropozitiflik yüzdesi yüksek bulunmuştur. Çalışanlardan alınan anamnezde deri lezyonu ve göz enfeksiyonu ile ilgili bir şikayet belirlenmemiştir. Seropozitiflik oranı değerlendirmesi belediye

Tablo 1. Sabin-Feldman Boya Testi ile Malatya Belediyesi İşçilerinde saptanan toksoplazmosis seropozitiflik oranlarının ve titrelerinin meslek gruplarına göre dağılımı

Meslek Grupları	Pozitif		Titreler			
	n	%	1:16	1:32	1:64	1:256
Süpürgeci	18	56.25	11	4	2	1
Çöp Toplayıcı	8	25.00	5	2	1	-
Şoför	6	18.75	4	-	2	-
Toplam	32	100.0	20	6	5	1

Tablo 2. Listeria Aglutinasyon Yöntemi ile Malatya Belediyesi İşçilerinde saptanan tespit edilen listeriosis seropozitiflik oranlarının ve titrelerinin meslek gruplarına göre dağılımı

Meslek Grupları	Pozitif		Titreler		
	n	%	1:100	1:200	1:400
Süpürgeci	10	41.70	9	1	0
Çöp Toplayıcı	10	41.70	9	1	0
Şoför	4	16.60	4	0	0
Toplam	24	100.0	22	2	0

temizlik işçilerinde enfekte hayvan dışkısı ile bulaşma risklerinin fazlalığı, bölgesel nedenlerden dolayı pastörize süt tüketiminin azlığı ve kişisel hijyen bilgilerinin eksikliği şeklinde açıklanabilir.

Paraziter enfeksiyon olan toksoplazmosis ise insan sağlığını tehdit eden ve genellikle asemptomatik seyirli zoonotik bir enfeksiyondur (1). Gödemerdan ve ark. (10) hayvan ve hayvan ürünleri ile ilişkisi olan meslek gruplarında Toksoplazmosisin yaygınlığının daha yüksek olduğunu bildirmişler ve Elazığ'da veteriner hekimlerde *Toxoplasma* seropozitifliğini %53,2 olarak bulmuşlardır. Yılmaz ve ark (11) Ankara'da gönüllü hayvan severlerde %50'lik seropozitiflik bildirmişlerdir. Yine Yolasığmaz ve ark (12) kırsal kesimde IgG'nin seropozitiflik oranını kentsel kesimdeki orandan daha yüksek bulmuşlardır. Benzer olarak Aslan ve Babür (13) mezbaha çalışanlarında %48,83 oranlarında seropozitiflik tespit etmişlerdir. Handemir ve ark. (14) da sağlıklı askerler üzerinde IgG Seropozitif oranını %20,77 ve IgM+IgG antikorlarını %5,38 olarak bildirmişlerdir. Çalışmada da benzer olarak %21,3 oranında toxoplasma seropozitiflik saptanmıştır. Ayrıca toksoplazmosis seropozitifliği açısından görev grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir. Süpürgeci olarak çalışanlarda seropozitiflik diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur. Bu durum belediye işçilerinin hayvan dışkısı ile bulaşma risklerinin fazlalığına ve çalışma esnasında zoonoz enfeksiyonlardan korunma ile ilgili tedbirlerin yeterince alınmamasından kaynaklanmış olabileceği şeklinde açıklanabilir.

Araştırma sonucu yapılan değerlendirmeler dikkate alındığında belediye yöneticilerine düşen görevler açısından eğitim yapılarak zoonozlardan korunma yollarına yönelik ilgili finansman desteğinin sağlanması gereklidir. Çünkü genel hijyen temizliği (işçilerin iş sonrasında günlük duş alımı, kullanılacak dezenfektan maddeler, tek kullanımlık maske ve eldivenler, sık sık değiştirilmesi gereken iş elbiseleri) belirli bir mali kaynak ihtiyacı doğuracaktır.

Ayrıca risk grubunu oluşturan meslek çalışanlarına ve ailelerine zoonotik enfeksiyonlarla ilgili bilgi-

lendirme, bulaşma ve korunma yolları yönünden halk sağlığı eğitim programlarının uygulanması ve tanıtıcı broşürlerle desteklenmesi yararlı olacaktır. Bu tip çalışmalarda yapılan eğitim çalışmalarının kalıcı davranış değişikliği yönünde izlenirliği açısından bilimsel izleme yöntemlerinin uygulanması belirlenen hedeflere ulaşmada etkin rol oynayacaktır. Bu nedenle halk sağlığı eğitim programlarının kısa, orta ve uzun vadeli ve ekip çalışması halinde yürütülmesi verimliliği artıracaktır.

Diğer taraftan bölgede bu enfeksiyonların epidemiyolojik özelliklerinin aydınlatılması için daha ileri araştırmaların yapılmasının da gerekliliği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis in animals and man. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1988:1-220.
2. Armstrong D. L.monocytogenes Infections. In; Alfred SE, Philip SB, eds. Bacterial infections of humans epidemiology and control. 2nd ed. New York: Plenum Publish Co. 1991:187-193.
3. Lorber B. Listeriosis. Clin Infect Dis, 1997; 24:1-11.
4. McLauchlin J, Low JC. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. Vet Rec, 1994;135(26): 615-617.
5. Ataş AD, Alim A, Ataş M. Sivas belediyesi çevre- gıda ve tıbbi tahlil laboratuvarına 1993-2006 yıllarında başvuran hastalarda bağırsak parazit dağılımlarının incelenmesi Türk Parazit Derg, 2008; 32(1):59-64.
6. Osebold J, Aalund O, and Chrips CE, 1965. Chemical and immunological composition of surface structures of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol, 89: 84-89.
7. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microbial indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science, 1948;108: 660:663.
8. McLauchlin J, Low JC. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. Vet Rec, 1994;135(26):615-617.
9. Kılıç S, Babür C, Dinçer Ş, Afacan G, Esen B. Ankara İli Mezbahaları Çalışanlarında Anti-*Listeria monocytogenes* "O" Antikorlarının Araştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg, 2003;60(1); 1-8.

10. Gödekmerdan A, Kalkan A, Kizirgil A, Demirdağ K, Özkekelikçi A: Elazığ yöresinde hayvancılıkla ilgili meslek gruplarında anti-Toxoplasma antikorlarının araştırılması, *Türk Parazitol Derg*, 1999;23:15.
11. Yılmaz GR, Babür C, Kiliç S, Taylan Ozkan A, Beyaz E, Karakoç AE. Investigation of *Toxoplasma gondii* antibodies in blood donors by Sabin-Feldman Dye Test. *Mikrobiyol Bul*, 2006;40(4):375-81.
12. Yolasığmaz A, Şakru N, Akısü Ç, Gürüz Ay, Kuman Ha, Altıntaş N. Kırsal ve kentsel bölgelerde yaşayanlarda anti- toxoplasma antikorlarının araştırılması, *T Parazitol Derg*, 2003;27(2):81-84.
13. Aslan G, Babür C. Şanlıurfa'da koyun ve sığırlar ile mezbaha çalışanlarında *toxoplasma gondii* seroprevalansı. *T Mikrobiyol Cem Derg*, 2002;32(1-2):102-105.
14. Handemir E, Koşan E, Şenlik B, Kırmızı E, Çam Y. Köpek üretim ve eğitim tabur komutanlığı (gemlik) personeline *toxoplasmosis* seroprevalansı. *T Parazitol Derg*, 2000; 24(2):186-189.

ENTEROKOK TÜRLERİNDE GLİKOPEPTİD GRUBU ANTİBİYOTİKLERE DİRENCİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARI VE GEN AKTARIM YOLLARI

Molecular Mechanisms of Resistance to Glycopeptide Antibiotics in *Enterococcus* Species and Modes of Gene Transfer

Arzu ÇÖLERİ, Cumhur ÇÖKMÜŞ

Ankara Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
ANKARA

İletişim:
Arzu ÇÖLERİ
Ankara Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, 06100
Tandoğan / ANKARA
Tel: +90 312 2126720/1095
Faks: +90 312 2232395
E-posta: arzucoieri@gmail.com

ÖZET

Enterokoklar özellikle 1980'lerden sonra en önemli nosokomiyal enfeksiyon etkenlerinden biri haline gelmiş ve antibiyotiğe dirençli fırsatçı patojenler olarak dikkatleri üzerine çekmişlerdir. Son yıllarda çoklu antibiyotik direnci gösteren enterokok suşlarının ortaya çıkması ile enfeksiyonlarda kullanılan mevcut tedavi yöntemlerinin uygulanabilirliği kısıtlanmış ve glikopeptid, penisilin ve aminoglikozit grubu antibiyotiklere direnç geni taşıyan enterokok enfeksiyonları halk sağlığını tehdit eder olmuştur. Özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptid grubu antibiyotiklere kazanılmış ve indüklenebilir yüksek seviyede direnç içeren Vankomisine Dirençli Enterokok (VRE) suşlarının sayısı giderek artmıştır. Şu ana kadar enterokoklarda *van A*'dan *van G*'ye kadar vankomisin direncinden sorumlu olduğu bilinen yedi farklı gen kümesinin dizilemesi yapılmış ve varlığı gösterilmiştir. Bu gen kümelerinden en iyi tanımlanan *van A* ve *van B* kümeleri olup klinik enterokoklarda en çok karşılaşılan direnç tiplerini oluştururlar. *Van A* tipi direnç gösteren VRE suşlarında görülen direncin nedeni, hücre duvarındaki peptidoglikan öncüsü D-ala-D-ala dipeptidinin, D-ala-D-lak depsiseptidi ile yer değiştirilmesi sonucu glikopeptidin 1000 kat daha az ilgiyle substratına bağlanabildiği bir modifikasyon ile vankomisinin hücre duvarı sentezini inhibe etmesinin engellenmesidir. *Van C*, *Van E* ve *Van G* tipi dirençlerde ise D-ala-D-serin şeklinde değişim söz konusudur. Bu direnç genlerinin enterokoklar arasında ve özellikle diğer Gram pozitif bakterilere plazmid ve transpozonlar aracılığıyla aktarımı, direncin hızla yayılmasına neden olarak tehlikeli boyutlara ulaşmıştır. Bu derlemede tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de geliştirdiği direnç mekanizmaları ile antibiyotik direncinin yayılımına yol açan enterokoklarda direnç kaynaklarının moleküler mekanizmaları irdelenmiş ve bu direnç kaynaklarının bilinmesinin, direncin önlenmesi ve yeni antibiyotik kullanım politikaları geliştirilmesi açısından önemi vurgulanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Enterokoklar, glikopeptid direnci, direnç genleri, direncin yayılımı

ABSTRACT

Enterococci have emerged as major antibiotic-resistant opportunistic pathogens causing nosocomial infections, especially after 1980's. In the last decade, currently available alternatives for therapy of enterococcal infections became limited due to multiple antibiotic resistant strains and these enterococcal infections caused by these strains carrying glycopeptide, penicilin and aminoglycoside resistance genes, began to treat public health. Particularly the number of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) have increased, carrying acquired and inducible high-level resistance genes to glycopeptide antibiotics in the course of time. Till now, seven different gene clusters responsible for glycopeptide resistance were sequenced and demonstrated from *van A* to *van G*. Of these clusters *van A* and *van B* gene clusters codes for the best described and the most encountered resistance phenotypes among

clinical enterococci. The reason of Van A type glycopeptide resistance in enterococci is to prevent vancomycin to inhibit cell wall synthesis by modification of cell wall precursor D-Ala-D-Ala dipeptide to D-Ala-D-Lac depsipeptide which leads binding of vancomycin to its substrate with 1000-times lower affinity. In Van C, Van E and Van G type resistance, the modification is on D-Ala-D-ser dipeptide. Plasmid and transposon-mediated transfer of these resistance genes between enterococci and specially to other Gram positive bacteria caused spread of resistance which reached to dangerous dimensions. In this review, it is emphasized the importance of knowing the source of genetic fundamentals in terms of controlling antibiotic resistance, and implementing new antibiotic policies for the control of enterococci which gave rise to the spread of resistance by developing antibiotic resistance mechanisms not only worldwide but also in Turkey.

Key Words: Enterococci, glycopeptide resistance, resistance genes, spread of resistance



GİRİŞ

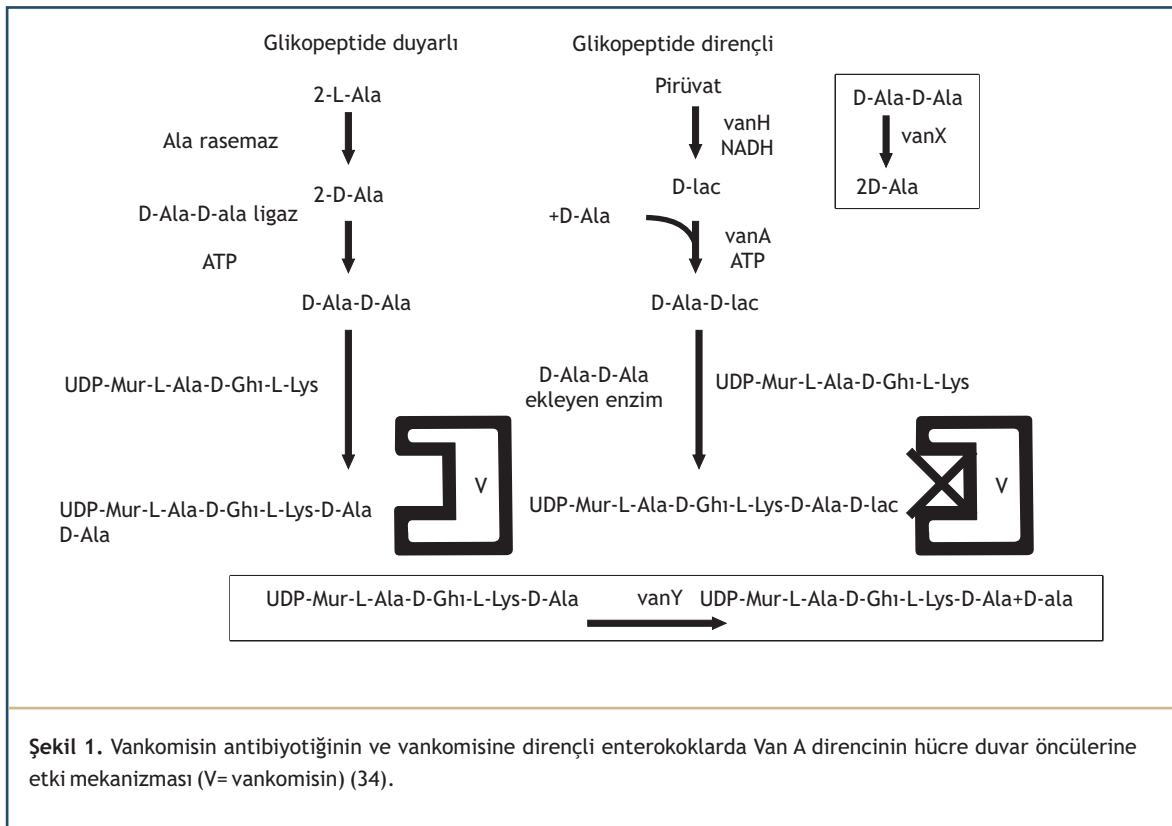
Son yıllarda özellikle antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirdikleri çoklu antibiyotik direnci sebebiyle enterokokların neden olduğu idrar yolu enfeksiyonları, safra kesesi enfeksiyonları, cerrahi yara enfeksiyonları, endokardit, bakteriyemi ve menenjit gibi ciddi nozokomiyal enfeksiyonların sayısında dünya çapında büyük bir artış görülmüştür. Bu artışın bir diğer sebebi de uygun virulans özelliklerini taşıyan ve hastane çevresine adapte bazı klonların ortaya çıkmasıdır. Enterokoklarda glikopeptid grubu antibiyotiklere direnç ilk olarak 1988'de bildirilmiş, daha sonra vankomisine ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençli suşlar tüm dünyada yayılmıştır (1). Yapılan çalışmalarda glikopeptid dirençli enterokokların oldukça geniş coğrafik yayılım gösterdikleri ve hem fenotipik hem de genotipik olarak heterojen oldukları belirlenmiştir (2). Direnç genlerinin enterokoklar arasında ve özellikle diğer gram pozitif bakterilere plazmid ve transpozonlar aracılığıyla aktarımı, direncin hızla yayılmasına neden olarak Amerika ve Avrupa'da tehlikeli boyutlara ulaşmıştır (3-11). Türkiye'de ise Vankomisine Dirençli Enterokok (VRE) izolasyonunun ilk olarak 2001 yılı sonrasında yapıldığı rapor edilmiş ve bu tarihten sonra ülkemizdeki VRE olgularında artış görülmüştür (12-15).

Klasik olarak üriner sistem dışındaki endokardit ve bakteriyemi gibi ciddi enterokok enfeksiyonlarının tedavisi için, β -laktam veya glikopeptid grubu antibiyotiklerin aminoglikozit ile kombine tedavisi ge-

rekmetedir. 2007 Avrupa Antibiyotik Direnci Sürveyans Sistemi (EARSS) verilerine göre, özellikle hücre duvar inhibitörlerinden glikopeptidlere karşı direnç oranları ülkemizde çok yüksek olmayıp; *Enterococcus faecium* izolatlarında %9.8; *E. faecalis*'de ise %1'in altındadır. Buna karşın sinerjik etkileşimi ortadan kaldıran yüksek düzey aminoglikozid direnci: *E. faecalis* için %30; *E. faecium* için %69 civarında olup bu oran, yüksek seviye kabul edilir (www.earss.rivm.nl). Enterokoklarda görülen direnç, bu tür kombinasyonların kullanımında ciddi sağaltım sorunlarına yol açmaktadır (16, 17). Bu nedenlerle tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de geliştirdiği direnç mekanizmaları ile antibiyotik direncinin yaygınlaştığı enterokoklarda doğru tür teşhisi, antibiyotik duyarlılık testlerinin optimize edilmesi ve direnç kaynaklarının genetik temelini araştırılması; direncin önlenmesi ve yeni antibiyotik kullanım politikaları geliştirilmesi açısından önemlidir (18).

Enterokoklarda Glikopeptidlere Karşı Geliştirilmiş Direnç Mekanizmaları

Enterokoklarda glikopeptid direnci, Van A'dan Van G'ye kadar çeşitlilik gösterebilen farklı direnç fenotipleri ile eksprese olur. Ancak direnç mekanizması tüm fenotiplerde benzerlik gösterip, vankomisinin hedefine daha düşük bir ilgi ile bağlanması ile sonuçlanır. Şekil 1'de de gösterildiği üzere ortamda vankomisin gibi bir indükleyici bulunduğu, sensör kinaz enziminin bir regülatör yanıt proteini ile



ilişkiye girmesi sonucu, vankomisin direncinden sorumlu genlerin transkripsiyonu uyarılır. Transkripsiyona uğrayan genler transle olarak vankomisin çok düşük bir ilgi ile bağlanabildiği ve D-ala-D-lak veya D-ala-D-ser ile sonlanan hücre duvarı öncülerinin oluşumunu sağlayan ligaz enzimlerine dönüşürler. Diğer gen ürünleri ise Dala-Dala dipeptidlerini keserek hücre duvarının esas yapısında bulunan glikopeptidlere duyarlı hedefleri ortadan kaldırırlar. VRE'lerde peptidoglikan öncülüğündeki bu değişiklikler, glikopeptid ajanların hedefine 1000 kat daha düşük bir ilgi ile bağlanmasına neden olur ve hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, bu temel mekanizma ile engellenir (19, 20).

Enterokoklarda Antibiyotik Direncinin Genetik Organizasyonu

Son zamanlarda VRE olgularındaki artış, araştırmacıları direnç genlerince kodlanan proteinlerin ya-

pılarını ve işlevlerini daha kapsamlı şekilde çalışmaya itmiş ve yüksek düzey glikopeptid direncine sahip enterokok suşlarının fenotipik özelliklerini kodlayan genetik bilgilere ulaşmayı kolaylaştırmıştır. Bu bilgiler ışığı altında vankomisine dirençli enterokoklar, bakterinin sadece vankomisin ya da hem vankomisin hem de teikoplanine dirençli olması, direncin indüklenebilir veya yapısal olması ve diğer bakterilere aktarılabilir olup olmamasına göre yapılan sınıflandırmada Van A'dan Van G'ye kadar isimlendirilen yedi farklı grup altında incelenirler (Tablo 1). Bu glikopeptid direnç tipleri içerisinde en iyi tanımlanmış olanları Van A, Van B, Van C ve Van D dirençleridir (2, 11).

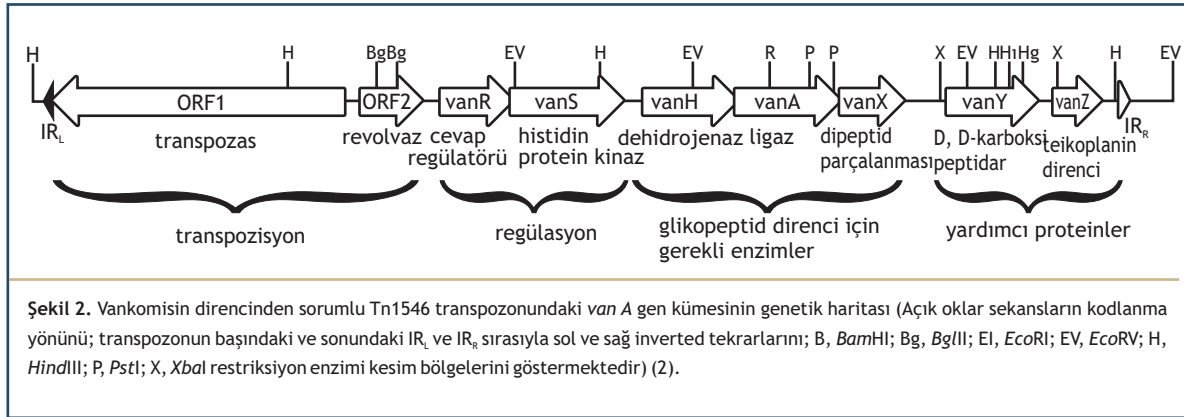
Van A tipi direnç: Van A tipi direnç enterokoklarda en iyi tanımlanmış direnç mekanizmasıdır. Vankomisine ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençten, 39-40 kDa ağırlığında, Van A sitoplazmik proteinleri sorumludur. Dirence neden olan proteinler

Tablo 1. Enterokoklarda glikopeptid direnç tipleri (19, 20)

Özellik	Van A	Van B	Van C	Van D	Van E
MİK(µg/ml)					
Vankomisin	64 ila >1000	4 ila >1000	2 ila 32	16 ila 64	16
Teikoplanin	16 ila > 512	0.5 ila > 32	0.5 ila 1	2 ila 4	0.5
Transfer edilebilme	+	+	-	-	?
Direnç genlerinin lokasyonu	Plazmidler	Kromozom (plazmidler)	Kromozom	Kromozom	Kromozom
İndüklenme ile ekspresyon					
Vankomisin	+	+	-	+	+
Teikoplanin	+	-	-	-	-
Hareketli element	Tn 1546	Tn 1547	-	?	?
Ligaz geni	<i>van A</i>	<i>van B</i>	<i>van C-1</i> ve <i>van C-2/van C-3</i>	<i>van D</i>	<i>van E</i>
Direnç tipi	Kazanılmış Direnç	Kazanılmış direnç	İntirinsik Direnç	Kazanılmış direnç	Kazanılmış direnç
Direnç proteinin M.A'lığı(kDa)	39-40	39.5	38	?	?
Modifiye edilmiş hedef	D-ala-D-lac	D-ala-D-lac	D-ala-D-ser	D-ala-D-lac	D-ala-D-ser
Türler	<i>E. faecalis</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. faecium</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. durans</i> <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>

ancak vankomisin varlığında sentezlenebilen ve hücre duvar sentezi için mutlaka gerekli olan bir ligaz (*van A* genince kodlanır), bir D-D-dipeptidaz (*van X* genince kodlanır) ile bir D,D-karboksipeptidaz'dır (*van Y* geni tarafından kodlanan bu enzim *van X* genince kodlanan protein ile benzer aktivitededir ancak direnç için mutlaka gerekli değildir). Van A fenotipi vankomisine (MİK: >64-1000 µg/ml) ve te-

ikoplanine (MİK: >16-512 µg/ml) yüksek düzeyde indüklenebilir dirence yol açar veya yol açması ile tanımlanır. Modifiye edilmiş hedef D-ala-D-lak'dır. Bu tip direnç gelişimi özellikle *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* ve nadiren *Enterococcus avium*'da görülmektedir. Şekil 2'de de görüldüğü gibi yedi genden oluşan *vanA* kümesi (*van R*, *van S*, *van H*, *van A*, *van X*, *van Y* ve *van Z*) plazmid DNA'ya entegre



olmuş bir transpozon üzerinde yerleşmiştir. Tn1546 olarak adlandırılan 10.5 kb'lık bu transpozon, dört fonksiyonel grubun toplam dokuz polipeptidi kodladığı genetik bir elemandır (2, 22). Tn1546, Tn3 transpozon ailesine benzerlik gösterip baş ve son kısmında 36 ile 38 bp'lik "inverted" diziler içerir. Bu "inverted" diziler sayesinde direnç genleri, üzerinde bulunduğu plazmidten çıkıp tekrar başka bir plazmide rahatlıkla entegre olabilir. Bu transpozonu oluşturan fonksiyonel gruplardan ilki transpozisyonunda görev alan ve ters yönde transkripsiyona uğrayan açık okuma bölgeleri olup, bunlardan ORF1 yapısal bir transpozazı ve ORF2 ise bir rezolvazı kodlar. İkinci bölgede vankomisin direnç genlerinin regülasyonundan sorumlu *van R* ve *van S* genleri mevcuttur. Bu iki gen, glikopeptidlere cevap olarak, iki bileşenli bir sinyal regülasyon sistemi ile *van H*, *van A* ve *van X* genlerinin transkripsiyonlarını aktive ederek depsipeptid oluşumunu kontrol ederler. Üçüncü fonksiyonel grup, depsipeptidlerin oluşumundan ve glikopeptid direncinden sorumlu genleri (*van H*, *van A* ve *van X*) içerir. Üçüncü bölgedeki *vanA* geni geniş substrat özgüllüğüne sahip bir ligazı, *van H* geni ise peptidoglikan sentezinde D-Ala-D-Ala'nın D-Ala-D-Lac ile yer değiştirildiği yeni depsipeptidin sentezinde gerekli bir dehidrojenazı kodlar. *van X* geninin görevi, direnç ekspresyonu için mutlaka gerekli olan ve dipeptid parçalanmasından sorumlu bir D-D-dipeptidazın kodlanmasıdır. Son fonksiyonel gruptaki *van Y* geni ise *van X* ile benzer işlev gösterir; ancak

glikopeptid direnci için tam olarak esansiyel olmayan bir D, D-karboksipeptidazı kodlar. Entero-koklarda Van A fenotipi içeren elemanlar birbirlerine benzerlik gösterir ve Tn1546 ile taşınır; ancak bazı VRE suşlarının intergenik bölgelerine bazı hareketli insersiyon dizilerinin entegre olmasından dolayı direnç düzeylerinde varyasyonlar görülebilmektedir. Kazanılmış (acquired) direnç genleri çoğunlukla geniş konakçı profili gösteren plazmidler ve konjugatif transpozonlar aracılığı ile diğer türlere kolaylıkla aktarılabilir. Bunlar arasında en dikkat çekici olanı, *van A* genini içeren vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA) izolatlarının olmasıdır (4, 9, 16, 17, 23-25, 33).

Van B tipi direnç: Van B tipi direnç; Tn1547 transpozonunu üzerinde kodlu olan *vanB* geninin sentezlediği 39.5 kDa moleküler ağırlıklı *Van B* membran proteini ile oluşturulur. Vankomisin direnci orta düzeyde olup, dirençli bakteriler vankomisine dirençli (MİK: 4-1000 µg/ml) ancak teikoplanine duyarlıdır (MİK: 0.5-1 µg/ml). İndüklenebilir ve kazanılmış bir dirençtir. Modifiye edilmiş hedefi D-ala-D-lak'dır. *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinde görülür. Sadece Van B direncine özgü bir gen dışında diğer altı genin, *van A* kümesindeki genlerle %77 homoloji gösterdiği saptanmıştır. Van B direnç tipi, Van A tipi dirençte olduğu gibi *van R_B*, *van S_B*, *van H_B*, *van A_B*, *van V_B*, *van Y_B* ve *van Z_B* adlı yedi farklı gen kümesi içerir (2). Direnç genleri genellikle kromozom üzerinde yerleşmiştir ve konjugasyon ile aktarı-

labilir, ancak bazı VRE vakalarında plazmidler üzerinde bulunabileceği de saptanmıştır (16, 17, 24, 26).

Van C tipi direnç: Van C tipi direnç; *Enterococcus gallinarum* (van C-1), *Enterococcus casseliflavus* (van C-2) ve *Enterococcus flavescens* (van C-3) suşlarında tespit edilen, vankomisine düşük düzeyde direnç olarak tanımlanır. A, B, D ve E tipi direnç genlerinden farklı olarak Van C tipi vankomisin direncini kodlayan genler endojeniktir ve yukarıda sözü geçen üç türe spesifik ligazlar içerir. 38 kDa'luk Van C membran proteinince oluşturulan, indüklenemez bir dirençtir. Modifiye edilmiş hedef D-ala-D-ser'dir. *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* suşlarının vankomisine duyarlılığı diğer enterokok suşlarından daha az olup, tüm *E. gallinarum* suşları vankomisine düşük düzeyde (MİK: 2-32 µg/ml) dirençli ve teikoplanine (MİK: 0.5-1 µg/ml) duyarlıdır. Tüm suşların yapsal olarak dirençli olmaları nedeniyle intrinsik bir dirençtir ve aktarılamaz (27).

Van D tipi direnç: Van D tipi direnç ise *E. faecium*'da tespit edilmiştir. Orta düzeyde vankomisin direnci (MİK: 16-64 µg/ml) ve düşük düzeyde teikoplanin direnci (MİK: 2-4 µg/ml) görülür. İndüklenebilir bu dirençten Van D membran proteini sorumludur. Modifiye edilmiş hedef D-ala-D-lak'dır. Glikopeptid direnci gen grubu olan *van D*, *van A* ve *van B* operonları ile benzer organizasyon gösterir (28).

Enterokoklarda Glikopeptid Direncinin Aktarım Yolları

Enterokoklarda kazanılan direnç, ya mutasyonlar ya da daha çok yabancı DNA kazanımı ile olur. Enterokokların, direnç genlerini diğer bakterilere aktararak yayabilmek için kullandıkları pek çok genetik aktarım sistemleri mevcuttur. Bu sistemler içerisinde; çok sayıda Gram pozitif (*Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*) türde de replike olabilen plazmidler, *E. faecalis* türleri arasında bazı durumlarda transfer sıklığı %100'e yaklaşan ve plazmid kopya sayısının belirlenmesinden sorumlu olup stabiliteyi oldukça yüksek olan seks feromon-cevap plazmidleri ile genetik materyal üzerinde

DNA'nın bir bölgesinden diğerine hareket edebilen, özelleşmiş, konjugatif tipte hareketli genetik elemanlar olan transpozonlar mevcuttur. Enterokok türleri arasında, yukarıda sözü geçen ve direnç genlerini içeren sistemler ile genetik değişimin her ne kadar transdüksiyonla olabildiği gösterilse de, en yaygın mekanizmanın konjugasyon ile gerçekleştiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra enterokoklarda; kromozomlar veya plazmidler üzerinde bulunan transpozonlar ile yeni bir konak bakteriye direnç geninin entegre olarak aktarıldığı da gösterilmiştir (18).

Enterokokların diğer patojenlere nazaran glikopeptid direnç genlerinin konjugal transferinde başarılı olmasının ve konjugasyon transfer sıklığının daha yüksek olmasının pek çok sebebi mevcuttur. Özellikle bazı *E. faecalis* plazmidlerinin konjugal transferi bir seks-feromon sistemi ile regüle edilir. Potansiyel alıcı hücreler, plazmid taşıyan verici hücreler için eşleşmeye spesifik bir cevap oluşturacak küçük peptid hormonları salgırlar. Hormon sentezinden 30 ila 40 dakika sonra verici hücrelerde eşleşmenin indüklenerek başlatıldığı gözlenmiştir. Bu esnada verici hücreler alıcı ile rastgele çarpışabilmek ve konjugasyon sıklığını arttırmak için yüzey adezyon proteinleri sentezleyerek eşleşme agregatları oluştururlar. Bu hormon salınımından sonra verici hücrelerdeki plazmid transfer sıklığının yaklaşık 1000 kat arttığı saptanmıştır (29).

Bunun dışında VRE'lerde yüksek seviyede glikopeptid direnç fenotipi gösteren genler çoğunlukla yüksek kopya sayısına ve yüksek stabiliteye sahip plazmidler ve plazmidlere entegre olmuş transpozonlar üzerinde bulunurlar. Plazmid veya kromozomlara entegre olmuş konjugatif transpozonlar aracılığıyla kazanılmış glikopeptid direnci de yine insersiyon dizileri içeren transpozonun başka bir konukçu DNA'ya entegre olabilmesi ile kolaylıkla aktarılabılır. Direnç genini içeren plazmidin stabilitesinin ve kopya sayısının yüksek olması da direncin sürdürülebilme ve transfer edilebilme olasılığını sağlamlaştırır (30, 31).

Enterokoklarda, yukarıda sözü edilen seksferomon sistemine sahip plazmidlerin bir kısmı aynı zamanda bakteriyeye beta hemoliz yeteneği kazandıran genlerini de taşır. Tuz, safra ve asitler gibi zorlu şartların bulunduğu organ ve dokularda yaşayabilme yetenekleri sayesinde hastane ortamlarındaki yoğun antibiyotik baskısına dayanabilirler (23). İşte böyle avantajlı konjugatif genetik elemanlara sahip enterokoklar ile direncin yayılımı özellikle son yıllarda tehlikeli boyutlara ulaşmış ve bu konu ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır.

Handwerger ve arkadaşları nozokomiyal bir *E. faecium* suşu ile yaptıkları çalışmada hem vankomisin direnci hem de beta hemoliz ile feromon cevaptan sorumlu 55 kb'luk bir pHKK100 konjugatif plazmidi izole etmişlerdir. Suşun yüksek konjugal transfer yeteneğini, kazanılmış plazmid üzerinde kodlu feromon cevap özelliği ve alıcı hücrenin salgıladığı eşey hormonlarına cevap olarak agregasyona uğramasıyla açıklamışlardır. Araştırmacılar, böyle kümeleşme şeklinde oluşan bir cevap ile konjugal transferin çok daha yüksek sıklıkla gerçekleşmesiyle sonuçlanacağını belirtmişlerdir (5).

Leclercq ve arkadaşlarının 1989 yılında *E. faecium* BM4165 ve *E. faecium* BM4178 suşları ile yaptığı çalışmada; nozokomiyal VRE'lerde aynı genetik elemanlar üzerinde sadece glikopeptid direnci değil, aynı zamanda çoklu antibiyotik direnç genlerinin de lokalize olabildiği gösterilmiştir. BM4164 suşunun sırasıyla vankomisin, tetrasiklin ve MLS antibiyotik direnci gösteren, transfer edilebilir, 34 kb'luk pIP819 plazmidi ve penisilin ile tetrasiklin direncinden sorumlu, 50 kb'luk pIP820 plazmidi içerdiği saptanmıştır. Yüksek seviyede glikopeptid (Van^R, Tei^R) direncinden her iki *E. faecium* suşunda da büyüklükleri sırasıyla 34 ve 40 kb olan pIP819 ve pIP821 plazmidleri sorumlu olduğu gösterilmiştir. pIP819 plazmidinin, daha önce farklı bir VRE suşundan izole ettikleri vankomisin direncinden sorumlu (29) pIP816 plazmidi ile neredeyse benzer olduğu fakat glikopeptid direnç geni yanında MLS antibiyotik direnç genlerini de içerdiği gösterilmiştir (4).

Bozdoğan ve Leclercq'in rapor ettiği başka bir çalışmada, vanA ve vanB tipi direnç in vitro olarak konjugasyonla, mobilize plazmidler veya plazmid üzerindeki transpozonlar ile ve kromozom aracılığıyla transfer edilebilmiştir. *E. faecium* ile yaptıkları çalışmada, 60 kb'dan büyük bir plazmid aracılı vankomisin ve streptogramin direnci saptanmıştır. Bakteride vankomisin (MİK >128 µg/ml), eritromisin (MİK >128 µg/ml) ve tetrasiklin direnci gösterilmiştir. Aynı büyük plazmid üzerinde *erm AB*, *sat A* ve *van B* genlerinin lokalize olduğu ve bu genlerin glikopeptid ve streptogramin direncinden de sorumlu olduğunu belirlemişlerdir (9).

Heaton ve arkadaşlarının bir araştırmasında, *E. faecium* R7 izolatu ile çalışılmış ve bu suşta vankomisin direncinin konjugal transferi ile ilişkili iki farklı plazmid tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre pHKK702; 41 kb'luk ve glikopeptid direncinden sorumlu, Tn1546 benzeri bir eleman içeren, nonkonjugatif bir plazmid ve pHKK703 ise 55 kb'luk, *E. faecalis* seks feromon cevap plazmidi olan pCF10'a benzer, pHKK702'nin konjugasyonundan sorumlu bir plazmidir. pHKK702'nin pHKK703'e konjugal aktarımı sonunda oluşan pHKK701 plazmidinin ise, her iki plazmid DNA'yı da kapsayan yaklaşık 92 kb'luk hibrit bir plazmid olduğu tespit edilmiştir. pHKK701, Van A tipi glikopeptid direnci sağlayan pHKK702 plazmidine ait Tn5506 transpozonunun aktarımı ile oluşturulmuştur. Heaton ve arkadaşlarına göre, vankomisin direncindeki yayılımın artmasındaki nedenlerden biri de *E. faecium*'da yüksek seviyede indüklenebilir glikopeptid direnci gösteren Van A fenotipi içerikli Tn1546 transpozonunun tanımlanmasıdır (4). Araştırmacılar, Enterokoklar arasındaki vankomisin direnç elemanlarının yayılımını; Tn1546 benzeri elemanların konjugatif mobilizasyonu ile gerçekleştirdiğini açıklamışlardır (7).

Glikopeptid Direncinin Enterokoklardan Diğer Patojenlere Hızlı Yayılımı

Enterokoklarda glikopeptid direncinin sadece tür içi ve türler arası değil farklı cinslerdeki patojenlere

de aktarılabildiği yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Ne yazık ki direnç genlerinin transfer yetenekleri sadece laboratuvar ortamında değil, aynı zamanda hastane ortamlarında çeşitli vakalardan izole edilen vankomisine dirençli diğer türler ve cinslerin varlığı ile de gösterilmiştir.

Nozokomiyal kökenli *E. gallinarum* ET193 izolatu ile yapılan bir çalışmada, Van A fenotipi gösteren van A tipi direnç genlerinin varlığı tespit edilmiş ve PCR ile yapılan dizileme sonucunda Tn1546 ile ilişkili olduğu saptanan, konjugasyon yeteneğine sahip, 10.8 kb'lık Tn1546'ya benzer bir transpozonun varlığı gösterilmiştir. Yapılan konjugasyon çalışmalarında direnç genlerinin *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerine aktarılabildiği görülmüştür. Normalde Van C fenotipi ile düşük seviyede intrinsik direnç göstermesi beklenen *E. gallinarum* türünde van A tipi direnç genleri ile karşılaşılması, vankomisin direnci ile ilgili bu genin türler arasında kolaylıkla aktarılabildiğine ve yayılımın ne denli tehlikeli boyutlara ulaştığına işaret etmektedir (32).

Bazı araştırmalarda, van A geninin enterokoklardan *Staphylococcus aureus*'a konjugatif transferinin in vitro olarak yapılabildiği gösterilmiştir. 2002 yılında ise Amerikada bir hastada ilk kez ≥ 32 µg/ml vankomisin MİK değerine sahip enfeksiyon etmeni vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşunun izole edildiği rapor edilmiştir. İzolatın glikopeptid MİK profiline sahip olduğu ve enterokokal kaynaklı vanA vankomisin direnç geni taşıdığı belirtilmiştir. Bu da vankomisin direncinin sadece stafilokoklara değil diğer cinslere de aktarılabileceğini göstermiş ve tehlikenin boyutlarına işaret etmiştir (33).

Sonuç olarak, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de antibiyotiklerin yaygın ve kontrolsüz kullanımı, dirençli bakteri suşlarının yararına bir seleksiyon oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalar, ülkemizden izole edilen klinik kökenli *Enterococcus* cinsi bakterilerde antibiyotiklere karşı direncin artmasına işaret etmektedir. Özellikle 1980'lerden sonra antibiyotiklere karşı değişik tiplerde direnç

mekanizmaları geliştiren ve enfeksiyon tedavisinde mevcut antibiyotik kullanımını kısıtlayan enterokoklarda direncin genetiği araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Direncin yayılımında insanlar için bu denli tehlike yaratan VRE vakalarında direncin genetik temelini daha iyi anlaşılması ile antibiyotik kullanımını kontrol altına alıp, hızlı bir direnç patlamasının önüne geçmek mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, and George RC. Vancomycin resistant enterococci. Letter. Lancet. 1988; 1: 57-58.
2. Arthur M, and Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in Enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 1593-1571.
3. Zervos MJ, Mikesell TS, and Schaberg DR. Heterogeneity of plasmids determining high-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1986; 30: 78-81.
4. Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, and Courvalin P. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 1989; 33: 10-15.
5. Handwerker S, Pucci MJ, and Kolokathis A. Vancomycin resistance is encoded on a pheromone response plasmid in *Enterococcus faecium* 228. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34: 358-360.
6. Signoretto C, Boaretti M, and Canepari P. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the low-affinity penicillin binding protein of *Enterococcus faecalis*. FEMS Microbiol Letters, 1994; 123: 99-106.
7. Heaton MP, Discotto LF, Pucci MJ, and Handwerker S. Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a Van A plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. Gene. 1996; 171: 9-17.
8. Woodford N, Chadwick PR, Morrison D, and Cookson BD. Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their van genotypes during an outbreak. J Clin Microbiol. 1997; 36: 2966-2968.

9. Bozdoğan B, and Leclercq R. Plasmid-mediated coresistance to streptogramins and vancomycin in *Enterococcus faecium* HM103. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2097-2098.
10. Son R, Nimita F, Rusul G, Nasreldin E, Samuel L, and Nishibuchi M. Isolation and molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Malaysia. *Letters in Appl Microbiol.* 1999; 29: 118-122.
11. Simjee S. and Gill M.J. 1997. Gene transfer, gentamicin resistance and *Enterococci*. *J Hospital Infect*, 36; 249-259.
12. Basustaoglu A, Aydogan H, Beyan C, Yalcın A, and Unal S. First glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolate from blood culture in Ankara, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(1): 1-2.
13. Colak D, Naas T, Gunseren F, Fortineau N, Ogunc D, Gultekin M, and Nordmann P. First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50: 397-401.
14. Coleri A, Cokmus C, Ozcan B, Akcelik M, and Tukul C. Determination of antibiotic resistance and resistance plasmids of clinical *Enterococcus* species. *J Gen Appl Microbiol.* 2004; 50: 213-219.
15. Yenişehirli G, Bulut Y. Antibiotic resistance of *Enterococci* isolated from an intensive care unit. *Türkiye Klinikleri, J Med Sci.* 2006; 26: 477-482.
16. Handwerger S, Perlman DC, Altarac D, and McAuliffe V. Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of *Enterococci*. *Clinical Infec Dis.* 1992; 14: 655-661.
17. Lavery A, Rossney AS, Morrison D, Power A, and Keane CT. Incidence and detection of multi-drug-resistant *Enterococci* in Dublin hospitals. *J. Med. Microbiol.* 1997; 46: 150-156.
18. Çöleri, A. Türkiye kaynaklı klinik *Enterococcus*'ların antibiyotik dirençliliği. Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans, Ankara. Tezi. 2002; 1-93.
19. Murray BE. Vancomycin-resistant Enterococcal infections. *The New England J Medic.* 2000; 342: 710-721.
20. Guardabassi L, and Dalsgaard A. Occurrence, structure, and mobility of TN1546-like elements in environmental isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 984-990.
21. Aktaş O. Enterokok türlerinde glikopeptid, penisilin ve yüksek düzey aminoglikozid dirençlerinin araştırılması. SSK Eğitim İzmir Hastanesi (Uzmanlık tezi), 1999; 1-32.
22. Ligozzi M, Lo Cascio G, and Fontana R. *van A* gene cluster in a vancomycin-resistant clinical isolate of *Bacillus circulans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(8): 2055-2059.
23. Gutmann L, Al-Obeid S, Billot-Klein D, Guerrier ML, and Collatz E. Synergy and resistance to synergy between β -lactam antibiotics and glycopeptids against glycopeptide resistant strains of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1994; 38(4): 824-829.
24. Hanrahan J, Hoyen C, and Rice LB. Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1349-1351.
25. Tremlett CH, Brown DFJ, and Woodford N. Variation in structure and location of *van A* glycopeptide resistance elements among enterococci from a single patient. *J Clinic Microbiol.* 1999; 37: 818-820.
26. Leclercq R, and Courvalin P. Resistance to h-glycopeptides in enterococci. *Clin Infect Dis.* 1997; 24; 545-554.
27. Vincent S, Knight RG, Green M, Sahn DF, and Shlaes DM. Vancomycin Susceptibility and Identification of Motile *Enterococci*. *J Clinic Microbiol.* 1991; 29: 2335-2337.
28. Perichon, B., Casadewall, B., Reynolds, P. and Courvalin, P. 2000. Glycopeptide Resistant *Enterococcus faecium* BM4416 Is a Van D-Type Strain with an Impaired D-Alanine:D-Alanine Ligase. *Antimicrob. Agents Chemo.* 44; 1346-1348.
29. Leclercq R, Derlot E, Duval J, and Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med Microbiol.* 1988; 9: 275-302.
30. Clewell DB. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell.* 1993; 73: 9-12.
31. Dunny GM, Leonard BAB, and Heberg PJ. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*:

- interbacterial and host-parasite chemical communication. *J Bacteriol.* 1995; 177: 871-876.
32. Camargo LBC, Barth AL, Pilger K, Seligman BGS, Machado ARL, and Darini ALC. *Enterococcus gallinarum* carrying the *van A* gene cluster: first report in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2004; 37: 1669-1671.
33. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin in United Nations, Morbidity and Mortality Weekly Report. 2002; 51(26): 565-567.
34. Patel R. Vancomycin-resistant enterococci in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 1999; 4: 271-280.
www.earss.rivm.nl. The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) internet sitesi, erişim tarihi 26.06.2008.

AKREP ANTİVENOM ÜRETİMİ

Scorpion Antivenom Production

Özcan ÖZKAN

Refik Saydam Hıfzısıhha
Merkez Başkanlığı,
ANKARA

İletişim:
Özcan ÖZKAN
Refik Saydam Hıfzısıhha
Merkez Başkanlığı
Cemal Gürsel Cad. 18
ANKARA
Tel: 0 312 498 21 50-1135
e-posta: ozcan.ozkan@rshh.gov.tr

ÖZET

Akrep hastalık etkenlerini taşımazlar, ancak çoğu zaman kendilerini korumak amacıyla, insan ve hayvanları sokarak zehirlenmeye neden olurlar. Skorpionizm vakalarının tedavisinde halen kullanılan tek metot akrep antivenom tedavisidir. Antivenom at, koyun, keçi veya deve gibi hayvanlara küçük miktarlarda venom enjeksiyonu ile üretilmektedir. Bu hayvanlarda venomun aktif molekülüne karşı immün bir yanıt gelişir. Hayvanların kanında üretilen antikorlar hayvanlardan düzenli aralıklarla alınır. Toplanan kandan plazma ayrılır. Farklı kimyasal yöntemlerle saflaştırılır ve akrep sokmalarının tedavisinde kullanılır. Türkiye’de, akrep antivenomu 1942 yılından beri Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı’nda üretilmektedir. Bu derlemede, akrep antivenom üretim protokolü hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Akrep, antivenom, üretim, protokol

ABSTRACT

Scorpions do not harbor agents of disease but, they cause envenomations by stinging humans and animals, most of the time to protect themselves. Scorpion antivenom treatment is still the only method used for therapy of scorpionism cases. Antivenom is produced by injecting a small amount of the venom into an animal such as horse, sheep, goat, or camel. These animals develop an immune response against the venom’s active molecule. Antibodies produced in animal’s blood were taken in regular intervals. Plasma was separated from collected blood. It purified by different chemical process and used to treat of scorpion stings. In Turkey, scorpion antivenom has been produced in Refik Saydam Hygiene Center since 1942. The protocol of scorpion antivenom production was explained in this study.

Key Words: Scorpion, antivenom, production, protocol

GİRİŞ

Akrepler, hayvanlar aleminin Arthropoda şubesi, Chelicerata altşubesi, Arachnida sınıfı, Scorpiones takımında yer alan, üzerleri kalın bir kitin tabakası ile kaplı, ergin bireylerinin uzunlukları 130220 mm arasında değişen eklem bacaklılardır (13). Varlığı ve zehirlilikleri çok eski çağlardan beri bilinen akrepler, hastalık etkenlerini taşımazlar. Ancak çoğu zaman kendilerini korumak amacıyla, insan ve hayvanları sokarak zehirlenme ve ölümlere neden olabilirler (4,5). Bu nedenle akrep sokması sonucu meydana gelen zehirlenmeler (skorpionizm) tropikal ve subtropikal bölgelerde halk sağlığını tehdit etmektedir (4-6).

Skorpionizm Ülkemizin coğrafi konumu, iklim koşulları ve sosyo-ekonomik yapısı itibarı ile görülmekte olup, özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde önemli bir halk sağlığı sorunudur (1, 5, 6). Türkiye'de skorpionizme neden olan en önemli akrep türleri *Buthidae* ailesinden *Androctonus*, *Leiurus* ve *Mesobuthus* cinsine ait türlerdir (1, 5, 6). Bunlardan *Androctonus crassicauda* türünden elde edilen venom, antivenom üretiminde antijen olarak kullanılmaktadır (7, 8). Türkiye'de görülen skorpionizm vakalarında, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) tarafından üretilen ulusal antivenom kullanılmaktadır (7-9). Dünyada skorpionizm vakalarına karşı kullanılan tek ve özgün sağaltım seçeneği antivenom kullanımıdır (10-13). Bu makalede, ülkemizde kullanılan antivenom üretim protokolüne yönelik bilgiler sunulmuştur.

ANTİVENOMUN ÜRETİMİNİN TARİHÇESİ

İlk antitoksin çalışmaları difteri ve tetanoz hastalıklarının tedavisine yönelik olarak von Behring ve Kitasato tarafından yapılmıştır (Şekil 1). Bu çalışmaların takiben Calmette tarafından 1894 yılında deneysel olarak tavşandan yılan venomuna karşı ilk antivenom üretilmiştir (12, 13).

Akrep telsonlarından maserasyon yöntemi ile venom elde etme çalışmaları 1872 yılında Jousset de Bellesme tarafından başlatılmıştır (14). Bu yöntem geçmişte olduğu gibi günümüzde de birçok araştır-

mada ve antivenom üretiminde halen kullanılmaktadır. İlk akrep antivenom üretimi, Todd tarafından 1909 yılında gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda Cezayir (1936), Türkiye (1942), Tunus (1958), Bombay (1961) ve İran (1965) da akrep antivenom üretimine başlanmış (14) ve günümüzde de üretime devam edilmektedir.



Şekil 1. Atlardan ilk antitoksin üretimi (Shore, 2002).

Türkiye'de akrep antivenomu, 65 yıl ara verilmeden RSHMB bünyesinde üretilmektedir (7-9). Türkiye'de *Androctonus crassicauda* türünden elde edilen venomun, antivenom üretiminde antijen olarak kullanılmaktadır (7, 8). *A. crassicauda* venomuna karşı üretilen antivenomun, diğer akrep türlerinin (*A.australis*, *Buthus occitanus* [Cezayir], *Tityus serrulatus*, *T. bahiensis* [Brezilya], *Parabuthus* spp. [Güney Afrika], *Centruroides sculpturatus* ve *C. vittatus* [ABD] (15), *Leiurus quinquestriatus*, (9) *Mesobuthus gibbosus* (16) sokmalarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir.

Başlangıçta saflaştırılmadan kullanılan at kaynaklı serumlar çok ciddi reaksiyonlarla birlikte, bazen venomun kendisi kadar tehlikeli sonuçlara neden olmuştur. Bu bağlamda antivenom üretimine yönelik araştırma ve geliştirme çalışmaları geçmişten günümüze kadar devam etmiştir (10, 12, 17).

ANTİVENOM İÇİN ÜRETİM HAYVANININ SEÇİMİ

Antivenom üretiminde at, keçi, koyun, deve ve embriyolu tavuk yumurtası (ETY) kullanılmaktadır (7, 8, 10-12, 18-21). ETY ile daha spesifik ürün elde edilmesine karşın saflaştırma (pürifikasyon) sisteminden kaynaklanan oldukça büyük maliyete sahiptir. Antivenom üretiminde bakım kolaylığı, adaptasyon yeteneğinin yüksek olması, üretim sürecinde diğer hayvanlara göre daha fazla serum elde edilmesi ve saflaştırma yönteminin iyi gelişmiş olması nedeniyle yaygın olarak at modeli kullanılmaktadır (10, 17, 21).

Antivenom üretiminde kullanımı planlanan hayvanlar, üretim sürüsüne alınmadan önce en az bir ya da iki ay izole edilmiş bir mekânda karantinaya alınmalıdır. Karantina süresince hayvanlara değişik testler uygulanır (18, 19, 22). Hastalık etkeni taşıma-

yan hayvanlar çeşitli aşılama ve antiparaziter tedavi programına alınır (Tablo 1). Karantina sonucunda veteriner hekim denetimindeki hayvanlardan; sağlıklı, kondisyonlu, genç, kuvvetli hayvanlar seçilerek üretime alınır (18, 19, 22).

Seçilen hayvanlarda yapılması gereken bazı rutin testler ve kontroller bulunmaktadır:

Ruam (Glanders-Malleus Rotz); akut ve kronik seyirli, bulaşıcı, zoonoz bir hastalıktır. Enfeksiyon atlarda kronik seyirlidir. Enfekte hayvanlar ve taşıyıcılar enfeksiyon kaynağıdır. Ruam, Kuzey Amerika, Batı ve Orta Avrupa'da eradike edilmiştir. Ancak Doğu Avrupa ve Asya'da hala görülmektedir. Bu nedenle hem üretim sürüsünün sağlığı açısından hem de elde edilen biyolojik ürünün güvenliğinin sağlanması için kullanılan atlara intradermik mallein testi uygulanır ve test sonuçları değerlendirilir (Tablo 2), (23, 24).

Tablo 1. Sağlık raporu, üretim için uygun olan atlar üretim sürüsüne alınmadan önce uygulanacak aşılama, aşı takvimi, antiparaziter tedavi planı ile yapılması gereken kontroller.

AŞI TAKVİMİ						
AŞI	UYGULAMA	0. GÜN	1.AY	2.AY	6.AY	12.AY
Tetanoz	IM	√	√	√	–	√**
Influenza	IM	√	√	–	–	√**
Rhinopneumonia	IM	√	√	–	√*	√**
Gazlı Gangren	IM	√	√	–	–	√**
Kuduz	IM	–	–	√	–	√**

*: Altı ayda bir tekrarlanır. **: Her yıl tekrarlanır.

Antiparaziter Tedavi Planı				
Tedavi	Uygulama	40. Gün	60. Gün	70. Gün
Endoparazit	Derialtı (SC)	√	√	√
Ektoparazit	Pülverizatör	√	–	–

Kontroller	
Serolojik Muayene	3 ayda bir
Paraziter Muayene	3 ayda bir
Tam Biokimya Analizi	İmmünizasyon öncesi/sonrası
Tam Kan Analizi	İmmünizasyon öncesi/sonrası

Tablo2. İntradermik Mallein uygulamasından üç gün sonra oluşan reaksiyon sonucu deri kalınlığındaki değişikliğe göre testin değerlendirilmesi

Deri Kalınlığı	Değerlendirme;
5 mm veya>	Pozitif (+)†
3-5 mm (4.9 dahil)	Şüpheli (?)
0-3 mm (2.9 dahil)	Negatif (-)

† Pozitif değerlendirilen hayvanlar; Hayvan Sağlığı ve Zabıtası (23) ve Ruam savaş yönetmeliğinde (24) belirtilen ve bildirilen prosedürler ivedilikle uygulanır.

Üretim yapılan ülkenin coğrafi ve epidemiyolojik verilerine uygun olarak Tablo 3'de gösterilen diğer enfeksiyonlar yönünden karantinada bulunan atlara serolojik testler uygulanır. Test değerlendirmeleri sonunda negatif kabul edilen atlar aşılabilir (18, 19, 22, 25).

Uygulanan tüm işlemler hayvanların kimlik kartlarına kayıt edilerek üretim sürüsüne dahil edilirler. Üretime alınan hayvanlar, immunizasyona başlamadan önce ayrı olarak yedi gün karantinada tutulur. Üretim öncesi karantinaya alınan hayvanların genel sağlık durumlarına ait veriler kayıt edilir. Bu süre sonunda veteriner hekim denetiminde immünizasyon programına uygun olan hayvanlar immünizasyon için hazırlanır (18, 19, 22).

VENOM ELDESİ

İçeriğindeki etken maddelerin çeşitliliği nedeniyle fizyolojik ve farmakolojik çalışmalarda, araştırma materyali olarak sıkça kullanılan akrep zehiri, akreplerin telsonunda (Şekil 2) bulunan zehir bezlerinden salgılanır ve birçok protein, peptid ve biyolojik yönden etkin bileşiklerden oluşan nörotoksik etkili bir salgıdır (4, 5, 14, 26, 27) (Şekil 3). Venomun toksisitesi, bölgeden bölgeye ve aynı tür içerisinde bile değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle akrep sokması sonucu oluşan zehirlenmelerde; akrebin türü, beslenme durumu, zerk edilen zehir miktarı ve içeriği, sokma sayısı, hastanın yaşı, kilosunu, sağlık durumu ve bölgenin iklimi gibi faktörlere bağlı olarak değişik klinik tabloların oluşabileceği vurgulanmıştır

Tablo3. Üretim yapılan ülke ve ithal edilme durumu göz önüne alınarak hayvanlarda araştırılması gereken viral enfeksiyonlar

Atların Viral Enfeksiyonları
<i>Eastern, Western & Venezuelan Equine encephalitis viruses*</i>
<i>St Louis encephalitis virus (SLEV)*</i>
<i>Japanese B encephalitis virus*</i>
<i>Vesicular stomatitis virus (VSV)*</i>
<i>Equine herpes virus, tip 1-5*</i>
<i>West Nile fever virus (WNV)*</i>
<i>Reovirus tip 1-3*</i>
<i>Equine influenza virus*</i>
<i>Equine morbilli virus (Hendra)*</i>
<i>Borna disease virus*</i>
<i>Equine rotavirus</i>
<i>Equine and bovine papillomaviruses (EqPV 1-2 ve BPV 1-2)</i>
<i>Equine infectious anaemia virus (EIAV)</i>
<i>Equine arteritis virus</i>
<i>African Horse Sickness (Orbi)</i>
<i>Equine parvovirus</i>

*: Zoonotik enfeksiyonlar.

(4-6, 28). Ayrıca araştırmalarda ve antivenom üretiminde venom kaynağı olarak kullanılan telsonların nakil koşulları, kurutma yöntemi, depolanması ve kullanım süresi gibi faktörlerin de venom toksisitesi üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir (14, 29).



Şekil 2. Akreplerin, savunma ve beslenmede kullandıkları, içinde oval armut şeklinde zehir bezinin bulunduğu son segment (Özkan, 2005).



Şekil 3. Elektrik akımı ile istem dışı olarak elde edilen şeffaf venomun görünüşü.

Üretimi yapılacak antivenomun kökeni (orijini) belirtilmelidir. Kaynağa yönelik bu bilgiler içerisinde akrebin türü ve bölgesinin tam olarak tanımlanması gereklidir (18, 22).

Venom eldesinde maserasyon ve elektriksel uyarımla sağım yöntemlerinden yararlanılmaktadır.

a) Maserasyon Yöntemi: Akrep telsonlarının kahve değirmeninde öğütülmesinden elde edilen tozun fizyolojik tuzlu su (FTS) ile +4° C' de 72 saat süre ile yapılan ekstraksiyon işlemidir (7, 28, 29).

b) Elektriksel Uyarılarla Sağım Yöntemi: 0-50 V'luk bir elektrik kaynağı ile canlı akreplerin telson bölgesine verilen elektrik akımı ile zehirin akrepten istem dışı olarak elde edilmesidir. Sağım sonucu elde edilen zehir, FTS ile sulandırılır ve liyofilize edilerek -20 ° C de kullanıncaya kadar muhafaza edilir (29).

LETALİTE TESTLERİ

Maserasyon veya elektrik uyarımı ile elde edilen venomun memeliler için toksik düzeylerinin belirlenmesi amacıyla küçük laboratuvar hayvanları (fare, sıçan) üzerinde yapılan testlerle, hayvanlarda görülen intoksikasyon semptomları ve öldürücü olan venom miktarları (mg/kg) tespit edilir.

Lethal Doz 50 (LD₅₀): 18-20g ağırlığında erkek veya dişi farelere farklı konsantrasyonlarda hazırlanan venom solusyonlarının deri altı yolla uygulanmasını takiben farelerin 24-48 saat süre ile

izlenerek ölen hayvan sayısına göre istatistiki yöntemler yardımı ile LD₅₀ sinin hesaplanması ile venomun toksisitesi belirlenir (7, 10, 17, 29-31).

Behrens & Karber ve Spearman Karber ile LD₅₀ Hesaplama için genellikle, 18-20 g ağırlığında en az 5 en fazla 10 tane fare kullanılır, 0.5 ml içerisinde venom deri altı, periton içi ya da damar içi yollarından biri kullanılarak artan miktarlarda verilir. Geometrik ilerleme ile venom miktarları seçilir. Dozlar % 0100 mortalite aralıklarına çekilmelidir. Hayvanlar 24 ya da 48 saat gözlenerek, ölen sayıları kayıt edilerek ve aşağıdaki formüller ile LD₅₀ hesaplanır (25, 28);

Spearman Karber;

$$\text{Log}_{10} \text{LD}_{50} = - (X_0 - d/2 + d \sum ri/n)$$

X ₀	:	% 100 öldüren Log ₁₀ konsantrasyonu
D	:	Dilasyon faktörü
n	:	Hayvan sayısı
ri	:	Her bir venom dozunda ölen hayvan sayısı

Behrens ve Karber;

$$\text{LD}_{50} = \text{LD}_{100} - a.b + \dots + a.b/n$$

a	:	Birbirini izleyen iki doz arasındaki fark;
b	:	Birbirini izleyen iki dozdan ileri gelen ölümlerin aritmetik ortalaması;
n	:	Her bir gruptaki hayvan sayısı

Minimal Lethal Doz (MLD): 150 g ağırlığında erkek sıçan alınarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan venom solusyonlarının deri altı yolla uygulanmasını takiben üç saat süre sonunda ölen hayvan sayısına göre en düşük öldüren doz olarak belirlenir (7, 32, 33).

İMMUNİZASYON PLANI

Venomun toksisitesine bağlı olarak, kullanılacak venom miktarı(ları) değişkenlik gösterebilmektedir. Preinsip olarak sublethal dozla başlanır ve artan dozlar şeklinde hayvanlar immunize edilir (7). Bu

nedenle üretim sürüsüne dahil edilen hayvanlara antivenom üretimine yönelik antijen olarak kullanılan venomun LD₅₀ (Tablo 4-5) ve MLD (Tablo 6-7) toksisite değerine göre başlangıç immunizasyon planı ile üretim tekrarında uygulanacak immunizasyon planları Tablo 5 ve 7'de açıklanmıştır.

BİOASSAY

Hayvanların boyun bölgesinden *Vena Jugularis dextera/sinistra*'dan kan alınır (7, 35). Kan alma işlemi de enjeksiyonda olduğu gibi saha temizlenir ve dezenfekte edilir (18). Alınan kan örneği (20 ml) 5,000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilerek serum örneği hazırlanır (32).

Tablo 4. Üretim sürüsüne alınan hayvanlara LD₅₀ değerine göre venomun uygulanan başlangıç immunizasyon planı.

LD ₅₀ Göre İmmunizasyon Planı		
Gün	Venom (mg)	Adjuvant
0	1mg	CFA [†]
14	2 mg	IFA [†]
21	4mg	AlOH
28	8mg	AlOH [†]
35	10mg	AlOH [†]
42	15mg	AlOH [†]
POTENS BELİRLEME		
KAN ALMA [°]		
45	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
48	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
51	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
51-70	İSTİRAHAT	

[†] Complete ve Incomplete Freund's Adjuvantları, Ribi Adjuvant Sistemi, TiterMax® Adjuvant Sistemi ya da diğer adjuvant sistemleri üretici tarafından tercih edilebilir (31). [°] Kan alma prosedüründe; toplam kan alımı üretici tarafından kullanılan prosedüre göre değişmektedir.

Tablo 5. Birinci immunizasyon sonucu istirahate ayrılan hayvanlara üretim tekrarında uygulanan immunizasyon planı

II. İMMUNİZASYON (Üretim Tekrarı)		
Gün	Venom (mg)	Adjuvant
70	2 mg	IFA
77	4 mg	AlOH
84	8 mg	AlOH
91	10 mg	AlOH
98	12 mg	AlOH
105	15 mg	AlOH
POTENS BELİRLEME		
KAN ALMA		
108	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
111	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
114	5L	Plazmaferesis/ Aferesis
114-140	İSTİRAHAT	

Tablo 6. Üretim sürüsüne alınan hayvanlara MLD değerine göre venomun uygulanan başlangıç immunizasyon planı.

MLD Göre İmmünizasyon Planı		
Gün	Venom (telson) mg	Adjuvant
0	180 mg	CFA
14	360 mg	IFA
21	720 mg	AIPO
28	1000 mg	AIPO
35	1000 mg	AIPO
42	1500 mg	AIPO
POTENS BELİRLEME		
KAN ALMA		
45	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
48	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
51	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
51-70	İSTİRAHAT	

Tablo 7. Birinci immunizasyon sonucu istirahate ayrılan hayvanlara üretim tekrarında uygulanan immunizasyon planı.

II. İMMÜNİZASYON (Üretim Tekrarı)		
Gün	Venom (telson) mg	Adjuvant
70	360 mg	IFA
77	720 mg	AIPO
84	1000 mg	AIPO
91	1000 mg	AIPO
98	1500 mg	AIPO
105	2000 mg	AIPO
POTENS BELİRLEME		
KAN ALMA		
108	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
111	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
114	5L	Plazmapheresis/ Apheresis
114-140	İSTİRAHAT	

LD₅₀'ye Göre Etkili Doz 50 (ED₅₀) Belirleme; alınan kan serum örnekleri farklı oranlarda hazırlanarak LD₅₀'si belirlenen venomun 50 katı ile karıştırılır. Oluşan karışım oda sıcaklığında bir saat veya 37°C de yarım saat nötralizasyona bırakılır. Her bir karışım en az altı adet 1820 g ağırlığında, sağlıklı er-

kek veya dişi fareye derialtı yolla uygulanır. Aynı özellikteki farelere kontrol grubu olarak 5 LD₅₀ venom verilir. Hayvanlar 24 ya da 48 saat gözlem altında tutularak yaşayan hayvan sayısına göre istatistiki yöntemler yardımı ile ED₅₀'sinin hesaplanması ile serum örneğinin potensi belirlenir (7, 10, 17, 31, 35-37).

MLD'e Göre Etkili Doz Belirleme; venomun sıçanlarda belirlenen MLD sabit tutularak alınan kan serum örnekleri farklı oranlarda hazırlanarak iki MLD venom miktarı ile karıştırılır. Oluşan karışım oda sıcaklığında bir saat nötralizasyona bırakılır. Her bir karışım en az iki adet 150 g erkek sıçana derialtı yolla uygulanır. Aynı özellikteki sıçanlara kontrol grubu olarak iki MLD venom verilir. Hayvanlar üç saat gözlem altında tutularak yaşayan hayvan sayısına göre etkili serum dozu belirlenir. Yapılan bioassay değerlendirme sonunda immunizasyonu tamamlanan atlardan kan alma işlemi gerçekleştirilir (7, 32, 33, 37).

KANALMA

Üreticinin kullandığı prosedüre bağlı olarak immün hayvanlardan kan alma işlemleri apheresis veya plasmapheresis yöntemleri kullanılarak yapılır. Apheresis yönteminde hayvandan alınan kandan plazma ayırımı sonrası kanın şekilli elemanları kullanılmazken, plasmapheresis işleminde plazma ayırımı sonunda kanın şekilli elemanları tekrar hayvana geri verilir. Bu yöntemler;

a) Apheresis: İmmünizasyon ve hiperimmünizasyon periyodu boyunca önceden hazırlanan üretim planına sadık kalınarak antikor titresini yüksek olan atlardan kan alınır. Atlardan kan boyun bölgesinden Vena jugularis dextra/sinistra'dan alınır. Kan alma işleminde de enjeksiyonda olduğu gibi saha temizlenir ve dezenfekte edilir. Önceden hazırlanmış steril toraklar yardımıyla V. jugularise girilerek 46 litrelik steril sitratlı cam silindirlere veya steril kan torbalarına kan alınır (Şekil 4). Alınacak miktar hayvanın kondisyonuna ve ağırlığına göre 35 litre olabilir. Kan alma işleminden sonra saha dezenfekte edilerek kompres uygulanarak olası kanamalar önlenir (7, 21, 22).

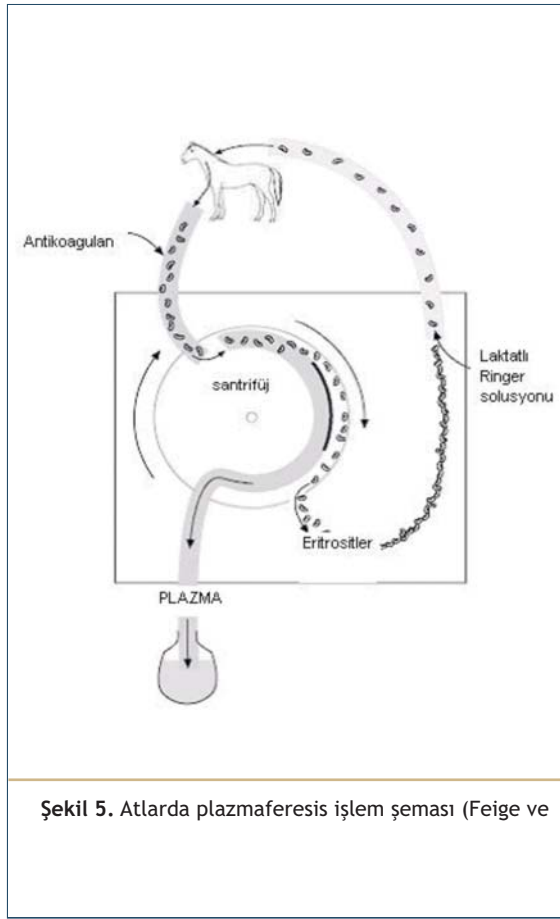
Kanın pıhtılaşmasını önleyen antikoagulan madde olan Trinatryumsitratdehidrat %15'lik çözeltisi (saf su/trinatryumsitrat dehidrat; 1000 ml:15 gr) kullanılmaktadır. Hazırlanan çözeltiden steril cam silindirlere hacminin %10'u oranında (6 000 ml : 600 ml sodyum sitrat çözeltisi) steril şartlarda konulur (32, 41).

b) Plasmapheresis: İmmünizasyon ve hiperimmünizasyon periyodu boyunca önceden hazırlanan üretim planına sadık kalınarak antikor titresini yüksek olan atlara Plasmapheresis işlemi uygulanır; Atların boyun bölgesinden V. jugularis dextra/sinistra sahalari traş edilir. Bu bölgeler antiseptikler yardımıyla dezenfekte edilir. Dezenfekte edilen saha lokal anestezi preparatlarla kateter uygulaması için hazırlanır. V.jugularise kateter yerleştirilerek Plasmapheresis cihazından kan akış hızı (70-100ml/dk) ayarlanır. Cihaz tarafından plazma ayırma işlemi sonunda kanın şekilli elemanları laktatlı ringer solusyonu ile hayvana geri verilir. Ayrılan plazma (steril plazma torbasında) toplanarak plasmapheresis işlemi tamamlanır (39, 40) (Şekil 5).

Kanların Muhafazası: 4-6 litrelik (apheresis sonucu) steril sitratlı cam sedimantasyon silindirlerine veya steril kan torbalarına (Şekil 5) alınan kanlar 4-



Şekil 4. Boyun bölgesinden Vena jugularis sinistra'dan apheresis yöntemiyle kan alınma işlemi.



Şekil 5. Atlarda plazmaferesis işlem şeması (Feige ve

8°C 'de soğuk odada, plazma ayrışması süresince muhafaza edilir ve cam sedimentasyon silindiri veya kan torbaları üzerine, alınan kana ait bilgiler (hayvanın üretim numarası; üretim tarihi; potens durumu) kaydedilir (41).

PLAZMANIN ELDE EDİLMESİ

Steril sitratlı cam sedimentasyon silindirlerine veya steril kan torbalarına aseptik şartlarda atlardan alınan kan, soğuk odada (4 - 8°C 'de) 10 gün bekletilir. Bu süre içerisinde, cam sedimentasyon silindirlerindeki kanın 2/3'ü plazmadan, 1/3' ü kanın şekilli elementlerinden oluşur. Oluşan plazma hayvanın beslenmesine bağlı olarak açık kehribar renginden açık yeşil renge kadar değişen renklerde olabilmektedir

(41). Aseptik şartlarda plazma steril cam silindirlere veya steril plazma torbasına aktarılır. Bu aktarma işlemi sırasında; sepsi/asepsi kurallarına uygun ve dibde çökmüş olarak bulunan eritrositlerin (alyuvarların) plazma ile birlikte çekilmemesine dikkat edilir. Dikkat edilmediği takdirde eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan hemoglobinin plazma renginin değişmesine neden olur (41).

Plazma Alma İşlemi Sırasında Dikkat Edilecek Başlıca Hususlar: Plazmanın hemolize olmaması için kan doğrudan akıtılmamalı, cam silindirin cidarından kanın kayarak akması sağlanmalıdır. Akan kan sitrat çözeltisi ile yavaş yapılan dairesel hareketlerle kan/sitrat karışımı homojenize edilmelidir. Üretim maliyetine yönelik tek kullanımlık cam silindirler kullanılmıyorsa, cam silindirlerin temizlenmesi işleminde kesinlikle deterjan kullanılmamalıdır. Şayet deterjan ile yıkama yapılırsa iyice durulandıktan sonra tekrar saf sudan geçirilmelidir (41).

Krezol Çözeltisinin Hazırlanması ve Plazmaya Katılması: Koruyucu madde olarak hazırlanan krezol çözeltisi (sodyum krezol: dietileter; 2:1) plazmaya % 0,45 oranında ilave edilir. Plazma krezol çözeltisi ile homojen hale getirilerek karanlıkta ve soğuk odada 4 - 8°C 'de muhafaza edilir (41).

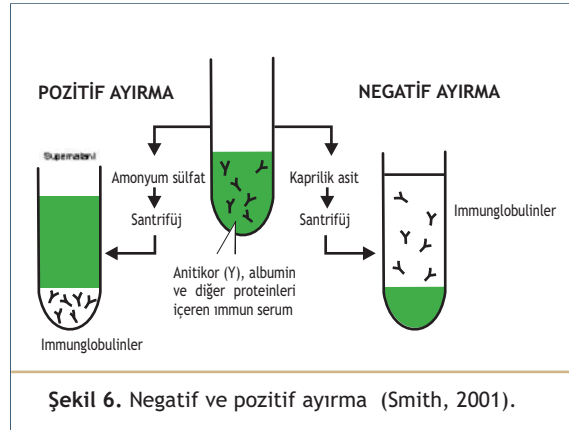
Plazmanın Saklanması Dikkat Edilecek Hususlar: Plazmanın donmamasına çok dikkat edilmelidir. Plazma 0 °C'de muhafaza edilirse 5 yıl süre ile etkinliklerinden (potens) hemen hemen hiçbir kayıp olmaz. Ancak 5°C'de ve karanlıkta muhafaza edildikleri takdirde plazmaların etkinliklerinde; her yıl azami %5, 20 °C 'de %20, 37°C 'de %50 oranında kayıp meydana gelmesine karşın saflaştırılmış ve konsantre serumlarda ise kayıp çok daha az olmaktadır. 0-5°C 'de muhafaza edilirlerse hemen hiçbir kayıp olmamakla birlikte 15°C ' yılda ortalama %3, 20°C ' yılda ortalama %5, 37°C 'de ise saflaştırılmış ve konsantre serumda %10-20 oranında kayıp olur. Bu nedenle raf ömrü süresinde meydana gelebilecek sıcaklık değişimindeki kayıplara karşılık olarak, tevzi aşamasında %20-25 fazla antivenom konulmaktadır (38).

SAFLAŞTIRMA İŞLEMİ

Kullanılan saflaştırma yöntemi Ulusal kontrol otoritesi tarafından onaylanmalıdır (22). Antivenomların çoğu ya kısmen saflaştırılmış immunglobulin G (IgG) ya da antijenin bağlandığı fragment (F(ab')₂) kullanılarak hazırlanmaktadır (10-19).

Pozitif Ayırma: Alınan plazmalar bir araya getirilir (Protein miktarı 70 mg/ml). Plazma protein miktarı 40 mg/ml olacak şekilde steril distile su ile seyreltilir. Seyreltilmiş plazmanın pH'sı 2N HCL ile 3,2 ayarlanır. pH 3,2 olan plazmaya 1:8 oranında Pepsin ilave edilir. Bir saat 37°C de yavaş bir şekilde karıştırılır ve peptik parçalama işlemi başlatılır. Ön parçalama işlemi sonunda plazmanın pH'sı 2N NaOH ilave edilerek 4,3'e ayarlanır. Plazma ısı oda sıcaklığına ayarlanır (22-24 °C), pH'sı 4,3 olan plazma karışımına %14'ü amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) tuzu olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilir. Oda sıcaklığında olan plazma bir saat yavaş bir şekilde karıştırılır. Plazma karışımının sıcaklığı 56°C yükseltilir. Bir saat sonunda plazma sıcaklığı 40°C ye indirilir. İstenmeyen proteinlerin çökmesi sağlanır ve Whatman K300 filtre kağıdı ile filtrasyon işlemi yapılır. Bu filtrasyon sonunda, filtrat ve çöküntü kısmı ayrılmış olur. Filtrat kısmı alınarak pH 7,2 olarak ayarlanır. pH'sı 7,2 olan plazma karışımına % 31'i amonyum sülfat tuzu olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilir. Oda sıcaklığında olan plazma bir saat yavaş bir şekilde karıştırılır. İmmunoglobulinler çöker (Şekil 6). Tekrar filtrasyona tabi tutulur ve çöküntü kısmı alınır. Amonyum Sülfat tuzundan ayırtmak için diyaliz işlemine tabi tutulur ve steril FTS (%0,85 NaCl) ilave edilerek serum hazırlanır (Şekil 7), (42-46).

Negatif Ayırma: F(ab')₂ İmmunoglobulin solusyonu (Protein miktarı 70 mg/ml) 1,76 N asetik asit ile pH 5,8 ayarlanır. Bu karışıma %2,5 kaprilik asit ilave edilir. Bir saat süre ile kuvvetlice karıştırılır. Karışım, 5000 x g, 30 dk. Santrifüj edilir. Süpernatant alınır ve çöküntü atılır (Şekil 6). Süpernatant F(ab')₂ ultrafiltrasyon yapılır. pH 1 N NaOH ilave edilerek 6,8-7,0'e ayarlanır. İmmunoglobulin F(ab')₂ antivenom hazırlanır (42-46).



Şekil 6. Negatif ve pozitif ayırma (Smith, 2001).



Şekil 7. Saflaştırılmış ürün (Özkan, 2001).

STANDARDİZASYON VE KALİTE KONTROL TESTLERİ

Antivenom üretiminde, son ürüne uygulanan kalite kontrol testleri, ulusal ve uluslararası standartlarla belirlenmiştir (18, 19, 22, 47, 48). 16 Ocak 1996 tarih ve 22525 sayılı Resmi Gazete de yayımlanarak yürürlüğe Ulusal Asgari Uygunluk Kriterleri Tebliğlerine (96/7-8-9) uygun olmalıdır (48-51).

Gelişen ülkelerde dahi akrep sokmaları sonucu zehirlenme vakaları yaygın olarak görülmektedir (17). Bu nedenle yüksek kalitede, ucuz, standardize edilmiş antivenom ulusal kontrol otoritesi tarafından kontrol edilmelidir (18, 19, 47). Antivenom hazırlama prosedürleri ulusal ve uluslararası düzeyde iyi üretim uygulamaları (İÜU-GMP) ilkeleri gerekleri yanısıra WHO, US farmakopesi ve Avrupa

farmakopesindeki öneriler de dikkate alınarak hazırlanmalıdır (12, 47, 48).

KAYNAKLAR

- Özkan Ö, Karaer Z. Türkiye akrepleri. *Türk. Hij. Den. Biyol. Derg.* 2003; 60(2): 55-62.
- Özkan Ö, Karaer Z. Akreplerin Vücut Yapıları. *T.Parazitol Derg.* 2004; 28 (1): 54-58.
- Özkan Ö, Yaman N. Akrepler. *Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Bülteni.* Ankara, Kasım, 2004; 15-18.
- Özkan Ö, Yaman N. Akrep Zehri. *Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Bülteni.* Ankara, Şubat, 2004; 19-22.
- Ozkan O, Kat I. *Mesobuthus eupeus* scorpionism in Sanliurfa region of Turkey. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2005; 11(4), 479-491.
- Ozkan O, Kat I. *Androctonus crassicauda* (Oliver 1807) scorpionism in Sanliurfa region of Turkey. *Acta Parasitologica Turcica.* 2006; 30(3), 239-245.
- Ozkan O, Adıgüzel S, Ates C, Bozyigit I, Filazi A. Optimization of Antiscorpion Venom Production. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2006; 12(2), 297-309.
- Tulga T. Scorpions found in Turkey and paraspecific action of an antivenin produced with the venom of the species *Androctonus crassicauda*. *J. Turkish Hygiene Exp Bio.*, 1964; 24; 2, 146-155.
- Tulga T. Cross-reactions between anti-scorpion (*Buthus quinquestratus*) and anti-scorpion (*Prionurus crassicauda*) sera. *J. Turkish Hygiene Exp Bio.*, 1960; 20, 191-203.
- Theakston RD., Warrell DA., Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon.* 2003; 41, 541-557.
- Sedik SS, Wanas S, Shehata A, Fawaz S. Development of an improved method for production of antiscorpion F(ab)₂ fragment of IgG with high yield and potency. *Journal of Natural Toxins.*, 2002; 11(2), 123-132.
- Krifi MN, El Ayeb M, Dellagi K. The Improvement and Standardization of Antivenom Production in Developing Countries: Comparing Antivenom Quality, Therapeutical Efficiency, and Cost. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 1999; 5(2), 128-141.
- Isbister GK, Graudins A, White J, Warrell D. Antivenom treatment in arachnidism. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology.* 2003; 41(3), 291-300.
- EMA. The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Evaluation of Medicines for Human Use. Note for Guidance on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use. CPMP/BWP/3354/99. London, 2002, 14.
- Animal Sera. http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/en/Animal_sera. Erişim Tarihi 2006.
- Meddeb-Mouelhi F, Bouhaouala-Zahar B, Benlasfar Z, Hammadi M, Mejri T, Moslah M, Karoui H., Khorchani T, El Ayeb M. Immunized camel sera and derived immunoglobulin subclasses neutralizing *Androctonus australis hector* scorpion toxins. *Toxicon.* 2003; 42, 785-791.
- Christensen PA. Production and standardization of antivenin. In: Lee CY, *Handbook of experimental pharmacology.* Berlin: Springer Verlag, 1979:825.
- WHO, Requirements for immune sera of animal origin (Requirements for Biological Substances No.18). *WHO Techn. Rep. Ser.*, 1969, 413, 45-60.
- Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Yönetmeliği. Bakanlar Kurulu Karar Tarihi - No: 22.02.1989 89/13838. Dayandığı Kanun Tarihi - No: 08.05.1986 3285. Yayımlandığı Resmi Gazete Tarihi - No: 15.03.1989 20109
- Ruam Savaş Yönetmeliği. 12 Aralık 1977 tarih ve 16144 sayılı Resmi Gazete.
- Burnouf T, Griffiths E, Padilla A, Seddik SS, Stephano MA, Gutierrez J. Assesment of the viral safety of antivenoms fractioned from equine plazma. *Biologicals.* 2004; 32 , 115-128.
- Padilla A, Govezensky T, Possani LD, Larralde C. Experimental envenoming of mice with venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*: differences in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. *Toxicon.* 2003; 41(8), 959-965.
- Balozet L. Scorpionism in the old world. In; *Venomous Animal and Their Venoms* (Bücherl, W. & Buckley, E.E., Eds). Academic Press, New York. 1971: 3, 349-371.
- Zlotkin E, Miranda F, Rochat H. Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In *Handbook of Experimental Physiology* (Bettini S., Ed.), Springer-Verlag, Heidelberg. 1978; 48, 317-369.
- Ozkan O, Filazi A, The determination of acute lethal dose - 50 (LD50) levels of venom in mice, obtained by different methods from scorpions, *Androctonus crassicauda* (Oliver 1807). *Acta Parasitologica Turcica.* 2004; 28(1), 50-53.

26. Ozkan O, Adiguzel S, Yakistiran S, Filazi A. Study of the relationship between *Androctonus crassicauda* (Oliver, 1807; Scorpiones, Buthidae) venom toxicity and telson size, weight and storing condition. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2006; 12(2), 297-309.
27. Krifi MN, Marrakchi N, ElAyeb M, Dellagi K. Effect of some variables on the in vivo determination of scorpion and viper venom toxicities. *Biologicals*. 1998; 26, 277-288.
28. World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO offset publication No 58. Geneva, 1981.
29. Antivenom Production Process. Lister Institute of Preventive Medicine. Federal Security Agency U.S. Public Health Service National Institute of Health (Text-book), 1948, 161.
30. Antivenom Prospectus. Scorpion antivenom production prospectus used Refik Saydam Hygiene Center of Turkish republic Health Ministry (Prospectus, using instruction). 2004.
31. Veronica M.J. Review of Selected Adjuvants used in Antibody Production. *ILAR Journal*. 1995; 37(3), 119-125.
32. Yamileth A., Ricardo E., José M.G. Effects of bleeding in horses immunized with snake venoms for antivenom production. *Revista De Biologia Tropical* 1997; 45(3), 1209-1215.
33. European Pharmacopoeia. Viper venom, antiserum, European 1997. 0145, 1712-1713.
34. Whittemore FW., Keegan HL., Borowitz JL. Studies of scorpion antivenins. 1. Paraspecificity. *Bull. World Health Organ.*, 1961; 25, 185-188.
35. WHO, Requirement for snake antivenins (Requirements for Biological Substances No.21) WHO Techn.Rep.Ser., 1971, 21-44.
36. Aşı ve Serum Uygulama Rehberi. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, Sağlık İşleri Genel Müdürlüğü, No: 426. 1973; 104.
37. Feige K, Ehrat FB, Kästner SBR, Wampfler B. The effects of automated plazmapheresis on clinical, haematological, biochemical and coagulation variables in horses. *J. Vet. Med.*, 2003; 50, 185-189.
38. Slovis NM., Acvim D, Murray G. How to Approach whole blood transfusions in horses. *AAEP proceedings*. 2001; 47, 266-269.
39. Antivenom Üretim Protokolü. Refik Saydam Merkez Başkanlığı Akrep antivenom üretim protokolü. 1956.
40. Gutierrez JM, Rojas E, Quesada L, Leon G, Nunez J, Laing GD, Sasa M, Renjifo JM, Nasidi A, Warrell DA, Theakston RD, Rojas G. Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG. An alternative to the antivenom crisis in Africa. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hygiene.*, 2005; 99, 468-475.
41. Herrera M, Leon G, Segura A, Meneses F, Lomonte B, Chippaux JP, Gutierrez JM. Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camel IgGs. *Toxicon*. 2005; 46, 775-781.
42. Rojas G, Manuel JJ, Gutierrez JM. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma. Description of simple procedure for antivenom production. *Toxicon*. 1994; 32(3), 351-363.
43. Sezginman N, Demirtaş N. Purification and concentration of antitoxic plasmas. *J. Turk. Hyg. Exp Biol.*, 1970; 30(61), 63-72.
44. Smith D. Spitting venom the search for a cure for a Thrid World killer. *The Chemical Engineer*. 2001; 718, 3839.
45. WHO. Good manufacturing practices for biological products. WHO Techn. Rep. Ser., 1992; 822, 20-30.
46. European Pharmacopoeia. Immunsera for Human Use. Part 2. European Treaty Series No. 50. 1981, 4.
47. Sterilite Testi Ulusal Asgari Uygunluk Kriterleri. 16 Ocak 1996 tarih ve 22525 sayılı Resmi Gazete, Tebliğ No: 96/7. Yürütme ve İdare Bölümü, 42-45.
48. Fiziko-Kimyasal Kontroller Ulusal Asgari Uygunluk Kriterleri. 16 Ocak 1996 tarih ve 22525 sayılı Resmi Gazete, Tebliğ No: 96/9. Yürütme ve İdare Bölümü, 48-51.
49. Zararsızlık Testi Ulusal Asgari Uygunluk Kriterleri. 16 Ocak 1996 tarih ve 22525 sayılı Resmi Gazete, Tebliğ No: 96/8. Yürütme ve İdare Bölümü, 47.

DUYURU

I
S
P
S
9

ULUSLARARASI
ECZACILIK BİLİMLERİ
SEMPOZYUMU

HAZİRAN 23-26, 2009
ANKARA, TÜRKİYE

Organizasyon komitesi adına sizleri fakültemizde yapılacak olan sempozyumumuza içtenlikle davet ediyoruz. Sempozyum temel ve farmasötik bilimlerdeki son gelişmeleri içeren özel konferanslar, poster ve sözlü sunumlara evsahipliği yapacaktır. Sempozyum hakkında daha fazla bilgi almak için lütfen web sayfamızı ziyaret ediniz:

www.pharmacy.ankara.edu.tr

Prof. Dr. Seçkin ÖZDEN
Dekan

Sempozyum Sekreteri:

Prof. Dr. Süreyya ÖLGEN

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Tandoğan 06100 ANKARA

Telefon: 312 203 30 73 **Faks:** 312 213 10 81

E-mail: olgen@pharmacy.edu.tr

Web: www.pharmacy.edu.tr

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE

REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi
REFİK SAYDAM HYGIENE CENTER

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology Publishing Agreement Form

.../.../20..

Makale Türü/Article Type: (...)Araştırma/Research (...)Derleme/Review (...)Olgu/Case
Makale Başlığı/Article Entitled:.....

Sayın Editör,

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

Bu çalışmanın:

1. Bilimsel, etik ve hukuki sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Daha önce yurt içinde veya yurt dışında Türkçe veya yabancı bir dilde yayınlanmadığını,
3. Başka bir yayın organına yayınlanmak üzere gönderilmediğini,
4. Yayın için kabulü halinde tüm 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 legally,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under evaluation by this bulletin,
3. The article contains no libellous or other 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: 1.İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz.
2.Formu aşağıdaki adrese faks/posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz.

Note: 1.Please indicate the corresponding Author with (X).
2.Please send this form to the address below by faks or mail, or deliver personally.

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 06100 Sıhhiye-ANKARA
Tel/Phone: 0312 458 23 64 Faks/Fax: 0312 458 24 08 e-posta/e-mail: turkhijyen@rshm.gov.tr

