



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

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

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

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

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

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

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

EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Demet CANSARAN-DUMAN
Yavuz UYAR

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

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

TEKNİK YÖNETMEN / TECHNICAL MANAGER

Nevzat IŞIK

TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Murat BAYRAM
Murat DUMAN
Hasan KAYA
Zeynep KÖSEOĞLU
Selahattin TAŞOĞLU

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

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

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

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

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

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

Ahmet ÇARHAN, Türk Akreditasyon Kurumu, Ankara

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

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

Ali ALBAY, GATA, Ankara

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Berrin ESEN, RSHMB, Ankara

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

Celal GÖKÇAY, ODTÜ, Çevre Müh., Ankara

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

Daniel MOTLHANKA, Botswana College of Agriculture, Botswana

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gülner TARHAN, Ahievran Üniv., Sağlık MYO, Kırşehir

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

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

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

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

Iva CHRISTOVA, NCIPD, Sofia, Bulgaria

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

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

İsmail CEYHAN, RSHMB, Ankara

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

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

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

Mahinur AKKAYA, ODTÜ, Kimya Müh., Ankara

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nilay ÇÖPLÜ, RSHMB, Ankara

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

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

Orhan BAYLAN, GATA, Ankara

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

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

Paul HEYMAN, Queen Astrid Military Hospital, Belgium

Pauline MWINZI, Medical Research Inst., Kenya

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

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

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

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

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

Roberto Canete VILLAFRANCA, Centre for Hygiene, Cuba

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

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

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

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

Sıraç DİLBER, Karolinska Univ., Medical School, Sweden

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

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

Takashi AKAMATSU, Prof. Emeritus, Japan

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

Yesim ÖZBAŞ, Hacettepe Üniv. Gıda Müh., Ankara

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

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

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

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

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

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallar aranır:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11- Makale yazımında dikkat edilecek hususlar şunlardır:

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

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

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

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

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

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

Bulgular: Sadece elde edilen bulgular açık bir şekilde belirtilmelidir.

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

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

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

Sürelî yayın: Yazar(lar)ın Soyadı Adının baş harf(ler)i (altı veya daha az yazar varsa hepsi yazılmalıdır; yazar sayısı yedi veya daha çoksa yalnız ilk altısını yazıp "et al." veya "ve ark." eklenmelidir). Makalenin başlığı, Derginin Index Medicus'a uygun kısaltılmış ismi, Yıl; Cilt (Sayı): İlk ve son sayfa 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 Parazitoloj Derg*, 2001; 25 (3): 234-5.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12- Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

13- Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

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

Tel : (0312) 458 23 64

Faks : (0312) 458 24 08

e-posta : turkhijyen@rshm.gov.tr

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

Manuscripts are sought according to the following rules:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Key words should be given under Turkish and English.

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

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

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

Results: The findings should be stated clearly.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

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

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

EDITORIAL POLICY

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

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

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

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi;

CABI Index



Ulrichsweb and
Serials Solutions



Chemical Abstracts
Service (CAS)



TURK MEDLINE



DOAJ



Türkiye Atıf Dizini



Index Copernicus



Genamics
JournalSeek



Google Scholar



NewJour



Open J-Gate



TUBİTAK-ULAKBİM



tarafından dizinlenmektedir.

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

İLETİŞİM

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

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

www.turkhijyen.org

CORRESPONDENCE

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

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

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi

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

■ Olgu Sunumu

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

■ Derleme

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

CONTENTS

■ Original Article

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

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

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

Nihal YÜCEL, Yeliz ANIL

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

İbak GÖNEN

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

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

■ Case Report

5. Anthrax on lower eyelid 93 - 96

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

■ Review

6. Rapid diagnostic methods in microbiology 97 - 104

Zeki ARAS

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

Sibel UZUN

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

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

Fabiana VALADARES¹, Maria Rita Carvalho Garbi NOVAES², Roberto Cañete VILLAFRANCA³
Marília da Cunha MENEZES⁴, Mariana Campos REIS⁴, Daniella Rodrigues GONÇALVES⁴

ÖZET

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

¹ Clinical Nutrition Institute. University of Brasília - DF, BRAZIL

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

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

⁴ School of Medicine. Institute of Health Science- ESCS

İletişim / Corresponding Author : Maria Rita Garbi NOVAES

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

Tel : +90 537 832 55 94

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

Geliş Tarihi / Received : 13.12.2010

Kabul Tarihi / Accepted : 25.03.2011

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

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

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

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

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

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MATERIAL AND METHODS

Study setting

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

Enrolment and subject selection

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

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

Inclusion criteria

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

Ethics

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

A. sylvaticus extract

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

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

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

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

Clinical outcome

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

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

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

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

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

Statistical Analysis

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

RESULTS

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

Results of Patients with three chemotherapy cycles

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

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

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

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

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

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

* Comparison between baseline and after three months

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

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

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

Regarding immunological parameters, the number of white blood cells was observed. There was a significant increase in the number of leukocytes (5.07 ± 1.54 to 5.9 ± 1.90, p = 0.03) for the *A. sylvaticus* group. Findings in the placebo group showed a slight decrease, but revealed no significant difference (5.28 ± 1.70 to 4.36 ± 1.55, p = 0.26). Observed reference values were 3.5 to 10.5 / mm³ (Table 2).

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

Regarding lymphocyte percentages, there was no significant difference for both groups, however, for total lymphocyte count (TLC) there was a significant difference in the placebo groups with significant reduction of data (1738.45 ± 744 1115.15 ± 218 for, 16, $p=0.01$) and for the *A. sylvaticus* group a significant increase was revealed (from 1454.32 ± 381.47 to 1931.39 ± 649.60 , $p=0.009$) (Table 2).

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

Outcome of Patients with six chemotherapy cycles

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

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

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

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

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

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

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

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

* Comparison between baseline and after three month

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

When comparing the first and third month of chemotherapy, considering reference values from 3.9 to 5.03 10^6 / μmL , to assess the number of red blood cells, the placebo group showed a significant decrease (from 4.21 ± 0.55 10^6 / μmL to 3.94 ± 0.66 10^6 / μmL , $p=0.02$). As for values observed in the sixth month of treatment, there was a decrease in the number of red blood cells (4.21 ± 0.55 to 3.63 ± 0.33 10^6 / μmL , $p=0.03$). The group supplemented with *A. sylvaticus* revealed a significant increase in the number of red blood cells for the third month of supplementation (from $1.18 \pm 4:23$ 10^6 / μmL to 4.6 ± 0.9 10^6 / μmL , $p=0.0007$) and for the sixth month of supplementation (from $1.18 \pm 4:23$ 10^6 / μmL to 5.01 ± 0.5 10^6 / μmL , $p=0.0008$) when compared to the first month of treatment (Table 3).

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

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

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

Red series	Placebo (n = 10)				<i>A. sylvaticus</i> (n = 10)				Reference value
	Initial	Three months	Six months	* p value	Initial	Three months	Six months	* p value	
Hemoglobin (g/dL)	12.22 ± 1.32	11.52 ± 1.98	11.68 ± 1.66	0.25	12.04 ± 1.21	12.61 ± 1.27	13.17 ± 1.26	0.01	12 to 15.5 g/dL
Hematocrit (%)	35.10 ± 3.37	32.97 ± 4.49	35.32 ± 4.74	0.80	36.44 ± 3.06	38.07 ± 3.41	38.23 ± 3.06	0.10	35-45%
RBC (10^6 / μmL)	4.22 ± 0.55	3.94 ± 0.66	3.63 ± 0.33	0.03	4.23 ± 1.18	4.6 ± 0.94	5.01 ± 0.5	0.0008	3.9 to 5.00 10^6 / μmL
MCV (fL)	85.75 ± 4.78	83.39 ± 9.6	75.15 ± 17.4	0.12	86.06 ± 3.03	86.61 ± 5.10	88.84 ± 3.41	0.09	82-98 fL
MCH (pg)	27.95 ± 1.86	26.74 ± 0.36	29.23 ± 1.83	0.08	26.05 ± 1.76	28.89 ± 12.85	29.04 ± 2.12	0.01	26-34 pg
MCHC (g/dL)	33.05 ± 0.88	32.51 ± 1.5	33.63 ± 1.74	0.30	31.91 ± 1.28	33.91 ± 3.27	32.73 ± 2.15	0.30	31-36 g/dL

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

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

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

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

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

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

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

DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

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

* Comparison between baseline, after three and six months.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Research with medicinal mushrooms indicate that β -glucan polysaccharide acts in the body by increasing

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSION

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

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

KAYNAKLAR

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

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

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

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

Nihal YÜCEL¹, Yeliz ANIL²

ÖZET

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

¹ Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA

² Ankara Üniversitesi, Sağlık Kültür Spor Dairesi Başkanlığı, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Nihal YÜCEL

Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA

Tel : +90 312 202 11 89

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

Geliş Tarihi / Received : 19.01.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 28.02.2011

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

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

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

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

GİRİŞ

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

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

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

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

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

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Toplanması ve Analize Hazırlanması

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

Stafilocokların İzolasyonu ve İdentifikasyonu

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

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

Stafilocokların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

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

BULGULAR

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

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

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

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

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

n: izolat sayısı

*: yüzde değerleri toplam izolat sayısına göre alınmıştır

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

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

n: izolat sayısı

*: yüzde değerleri toplam izolat sayısına göre alınmıştır

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

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

n: toplam KPS/KNS izolat sayısı

TARTIŞMA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KAYNAKLAR

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