

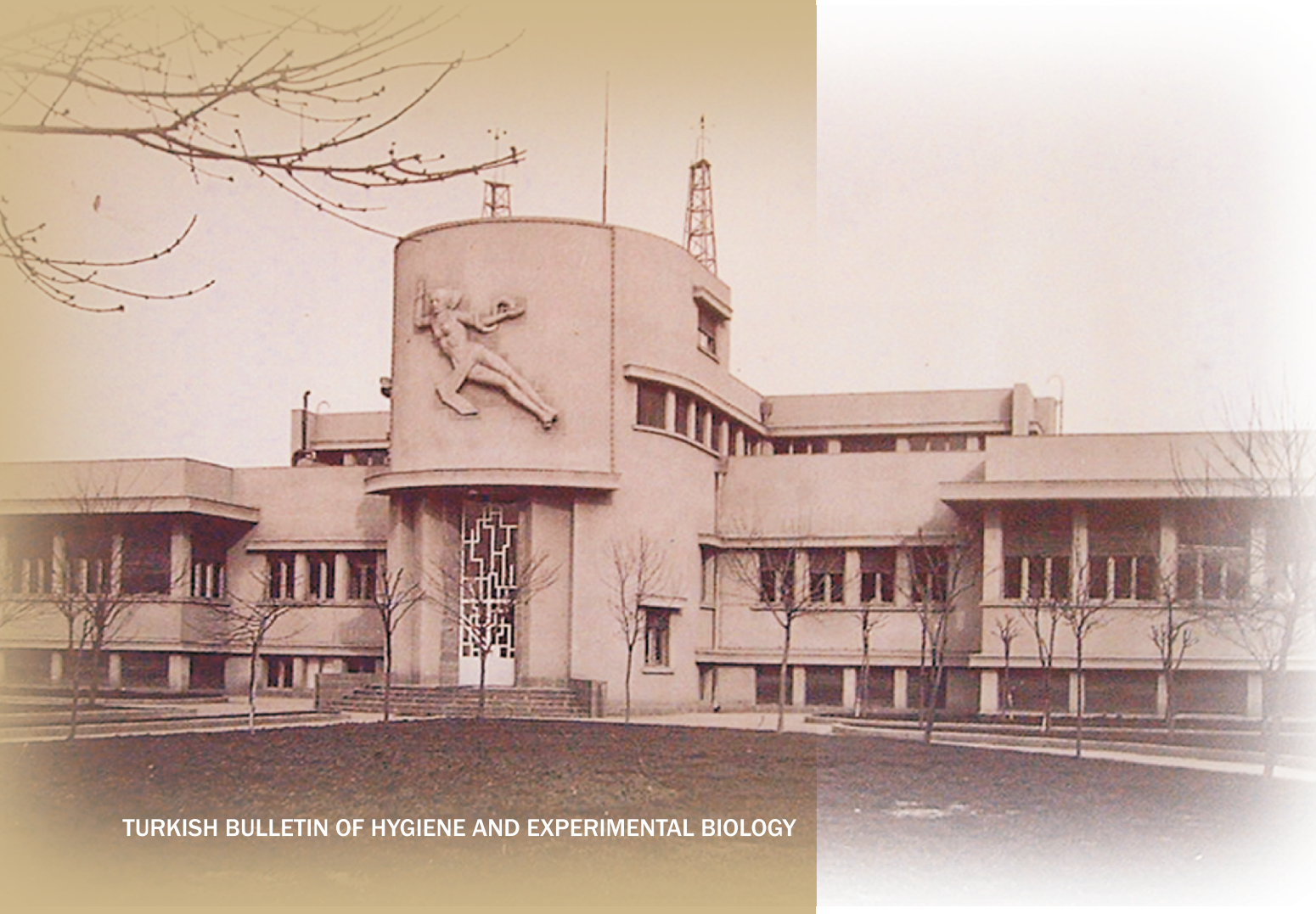


T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 73 ■ Sayı/Number 3 ■ Yıl/Year 2016





T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

REPUBLIC OF TURKEY
THE MINISTRY OF HEALTH
PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

ISSN 0377-9777 (Basılı / Printed)

ISSN 1308-2523 (Çevrimiçi / Online)

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 73 ■ Sayı/Number 3 ■ Yıl/Year 2016

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu adına

On behalf of Public Health Institution of Turkey

İrfan ŞENCAN, Başkan (President)

EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Hasan IRMAK

EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

Demet CANSARAN-DUMAN

Hülya ŞİMŞEK

Pınar KAYNAR

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Mehmet Kürşat DERİCİ

Fatih BAKIR

Mestan EMEK

Fehminaz TEMEL

Selin NAR-ÖTGÜN

Dilek YAĞCI-ÇAĞLAYIK

Şule ŞENSES-ERGÜL

Arsun ESMER

Sibel KARACA

Gülsen TOPAKTAŞ

TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Utku ERCÖMART

Zeynep KÖSEOĞLU

Selahattin TAŞOĞLU

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayınlanır / Published four times per year

Asitsiz kağıt kullanılmıştır / Acid free paper is used

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu / Public Health Institution of Turkey

Destek Hizmetleri / Supportive Services

Satınalma ve İdari İşler Daire Başkanlığı /

Purchasing and Administrative Affairs Department

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

Azim Matbaacılık

Büyük Sanayi 1. Cad. No: 99/33 İskitler-ANKARA

Tel: +90 312 342 03 71-72

e-posta: info@azimmatbaacilik.com

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

2016

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, Sweden

Anna PAPA, Greece

Aziz SANCAR, USA

Cristina DOMINGO, Germany

Daniel MOTLHANKA, Botswana

Dwight D. BOWMAN, USA

Isme HUMOLLI, Kosovo

Isuf DEDUSHAJ, Kosovo

Iva CHRISTOVA, Bulgaria

Johan LINDH, Sweden

Kosta Y. MUMCUOĞLU, Israel

Manfred WEIDMANN, U.Kingdom

Paul HEYMAN, Belgium

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Cuba

Sıraç DİLBER, Sweden

Susana RODRIGUEZ-COUTO, Spain

Takashi AKAMATSU, Japan

Varalakshmi ELANGO, India

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Ahmet KART, Ankara

Akçahan GEPEĐREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADILOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Ali Pekcan DEMİRÖZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Ankara

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Çorum

Banu ÇAKIR, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Ankara

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Çağatay GÜLER, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Emrah RUH, Kıbrıs

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fehminaz TEMEL, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnur TARHAN, Adıyaman

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

Hasan IRMAK, Ankara

Hasan TEZER, Ankara

Hayrettin AKDENİZ, Bolu

Hilal ÖZDAĞ, Ankara

Hülya ŞİMŞEK, Ankara

Hürrem BODUR, Ankara

Işıl MARAL, İstanbul

İ. Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir

İpek MUMCUOĞLU, Ankara

İrfan EROL, Ankara

İrfan ŞENCAN, Ankara

İsmail CEYHAN, Ankara

Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara

Koray ERGÜNAY, Ankara

Levent AKIN, Ankara

Mahinur AKKAYA, Ankara

Mehmet Ali ONUR, Ankara

Mehmet Kürşat DERİCİ, Çorum

Mestan EMEK, İzmir

Metin KORKMAZ, İzmir

Mithat ŞAHİN, Kars

Muhsin AKBABA, Adana

Murat DİZBAY, Ankara

Mustafa AKSOY, Ankara

Mustafa ERTEK, Ankara

Mustafa Kasım KARAHOCAGİL, Kırşehir

Mustafa Kemal BAŞARALI, Ankara

Mustafa KAVUTÇU, Ankara

Mükerrem KAYA, Erzurum

Nazime MERCAN, Denizli

Nazmi ÖZER, Ankara

Nilay ÇÖPLÜ, Ankara

Nur AKSAKAL, Ankara

Nur Münevver PINAR, Ankara

Nuran ESEN, İzmir

Oğuz GÜRSOY, Denizli

Orhan BAYLAN, İstanbul

Orhan YILMAZ, Ankara

Özlem KURT AZAP, Ankara

Pınar KAYNAR, Ankara

Pınar OKYAY, Aydın

Rahmet GÜNER, Ankara

Recep AKDUR, Ankara

Recep KEŞLİ, Afyon

Recep ÖZTÜRK, İstanbul

Rıza DURMAZ, Ankara

S. Aykut AYTAÇ, Ankara

Saime ŞAHİNÖZ, Gümüşhane

Sami AYDOĞAN, Kayseri

Sarp ÜNER, Ankara

Seçil ÖZKAN, Ankara

Seda KARASU YALÇIN, Bolu

Seda TEZCAN, Mersin

Selçuk KAYA, Trabzon

Selçuk KILIÇ, Ankara

Selim KILIÇ, Ankara

Selin NAR ÖTGÜN, Ankara

Sema BURGAZ, Ankara

Semra Ayşe GÜREŞER, Çorum

Sercan ULUSOY, İzmir

Sultan ESER, İzmir

Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa

Sümer ARAS, Ankara

Şule SENSES ERGÜL, Ankara

Tevfik PINAR, Kırıkkale

Turan BUZGAN, Ankara

Yeşim ÖZBAŞ, Ankara

Yunus Emre BEYHAN, Van

Zafer ECEVİT, Ankara

Zafer KARAER, Ankara

Zati VATANSEVER, Kars

Zeynep GÜLAY, İzmir

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. Araştırma yazıları;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

16. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

17. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

Tel : (0312) 565 55 79

Faks : (0312) 565 55 91

e-posta : turkhijyen@thsk.gov.tr

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. Research Articles;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12. Research articles should have up to 40 references.

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

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

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

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

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Public Health Institution of Turkey

Tel : +90 312 565 55 79

Fax : +90 312 565 55 91

e-mail : turkhiyjen@thsk.gov.tr

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

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

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

EDITORIAL POLICY

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

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

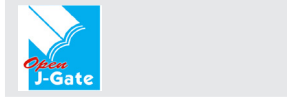
- Copyright transfer form is completed in full and signed by all authors according to the name order.
 - Author names are written clearly.
 - Affiliated institutions of the all authors are given on the title page by the number stated after the author's name.
 - The name, address, phone-fax numbers and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

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

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



DOAJ
DIRECTORY OF
OPEN ACCESS
JOURNALS



INDEX
INTERNATIONAL
COPERNICUS

CAS
A division of the American Chemical Society

Google
scholar
beta

SCIRUS
for scientific information only

Academic Journals Database
disseminating
quality controlled scientific knowledge

BASE
Bielefeld Academic Search Engine

New Jour
• Electronic Journals & Newsletters •

EBSCO
HOST
Electronic
Journals
Service

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

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



TURK
MEDLINE



TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

ULRICHSWEB™
GLOBAL SERIALS DIRECTORY

Wolters Kluwer
Health | Ovid LinkSolver™

GENAMICS™
...research from your desktop

libsearch

Scopus

medoanet
Mediterranean Open Access Network

crossref

İLETİŞİM

CORRESPONDENCE

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

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

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

Tel: 0312 565 55 79

Faks: 0312 565 55 91

e-posta: turkhijyen@thsk.gov.tr

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

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Ankara'daki çeşitli hastanelerden elde edilen *Acinetobacter baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkinin gösterilmesi ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi

Evaluation of clonal relationship between Acinetobacter baumannii isolates and determination of resistance to antibiotics which were obtained from different hospitals in Ankara

Hünkar ŞAHİN, Ufuk ÖNDE, Ali Kudret ADILOĞLU, Ayşe Esra KARAKOÇ, Cemal BULUT, Ziya Cibali AÇIKGÖZ, Gül Bahar ERDEM, Gülşen HAŞÇELİK, Ayşegül ÖZTÜRK-ÇOŞKUN

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.22043 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

199 - 210



2. Determination of serum hepatitis B virus DNA in HBV endemic region: Clinical significance and correlation with serological markers, ALT and AST
HBV endemic bölgede serum HBV DNA düzeylerinin klinik önemi ve serolojik işaretler, ALT, AST ile ilişkisi

Tuba MUDERRİS, Osman Sezer CİRİT, Tulin YAZICI

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.66563 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

211 - 220



3. Akharım beldesinde musluk suyu kaynaklı gastroenterit salgını, Afyonkarahisar ili, Türkiye, Mayıs 2014

A gastroenteritis outbreak caused by contaminated tap water, Akharim town, Afyonkarahisar province, Turkey, May 2014

Pınar DUMAN, Yasemin DEMİRBİLEK, Fatma ÇELİK, Mehmet ŞENOL, Ramazan ÖZÇELİK, Murat KOÇKAR, Serap ÇETİN-ÇOBAN, Fehminaz TEMEL, Mustafa Bahadır SUCAKLI, Gülay KORUKLUOĞLU

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.16779 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

221 - 232



4. Afyonkarahisar ili Dinar ilçesinde 2015 yılı Ocak ayında görülen tularemi vakaları
Tularemia cases in Dinar district, Afyonkarahisar province, January 2015

Ali BOZ, Gamze AKTUNA, Şenay ÖZGÜLCÜ, Berna SEZGİN, Fehminaz TEMEL, Bekir ÇELEBİ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.82957 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

233 - 244



5. HbA2 ölçümü için BioRad D-10TM ve Tosoh HLC 723 G8 HPLC sistemlerinin karşılaştırılması
Comparison of the BioRad D-10TM and Tosoh HLC 723 G8 HPLC instruments for the detection of HbA2

Güzin AYKAL, Fazıla ATAKAN-ERKAL, Ayşenur YEĞİN, Esin EREN, Necat YILMAZ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.46762 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

245 - 252



6. Environmental risk assessment under the pollutants exposure with using four lichen species and molecular assay in cement plant, Aşkale-Erzurum (Turkey)

Aşkale-Erzurum Çimento fabrikası etrafında kirleticilere maruz kalmış dört farklı liken türü kullanılarak yapılan moleküler boyutta çevresel risk değerlendirmesi

Rasim HAMUTOĞLU, Ali ASLAN, Sümer ARAS, Demet CANSARAN-DUMAN

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.57805 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

253 - 266



■ Olgu Sunumu / Case Report

7. Olgu sunumu; Yanıkta izole edilen *Bacillus licheniformis*
Case report: The Burn isolated *Bacillus licheniformis*

Nezire Mine TURHANOĞLU, Demet GÜR-VURAL

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.16023 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

267 - 270



■ Teknik Rapor / Technical Report

8. European Union approach in monitoring drinking water quality: Emergency case management and risk analysis for the protection of public health

İçme suyu kalitesinin izlenmesinde Avrupa Birliği yaklaşımı: Halk sağlığının korunması için acil durum yönetimi ve risk analizi

Dilek DİKMEN, Hasan IRMAK

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.83436 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

271 - 278



■ Derleme / Review

9. Batı Nil Virüsü (BNV) ve Türkiye'de Batı Nil Virüsü'nün güncel durumu
West Nile Virus (WNV) and current status of West Nile Virus in Turkey

Yavuz UYAR, Esra BAKIR

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.32757 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

279 - 292



10. Yeni bir viral tehdit: Enterovirüs D68
A new viral threat: Enterovirus D68

Mustafa ALTINDİŞ, Tuba DAL

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.94546 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

293 - 302



Ankara'daki çeşitli hastanelerden elde edilen *Acinetobacter baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkinin gösterilmesi ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi

Evaluation of clonal relationship between *Acinetobacter baumannii* isolates and determination of resistance to antibiotics which were obtained from different hospitals in Ankara

Hünkar ŞAHİN¹, Ufuk ÖNDE², Ali Kudret ADILOĞLU², Ayşe Esra KARAKOÇ², Cemal BULUT³, Ziya Cibali AÇIKGÖZ⁴, Gül Bahar ERDEM⁵, Gülşen HASÇELİK⁶, Ayşegül ÖZTÜRK-ÇOŞKUN⁷

ÖZET

Amaç: *Acinetobacter baumannii*, özellikle yoğun bakım ünitelerinde mortalite ve morbiditeyi arttıran hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biridir. Bu bakteri, pnömni, bakteriyemi, idrar yolu enfeksiyonu, yara enfeksiyonu ve menenjit gibi çeşitli enfeksiyonlardan izole edilebilir. Bu çalışmanın amacı Ankara'daki çeşitli hastanelerden Kasım 2009 ile Aralık 2011 tarihleri arasında elde edilen 99 *A. baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkiyi göstermek ve antibiyotik dirençlerini belirlemektir.

Yöntem: *Acinetobacter baumannii* izolatlarının tanımlanması ve antibiyotik paternleri VITEK 2 (bioMérieux, France) sistemi ile yapıldı. Çalışmada antimikrobiyal ajan olarak amikasin, siprofloksasin, tetrasiklin, netilmisin, sulbaktam/ampisilin, trimetoprim/sulfametoksazol, seftazidim, gentamisin, levofloksasin, meropenem, imipenem, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, sefoperazon/sulbaktam, sefepim, tigesiklin ve kolistin kullanıldı. *Acinetobacter* izolatlarının klonal ilişkisi Rep-PCR

ABSTRACT

Objective: *Acinetobacter baumannii* is one of the most important cause of hospital acquired infections which raises the rates of mortality and morbidity especially in intensive care units. *Acinetobacter baumannii* may be isolated from various infections such as pneumonia, bacteremia, urinary track infections, wound infections and meningitis. The aim of this study is to determine the clonal relationship and determination of antibiotic resistances between 99 *Acinetobacter baumannii* isolates which were obtained from different hospitals in Ankara between November 2009 and December 2011.

Method: Identification of *A. baumannii* isolates and antibiotic susceptibilities were performed by Vitek 2 (bioMérieux, France) system. In this study, amikacin, ciprofloxacin, tetracyclin, netilmicin, sulbactam/ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ceftazidime, gentamicin, levofloxacin, meropenem, imipenem, piperacillin, piperacillin/tazobactam, cefoperazone/sulbactam, cefepime, tigecycline, and colistin were used as antimicrobial agents. The clonal relationship of *Acinetobacter* isolates was analysed by

¹Rize Halk Sağlığı Laboratuvarı Tıbbi Mikrobiyoloji, Rize

²Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

³Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara

⁴Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

⁵Dişkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

⁶Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

⁷Bartın Halk Sağlığı Laboratuvarı Tıbbi Mikrobiyoloji, Bartın



İletişim / Corresponding Author : Hünkar ŞAHİN

Rize Halk Sağlığı Laboratuvarı, Piriçeşlebi Mah. 53100 Rize / Türkiye

Tel : +90 464 213 03 63

E-posta / E-mail : dr.hunkarsahin@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 09.04.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 05.04.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.22043

Şahin H, Önde U, Adiloğlu AK, Karakoç AE, Bulut C, Açıkgöz ZC, Erdem GB, Hasçelik G, Öztürk-Çoşkun A. Ankara'daki çeşitli hastanelerden elde edilen *Acinetobacter baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkinin gösterilmesi ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(3): 199-210

yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: Çalışmaya dâhil edilen 99 *A. baumannii* izolatının %99'u imipenem ve meropenem dirençli bulundu. Kolistine dirençli suş saptanmadı (%0). Piperasilin ve piperasilin/tazobaktama tüm suşların dirençli olduğu gözlemlendi (%100). Siprofloksasine %99, ampisilin/sulbaktama %98, seftazidime %97, sefepime %96, levofloksasine %85, tetrasikline %80, trimetoprim/sulfametoksazole %71, amikasine %59, gentamisin ve netilmisine %56 direnç görüldü. Tigesiklin için dirençliler %5, orta duyarlılar %27 ve duyarlılar ise %68 olarak saptandı. *Acinetobacter baumannii* izolatlarının dört patern oluşturduğu görüldü. İlk 3 paternin bir grup oluşturduğu ve dördüncü paternden farklı olduğu görüldü. Birinci patern (P1)'de 14 suş, ikinci patern (P2)'de 37 suş, üçüncü patern (P3)'de 36 suş bulunmaktaydı. Dördüncü patern (P4)'de ise 12 suş vardı. İlk üç paternin oluşturduğu grup ile dördüncü paternin farklı oldukları ve aralarında üçten fazla bant farklılığının olduğu görüldü. İlk üç paternin ise aralarındaki bir bant farklılığı ile benzer oldukları görüldü. Ayrıca, her dört paternin kendi içinde bant farkı göstermeksizin aynı oldukları saptandı. Her dört paternde de farklı hastanelerden suşların bulunduğu saptandı. Böylece her dört hastaneye muhtemelen hasta transferleriyle aynı *Acinetobacter baumannii* suşlarının yayılmış olduğu gösterildi.

Sonuç: Bu hastanelerde, çalışmanın devamı olarak *A. baumannii*'nin direnç mekanizmaları ve direnç genleriyle ilgili araştırma yapılabilir. Ayrıca, hastalara ilişkin risk faktörleri belirlenerek karbapenem ve diğer antibiyotiklerin dirençlerinden sorumlu izolatlarla ilişkin epidemiyolojik veriler daha kapsamlı bir şekilde ortaya konulabilir.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, klonal ilişki, rep-PCR, antibiyotik direnci

Rep-PCR method.

Results: Ninety nine percent of *A. baumannii* isolates was resistant to imipenem and meropenem. There was no resistant strain to colistin (0%). All of the strains were resistant to piperacillin and piperacillin/tazobactam (100%). Ciprofloxacin was 99%, sulbactam/ampicillin 98%, ceftazidime was 97%, cefepime was 96%, levofloxacin was 85%, tetracycline was 80%, trimethoprim/sulfamethoxazole was 71% resistant. Resistance to amikacin was 59% and resistance to gentamicin and netilmicin were both 56%. Five percent of strains were resistant, 27% were intermediate susceptible and 68% were susceptible to tigecycline. There were four patterns. P1, P2 and P3 gathered to one group (G1) and they were similar. P4 was different from them. P1 had 14, P2 had 37, P3 had 36 and P4 had 12 strains. There were more than three bands difference between G1 and P4 which showed that they were different strains. Band difference between G1 (P1, P2, P3) was only one and this showed us that they were similar. In the other hand, there were not any band difference in P1, P2, P3 and P4. All of the patterns were consisted of strains from different hospitals. We determined that the same strains spread to four different hospitals probably by patient transfers.

Conclusion: A study can be organized to determine resistance genes and resistance mechanisms of *A. baumannii* in these hospitals as continuation of this study. Moreover, a comprehensive epidemiologic data can be revealed by determining the risk factors of patients relevant to those responsible isolates for carbapenem and other antibiotics resistance.

Key Words: *Acinetobacter baumannii*, clonal relationship, rep-PCR, antibiotic resistance

GİRİŞ

Acinetobacter türleri yoğun bakım üniteleri (YBÜ) başta olmak üzere hastane enfeksiyonlarından sorumlu önemli fırsatçı patojenlerdir. Pnömoni, deri ve yara enfeksiyonları, peritonit, endokardit, menenjit ve idrar yolu enfeksiyonları yapabilirler. *Acinetobacter* enfeksiyonları için önemli risk faktörleri arasında travma, mekanik ventilasyon ve cerrahi işlemler bulunmaktadır (1-3).

Acinetobacter baumannii hastane kaynaklı enfeksiyonlardan en sık sorumlu olan türdür (3-5). Çoklu ilaca dirençli *A.baumannii* enfeksiyonlarının sayısı son yıllarda artış göstermiştir. Bu durum *A. baumannii*'yi nozokomiyal gram-negatif patojenler içerisinde tedavisi en zor olanlardan biri haline getirmektedir (6, 7).

A. baumannii bulaşlarının çoğundan hasta yatakları, kapı kolları, klimalar ve mekanik ventilasyon ekipmanları gibi çevresel kaynaklar sorumludur. *A. baumannii*'nin kuru cansız yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmesi salgınların oluşmasına katkı sağlamaktadır (3-5). Çeşitli salgınlarda yatan hastaların cilt, boğaz, solunum sistemi ve sindirim sisteminde yüksek düzeyde *Acinetobacter* kolonizasyonu gösterilmiştir (2,8,9). Solunum yollarında *Acinetobacter* kökenlerinin kolonize olduğu hastalara mekanik ventilasyon uygulamak için kullanılan ekipmanların kontamine olması salgınların en önemli nedenidir (2, 10).

Hastalarda genellikle cilt kolonizasyonu da bulunmakta ve bu hastalara sağlık hizmeti veren personelin elleri salgının yayılımı ve devamında önemli rol oynamaktadır. Sindirim sisteminde kolonizasyon da nadiren salgın kaynağı olmaktadır (11-13).

Moleküler tiplendirme metodları epidemik kökenlerin yayılım kaynağını saptamada önemli araçlardır. Çeşitli moleküler tiplendirme metodları olmasına rağmen bunlar arasında "Repetitive Sequence Based Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR)"; kullanım kolaylığı, yüksek veri seçeneği ve "pulse field gel elektroforesis (PFGE)" ile kıyaslanabilir ayırım gücü ile ön plana çıkmaktadır (14).

Son yıllarda *Acinetobacter* türleri arasında aminoglikozidlere direnç artma eğilimindedir. Yine nozokomiyal salgınlarda karbapenem dirençli *Acinetobacter* türlerini de içeren çoklu ilaca dirençli suşlarda bir artış görülmektedir. Pek çok suş açısından geniş antibiyotik direnç oranları (geniş spektrumlu β -laktamlar, aminoglikozidler ve florokinolonlar) nedeniyle tedavinin güçleşmiş olması, *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kontrolün önemini daha da artırmıştır (15, 16).

Bu çalışmada Ankara'daki çeşitli hastanelerden izole edilen *A. baumannii* suşlarının antibiyotiklere direnç oranlarının saptanması ve suşlar arasında klonal ilişki olup olmadığının Rep-PCR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza; Kasım 2009 - Aralık 2011 tarihleri arasında Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi (AEAH), Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi (AAEAH), Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi (DYEAH), Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi (HÜTFH) servis ve yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 99 *A. baumannii* suşu dahil edildi. Hastalardan aynı tür örnek sadece bir kez kabul edildi. Konvansiyonel yöntemlerle *Acinetobacter* ön tanısı olan bakteriler VITEK 2 Compact 60 (BioMerieux, Fransa) otomatize bakteri identifikasyon sistemi ile tanımlandı ve antibiyotik duyarlılık testlerinin ardından Rep-PCR ile genotiplendirilmesi yapıldı. Genotipik analiz için otomatize bir sistem olan Diversilab (BioMerieux, Fransa) cihazı kullanıldı.

Bu çalışma firma önerileri doğrultusunda dört aşamada yapıldı:

- *Acinetobacter baumannii* saf kültüründen manuel DNA ekstraksiyonu
- Thermal cyler'da DiversiLab parmak izi kitleri kullanılarak Rep-PCR
- Biyoanalizör kullanılarak otomatik

microfluidic elektroforez

- İnternet tabanlı yorumlama ve yazılım programı ile değerlendirme

Değerlendirme için benzerlik hesaplarının yapılmasında DiversiLab yazılımı Pearson Korelasyon katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Rep-PCR profillerini otomatik olarak karşılaştırmak amacıyla kullanıldı.

Benzerlik matriksindeki renklerden kırmızı %100-95, turuncu %95-90, mavi %90-80, pembe %80-70, gri %70-0 benzerlik olduğunu göstermekteydi. Kırmızı renkte görünen suşlar aynı kabul edildi. Bant farkı göstermeyen suşlar aynı paterne dahil edildi.

BULGULAR

Kasım 2009 - Aralık 2011 tarihleri arasında A. *baumannii* olarak izole edilen toplam 99 suş incelendiğinde, en çok gönderilen klinik örneğin derin trakeal aspirat olduğu (DTA) (n=51, %52), bunu kan (n=20, %20), kan kateter (n=15, %15), yara (n=8, %8), sonda idrarı (n=4, %4) ve balgam örneklerinin (n=1, %1) izlediği görüldü. Bu suşların 62 tanesi AEAH'den, 9 tanesi AAEEAH'den, 10 tanesi DYEAH'den ve 18 tanesi HÜTFH'den elde edilen izolatlardan oluşmaktaydı.

Örneklerin, gönderildikleri kliniklere göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 99 A. *baumannii* izolatının

Tablo1. Klinik örneklerin gönderildikleri kliniklere göre dağılımı

Klinikler	Sayı (%)
ARYBÜ	67,7
Cerrahi Servisler	13,1
Dahili Servisler	9,1
NYBÜ	5,1
DYBÜ	4,0
KYBÜ	1,0
TOPLAM	100,0

ARYBÜ: Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi,
 NYBÜ: Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi,
 DYBÜ: Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi,
 KYBÜ: Koroner Yoğun Bakım Ünitesi

sadece biri VITEK 2 Compact sistem ile imipeneme ve meropeneme duyarlı bulundu, diğer suşlar bu karbapenemlere dirençliydi (%99). Kolistine (CT) dirençli suş saptanmadı (%0). Piperasilin (PİP) ve piperasilin/tazobaktama (TZP) tüm suşların dirençli olduğu gözlemlendi (%100). Ampisilin/sulbaktama (SAM) sadece iki suşun duyarlı, diğerlerinin dirençli olduğu (%98) belirlendi. Seftazidime (CAZ) direncin %97, sefepime (FEP) direncin ise %96 olduğu görüldü. Siprofloksasine (CİP) %99, levofloksasine (LEV) %85, tetrasikline (TE) %80 direnç saptandı. Amikasine (AK) %59, gentamisin (GN) ve netilmisine (NET) %56 direnç bulubdu. Tigesiklin (TGC) için dirençlilerin yüzdesi %5, orta duyarlıların yüzdesi %27 ve duyarlıların yüzdesi ise %68 olarak belirlendi. Trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) için %71 direnç vardı (Şekil 1).

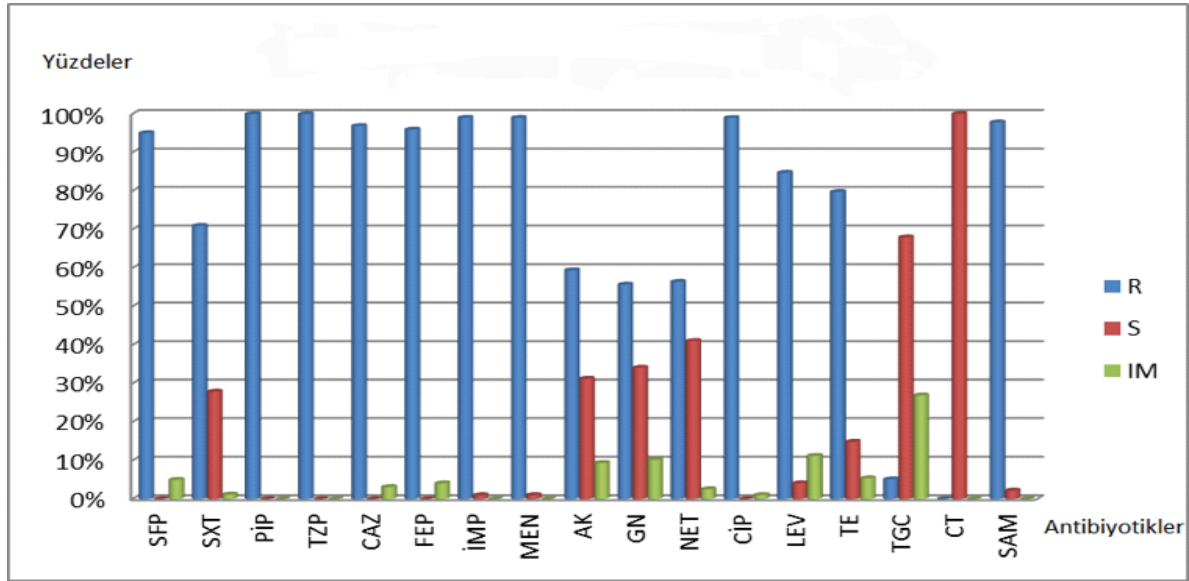
Rep-PCR bulguları:

Toplam 99 suşun dört paterne ayrıldığı, ilk üç paternin bir grup oluşturduğu ve dördüncü paternden farklı olduğu görüldü. Birinci patern (P1)'de 14 suş, ikinci patern (P2)'de 37 suş, üçüncü patern (P3)'de 36 suş bulunmaktaydı. Dördüncü patern (P4)'de ise 12 suş vardı.

P1'deki 14 suşun yedi tanesi YDEAH'ne, bir tanesi AAEEAH'ne, altı tanesi ise AEAH'ne ait suşlardan oluşmaktaydı. Sadece bir suşun (AAEEAH) 2010 yılına, diğerlerinin 2011 yılına ait olduğu görüldü. P1 paternindeki suşlar arasında bant farkı görülmedi (Şekil 2).

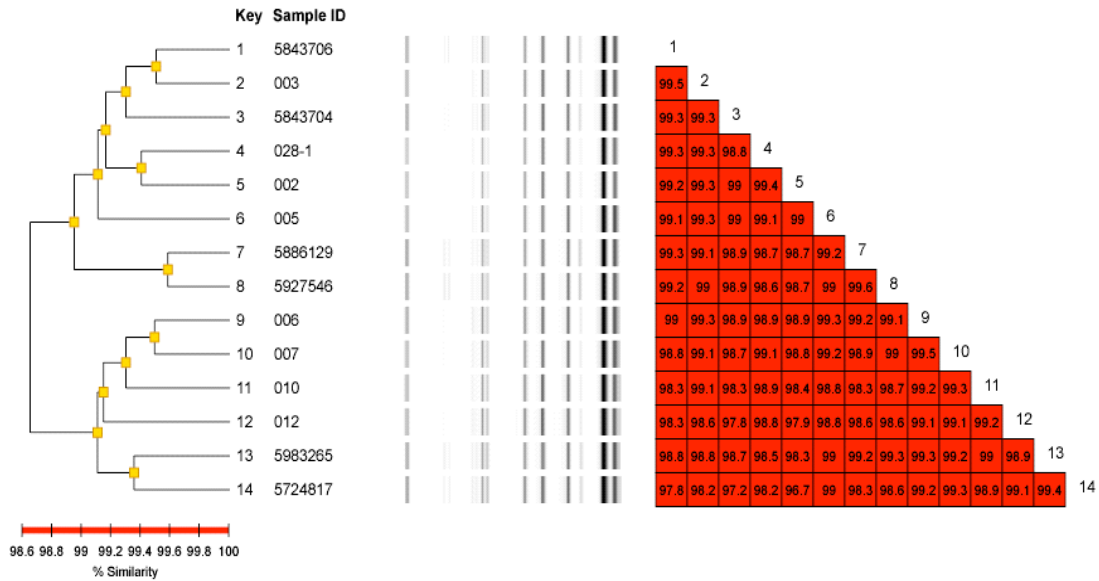
En çok suş bulunduran P2'deki 37 suşun bir tanesi HÜTFH' ne ait olup, diğer suşların AEAH' ne ait olduğu görüldü. Bu paternde 2009, 2010 ve 2011 yıllarına ait suşlar vardı. P2 paterni incelendiğinde bant farkının olmadığı görüldü (Şekil 3).

İkinci çok suş bulduğu (36) P3' te, 17 suş HÜTFH' ne, dokuz suş AEAH' ne, yedi suş AAEEAH' ne ve üç suş YDEAH' ne ait idi. Bu paternde de P2 gibi 2009, 2010, 2011 yıllarına ait suşlar vardı. Bu paternde de bant farkı yoktu (Şekil 4).

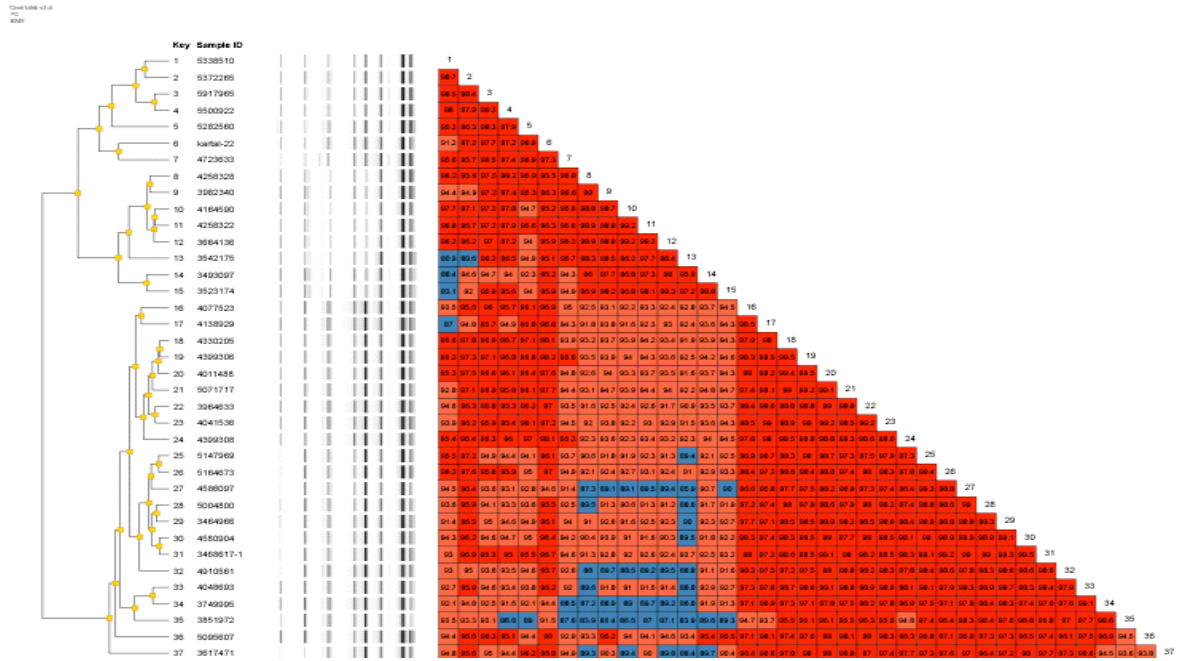


Şekil 1. *A. baumannii* izolatlarının VITEK 2 Compact sistem ile tespit edilen antibiyotik duyarlılık yüzdeleri, Ankara, Kasım 2009 - Aralık 2011

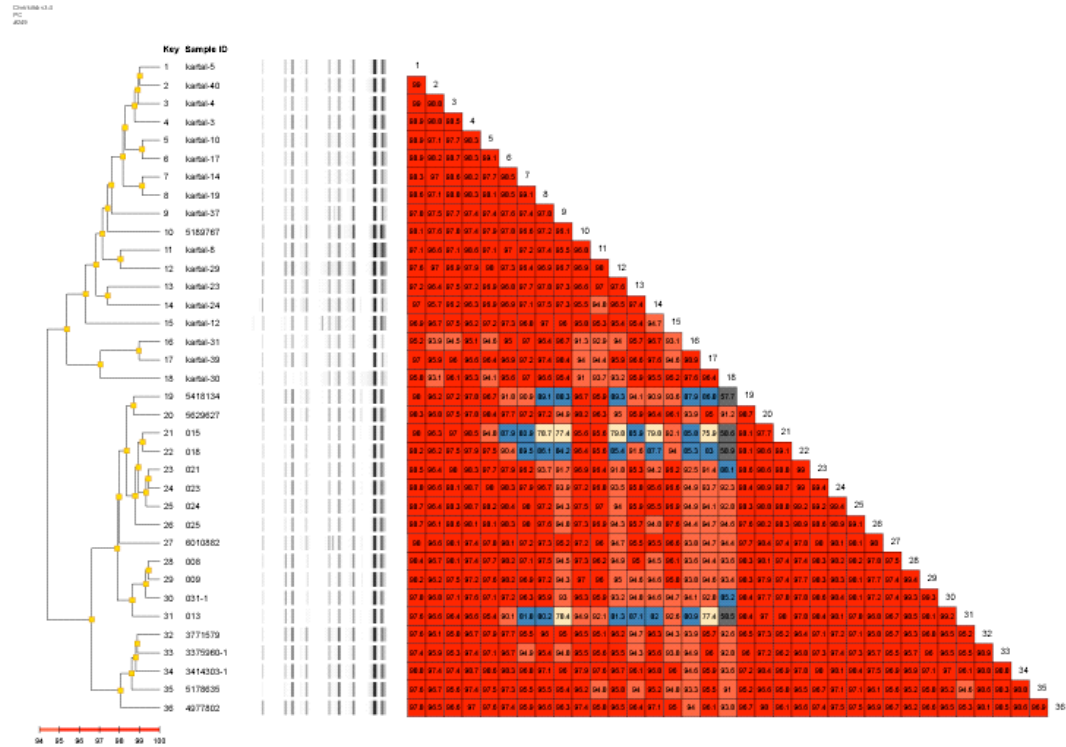
Diversilab v3.4
PC
#247



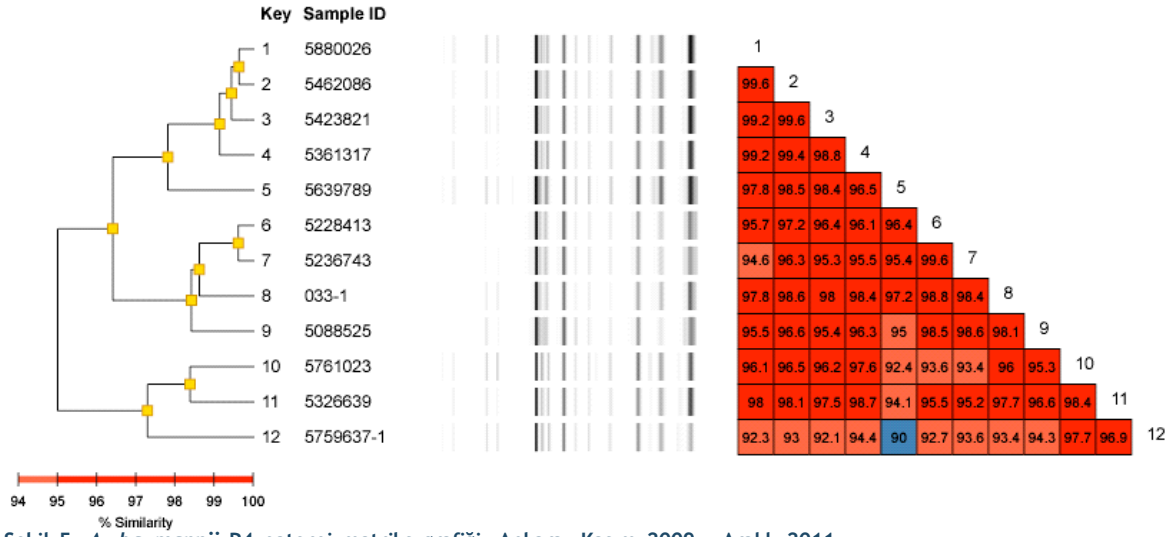
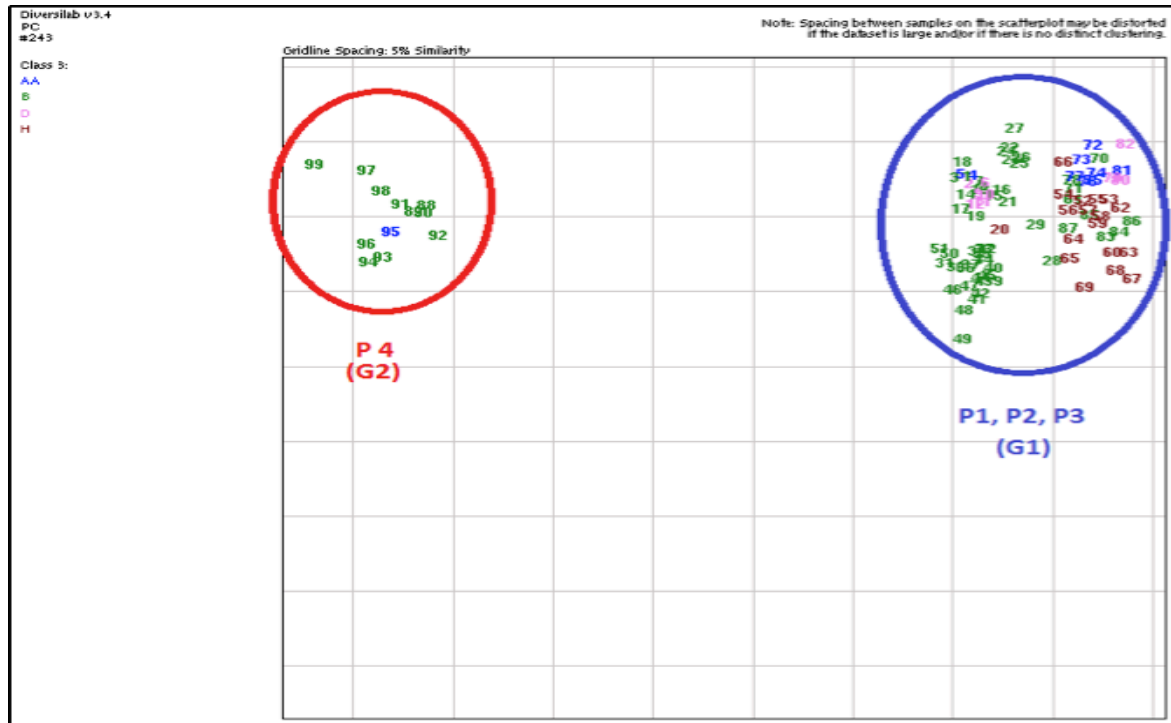
Şekil 2. *A. baumannii* P1 paterni matris grafiği, Ankara, Kasım 2005 - Aralık 2011



Şekil 3. *A. baumannii* P2 paterni matrisi grafiği, Ankara, Kasım 2009 - Aralık 2011



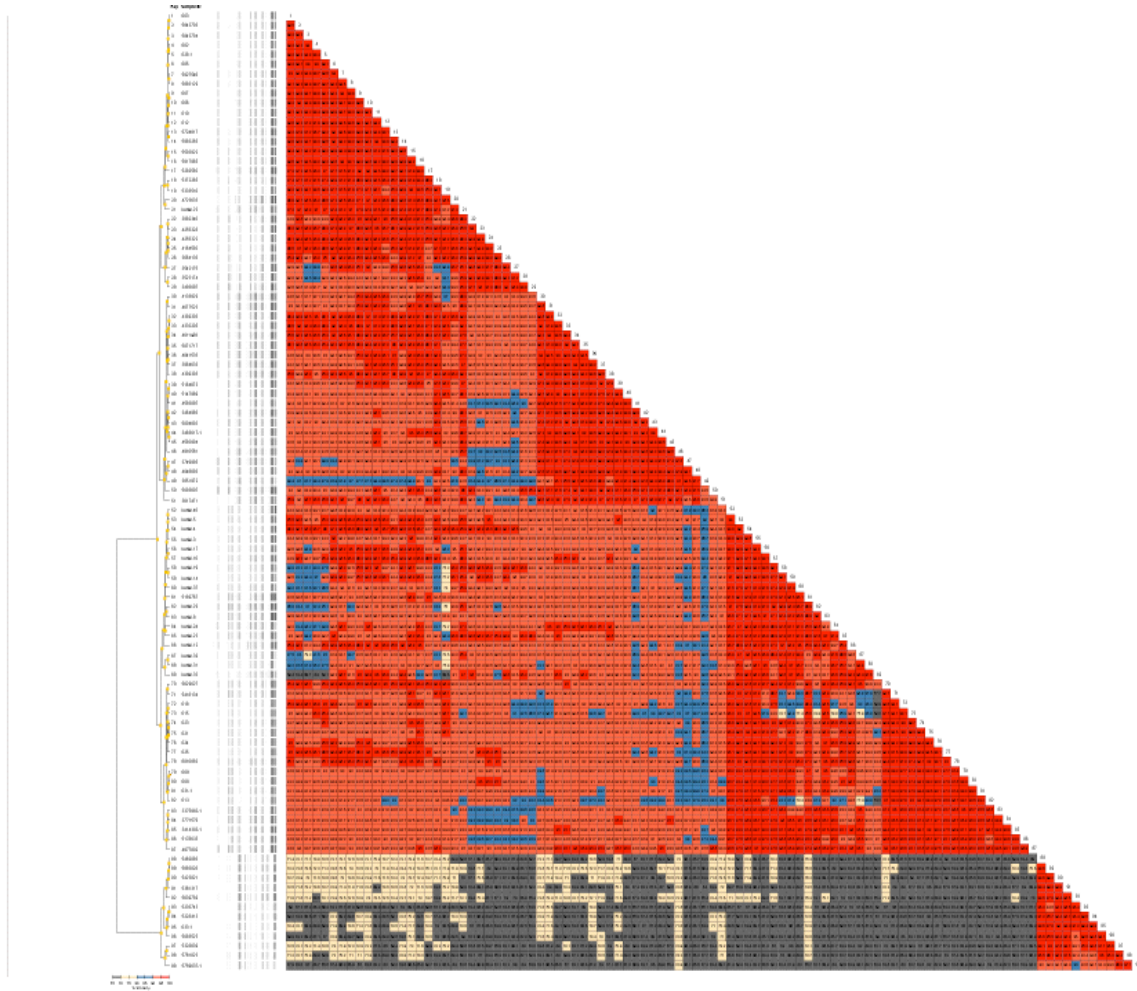
Şekil 4. *A. baumannii* P3 paterni matrisi grafiği, Ankara, Kasım 2009 - Aralık 2011

Şekil 5. A. *baumannii* P4 paterni matris grafiği, Ankara, Kasım 2009 - Aralık 2011

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, B: Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, D: Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, H: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi

Şekil 6. Ankara'daki çeşitli hastanelerden elde edilen A. *baumannii* izolatlarına ait scatterplot grafiği, Kasım 2005 - Aralık 2011

Tüm suşları birlikte gösteren matris grafiği Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. Tüm suşlara ait matris grafiği

İlk üç paternden farklı olan P4 paternindeki toplam 12 suşun hepsi 2011 yılının suşları olup, bir suş AAEAH'ye diğerleri AEAH'ye ait idi. Bu patern de kendi içinde bant farklılığı göstermiyordu (Şekil 5).

Farklı renkli numaraların farklı hastanelere ait olduğunu gösteren tüm suşlara ait scatterplot grafiği incelendiğinde ilk üç paternin dördüncü paternden farklı gruplandırıldığı izlenmektedir (Şekil 6, 7).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yoğun bakım üniteleri hastane enfeksiyonlarının ve doğal olarak *Acinetobacter* enfeksiyonlarının en sık görüldüğü yerlerdir (2). Erben ve ark. yaptıkları çalışmada *Acinetobacter* türlerinin en sık görüldüğü servis %38 ile Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi olarak bildirmişlerdir (17).

A. *baumannii*, yatan hastaların çevresindeki çeşitli yüzeylerde uzun süre canlı kalır ve bu yüzeylerden hastalara doğrudan sağlık çalışanlarının elleri veya diğer temas yolları ile bulaşır (18). *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlara kontamine nemlendirici ve ventilatör aksamının sıklıkla neden olduğu bildirilmektedir (19). Yoğun bakım üniteleri, bu ekipmanların yaygın olarak kullanıldığı merkezlerdir. Anestezi ve Yoğun Bakım Ünitesinde *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların daha sık görülmesi, kritik hastaların bu üniteye takip edilmesi ve bu hastalara mekanik ventilasyon, trakeostomi, entübasyon, santral kateterizasyon ve üriner kateter gibi invaziv girişimlerin daha sık uygulanması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda, A. *baumannii* suşlarının en sık izole edildiği servis, %68 oranı ile anesteziyoloji ve yoğun bakım üniteleri olmuştur.

Villers ve ark., *Acinetobacter* izolatlarının sıklıkla solunum sistemi, üriner sistem, yara yeri, santral sinir sistemi ve kan dolaşım yolu enfeksiyonlarına neden olduklarını bildirmişlerdir (20). Balcı ve ark. *Acinetobacter* izolatlarını en sık solunum sistemi ve yara materyalinden izole etmişlerdir (21). Çalışmamızdaki örnekler 51 (%52) derin trakeal aspiratı, 20 (%20) kan, 15 (%15) kan kateter, 8 (%8) sonda idrarı, 4 (%4) yara ve bir (%1) balgam olmak üzere daha çok splunum sisteminden izole edilmiştir.

Acinetobacter baumannii'nin antimikrobiyal duyarlılık oranları farklılıklar gösterebilmektedir. Çoğunlukla beta-laktam antibiyotiklere, aminoglikozidlere ve florokinolonlara direnç saptanmaktadır (15, 16, 22).

Yakın tarihli çalışmalarda direnç oranlarında artış olduğu gözlenmektedir. Sonuçları çalışmamıza benzeyen, Gözütok ve ark., Mart 2011 ve Kasım 2012 tarihleri arasında hastane enfeksiyonu etkeni olan 161 A. *baumannii* izolatını değerlendirdikleri çalışmalarında, kolistin direnci saptanmamış olup izolatların %91'i meropenem ve imipenem, %92'si siprofloksasin ve sefoperazon/sulbaktam'a, %94'ü levofloksasine, %97'si

piperasilin/tazobaktama dirençli saptanmıştır (23).

A. *baumannii* enfeksiyonlarında hem karbapenem direncinin hem de çoklu antibiyotik direncinin giderek artması ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde salgınlara yol açabilmesi, bu bakterinin sürekli gündemde olan bir patojen olmasına neden olmaktadır.

İmipenem, dirençli suşlarda en etkili antibiyotiklerden biri olmasına karşın yaygın kullanımı sonucu karbapenem direnci ürkütücü boyutlara ulaşmıştır. Avrupa antimikrobiyal direnç surveians sistemi verileri 2000-2003 yılları arasında Türkiye'den izole edilen 779 A. *baumannii* suşunda imipenem direncini %48 olarak bildirmektedir (24). Antimikrobiyal surveians programı "Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC)" 1997-2000 çalışmasında dünyanın pek çok ülkesinde A. *baumannii* suşlarının imipenem direnci %0-7 arasında değişirken, aynı çalışmada Türkiye'de izole edilen suşlarda imipenem direnci %38 olarak saptanmıştır. 2000-2003 yılları arasındaki MYSTIC çalışmasında ülkemizdeki meropenem ve imipenem direnç yüzdeleri sırasıyla %42 ve %48 olarak saptanmıştır (25, 26). Türkiye'de gram-negatif hastane kaynaklı kökenlerin beta laktam antibiyotiklere direncinin araştırıldığı çok merkezli HİTİT çalışmasında, A. *baumannii* suşlarının imipenem direnç değerleri 2005'de %52,2 ve 2007'de %55 bulunmuştur (27, 28).

Çalışmamızda, A. *baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri incelendiğinde, hem imipenem hem meropenem için direnç oranları %99 olarak belirlenmiştir. Suşlarımızın büyük bir çoğunluğunun (%99) karbapenem direncine sahip olması, çalışmaya alınan suşların büyük çoğunluğunun YBÜ'de ve servislerde tedavi gören hastalardan izole edilmiş olmasına bağlanabilir. Çünkü bu hastalar mekanik solunum cihazı desteği, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, girişimsel uygulamalar, geçirilmiş cerrahi ve eşlik eden ciddi hastalıklar gibi çoklu ilaca dirençli A. *baumannii* ile kolonizasyon ve enfeksiyon gelişimi için risk faktörleri taşımaktadır (29). Ayrıca antibiyotiklere duyarlılık ülkeler, merkezler, hatta hastanelerin bölümleri

arasında farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar, farklı epidemiyolojik koşullar, antibiyotik kullanım ve kontrol politikalarının yansımaları olarak düşünülebilir.

Acinetobacter baumannii enfeksiyonlarının epidemiyolojisini araştırmak amacıyla yaygın olarak uygulanan moleküler yöntemlerden biri Rep-PCR'dır. Mikroorganizmalar arasında klonal ilişkilerin belirlenmesinde PFGE yöntemi altın standart olarak kabul edilmekle birlikte; Rep-PCR, ayırım gücü yüksek, uygulaması ve yorumlaması PFGE'ye göre kolay bir genotipleme yöntemidir. Ayrıca Rep-PCR'nin PFGE ile iyi korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (15, 30).

Bou ve ark., tarafından hastane salgınlarına neden olan imipenem ve meropenem dirençli *A. baumannii* türlerinin tanımlanmasıyla ilgili bir araştırmada; PCR temelli DNA tiplendirme yöntemleri (REP-PCR, Arbitrary primed PCR) referans teknik olan PFGE ile karşılaştırılmıştır. İmipenem ve meropenem dirençli ve duyarlı *A. baumannii* türlerine ait bant profilleri karşılaştırıldığında Rep-PCR'ın Arbitrary primed PCR'dan daha fazla ayırt edici olduğu ve PFGE tekniği gibi yüksek performans gösterdiği bulunmuştur (15).

Bizim çalışmamızda dört farklı hastaneden 99 *A. baumannii* suşu çalışmaya alınıp, Rep-PCR yöntemiyle klonal ilişki araştırıldı. Suşların dört patern oluşturduğu gözlemlendi. Her dört paternde de farklı hastanelerden suşların bulunduğu saptandı. Böylece her dört hastaneye muhtemelen hasta transferleriyle aynı *A. baumannii* suşlarının yayılmış olabileceği gösterildi.

İlk üç paternin bir grup oluşturarak aynı oldukları saptandı. Dördüncü paternin ise bunlardan farklı olmakla beraber kendi içinde bant farklılığının olmadığı izlendi. Toplam 99 suşun sadece dört patern oluşturmasının sebebinin; özellikle baskın klonu oluşturan gruptaki hastaların hastaneler arası transferlerinden ve sağlık çalışanlarının kontaminasyonlarından

kaynaklanabileceği düşünüldü. Bu suşlar söz konusu hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde salgınlara neden olmakta ve yıllarca buralarda aynı klona ait suşlar varlığını sürdürebilmektedir.

Özellikle bir grup oluşturan ilk üç paterne ait suşlar incelendiğinde, P3'teki 84 numaralı suşun bizim çalışma grubumuzdaki ilk vaka olabileceği düşünüldü. Bu suşun, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Anestezi ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesinde yatmakta olan bir hastanın 20.11.2009 tarihinde laboratuvarımıza ulaşan, derin trakeal aspirat örneği olduğu görüldü. Dördüncü paternde ise 22.2.2011 tarihinde yine AEAH ARYB'den elde edilen 96 numaralı suşun diğerlerinden farklı olan P4 paterni için bizim çalışma grubumuzdaki ilk vaka olabileceği düşünüldü. Karşılaştırmalı olarak objektif bir değerlendirme yapılamamasına rağmen, çalışmanın yeterince hızlı ama maliyetinin diğer yöntemlere göre yüksek olduğu görüldü.

Sonuç olarak; günümüzde *A. baumannii* salgınlarının kaynağının hızlı ve doğru tespiti, enfeksiyonun tedavisi ve salgının kontrolü açısından çok önemlidir. Ancak moleküler temelli çalışmaların daha fazla yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu sayede daha ucuz, kolay ve hızlı moleküler temelli yöntemler rutin kullanımda kendine daha fazla yer bulabilecektir.

Bu çalışmanın amacı suşlar arasındaki klonal ilişkiyi ve antibiyotik direnç profillerini belirlemektir. Yine bununla bağlantılı olarak *A. baumannii*'nin direnç mekanizmaları ve direnç genleriyle ilgili çalışmaların yapılması yararlı olacaktır. Ayrıca; altın standart kabul edilen PFGE ile Rep-PCR'ın ve diğer moleküler yöntemlerin maliyet, hız, ayırım gücü gibi özellikler açısından kıyaslamalı çalışmalarla sonuçların değerlendirilmesinin, hem klinik birimlere hem de mikrobiyoloji laboratuvarlarına yeni perspektifler sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology; 6'th ed. Lippincott Philadelphia. 2006:316-355.
2. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev, 1996;9:148-65.
3. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. Infection Control and Hospital Epidemiology 2003;24(4):284-95.
4. Beck-Sague CM, Jarvis WR, Brook JH, et al. Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care unit. Am J Epidemiol 1990;132:723-33.
5. Lortholary O, Fagon J-Y, Hoi AB, et al. Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. Clin Infect Dis, 1995;20:790-96.
6. Jain R, Danziger LH. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. Ann Pharmacother, 2004;38:1449-59.
7. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents 2005;25:11-25.
8. Webster CA, Crove M, Humphreys H, Towner KJ. Surveillance of and adult intensive care unit for long-term persistence of a multi-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol, 1998;17:171-76.
9. Corbella X, Pujol M, Ayast J, Sendra M, Ardanury C, Dominguez MA, et al. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multi resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect Dis, 1996;23:329-34.
10. D'Agata EMC, Thayer V, Schaffner W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The importance of cross-transmission. Infection Control and Hospital Epidemiology 2000; 21: 588-591.
11. Bayat A, Shaaban H, Dodgson A, Dunna KW. Implications for burns unit design following outbreak of multi-resistant *Acinetobacter* infection in ICU and Burns Unit. Burns 2003; 29:303-06.
12. Husni R N, Goldstein L S, Arroliga A C, Hall G S, Fatica C, Stoller J K, Gordon S M. Risk factors for an outbreak of multi-drug-resistant acinetobacter nosocomial pneumonia among intubated patients, Chest 1999;115:1378-82
13. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. N Engl J Med. 2008 Mar 20;358(12):1271-81.
14. Saeed S, Fakhri MG, Riederer K, et al. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Infect Control Hosp Epidemiol, 2006;27:981-3.
15. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. PCR based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clinical Microbiology and Infection 2000; 6:635-43.
16. Hsueh PR, LJ, Chen CY, et al. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. Emerg Infect Dis 2002;8:827-32.
17. Erben N, Kiremitçi A, Özgüneş İ. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz ve indüklenebilir beta-laktamaz sıklığının ve antimikrobiyal duyarlılığın değerlendirilmesi, Osmangazi Tıp Derg, 2006;28(3):135-46.
18. Cisneros JM, Rodríguez-Barío J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment, Clinical Microbiology and Infection, 2002; 8(11):687-93.
19. Smith PW, Massanari RM. Room humidifiers as the source of *Acinetobacter* infections. Journal of the American Medical Association, 1997; 237(8):795-97.
20. Villers D, Espaze E, Coste-Byrel M. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. Annals of Internal Medicine, 1998;129(3):182-89.

21. Balcı M, Bitirgen M, Kandemir B, Turk Arıbaş E, Erayman İ. Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılığı. *Ankem Dergisi* 2010; 24: 28-33.
22. Weinbren MJ, Johnson AP, Kaufmann ME, Livermore DM. *Acinetobacter* spp. isolates with reduced susceptibilities to carbapenems in a UK burns unit. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1998, 41(5):574-6.
23. Gözütok F, Çelik İ, Berk E, Aydın B, Güzel D. Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarının araştırılması. *Ankem Derg.* 2013;27(1):7-12.
24. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro surveillance*, 2008;13(47):1-11.
25. Turner P, Greenhalgh J. The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997- 2000. *Clin Microbiol Infect*, 2003;9(6):563-67.
26. Turner PJ. Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008;60(2):185-92.
27. Gür D, Hascelik G, Aydın N, et al. Antimicrobial resistance in Gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 surveillance study of 2007. *J Chemother*, 2009;21(4):383-89.
28. Gür D, Gülay Z, Akan ÖA, et al. Türkiye’de hastane izolatu Gram-negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: Çok merkezli HITIT sürveyansının sonuçları. *Mikrobiyol Bul*, 2008;42(4):537-44.
29. Maragakis L, Perl T. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*, 2008;46(8):1254-63.
30. Reboli AC, Houston ED, Monteforte JS, et al. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11): 2635-40.

Determination of serum hepatitis B virus DNA in HBV endemic region: Clinical significance and correlation with serological markers, ALT and AST

HBV endemik bölgede serum HBV DNA düzeylerinin klinik önemi ve serolojik işaretler, ALT, AST ile ilişkisi

Tuba MUDERRİS¹, Osman Sezer CİRİT², Tulin YAZICI³,

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to investigate, demographics and the relationship between serologic markers, liver enzymes and HBV DNA levels from the patients whose samples were sent to microbiology laboratory for HBV DNA polymerase chain reaction (PCR) test, in one of the greatest cities of Southeast Anatolia, where HBV infection is extremely common.

Method: Between October 2009 and October 2010, blood samples of 1662 patients were sent to our laboratory for HBV DNA PCR testing as part of a routine examination for viral hepatitis in Şanlıurfa Training and Research Hospital in Turkey. Hepatitis markers (HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBc IgM) and liver function enzymes (ALT, AST) are tested simultaneously in these samples. HBsAg, HBeAg, anti-HBs and anti-HBc IgM levels were assessed with chemiluminescent microparticle immunoassay method (Architect-i2000 SR, Abbott, Ireland). ALT and AST levels were measured with commercial kits in Roche Modular-P and Roche-Integra autoanalysator (Roche Diagnostics Mannheim, Germany). HBV DNA PCR: Isolation of HBV DNA from serum samples was done with M24sp automated extraction device (Abbott, USA). Purified DNA was amplified with Real-Time PCR method with the help of Abbott-m2000 sample preparation system (Abbott, USA).

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, HBV enfeksiyonunun son derece yaygın olduğu Güneydoğu bölgesindeki büyük şehirlerden birinde HBV DNA polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi için mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen hasta örneklerinde, demografik özellikler ve serolojik belirteçler, karaciğer enzimleri ve HBV DNA seviyeleri arasındaki ilişkileri incelemektir.

Yöntem: Ekim 2009-Ekim 2010 tarihleri arasında Şanlıurfa Eğitim ve Araştırma Hastanesinde viral hepatitin rutin testlerinin bir parçası olan HBV DNA PCR testi için 1662 hastanın kan örneği laboratuvarımıza gönderildi. Bu örneklerde eş zamanlı olarak hepatit belirteçleri (HBsAg, HBeAg, anti-HBs ve anti-HBc IgM) ve karaciğer fonksiyon enzimleri (ALT, AST) çalışıldı. HBsAg, HBeAg, anti-HBs ve anti-HBc IgM seviyeleri kemiluminesan mikropartikül immunoassay yöntemi ile (Architect i2000 SR, Abbott, Ireland) çalışıldı. ALT ve AST seviyeleri Roche Modular P ve Roche Integra otoanalizörde (Roche Diagnostics Mannheim, Germany) ticari kitler ile ölçüldü. HBV DNA PCR: Serum örneklerinde HBV DNA'nın izolasyonu M24sp otomatize ekstraksiyon cihazı (Abbott, USA) ile yapıldı. Saflaştırılmış DNA Abbott m2000 sample preparation system (Abbott, USA) yardımı ile ve Real-Time PCR yöntemi ile DNA amplifikasyonu yapıldı.

¹Ankara Atatürk Training And Research Hospital Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey

²Şanlıurfa Training And Research Hospital Department of Medical Microbiology, Şanlıurfa, Turkey

³Şanlıurfa Training And Research Hospital Department of Medical Biochemistry, Şanlıurfa, Turkey



İletişim / Corresponding Author : Tuba MÜDERRİS

Ankara Atatürk Training and Research Hospital Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey

Tel : +90 505 502 51 43

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

Geliş Tarihi / Received : 06.08.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 25.02.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.66563

Muderris T, Cirit OS, Yazici T. Determination of serum hepatitis B virus DNA in HBV endemic region: Clinical significance and correlation with serological markers, ALT and AST. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(3): 211-220

Results: The mean age was 33.7 (Min-Max: 0-89) years old and the majority of the patients were male (Male/Female: 1103/559) in the study. HBsAg was positive in 96.2% of the patients and the median ALT level of these patients were 94 u/l (Min-Max: 4-2390 u/l), while median AST level was 74 u/l (Min-Max: 7-2505 u/l). HBV DNA was positive in 94.6% of HBsAg positive patients and the median HBV DNA level was 3.9×10^4 copies/ml (Min-Max: $35-3.4 \times 10^9$ copies/ml). HBeAg was positive in 17.1% of HBsAg positive patients. Median levels of ALT and AST in HBsAg negative patients (3.8%) were 32 u/l (Min-Max: 7-497 u/l) and 33 u/l (Min-Max: 13-280 u/l) respectively. HBV DNA was positive in only 7.9% of the patients with median HBV DNA level of 155 copies/ml (Min-Max: 34-624 copies/ml). HBeAg was found negative in 71.4% of patients with negative HBsAg and positive HBV DNA. In 26 of 1662 patients (1.6%), both HBsAg and Anti-HBs were negative (N/N). Only two of the N/N patients (7.7%) were found anti-HBc positive. Mean ALT and AST levels of two anti-HBc positive patients were 29.5 u/l and 30.5 u/l, respectively. HBV DNA was negative in one of these patients, and the other was found positive with a level of 3×10^2 copies/ml.

Conclusion: To acquire more reliable results on the diagnosis and follow-up of the treatment of Hepatitis B, quantitative HBV DNA tests should be used in together with more frequently used serologic and biochemical methods.

Key Words: HBV DNA, HBsAg, HBeAg, Anti-HBs, Anti-HBc, ALT, AST

Bulgular: Çalışmamızda ortalama yaş 33,7 (Min-Maks: 0-89) ve örneklerin çoğunluğu erkek cinsiyettedir (Erkek/Kadın: 1103/559). Hastaların %96.2'sinin HBsAg'si pozitif ve bu hastaların ortalama ALT seviyesi 94 u/l (Min-Maks: 4-2390 u/l) iken, ortalama AST seviyesi 74 u/l (Min-Maks: 7-2505 u/l)'dir. HBsAg pozitif hastaların %94.6'sında HBV DNA pozitif ve ortalama HBV DNA düzeyi 3.9×10^4 kopya/ml (Min-Maks: $35-3.4 \times 10^9$ kopya/ml)'dir. HBsAg pozitif hastaların %17.1'inde HBeAg pozitif idi. HBsAg negatif hastaların (%3.8) ortalama ALT ve AST düzeyleri sırasıyla 32 u/l (Min-Maks: 7-497 u/l) ve 33 u/l (Min-Maks: 13-280 u/l)'dir. HBV DNA hastaların sadece %7.9'unda pozitif ve ortalama HBV DNA seviyesi 155 kopya/ml (Min-Maks: 34-624 kopya/ml) idi. HBsAg negatif ve HBV DNA pozitif hastaların %71.4'ünde HBeAg negatif bulundu. 1662 hastanın 26 (%1.6)'sında HBsAg ve Anti-HBs' nin her ikisi de negatif (N/N) idi. Bu N/N hastalarının sadece ikisi (%7.7) anti-HBc pozitif bulundu. İki anti-HBc pozitif hastanın ortalama ALT ve AST seviyeleri sırasıyla 29.5 u/l ve 30.5 u/l idi. Bu hastaların birinin HBV DNA'sı negatif idi ve diğeri 3×10^2 kopya/ml ile pozitif bulundu.

Sonuç: Hepatit B infeksiyonlarının tanısında ve tedavisinin takibinde daha güvenilir sonuçlar elde edebilmek için daha sık kullanılan serolojik ve biyokimyasal testler ile birlikte kantitatif HBV DNA testleri kullanılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: HBV DNA, HBsAg, HBeAg, Anti-HBs, Anti-HBc, ALT, AST

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) is a noncytotoxic, hepatotropic virus of the Hepadnaviridae family that causes variable degrees of liver disease in humans. HBV carriers are at risk of developing life threatening cirrhosis (30%) and later on hepatic carcinoma (6-17.5%). Despite the availability of a prophylactic vaccine, HBV is estimated to infect around 400

million people worldwide and it is endemic in Asia and Africa (1). It will increase by nearly 50 million people a year with nearly two million deaths related to acute and chronic complications of HBV. World Health Organization reported that the virus causes hepatic carcinoma over 300.000 patients annually. HBV carriers are the most important factor in the

dissemination of HBV infection. Turkey is among the moderate endemic regions with a carrier rate of 3.9-12.5%. Various studies revealed even higher rates in Eastern and Southeastern regions of Turkey with remarkable rates of childhood transmission (2).

Viral antigens and antibodies that emerge against them, are commonly used in diagnosis and for determination of the prognosis of HBV infection (3). Serological tests can provide accurate information about acute, chronic or previous HBV infection. Routine serological tests that are used in the diagnosis of HBV are; Hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B surface antibody (anti-HBs), hepatitis B core antibody (anti-HBc), hepatitis B envelope antigen (HBeAg) and HBe antibody (anti-HBe) (4).

HBsAg is the most important marker for the diagnosis of acute and chronic hepatitis B virus and indicates potential infectiousness. It is one of the first serum markers to appear during the course of HBV infection. It is also useful as a follow-up marker, since declining concentrations are observed in resolving hepatitis B. HBsAg usually becomes undetectable after 4-6 months. If HBsAg persists for more than 6 months, the infected individual is considered as a chronic HBV carrier. Anti-HBs antibodies become detectable late in convalescence. Hepatitis B e antigen (HBeAg) protein appears shortly after the appearance of HBsAg and disappears within several weeks as acute hepatitis resolves. Its presence in the serum correlates with presence of viral replication in the liver. Antibody to hepatitis B core antigen (Anti-HBc) IgM is detectable at the outset of clinical disease and as the infection evolves, it gradually decline and become undetectable within six months. Anti-HBc IgG predominates and remains for a long time at detectable levels (5).

Lately, detection of HBV DNA in the serum and viral quantitation have an increasingly important role in diagnosis of the disease, designing the treatment and determination of the efficacy of

antiviral therapy. (6). The correlation between the HBsAg and the number of HBV particles is a key point, since this marker is used with a wide range of HBV particles in blood, depending on the infections state (7). Clinical liver function biomarkers, used for the diagnosis of liver damage and/or evaluation of treatment includes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) (8). Due to serious clinical problems that the infection may cause and the potential for obstinacy, accurate use and interpretation of laboratory tests have a crucial role in the diagnosis of the infection (4).

In this study, patient demographics and the relationship between serologic markers, liver enzymes and HBV DNA levels are investigated in patient samples that were sent to our microbiology laboratory for HBV DNA polymerase chain reaction (PCR) test, in one of the developed cities of Southeastern region of Turkey, where HBV infection is extremely common.

MATERIAL and METHOD

This study was carried out between 01 October 2009 and 31 October 2010. Blood samples of 1662 patients were sent to our laboratory for HBV DNA PCR testing as part of a routine examination for viral hepatitis in Şanlıurfa Training and Research Hospital, Turkey. Hepatitis markers (HBsAg, HBeAg, anti-HBs and anti-HBc IgM) and liver function enzymes (ALT, AST) are tested simultaneously in these samples.

HBsAg, HBeAg, anti-HBs and anti-HBc IgM levels were assessed with chemiluminescent microparticle immunoassay method with Architect i2000 SR (Abbott, Ireland) system.

ALT and AST levels were measured with commercial kits in Roche Modular P and Roche Integra autoanalyser (Roche Diagnostics Mannheim, Germany). The normal concentrations in the blood were between 5 to 41 U/L for AST and 5-38 u/l for ALT.

Isolation of HBV DNA from serum samples was done with M24sp automated extraction device (Abbott,

USA). Purified DNA was amplified with Real-Time PCR method using Abbott m2000 sample preparation system (Abbott, USA). The target sequence for the Abbott RealTime HBV assay is in the surface gene in the HBV genome. This region is specific for HBV and is highly conserved. The primers are designed to hybridize to this region with the fewest possible mismatches among HBV genotypes A through H. The lower limit of this commercial test was 34.1 copy/ml where upper limit was 3.41×10^9 copy/ml. Three controls (negative control, low positive control and high positive control) were included in to the study for determination of contamination and evaluation of the results.

RESULTS

One thousand one hundred and three of the subjects were male and 559 were female, with a mean age of 33.7 years (Min-Max: 0-89). Patient demographics and test results according to age groups are summarized in Table 1.

Median ALT level of HBsAg positive patients, which consisted 96.2% of all patients, was 94 u/l (Min-Max: 4-2390 u/l), while median AST level was 74 u/l (Min-Max: 7-2505 u/l). Of these HBsAg positive patients, HBV DNA was positive in 94.6% and median HBV DNA level was 3.9×10^4 copies/ml (Min-Max: $35-3.4 \times 10^9$ copies/ml). Median ALT/AST levels of patients with HBV DNA levels $\leq 10^3$ copies/ml, 10^3-10^5 copies/ml and $\geq 10^5$ copies/ml were 50 (Min-Max: 6-1158 u/l)/39 (Min-Max: 9-1636 u/l) u/l, 54 (Min-Max: 4-2053 U/L)/43 (Min-Max: 7-2505 U/L) U/L and 86 (Min-Max: 9-2390 U/L)/68 (Min-Max: 15-1967 U/L) U/L respectively. Median ALT/AST levels of patients with negative HBV DNA were 35 (Min-Max: 10-156 U/L)/32 (Min-Max: 13-95 U/L) U/L. HBeAg was positive in 17.1% of HBsAg positive patients. HBeAg positivity rates of patients with HBV DNA $\leq 10^3$ copies/ml, 10^3-10^5 copies/ml, $\geq 10^5$ copies/ml were 18.4%, 15.4% and 65.1%, respectively. HBeAg was positive only in 1.1% of HBsAg positive patients with negative HBV DNA. HBeAg, HBV DNA and ALT/AST levels of

Table 1. Demographic characteristics and serological test results of 1662 subjects, Şanlıurfa, October 2009-2010

	NO.	M/F	HBsAg		HBsAg/Anti-HBs			
			P	N	P/P	P/N	N/P	N/N
Sex								
Male	559 (33.6%)		538 (32.4%)	21 (1.3%)	89 (5.4%)	449 (27.0%)	10 (0.6%)	11 (0.7%)
Female	1103 (66.4%)		1061 (63.8%)	42 (2.5%)	158 (9.5%)	903 (54.3%)	27 (1.6%)	15 (0.9%)
Age (years)								
0-14	110 (6.6%)	63/47	108 (96.2%)	2 (0.1%)	23 (1.4%)	85 (5.1%)	2 (0.1%)	0
15-40	1046 (62.9%)	714/332	1015 (61.1%)	31 (1.9%)	126 (7.6%)	889 (53.5%)	15 (0.9%)	16 (1.0%)
41-60	444 (26.7%)	294/150	419 (25.2%)	25 (1.5%)	89 (5.4%)	329 (19.8%)	16 (1.0%)	9 (0.5%)
≥ 61	62 (3.7%)	32/30	57 (3.4%)	5 (0.3%)	9 (0.5%)	48 (2.9%)	4 (0.2%)	1 (0.1%)
Total	1662	1103/559	1599 (96.2%)	63 (3.8%)	247 (14.9%)	1352 (81.3%)	37 (2.2%)	26 (1.6%)

M: male, F: female, P: positive, N: negative

HBsAg positive patients are summarized in Table 2.

Median ALT level of HBsAg negative patients (3.8%) was 32 U/L (Min-Max: 7-497 U/L) and median AST level was 33 U/L (Min-Max: 13-280 U/L). HBV DNA was negative in 92.1% of these patients where it was positive in 7.9%, with a median HBV DNA level of 155 copies/ml (Min-Max: 34-624 copies/ml). HBeAg was negative in 71.4% of patients with negative HBsAg and positive HBV DNA. Anti-HBc and anti-HBs was positive in these patients (0.3% of total)

In 26 of 1662 patients (1.6%), both HBsAg and anti-HBs were negative (N,N). Among these N/N individuals, 24 (92.3%) were anti-HBc negative and 2 (7.7%) were anti-HBc positive. The incidence of being N/N was higher in women (2%) than in men (1.4 %). The prevalence of being N/N was highest in the group aged 41-60 years (2.0%), where it was 1.6% in the age group over 61 years, and lowest (1.4%) in the age group under 40 years (Table 3). The prevalence did not decrease according to age. Mean ALT level of the two anti-HBc positive patients was 29.5 U/L, and mean AST level was 30.5 U/L. HBV DNA was negative in one of these patients, and the other had a HBV DNA level of 3×10^2 copies/ml.

DISCUSSION

HBV viral load measuring is a very important tool for monitoring HBV infected patients. The most direct and reliable measurement of viral replication is HBV DNA quantification, which can replace other indirect methods to assess the efficacy of antiviral therapy used to treat HBV infected patients, such as serologic markers or measurement of liver enzyme functions. Monitoring the HBV viral load can predict the evolution to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (9), as well as a rapid and sustained response to treatment as a predictive factor for a favorable treatment outcome. It can also provide an early detection of treatment failure that may be related to poor adherence to therapy or selection of a resistant virus. The likelihood of resistance to nucleotide analogues is very low when HBV DNA level is undetectable during therapy and increases proportionally to the HBV DNA level (10).

Turkey is an intermediate endemic area (2-8%) for HBV infection. However, the east and southeast region of Turkey is known as an endemic area for HBV infection in Turkey (11) and this study is performed in one of the largest cities of Southeastern Anatolia. In our study, mean age (33.7) of HBsAg positive patients

Table 2. The relationship between HBV DNA, HBeAg positivity and ALT/AST levels in HBsAg positive patients, Şanlıurfa, October 2009-2010

			ALT/AST				Total
			N/N	N/H	H/N	H/H	
HBsAg + (96.2%)	HBeAg + (17.1%)	HBV DNA +	69	34	45	122	270
		HBV DNA -	3	0	0	0	3
	HBeAg - (83.0%)	HBV DNA +	612	258	266	107	1243
		HBV DNA -	46	13	6	18	83
Total			730	305	317	247	1599

N: Normal level, H: High level

Table 1. Prevalence of isolated anti-HBc presence in patients who were N/N (Negative/Negative) for HBsAg/anti-HBs, Şanlıurfa, October 2009-2010

	N/N	N/N		Isolated anti-HBc (% of total)
		Anti-HBc -	Anti-HBc +	
Sex				
Male (N:1103)	15 (1.4%)		0	0
Female (N:559)	11 (2%)		2 (10.0%)	0.4%
Age (years)				
0-14 (N:110)	0	0	0	0
15-40 (N:1046)	16 (1.4%)	16 (100%)	0	0
41-60 (N:444)	9 (2.0%)	8 (88.9%)	1 (11.1%)	0.2%
≥61 (N:62)	1 (1.6%)	0	1 (100%)	1.6%
Total (N:1662)	26 (1.6%)	24 (92.3%)	2 (7.7%)	0.1%

M: male, F: female, P: positive, N: negative

was consistent with other studies around the world and Turkey (12-14). A multicentric study found that average age of patients infected with Hepatitis B is lower in Southeastern Anatolia region (26.2 ± 11.3) when compared to other regions (15). Toy et al investigated 339 studies about HBsAg prevalence in Turkey between the years 1999-2009, and found out that the prevalence in East and Southeast Anatolia is highest in the age group of 15-24 years (%12.51) (12). HBsAg positivity was highest among the ages 15-40 in our study. High prevalence in younger age groups may be associated with factors like lower living standards, low socioeconomic status, close contact and a high rate of vertical and horizontal transmission (11), which are also the causes of higher HBV infection rates.

Studies showed that, HBV DNA could be demonstrated either in circulation or in liver tissue in every patient that HBsAg is detected (16). We found a very high rate of HBV DNA positivity (94.6%)

in HBsAg positive patients' blood samples in our study.

We also found HBV DNA in 7.9% of HBsAg negative patients. Similarly, even higher rates in chronic hepatitis patients, were reported in literature (17). This HBV DNA positivity in seronegative patients could be associated with mutant strains (18). These results suggest that, determining HBV replication only by detection of HBV marker is not enough and real-time PCR should be used simultaneously for more reliable results (19).

HBeAg positivity in HBsAg positive patients has reported as 8-13% in Turkey. (15,20-22). In our study this rate was 17.1%, which also indicates high HBV prevalence in our region.

HBeAg is detected during active viral replication, usually in patients with positive serum HBV DNA (4). In our study, HBV DNA was positive in 98.9% of HBsAg and HBeAg positive patients. Presence of

HBV DNA in HBeAg positive patients was found to be 80.5% by Ozbilge et al, 81.6% by Pekbay et al and 61% by Heper et al. (18,23,24). As these results suggest HBV DNA can be found negative in some HBeAg positive patients, which may be related to regional variability of mutant strains. Furthermore, it is very important to know whether the patient has been treated or not when HBV DNA and HBeAg serological tests are interpreted. It should be kept in mind that in some situations, especially when HBeAg is positive, HBV DNA may be negative or low positive while the patient is receiving antiviral treatment. HBV DNA could not be isolated in three HBeAg positive patients in present study. This condition has been reported in similar studies. (23,25,26). Lack of the information about treatment states of these patients is a disadvantage of our study.

HBV DNA was positive in 98.9% of HBsAg and HBeAg positive patients and serum ALT levels were elevated in 61.9% of them while it was normal in 38.1%. These results suggest immune tolerant phase (presence of HBeAg, high positivity of HBV DNA and normal ALT levels) and immune clearance phases (presence of HBeAg, high positivity of HBV DNA and elevated ALT levels), respectively. To precisely determine the phase of chronic hepatitis in patients, these findings have to be evaluated together with liver biopsy results (27). To find out the phase of the illness is especially important in prediction of prognosis and management of disease (28).

The anti-core antibody can induce anti-HBc responses without T-cell activation. This antibody can be found in almost every patient with a previous contact with HBV, even in HBV carriers without other responses. This serological pattern is called 'anti-HBc alone', and might reflect an occult HBV infection (OBI). Anti-HBc is not an ideal marker, the Taormina group recommended its use as a surrogate marker whenever an HBV DNA test is not available to identify potential seropositive OBI individuals such as in cases of blood, tissue or organ donation, or

in cases of patients undergoing immunosuppressive therapy (7). Numerous studies have been performed to identify contamination from HBsAg negative persons, in other words HBV presence in HBsAg negative patients, and various results (between 1/46000 and 1/630000) have been found in different countries (29). Studies in Turkey revealed isolated anti-HBc positivity between 0.011% and 6.4% (29-31). The results of our study showed that 1.6% of individuals were N/N based on routine serological tests for HBV (HBsAg/anti-HBs) and 7.7% of them were isolated anti-HBc positive individuals (2 patients, 0.1% of total subjects) and one of these was low positive for HBV DNA while other was negative. However, real prevalence of isolated anti-HBc positivity is still not known due to different patient numbers of the studies and variations in the sensitivities of the tests that are used in these studies. Because of that, highly sensitive and specific PCR tests are very important for determination of real prevalence (32). Furthermore, it is known that, HBV infection rates in the study region are also an important factor in prevalence of isolated anti-HBc positivity. The geographical factors are found to be highly associated with isolated anti-HBc prevalence, there by endemic HBV infection (33). Our higher prevalence rates were probably due to lower number of HBsAg positive patients in our study group and high HBV prevalence of the region. We suggested that it was necessary, larger studies with accurate and highly sensitive techniques and histopathological examinations to determine the real prevalence of isolated anti-HBc positivity in patients. Generally, infection is considered to be ended when antigens disappear and anti-HBs and anti-HBc antibodies turn up in an individual. However, we found HBV DNA in 0.3% (5/1662) of patients even though antigens were negative and antibodies were positive. This situation supports the idea of positive anti-HBs do not necessarily mean recovery (34, 35). The cause of anti-HBs presence in HBV DNA positive patients has not clarified yet, but it may be attributed to

insufficient neutralization of HBV or deficiency of determining the precise state of HBV infection with routine serologic tests.

When body tissue or an organ such as liver or heart is diseased or damaged, additional AST and ALT releases into the bloodstream, causing elevated levels of the enzymes. Therefore, the amount of AST and ALT in the blood is directly related to the extent of the tissue damage (36). It was found that median ALT and AST levels of HBsAg positive patients were elevated. This elevation in ALT and AST levels may show liver damage due to HBV replication. ALT and AST levels are important markers in diagnosis and management of acute Hepatitis B infection and acute fulminant hepatitis, as well as in diagnosis and follow-ups of inactive HBsAg carriers, according to the latest guidelines (37). It must be kept in mind that liver enzymes are important parameters in management of the patients in addition to molecular

techniques that are frequently used lately.

Studies revealed that HBeAg positive patients have higher replication levels than HBeAg negative ones. Togo et al and Sağlık et al showed higher ALT and HBV DNA levels in HBeAg positive patients similar to our study (3). ALT levels elevated in 61.2% of HBeAg positive patients while this rate was only 28.1% in HBeAg negative individuals in our study.

Serological markers and serum transaminase levels are not always adequate in evaluation of HBV infection. HBV DNA detection in serum sample is the best way in finding out the infectivity of the Hepatitis B infection, determining the necessity of antiviral treatment and efficiency of the treatment and evaluating the prognosis of the disease. As a result, quantitative HBV DNA tests should be used together with serological and biochemical test in the management of HBV infections.

REFERENCES

1. Busca A, Kumar A. Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *Viral J*, 2014; 11: 22.
2. Duman Y, Kaysadu H, Tekerekoğlu MS. Hepatit B virüs enfeksiyonunun seroprevalansı. *İnönü Üni Tıp Fak Derg*, 2009; 16 (4): 243-45.
3. Sağlık I, Mutlu D, Ongut G, Güvenc HI, Akbaş H, Oğunc D, et al. Kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda HBsAg ve HBeAg değerlerinin HBV DNA ve Alanin Aminotransferaz düzeyleri ile karşılaştırılması. *Viral Hepat J*, 2013; 19 (3): 119-22.
4. Genç Ö, Aksu E. Dumlupınar Üniversitesi Evliya Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde hepatit B serolojik testlerinin uygunsuz kullanımı, Kütahya. *Mikrobiyol Bul*, 2014; 48(4): 618-27.
5. Ponde RA. The underlying mechanisms for the "isolated positivity for the hepatitis B surface antigen (HBsAg)" serological profile. *Med Microbiol Immunol*, 2011; 200: 13-22.
6. Biçeroğlu SU, Yazan Sertöz R, Zeytinoğlu A, Altuğlu İ. Hepatit B virüs kantitasyonunda iki farklı gerçek zamanlı PCR testinin karşılaştırılması: COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan ve ARTHUS QS-RGQ KİT. *Ege J Med*, 2012; 51 (4): 233-7.
7. Ocana S, Casas ML, Buhigas I, Lledo JL. Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 2011; 17 (12): 1553-7.
8. Gleason JA, Post GB, Fagliano JA. Associations of perfluorinated chemical serum concentration and biomarkers of liver function and uric acid in the US population (NHANES), 2007-2010. *Environ Res*, 2015; 136: 8-14.

9. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*, 2006; 295: 65-73.
10. Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, et al. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: Recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology*, 2008; 134: 405-15.
11. Kangin M, Turhanoglu M, Gulsun S, Cakabay B. Seroprevalence of hepatitis B and C among children in endemic areas of Turkey. *Hepat Mon*, 2010; 10 (1): 36-41.
12. Toy M, Önder FO, Wörmann T, Bozdayi AM, Schalm SW, Borsboom GJ, et al. Age- and region-specific hepatitis B prevalence in Turkey estimated using generalized linear mixed models: a systematic review. *BMC Infect Dis*, 2011; 12: 337.
13. Sünbül M, Leblebicioğlu H. Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol*, 2005; 11: 1976-80.
14. Sagnelli E, Stroffolini T, Ascione A, Chiaramonte M, Craxi A, Giusti G, et al. Decrease in HDV endemicity in Italy. *J Hepatol*, 1997; 26: 20-4.
15. Celen MK, Koruk ST, Aygen B, Dal T, Karabay O, Tosun S, Koksall I, Turgut H, Onlen Y, Balık I, Yıldırım N, Dal MS, Ayaz C, Tabak F. The characteristics of patients with chronic hepatitis B in Turkey. *Med Glas (Zenica)*, 2014; 11(1):94-98.
16. Kangin M, Turhanoglu M, Gulsun S, Cakabay B. Seroprevalence of Hepatitis B and C among Children in Endemic Areas of Turkey. *Hepatitis Monthly*, 2010; 10(1):36-41.
17. Ergünay K. Gizli (okült) hepatit B enfeksiyonu. *Mikrobiyol Bul*, 2005; 39:241-249.
18. Altındış M. Hepatit B virus (HBV) serolojik belirteçleri ile HBV DNA'nın varlığının karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 2002; 16 (2): 141-5.
19. Özbilge H, Zeyrek FY, Mızraklı Uzala A, Tümkaya B. Hepatit B virus DNA pozitifliği ve serolojik testler. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)*, 2005; 27 (1):17-21.
20. Ghafourian S, Mohebi R, Khosravi A, Maleki A, Davoodian A, Sadeghifard N. Detection of Hepatitis B Virus DNA by Real-Time PCR in Chronic Hepatitis B Patients, Ilam, Iran. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2011; 9 (4):478-480.
21. Kaya Ş, Baysal B, Temiz H, Karadağ Ö, Özdemir K, Bilman F. Seroprevalence of hepatitis B and C among patients admitted to a tertiary hospital. *Viral Hepat J*, 2014; 20: 120-4.
22. Demirtürk N, Demirdal T, Toprak D, Altındis M, Aktepe OC. Hepatitis B and C virus in West-Central Turkey: seroprevalence in healthy individuals admitted to a university hospital for routine health checks. *Turk J Gastroenterol*, 2006; 17 (4): 267-72.
23. Pekbay A, Günaydın M, Eroğlu C, Bedir A, Esen Ş, Leblebicioğlu H. Hepatit B virüsü (HBV) serolojik göstergeleri ile HBV DNA arasındaki korelasyon. *Viral Hepat Derg*, 2001; 2: 302-4.
24. Heper Y, Mıstık R, Özakin C, Töre O. Hepatit B virus (HBV) markerleri ile HBV- DNA ilişkisi: Bursa bölgesi sonuçları. *Viral Hepat Derg*, 1999; 2: 137-9.
25. Yücesoy M, Bahar İH, Yuluğ N. Hepatit B virüsü (HBV) serolojik belirleyicileri ile HBV DNA'nın karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg*, 1999; 4: 581-4.
26. Külah C, Cömert F, Özlü N, Eroğlu Ö, Tekin İÖ. Hepatit B Virus (HBV) İnfeksiyonunda serolojik belirteçler, transaminaz düzeyleri ve HBV DNA'nın birlikte değerlendirilmesi. *Viral Hepat Derg*, 2007; 12 (3): 111-5
27. Hadziyannis SJ. New developments in the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin. Biol. Ther*, 2006; 6 (9): 913-21.
28. Değertekin H, Oğuz AK. Akut ve kronik HBV enfeksiyonunda doğal seyir. *Güncel Gastroenteroloji*, 2010; 14/2: 54-8.
29. Bal SH, Heper Y, Kumaş LT, Mıstık R, Töre O. İzole Anti-HBc pozitif olgularda HBV-DNA varlığının araştırılması ve bu olguların kan bankacılığı açısından önemi. *Mikrobiyol Bul*, 2009; 43: 243-50.
30. Altunay H, Kosan E, Birinci I, Aksoy A, Kirali K, Saribas S, et al. Are isolated anti-HBc blood donors in high risk group? The detection of HBV DNA in isolated anti-HBc cases with nucleic acid amplification test (NAT) based on transcription-mediated amplification (TMA) and HBV discrimination. *Transfus Apher Sci*, 2010; 43: 265-8.

31. Yakaryilmaz F, Gurbuz OA, Guliter S, Mert A, Songur Y, Karakan T, et al. Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. *Ren Fail*, 2006; 28: 729-35
32. Cabrerrizo M, Bartolome J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology*, 2000; 32: 116-23.
33. Utsumi T, Yano Y, Truong B, Kawabata M, Hayashi Y. Characteristics of occult hepatitis B virus infection in the Solomon Islands. *Int J Mol Med*, 2011; 27: 829-34.
34. Tanaka Y, Esumi M, Shikata T. Persistence of hepatitis B virus DNA after serological clearance of hepatitis B virus. *Liver*, 1990; 10: 6-10.
35. Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M, Hamamoto S, Satoh S, Tanaka S, et al. Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver diseases: clinical and virological significance. *J Med Virol*, 1999; 58: 201-7.
36. Huang XJ, Choi YK, Im HS, Yarimaga O, Yoon E, Kim HS. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors*, 2006; 6: 756-82.
37. III. Viral hepatit tanı ve tedavi rehberi. Viral hepatitle savaşım derneği. Ankara, 2011.

Akharım beldesinde musluk suyu kaynaklı gastroenterit salgını, Afyonkarahisar ili, Türkiye, Mayıs 2014

A gastroenteritis outbreak caused by contaminated tap water, Akharım town, Afyonkarahisar province, Turkey, May 2014.

Pınar DUMAN¹, Yasemin DEMİRBİLEK¹, Fatma ÇELİK¹, Mehmet ŞENOL², Ramazan ÖZÇELİK², Murat KOÇKAR², Serap ÇETİN-ÇOBAN¹, Fehminaz TEMEL¹, Mustafa Bahadır SUCAKLI¹, Gülay KORUKLUOĞLU²

ÖZET

Amaç: 8 Mayıs 2014 tarihinde, Afyonkarahisar Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından; Sandıklı ilçesi Akharım beldesinde, gastroenterit vakalarında artış olduğu ve 395 kişinin sağlık kuruluşlarına başvurduğu bildirilmiştir. Çalışma, salgının nedenini saptamak, bulaş yoluunu belirlemek, koruma ve kontrol önlemlerini almak amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: Vakaları bulmak için hastane kayıtları incelenmiştir. Akharım beldesinden 05-12 Mayıs 2014 tarihleri arasında sağlık kuruluşlarına başvuran ve akut gastroenteritle ilişkili ICD-10 tanı kodlarıyla (A09, R11 veya K52) kaydı yapılanlar şüpheli vakalar olarak tanımlanmıştır. Bu şüpheli vakalar arasından "ishal veya kusması olanlar" olası vaka olarak tanımlanmıştır. Salgının nedeninin kanalizasyon ve yağmur suyu sızıntılarıyla kirlenmiş şebeke suyu olduğu hipotezini test etmek amacıyla vaka-kontrol çalışması yapılmıştır. Veriler; sosyodemografik özellikler, semptomlar, hastane başvurusu, semptom başlama zamanı, içme-kullanma suyu tüketimi, hijyen alışkanlıkları bilgileriyle ilgili toplam 24 sorudan oluşan anket formuyla yüzyüze toplanmıştır. Etken tespiti için gaita ve su örnekleri alınmıştır. Ayrıca, vaka sayısındaki değişim ile ilçenin yağış değerlerindeki değişim karşılaştırılmıştır.

ABSTRACT

Objective: On 8 May 2014, it has been reported that 395 persons who have suffered from abdominal pain, nausea, vomiting, diarrhoea apply to health care institutions during the outbreak increase in gastroenteritis cases was reported from Akharım town, in Afyon province. We investigated the outbreak to determine its scope, source and mode of transmission and to provide prevention and control measures.

Method: In order to find the cases the hospital records was investigated. It was identified as a suspected cases that was admitted to a hospital related to ICD-10 (A09, R11, or K52) diagnosis codes of acute gastroenteritis. This cases have applied to health care institutions between the dates of 05-12 May 2014 from Akharım town. A probable case was a suspected case having diarrhoea or vomiting. To test our hypothesis that "the source of the outbreak is the tap water contaminated with sewage and rain water", we conducted a case-control study. Data including sociodemographic characteristics, symptoms, hospital admissions, symptom onset time, were collected by a face-to-face questionnaire consisted of 24 questions related to drinking-water consumption information. It has been collected stool and water samples to identify the agent. It has also compared the change in rainfall districts with the change in the number of cases.

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

¹ Afyonkarahisar Halk Sağlığı Müdürlüğü



İletişim / Corresponding Author : Pınar Duman

Sağlık Mah. Prof. Dr. Nusret Fişek Cad. No: 41 Sıhhiye 06100 Ankara - Türkiye

Tel : +90 312 565 25 25

E-posta / E-mail : pinarduman71@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 05.08.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 26.01.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.16779

Duman P, Demirbilek Y, Çelik F, Şenol M, Özçelik R, Koçkar M, Çetin-Çoban S, Temel F, Sucaklı MB, Korukluoğlu G. Akharım Beldesinde musluk suyu kaynaklı gastroenterit salgını, Afyonkarahisar İli, Türkiye, Mayıs 2014. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(3): 221-232

Bulgular: Araştırmada 292 vaka ve kontrolüne ulaşılmıştır. Atak hızı kadınlarda (%17,7) erkeklerden (%10,9) daha yüksektir. Şüpheli vakaların yaş ortancası 19'dur (En küçük-En büyük: 11 ay-87 yıl). Vakalar tüm yaş gruplarında görülmüş, en yüksek atak hızı 10-14 yaş grubunda (%32,6) saptanmıştır. Olası vakalarda en sık görülen semptomlar; karın ağrısı (%89,8), ishal (%89,8), bulantı (%80,9), kusma (%70,3) ve ateştir (%67,5). Vakalarda kontrollere göre; musluk suyu içme tahmini rölatif riski 113,5 (%95 GA: 32,9-694,0); mahalle çeşmesi suyu içme tahmini rölatif riski 0,10 (%95 GA: 0,04-0,3); kaynak suyu içme tahmini rölatif riski 0,10 (%95 GA: 0,02-0,30) ve damacana suyu içme tahmini rölatif riski 0,03 (%95 GA: 0,004-0,093) bulunmuştur. Damacana suyu içmek referans olarak kabul edildiğinde; vakalarda kontrollere göre musluk suyu içme durumu 91 kat daha fazladır (ORadj=91,1, %95GA: 12,4-666,4). İncelenen 9 adet gaita örneğinden ikisinde Norovirüs GI ve GII tespit edilmiştir. Bölgede içme-kullanma suyu olarak yüzeysel kaynakların kullanıldığı öğrenilmiştir. Şebeke suyu hattında da sızıntılar olduğu görülmüştür. Alınan 16 su örneğinin 11'inde total koliform sayısı yüksek bulunmuştur. Bütün su örneklerinde serbest klor miktarı 0 ppm olarak saptanmıştır.

Sonuç: Salgının, şebeke suyu kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Şebeke suyu sisteminin gözden geçirilmesi, onarılması ve su kaynağı olarak yer altı sularının kullanılması ve suyun düzenli klorlanarak halkın kullanımına sunulması önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: gastroenterit, içme suyu, su kaynaklı salgın, vaka-kontrol çalışması

Results: It has been reached 292 cases and controls in the study. The attack rate in women (17.7%) is higher than men (10.9%). The median age of suspected cases was 19 years (Min-Max: 11 months-87 years). The cases were seen in all age groups, the highest attack rate has been detected in the 10-14 age groups (32.6%). The most common symptoms of possible cases were abdominal pain (89.8%), diarrhoea (89.8%), nausea (80.9%), vomiting (70.3%), and fever (67.5%). It was found when comparing cases to controls; the estimated relation risks of drinking tap water, neighbourhood water, drinking spring water and bottled water were 113.5 (95% CI: 32.9-649.0); 0.10 (95% CI: 0.04 to 0.25); 0.10 (95% CI: 0.02 to 0.30), and 0.03 (95% CI: 0.004 to 0.093) times higher in cases respectively. When taking bottled water as a reference; drinking tap water was 91 times higher in cases than controls (ORadj=91.1, 95% CI: 12.4-666.4). Two of nine stool samples were which has been examined were tested positive for Norovirüs GI-GII. It has been detected that superficial water has been used as drinking water source in this region. Moreover leakage has been found in the pipeline system. 85% of water samples tested positive for E. coli and coliform bacteria. It was determined that 11 out of 16 water samples were found to have a high number of total coliform bacteria. Free chlorine level was 0 (zero) ppm in all samples.

Conclusion: It was observed that outbreak stems from drinking contaminated tap water. It has been recommended that the water supply system should be thoroughly inspected, repaired and that the water should be supplied from underground water sources. In order to ensure public access to clean wate. The water supply should be chlorinated regularly.

Key Words: drinking water, water-borne, outbreaks, gastroenteritis, case-control studies

GİRİŞ

Akut gastroenteritler, gastrointestinal sistemin bakteri, virüs veya parazitlerle oluşan enfeksiyonu olup Türkiye'de önemli bir halk sağlığı sorunudur (1). Ülkemizde enfeksiyöz kaynaklı akut gastroenterite bakteriler, virüsler ve parazitler yol açmakta olup bu etkenler arasında *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*,

Aeromonas ve *Yersinia* gibi bakteriler; rotavirüs, norovirüs ve enterik adenovirüs gibi virüsler ile *Entamoeba histolytica*, ve *Giardia intestinalis* gibi parazitler yer almaktadır (2).

Ülkemizde akut gastroenteritlerin "Akut Barsak Enfeksiyonları Sürveyansı" kapsamında

izlemi yapılmaktadır. İzlem sırasında erken uyarı sinyalleri takip edilmekte ve Halk Sağlığı Müdürlükleri (HSM) tarafından vaka sayılarında artış tespit edildiğinde, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK)'na yapılan bildirimler değerlendirilmektedir.

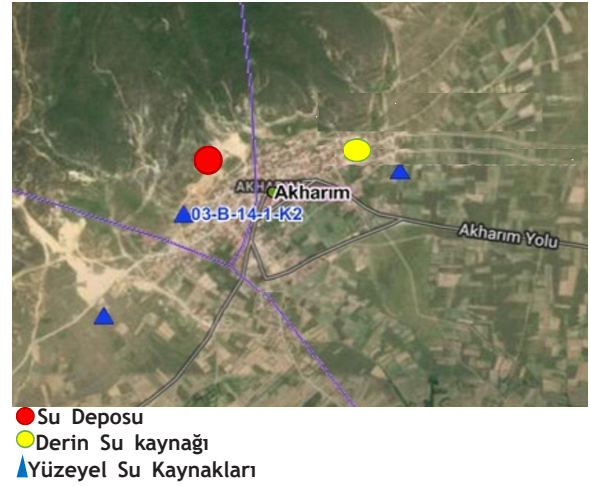
Afyonkarahisar HSM tarafından 7 Mayıs 2014 tarihinde Sandıklı ilçesi Akharım beldesinden, il merkezi ve ilçedeki muhtelif hastanelere karın ağrısı, bulantı, kusma ve ishal şikâyetleri ile başvuranların sayısında artış olduğu bildirilmesi üzerine salgının nedenini saptamak, bulaş yolunu belirlemek, koruma ve kontrol önlemlerinin uygulanmasını sağlamak amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Sandıklı İlçesine bağlı tek Belde olan Akharım Beldesi 2.763 nüfuslu olup Sandıklı İlçesine 27 km uzaklıktadır. Bir baraj gölü mevcut olan beldede tarım ve hayvancılık yapılmaktadır. Belde Belediyesi yetkililerinden alınan bilgilere göre, beldede bir derin ve iki de yüzeysel olmak üzere üç su kaynağı bulunmakta olup beldenin su ihtiyacı yüzeysel kaynaklardan gelen suların karşılanmaktadır (Şekil 1). Derin su kaynağından sağlanan su yalnızca su ihtiyacının arttığı zamanlarda şebeke sistemine verilmektedir. Beldede tek su deposu bulunmakta olup su şebeke sistemi ve depo belediye yetkililerinden alınan bilgilere göre uzun yıllardır yenilenmemiştir.

Toplum Sağlığı Merkezi (TSM) tarafından, su kontrol noktalarından önceki aylarda alınan su örneklerinin uygun çıkmaması nedeniyle, belde belediyesine yapılan uyarılar neticesinde belediye görevlilerince 5 Mayıs 2014 tarihinde saat 17:00 dan sonra su deposu temizlenmiş ve sonrasında yaklaşık 10 saat süreyle beldede su kesintisi uygulanmıştır.

Bölgenin son bir aydır yağış aldığı, beldenin şebeke sistemine yüzeysel kaynaklardan su temin edildiği, borularda yer yer sızıntılar bulunduğu,



Şekil 1. Akharım Beldesi Su Kaynakları

deponun mevzuata uygun şartları taşımadığı ve suyun klorlanmadan sisteme verildiği tespit edilmiştir.

Saha inceleme ekibi ilk incelemelerinde salgının su kaynaklı olabileceğini düşünerek, salgının 3. günü olan 9 Mayıs 2014 tarihinde deponun mevzuata uygun şartları taşımadığı ve suyun klorlanmadan sisteme verildiği tespit edilmiştir. yüzeysel su kaynakları yerine derin su kaynağının kullanılmasını sağlamıştır.

Afyonkarahisar HSM tarafından 7 Mayıs 2014 tarihinde Sandıklı ilçesi Akharım Beldesinden, beldedeki aile sağlığı merkezine, il merkezi ve ilçedeki muhtelif hastanelere karın ağrısı, bulantı, kusma ve ishal şikâyetleri ile başvuranların sayısında artış olduğu bildirilmiştir. Beldeden 7-9 Mayıs tarihleri arasında 395 kişinin sağlık kuruluşlarına başvurduğu, atak hızının %14,3 olduğu tespit edilmiştir.

Salgının nedeninin; kanalizasyon ve yağmur suyu sızıntıları ile kirlenmiş şebeke suyu olduğu hipotezini test etmek amacıyla bir vaka-kontrol araştırması yapılmıştır. Beldeden, 5-12 Mayıs 2014 tarihleri arasında sağlık kuruluşlarına başvuran ve belirlenen ICD 10 tanı kodları (A09, R11, K52)

ile kayıtları yapılanlar “şüpheli vaka” olarak tanımlanmış ve bu vaka tanımına uyan 395 şüpheli vaka tespit edilmiştir. “İshal veya kusması olan şüpheli vakalar” olası vaka olarak kabul edilmiştir.

Örnek büyüklüğü; %95 güven aralığı (GA), %80 güç, %20 cevapsızlık hızı öngörülerek 300 vaka ve 300 kontrol olarak hesaplanmıştır. Şüpheli vakalar arasından basit rastgele örnekleme yöntem ile 300 kişi seçilmiş, kontroller vakaların oturduğu evin sağ tarafında yer alan evde oturan ve 5-12 Mayıs 2014 tarihleri arasında şikâyeti olmayan kişiler arasından seçilmiştir. Anket için Sandıklı TSM’ de görevli sağlık çalışanlarından 10 kişilik bir gruba anket uygulama eğitimi verilmiştir. Salgın incelemesinin ivedilik gerektiren bir süreç olması nedeniyle ayrıca etik kurul onayı alınmamıştır. Ancak çalışmaya katılanlara inceleme ve salgın hakkında bilgi verilerek sözlü onamları alınmıştır. Veriler; bu salgına özgün olarak geliştirilen ve sosyodemografik özellikler, semptomlar, hastane başvurusu, semptom başlama zamanı, içme-kullanma suyu tüketimi, hijyen alışkanlıkları bilgileriyle ilgili toplam 24 sorudan oluşan anket formuyla yüz yüze toplanmıştır.

Beldede ikamet etmediği öğrenilen iki şüpheli vaka ile sağlık kuruluşuna başka nedenlerle başvurduğunu beyan eden altı şüpheli vaka çalışma dışında bırakılmıştır.

Çalışmada 292 vaka ve kontrolü değerlendirmeye alınmış ve analizler olası vaka tanımına uyan 246 vaka ve kontrolleri üzerinden yapılmıştır. Analizlerde yüzde dağılımları, Tahmini Rölatif Risk (TRR), lojistik regresyon yöntemi ile belirlenen ayarlanmış TRR (TRRadj) değerlendirilmiş, GA %95, hata payı %5 olarak kabul edilmiştir. Analizler EpiInfo, SPSS 15, ve OpenEpi programları kullanılarak yapılmıştır.

Gaita numunelerinin THSK Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarında kültür, Real-

time Multiplex PCR, ELISA, direkt bakı ve konsantrasyon yöntemleriyle virolojik (Rotavirüs, Adenovirüs, Norovirüs, Astrovirüs), bakteriyolojik (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, Enterohemorajik *Escherichia coli*, *Camphylobacter spp.*, *Aeromonas spp.*) ve parazitolojik (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*) açıdan incelemeleri yapılmıştır. Su numuneleri THSK Tüketici Güvenliği Laboratuvarları Daire Başkanlığı’nda Membran Filtrasyon Metodu kullanılarak mikrobiyolojik, virolojik ve kimyasal açıdan incelenmiştir.

Ayrıca vaka sayısındaki değişim, Sandıklı İlçesi Meteoroloji İstasyonu kayıtlarında yer alan, ilçenin yağış değerlerindeki değişim ile karşılaştırılmış olup beldenin 5 Mayıs’ta 7,8 mm ve 6 Mayıs’ta da 16,1 mm yağış aldığı ve Meteoroloji Genel Müdürlüğü sitesinde bu miktarların “orta şiddette yağış” olarak değerlendirildiği tespit edilmiştir.

BULGULAR

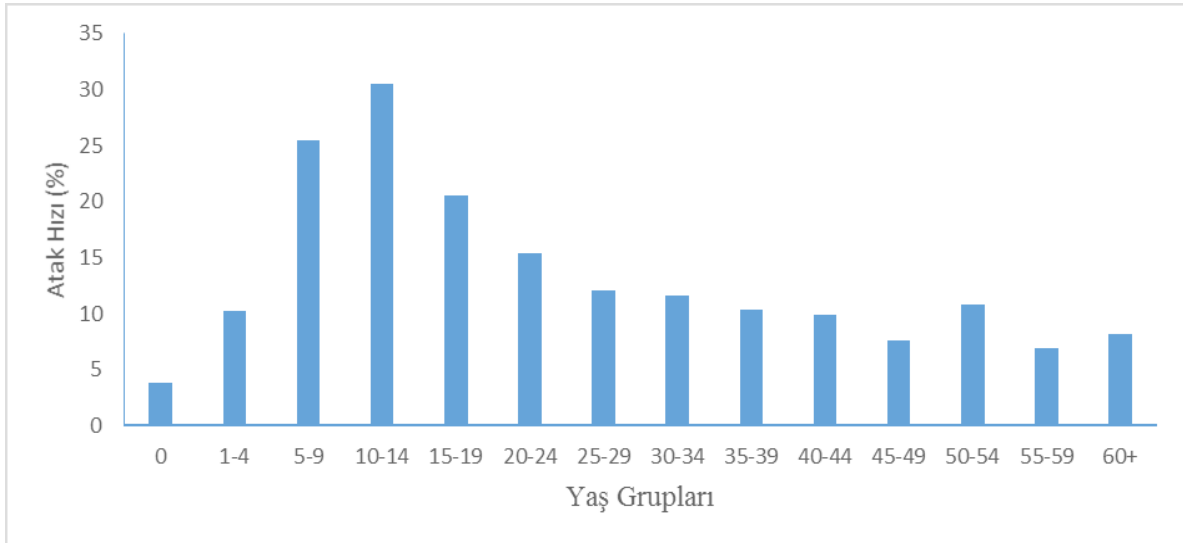
Salgından 395 kişi etkilenmiş olup genel atak hızı %14,3’tür. Dikmen Mahallesinde atak hızı en yüksektir (%17,2) (Şekil 2). Atak hızlarının mahallelerde benzer olduğu saptanmıştır. Hastalardan 16’sı yatarak tedavi görmüş olup ölümlerle sonuçlanan vaka bulunmamaktadır.

Olası vakaların %59,3 (n/N=146/246)’ü kadın %40,7 (n=100)’si erkektir. Kontrollerin ise %50,8 (n/N=125/246)’i kadın, %49,2 (n/N=121/246)’si erkektir. Vakalar ve kontroller arasındaki cinsiyet yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (OR=1,4; %95 GA=0,9-2,0).

Olası vakaların her yaş grubunda görülmele birlikte sırası ile 10-14, 5-9 ve 15-19 yaş grubunda vaka sayısının diğer yaş gruplarına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3). Yaş ortancası 19 yıldır (En az-En çok= 2 ay - 86 yıl).



Şekil 2. Şüpheli vakaların mahallere göre dağılımı, Akharım Beldesi, Mayıs 2014



Şekil 3. Olası vakaların yaş gruplarına göre atak hızı, Akharım Beldesi, Mayıs 2014

Tablo 1. Olası Vakaların Semptom Dağılımı, Akharım Beldesi, Mayıs 2014

Semptom	Sayı	Yüzde (%)
Karın Ağrısı	221	89,8
İshal	221	89,8
Bulantı	199	80,9
Kusma	173	70,3
Ateş	166	67,5
Diğer*	20	8,1

*Baş ağrısı, baş dönmesi, halsizlik ve mide ağrısı

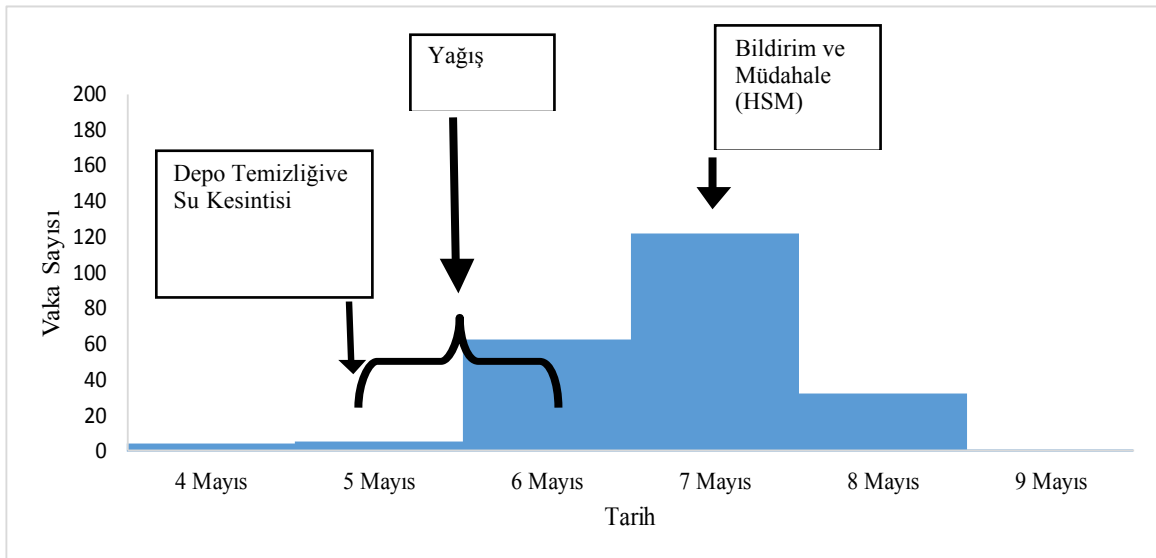
Olası vakaların %89,8 (n/N=221/246)'inde karın ağrısı, %89,8 (n/N=221/246)'inde ishal, %80,9 (n/N=199/246)'unda bulantı, %70,3 (n/N=173/246)'ünde kusma ve %67,5 (n/N=166/246)'inde ateş şikâyetleri olduğu görülmüştür (Tablo 1).

Tek kaynaklı bir salgın özelliği göstermekte olup vakalarda salgın öncesi dönemde ortak yiyecek tüketimi öyküsü bulunamamıştır.

Olası vakalarda semptomların 6 Mayıs 2014'te başladığı, 7 Mayıs 2014'te en fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4). Vaka sayılarındaki artış 7 Mayıs 2014'de başlamış, 8 Mayıs 2014'de en yüksek rakama ulaşmıştır. Bölgenin yağış durumu, depo temizliği nedeniyle uygulanan su kesintisi ile semptomların özellikleri göz önüne alındığında olası maruz kalma zamanı 5-6 Mayıs olarak düşünülmüştür.

Olası vakalarda kontrollere göre musluk suyu kullanımı TRR 113,46 kat (%95 GA: 32,90-694,03); mahalle çeşmesi suyu kullanımı TRR 0,10 kat (%95 GA: 0,04-0,25); kaynak suyu kullanımı TRR 0,10 kat (%95 GA: 0,02-0,30); damacana suyu kullanımı TRR 0,03 kat (%95 GA: 0,004-0,093) bulunmuştur (Tablo 2). Olası vaka ve kontrollerin kişisel hijyen davranışları arasında fark saptanmamıştır ($p=0,6$).

Damacana suyu referans olarak alındığında olası vakalarda musluk suyu içme TRR 91,1 kat (%95 GA: 12,4-666,4) bulunmuştur. Mahalle çeşmesi ve kaynak suyu gibi diğer suların hastalıkla ilişkisi bulunmamıştır (Tablo 3).

**Şekil 4.** Olası vakaların şikâyet başlama tarihine göre dağılımı, Akharım Beldesi, Mayıs 2014 (n=246)

Tablo 2. Olası vakaların semptom dağılımı, Akharım Beldesi, Mayıs 2014

İçme Suyu Tipi	Vaka		Kontrol		TRR (%95 GA)
	Sayı	Yüzde (%)	Sayı	Yüzde (%)	
Mustuk Suyu	236	95,9	127	51,6	113,46 (32,9-694,03)
Mahalle Çeşmesi Suyu	5	2,0	41	16,7	0,1 (0,04-0,25)
Kaynak Suyu	3	1,2	28	11,4	0,1 (0,02-0,30)
Damacana Suyu	2	0,8	58	23,5	0,03 (0,004-0,093)
Toplam	246	100,0	246	100,0	

Tablo 3. Olası vaka ve kontrollerde salgının olduğu dönemde içme suyu tüketimi, Akharım Beldesi, Mayıs 2014

İçme Suyu Tipi	Vaka		Kontrol		TRRadj	%95 GA
	Sayı	Yüzde (%)	Sayı	Yüzde (%)		
Mustuk Suyu*	236	95,9	127	51,6	91,1	12,4-666,4
Diğer Sular	9	0,4	70	28,5	6,3	0,8-51,3
Sadece Damacana Suyu**	1	0,4	49	19,9	Ref.	

* Mustuk suyu: Herhangi bir şekilde tek veya bir başka su ile birlikte mustuk suyu tüketenler

** Sadece damacana suyu: Sadece damacana suyu tüketenler

Salgın sırasında dokuz hastadan alınan ve THSK Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarlarında çalışılan gaita örneklerinden ikisinde Nörovirüs GI ve Nörovirüs GII tespit edilmiş olup incelenen diğer etkenler negatif olarak bulunmuştur (Tablo 4).

Su numunelerinin Afyon Halk Sağlığı Laboratuvarı ve THSK Laboratuvarlarında yapılan incelemeleri sonucunda; içme ve kullanma suyu olarak yüzeysel su kaynaklarından alınan tüm örneklerin (n/N=4/4) bulanıklık, koliform bakteri ve *E. coli* yönünden ilgili yönetmeliğe uygun olmadıkları; yüzeysel su kaynaklarından şebekeye su sağlandığı dönemde su deposu ve şebekeden alınan örneklerde de yine aynı parametreler açısından, %85 (n/N=6/7) uygunsuzluk olduğu belirlenmiştir. Salgın incelemesi sırasında yüzeysel su kullanımının önlenmesi için yer altı

suyu kullanımı önerilmiştir. Bu önerilerden sonra yüzeysel su kullanımı durdurulmuştur. Derin su kaynağı ve bu kaynaktan şebekeye su sağlandığı bu dönemde su deposu ve şebekeden alınan örneklerin tamamının (n/N=7/7) ise bulanıklık, koliform bakteri ve *E. coli* yönünden ilgili yönetmeliğe uygun oldukları tespit edilmiştir (Tablo 5). Ayrıca THSK Tüketici Güvenliği Laboratuvarında, yüzeysel su kaynaklarından alınan örnekler çok kirli olduğu için filtre edilememiş olup virolojik etkenler yönünden analizleri gerçekleştirilememiştir.

TARTIŞMA

Afyonkarahisar HSM tarafından 7 Mayıs 2014 tarihinde Sandıklı ilçesi Akharım Beldesinden, il merkezi ve ilçedeki muhtelif hastanelere karın ağrısı, bulantı, kusma ve ishal şikâyetleri ile başvuranların sayısında artış olduğu bildirilmiştir.

Tablo 4. Klinik örneklerin analiz sonuçları, Akharım Beldesi, Mayıs 2014

Klinik örnek türü	İncelenen örnek sayısı	Tespit edilen Virolojik etken		Tespit edilen Bakteriyolojik etken		Tespit edilen Parazitolojik etken	
		Örnek Sayısı	Sonuç	Örnek Sayısı	Sonuç	Örnek Sayısı	Sonuç
Gaita	9	2	Norovirüs GI ve Norovirüs GII	9	Negatif	9	Negatif

Tablo 5. Şebeke suyuna ait numunelerin inceleme sonuçları, Akharım Beldesi, 8-15 Mayıs 2014

Numune Yeri	Uygun (Sayı)	Uygun Değil*** (Sayı)	Uygunsuzluk Yüzdesi(%)
Yüzeysel Su Kaynakları	0	4	100,0
Derin Su Kaynağı	3	-	-
Su Deposu ve Şebeke*	1	6	85,7
Su Deposu ve Şebeke**	7	-	-
Mahalle Çeşmeleri	7	6	46,2

*Yüzeysel su kaynaklarından şebekeye su sağlandığı dönem

**Derin su kaynağından şebekeye su sağlandığı dönem

***Bulanıklık, Koliform bakteri ve *E. coli* yönünden ilgili yönetmeliğe uygun değildir

Beldeden 7-9 Mayıs tarihleri arasında 395 kişinin sağlık kuruluşlarına başvurduğu, atak hızının yüzde 14,3 olduğu tespit edilmiştir. Akut Barsak Enfeksiyonları Sürveyansı kapsamında, 1 Ocak - 5 Mayıs 2014 tarihleri arasında belirgin vaka artışı bulunmadığı belirlenmiştir.

Salgın incelemesi, Afyonkarahisar ili, Sandıklı İlçesine bağlı Akharım beldesinde görülen akut gastroenterit salgınının kaynağını ve etkeni belirlemek amacıyla yapılmıştır. Değerlendirmeler, 05-12 Mayıs 2014 tarihleri arasında sağlık kuruluşlarına yapılan başvurular üzerinden gerçekleştirilmiştir. Salgın ortaya çıkmasında şebeke sistemine su sağlayan yüzeysel kaynağın

kontamine olması ve su borularında bulunan çatlaklardan negatif basınçla yağmur sularının şebeke suyuna karışması etkili olmuştur.

Yaptığımız çalışmalardan elde ettiğimiz veriler salgının; musluk suyu kaynaklı bir nörovirüs salgını olabileceğini göstermiştir.

Yurtdışında ve ülkemizde yapılan araştırmalarda; viral gastroenterit salgınlarına neden olan etkenlerin başında genellikle rotavirüs, astrovirüs, adenovirüs ve insan calicivirüslerinin (Norovirüs ve Sapovirüs) geldiği (3,4) ve norovirüslerin de akut gastroenteritlerin en sık karşılaşılan nedenlerinden biri olduğu bildirilmiştir (5). Norovirüs, dünya genelindeki tüm akut gastroenterit salgınlarının

%60-80'inin nedeni olarak kabul edilmektedir (6,7). Ülkemizde 2008 yılında, bakteriyel olmayan gastroenteritler sürveyans sistemine dahil edildiği için daha önceki yıllarda viral etkenli akut gastroenterit salgınlarının bildirimi yapılmamıştır (4). Albayrak ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 2009 yılındaki akut gastroenteritlerin en sık saptanan viral etkeni olarak norovirüs (GI=%18 ve GII=%57) tespit edilmiştir (8).

Vakaların beldenin tamamına dağılımı olması, kümelenme olmaması ve mahalle atak hızlarının birbirine benzer olması salgının ortak bir kaynağa maruz kalma nedeniyle ortaya çıktığını düşündürmüştür. Yapılan incelemelerde o tarihlerde beldede ortak yemek düzenlenmediği tespit edilmiştir. Salgın eğrisi bize salgının tek kaynaklı olduğunu düşündürmüştür. Norovirüsler için ortalama inkubasyon süresi 33 saattir (en az=12 saat, en çok=48 saat) (9). Bu salgında da olası maruziyet tarihinden yaklaşık 12 saat sonra vakalar artmaya başlamıştır. Salgından önceki tarihlerde görülen dört vakanın salgına dahil olmadığı, havaların yağışlı geçmesine ve su sistemindeki olumsuzluklara bağlı olarak ortaya çıkan gastroenterit vakaları olduğu düşünülmektedir.

Yapılan diğer çalışmalarda da nörovirüs enfeksiyonlarının 1-3 gün sürdüğü bildirilmektedir (10). Belde aile sağlığı merkezinde görevli aile hekimleri ve hastaların başvurduğu hastanelerde hastaları muayene ederek tanı koyan hekimlerle yapılan görüşmeler hastaneye başvuran hastaların 2-3 gün içinde kendiliğinden iyileştiklerini göstermektedir.

Norovirüs enfeksiyonlarında görülen en önemli klinik belirtiler kusma ve ishaldir (10). Bizim çalışmamızda da en sık görülen semptomlar sırasıyla; karın ağrısı (%89,8), ishal (%89,8), bulantı (%80,9) ve kusma (%70,3) olarak bulunmuştur. Hastalardan alınan gaita örneklerinde bakteriyel etken tespit edilememiştir. ABD Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi (CDC) tarafından

önerilen Kaplan Kriterlerine (12-60 saatlik bir hastalık süresi, 24-48 saatlik kuluçka dönemi, vakaların %50'den fazlasında kusma görülmesi ve hiçbir bakteriyel etken bulunamaması) uyumu nedeniyle de salgına norovirüsün neden olduğu düşünülmektedir (11). İnkübasyon süresi, hastalığın semptomları ve bakteriyel etken saptanmaması, hastalığın süresi bu kriterleri desteklemektedir.

Enfeksiyon her yaş grubunda görülmekle birlikte genellikle çocuklar ve gençler daha çok etkilenmektedir (4). Bu incelemede de gençlerde ve geç çocukluk dönemlerinde hastalığın atak hızı daha fazla bulunmuştur.

Araştırmamızda kadınlarda atak hızının daha fazla olduğu dikkat çekmektedir. Her ne kadar cinsiyetin hastalık üzerine etkisi olduğu saptanmamıştır. Belde halkı ile yapılan görüşmelerde tarımla uğraşan erkeklerin sabah erken saatlerde su kesintisi bitmeden tarlaya gittikleri ve burada kaynak suyu içtikleri, diğerlerinin de kahvehanede çay, kahve vb. ürünler şeklinde kaynamış su içtikleri öğrenilmiştir. Altay ve arkadaşlarının daha önceki yapmış olduğu çalışmalarda da cinsiyetin hastalık üzerine etkisi bulunamamıştır (12). Dünyada yapılmış çalışmalar da norovirüsün cinsiyetle bir ilişkisi olmadığını göstermektedir (13-15).

Bulaş fekal-oral yolla olmaktadır. CDC, 1996-2000 yılları arasında görülen 348 Norovirüs salgınında bulaşmanın %39'unun gıda, %12'sinin insandan insana, %3'ünün ise su kaynaklı olduğunu saptamıştır (7,16-19). Su kaynaklı norovirüs salgınları daha çok su şebekesi ve su tesisleri ile kuyu, havuz vb. yerlere kanalizasyon suyu karışması sonucu ortaya çıkmaktadır (11, 16,19). Türkiye'de ise bu konuda yeterli sayıda yayınlanmış çalışma bulunmamaktadır ve yayınlanan çalışmalarda, bu çalışmamızda olduğu gibi Aksaray, Trabzon ve Keçiözümlü'de yaşanan norovirüs salgınlarında da kaynak içme suyu olarak tespit edilmiştir (3,21,22).

Bu salgında da yüzeysel su kaynağından, şebeke sisteminden ve su deposundan alınan örneklerin mikrobiyolojik incelemelerinde *E. coli* ve koliform bakteri üremesi tespit edilmesi içme suyuna kanalizasyon karıştığını göstermektedir. Yine salgından önce su kesintisi uygulanması ve şiddetli yağışların görülmesi borularda oluşan negatif basınç nedeniyle su borularındaki çatlaklardan sel sularının içme suyuna karışmış olabileceğini düşündürmektedir.

Sandıklı TSM tarafından salgından önceki dönemlerde izleme noktalarından rutin olarak alınan su örnekleri mevzuata uygun olmayıp *E. Coli* ve koliform bakteri üremeleri tespit edilmiş, bakiye klor düzeyi sıfır olarak ölçülmüştür. Su deposunda otomatik klorlama cihazı bulunmamaktadır ve sular klorlanmadan şebekeye verilmektedir. Yapılan çalışmalarda norovirüs salgınlarının önlenmesi için su kaynaklarının kontamine olduğu durumlarda yüksek klor konsantrasyonları (>10mg/l) 30 dakika veya daha uzun süre uygulanmasının yararlı olabileceği bildirilmiştir (22, 23). Yine kontamine yiyecekler, sular, kusma materyali ile kontamine olmuş çevresel yüzeylerle bulaşın (16, 17, 24, 25) önlenmesi için de klor (≥ 10 mg/L ile tamamen) ya da %70 alkol (kısmen inaktive olmaktadır ve dezenfektanlara enterovirüslerden daha dirençlidirler) uygulamanın yeterli olduğu (26, 27) yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur.

Çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Acil servis ve poliklinik hekimleri akut gastroenterit semptomlarıyla başvuranlardan gaita örneği almadığından numune sayısı azdır. Ülkemizde suda norovirüs etkeninin saptanmasına yönelik testler halen geliştirilme aşamasındadır ve THSK referans laboratuvarlarında çalışılmaktadır. Standart bir yöntem ihtiyacı bulunmakta, ayrıca etkenin suda

tespit edilmesi için 100 litre gibi çok miktarda su örneği alınması gerekmektedir. Tüm bu nedenlerle çalışmada suda etken araştırması yapıldığı halde norovirüs bulunamamıştır.

Çalışmada genel hijyen alışkanlıkları da sorulmuştur çünkü norovirüs salgınlarında kişiden kişiye bulaş da önemli bir rol oynamaktadır (28, 18). Çalışmaya katılanların hijyen tutumları ile ilgili sorulardan alınan cevaplar, genellikle iyi yönde bir hijyen tutumunu göstermektedir. Ancak kişilerin gerçek hijyen davranışlarını ölçmek gözlem altında yapılan çalışmalarla mümkündür. Bizim çalışmamızın tasarımı gerçek hijyen davranışını saptamak üzere planlanmamıştır.

Sonuç olarak; salgının nedeni güvenli olmayan kaynaktan sağlanan ve mevzuat açısından gerekli şartları taşımayan depo ve boru sistemleri ile klorlanmadan kullanıma sunulan belde şebeke suyudur. Salgının görüldüğü dönemde depo temizliği nedeniyle on saat süreyle su kesintisi uygulanması ve yoğun yağışlar da salgının ortaya çıkmasında yardımcı olmuştur.

Salgının kontrol altına alınması amacıyla ilk olarak otomatik klor cihazı temin edilerek sular klorlanmıştır. Yüzeysel su kaynağı yerine derin su kaynağından gelen suyun şebeke sistemine verilmesi sağlanmıştır. Belde halkının, özellikle yağışlı dönemlerde ve su kesintilerinden sonra, suyu kaynatarak kullanmaları konusunda farkındalığını artırmak için eğitim çalışmaları yapılmıştır. Benzer salgınların yaşanmaması amacıyla da derin su kaynağı kullanımının sürdürülebilir olması, su şebeke sistemi ve deposundaki tespit edilen eksikliklerin giderilmesi ve suyun klorlandıktan sonra kullanıma sunulması yönünde önerilerde bulunulmuştur. Bu önerilerin yapılmasına yönelik çalışmalar da halen izlenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gürbüz F, Tezer H, Şaylı TR. Akut gastroenterit nedeniyle hastaneye yatan hastalarda etkenler ve klinik bulgular: Epidemiyolojik çalışma. *Türkiye Çocuk Hast Derg*, 2010; 4 (4): 211-18.
2. Yazıcı V, Gültekin B, Aydın N, Aral YZ, Aydoğdu A, Karaoğlu AÖ. Akut gastroenteritli olguların dışkı örneklerinde bazı bakteri ve virüslerin araştırılması. *ANKEM Derg*, 2009; 23 (2): 59-65.
3. Uyar Y, Çarhan A, Özkaya E, Ertek M. Türkiye’de 2008 yılında ortaya çıkan ilk Nörovirüs salgınının laboratuvar sonuçlarının değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 2008; 42: 607-15.
4. Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Noroviruses: Agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disast Manag Resp*, 2004; 2 (1): 4-9.
5. Lopman BA, Adak GK, Reacher M, Brown DWG. A summertime peak of “winter vomiting disease”: Surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health*, 2003; 3: 13. doi:10.1186/1471-2458-3-13.
6. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, et al. epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*, 2002; 186: 1-7.
7. Lopman BA, Reacher MH, van Duynhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis*, 2003; 9: 90-6.
8. Albayrak N, Yağcı-Çağlayık D, Altaş AB, Korukluoğlu G, Ertek M. 2009 yılı akut viral gastroenterit verilerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2011; 68 (1): 9-15.
9. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*, 2003; 9: 247-62.
10. Xue C, Fu Y, Zhu W, Fei Y, Zhu L, Zhang H, et al. An outbreak of acute norovirus gastroenteritis in a boarding school in Shanghai: a retrospective cohort study. *BMC Public Health*, 2014; 14: 1092. doi: 10.1186/1471-2458-14-1092.
11. National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Viral Diseases (Page last reviewed: July 26, 2013, Page last updated: April 12, 2012). <http://www.cdc.gov/ncird>
12. Altay A, Bozdayı G, Meral M, Dallar BY, Dalgıç B, Özkan S, et al. Gastroenterit nedeniyle Ankara’da iki farklı hastaneye başvuran 0-5 yaş arası çocuklarda norovirüs enfeksiyonu sıklığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2013; 47 (1): 98-108.
13. Hoebe CJPA, Vennema H, Husman AMR, Van Duynhoven YTHP. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *JID*, 2004;189:699.
14. Prato R, Lopalco PL, Chironna M, Barbuti G, Germinario C, Quarto M. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy. *BMC Infect Dis*, 2004; 4: 37. doi:10.1186/1471-2334-4-37.
15. Nordgren J, Nitiema LW, Ouermi D, Simpore J, Svensson L. Host genetic factors affect susceptibility to norovirus infections in Burkina Faso. Kapoor A, ed. *PLoS One*, 2013; 8 (7): e69557. doi:10.1371.
16. Wu HM, Fornek M, Schwab KJ, Chapin AR, Gibson K, Schwab E, et al. A Norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2005;26 (10): 802-10.
17. Kireççi E, Özer A. Norovirüsler, salgınları ve mücadele. *Van Tıp Derg*, 2011; 18 (1): 49-56.
18. Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. Evidence for Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect*, 2000; 124: 481-7.
19. Todd EC, Greig JD, Bartleson CA, Michaels BS. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 3. Factors contributing to outbreaks and description of outbreak categories. *J Food Prot*, 2007; 70: 2199-217.
20. Çan G, Yavuzylmaz A, Çınarka H, Dereli M. Trabzon İli Sürmene İlçesi Nörovirüs Salgını İncelemesi-Temmuz 2010. *Selçuk Tıp Derg*, 2013; 29 (3): 127-30.
21. Sözen H, Gönen İ, Beydilli H. An outbreak of norovirus gastroenteritis in a county in Turkey. *JMID*, 2014; 4 (1): 26-9. doi: 10.5799/ahinj.02.2014.01.0119.
22. Öztürk R. Nörovirüs Enfeksiyonları. www.ekmud.org.tr (son erişim 29.10.2014).

23. Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect*, 2004; 58: 42-9.
24. Koo HL, Ajami N, Atmar RL, Dupont HL. Noroviruses: the principal cause of foodborne disease worldwide. *Discov Med*, 2010; 10 (50): 61-70.
25. Clarke IN, Lambden PR, Caul EO. Human enteric RNA viruses: Caliciviruses and astroviruses. In: Collier L, Ballows A, Sussman M, eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th edn, London: Edward Arnold, 1998: 511-35.
26. Jones PW. Norovirus and sapovirus. In: Percival S, Chalmers R, Embrey M, Hunter P, Sellwood J, eds. *Microbiology of Waterborne Diseases*. California; Elsevier Academic Pres, 2004: 433-41.
27. Parashar UD, Quiroz ES, Mounts AW, Monroe SS, Fankhauser RL, Ando T, et al. Norwalk-like viruses: Public health consequences and outbreak management. *MMWR*, 2001; 50: 1-1.
28. Centers for Disease Control and Prevention. "Norwalk-like viruses": public health consequences and outbreak management. *MMWR* 2001; 50 (No. RR): 1-17.

Afyonkarahisar ili Dinar ilçesinde 2015 yılı Ocak ayında görülen tularemi vakaları

Tularemia cases in Dinar district, Afyonkarahisar province, January 2015

Ali BOZ¹, Gamze AKTUNA¹, Şenay ÖZGÜLCÜ², Berna SEZGİN¹, Fehminaz TEMEL¹, Bekir ÇELEBİ³

ÖZET

Amaç: Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı'na 26 Ocak 2015 tarihinde Afyonkarahisar ili Dinar ilçesinde tularemi vakalarının olduğu bildirilmiştir. Salgın, olayın boyutunun saptanması, bulaş kaynağının tespiti, koruma-kontrol önlemlerinin alınması ve ileride oluşabilecek salgınlara önlenmesi amacıyla incelenmiştir.

Yöntemler: 17 Şubat 2015 tarihinde ilçede bir saha araştırması başlatılmış ve 15 Mart 2015 tarihine kadar pozitif çıkan her vaka araştırmaya dâhil edilmiştir. Vaka kontrol çalışması için vaka tanımı ve kontrol seçim kriterleri geliştirilmiştir. Vakalar "10 Aralık 2014-15 Şubat 2015 tarihleri arasında Dinar ilçesinde bulunan ve laboratuvar analizlerinde Francisella tularensis mikroaglutinasyon testi pozitif saptanan kişiler" olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ise "belirtilen tarihler arasında ilçede bulunan; tularemi yönünden herhangi bir şikâyeti bulunmayan kişiler"den oluşmuştur. Bir vakaya karşılık kontrol grubundan 4 kişi yer almıştır. Bu çalışmada vaka tanımına ve kontrol seçim kriterlerine uyan toplam 29 vaka ve 116 kontrol bulunmuştur. Analizlerde yüzde dağılımları, atak hızı, t-testi, ki-kare testi, olası risk faktörlerini değerlendirmek için %95 güven aralığı (GA), tahmini rölatif risk (TRR) ve lojistik regresyon kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi

ABSTRACT

Objective: Tularemia cases in Dinar, Afyonkarahisar were reported to Early Warning Response and Field Epidemiology Department on January 26, 2015. Outbreak was investigated to determine the scope, identify the source, to implement prevention and control measures and to avoid future outbreaks.

Methods: In the district, an investigation was initiated on February 17, 2015 and all identified new positive cases were included in the study until March 15, 2015. Case definition and control selection criteria were developed for the case-control study. Case was "a resident in Dinar, who was detected positive with microagglutination test for Francisella tularensis between the dates of 10 December 2014 and 15 February 2015. Controls were selected from residents who don't have any complaints regarding tularemia and are in that district between specified dates. Four controls were selected for each case. A total of 29 cases and 116 controls were found, all of which confirmed to the case definition and control selection criteria. In order to evaluate the possible risk factors in the analysis, it was used percentage distribution, attack rate, t-test, chi-squared test, 95% confidence interval (CI), Odds Ratio (OR) and logistic regression. Statistically significant level was

* Bu araştırma, I. Ulusal Su ve Sağlık Kongresinde (26-30 Ekim 2015, Antalya, Türkiye) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyolojisi D.B., Ankara

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar D.B., Ankara

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları D.B., Ankara



İletişim / Corresponding Author : Ali BOZ

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

Tel : +90 312 565 50 00-2520

E-posta / E-mail : bzali07@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 03.08.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 28.02.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.82957

Boz A, Aktuna G, Özgülcü Ş, Sezgin B, Temel F, Çelebi B. Afyonkarahisar İli Dinar İlçesinde 2015 Yılı Ocak ayında görülen tularemi vakaları. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(3): 233-244

$p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Ana su kaynakları, depolar ve kontrol izlem noktalarından su numuneleri alınması sağlanmıştır.

Bulgular: Vakaların %72,4'ü kadındır. Hastalık her yaş grubunda görülmekle birlikte vakaların %62,1'inin yetişkin yaş grubunda olduğu saptanmıştır. Vakaların yaş ortalaması $36,7 \pm 17,5$ yıldır (en küçük: 5, en büyük: 72). Vakaların yaş ortalaması, kontrol grubundakilerin yaş ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde küçüktür ($t=3,46$; $p=0,001$). Vakaların %89,7'sinde üşüme-titreme, %86,2'sinde boğaz ağrısı, %82,8'inde boyunda veya kulak çevresinde lenf bezi büyüklüğü ve 75,9'unda ateş olduğu saptanmıştır. Vaka ve kontrollerde musluk suyu kullanımı, sebze-meyve yıkamada kullanılan su, çiğ sebzeleri sirkeli suda veya çamaşır suyu eklenmiş suda bekletme, gölet, dere, ırmak suyu ile temas (yüzme, çamaşır yıkama), kemirici teması, av hayvanları teması ve kene ısırma öyküsü gibi risk faktörleri açısından değerlendirilmiştir. İncelenen bu faktörlere maruz kalma düzeyi vakalar ve kontrollerde benzer bulunmuş, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Yaş karıştırıcı bir faktör olabileceğinden oluşturulan lojistik modele, tüketilen suyun bağlı olduğu su deposu ve yaş değişkenleri konmuştur. Yaş kontrol edildiğinde, vakalarda kontrollere göre Depo 1'den su içme tahmini rölatif riski 3,6 kat (%95 GA: 1,5-8,7) bulunmuştur. Salgın için alınan su numunelerinde tularemi etkeni saptanamamıştır.

Sonuç: Epidemiyolojik veriler değerlendirildiğinde bu salgının Depo 1'den dağıtılan şebeke suyunun içilmesine bağlı bir tularemi salgını olduğu düşünülmüştür. Benzer salgınların tekrar yaşanmaması için su depolarının düzenli denetimi, bakiye klor ölçümlerinin düzenli takibi, hastalığın sık görüldüğü bölgelerde bu hastalık konusunda halkın bilgilendirilmesi ve hekimlerde farkındalığın artırılmasına yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: tularemi, zoonotik hastalıklar, su kaynaklı salgın, *Francisella tularensis*, vaka-kontrol çalışması, Türkiye

$p < 0,05$. Water samples were taken from the main water supply, and the storage tank and sampling points.

Results: Of the cases 72.4% was women. Although cases were distributed to all age groups, 62.1% of cases were in adult age groups. The mean age of cases was 36.7 ± 17.5 years (Min-Max: 5-72). The mean age of cases was significantly lower than the controls ($t=3.46$; $p=0.001$). Main symptoms of cases were detected chills (89.7%), sore throat (86.2%), swollen lymph nodes in neck (82.8%) and fever (75.9%). Cases and controls were evaluated for various risk factors such as use of tap water, water sources for washing fruits and vegetables, methods of washing raw vegetables (in water, in vinegar, in bleach), contact with lakes, streams, rivers (swimming, washing), contact with rodents, animal hunting and tick bite history. These factors were not associated with the disease. Logistic regression included age and water storage tanks providing drinking water. After controlling for age, people drinking water from Tank-1 were 3.6 times more likely to be ill (95% CI: 1.5-8.7). Tularemia agent was not detected in water samples.

Conclusion: Epidemiological data show that this tularemia outbreak was caused by drinking tap water distributed from Tank-1. To avoid similar future outbreaks; audits of water tanks, and monitoring of chlorine levels were recommended regularly. Public who lives in regions where tularemia is common should be trained for tularemia; awareness raising activities should be implemented for physicians.

Key Words: tularemia, zoonotic diseases, waterborne, outbreaks, *Francisella tularensis*, case-control studies, Turkey

GİRİŞ

Tularemi, *Francisella tularensis*'in oluşturduğu, ülsoro-glandüler, glandüler, pnömonik, tifoid, okülo-glandüler, orofarengeal formlarda seyredabilen zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır (1). Dünyada 30-71° kuzey enlemleri arasındaki bölgelerde görülmektedir. *F. tularensis*, doğada oldukça yaygındır ve memeli hayvan, kuş, artropod, balık ve sürüngenler gibi 250'den fazla hayvan türünden izole edilmiştir. Bakterinin doğal rezervuarları çoğunlukla yabani tavşan, sincap, su ve tarla faresi, kunduz, geyik ve rakun gibi kemirici hayvanlardır. İnsan ve evcil hayvanlar ise *F. tularensis*'in rastlantısal konağıdır (2-5). İnsandan insana bulaş vakaları bildirilmemiştir (6). Tularemi geçirenlerde ömür boyu bağışıklık gelişir.

Hastalığın inkübasyon süresi ortalama 3-5 gündür, bu süre 1-21 gün arasında değişebilir. Tularemi çoğunlukla ateş, üşüme-titreme, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık gibi semptomlarla akut olarak başlar. Eşlik eden boğaz ağrısı, kuru öksürük ve retrosternal ağrı grip benzeri bir tabloyu andırır. Bunun yanında; karın ağrısı, bulantı-kusma, ishal ve miyalji görülebilir. Ateş genellikle 38°C üzerindedir ve 41-42°C'ye çıkabilir. Hastaların %40'ında ateş-nabız diskordansı görülür. Bölgesel lenf bezleri hızla büyür ve bubonik bir görünüm alır. Tedavi edilmeyen vakalarda ateş günlerce (ortalama 32 gün) devam edebilir. Bu vakalarda semptomlar haftalarca hatta aylarca sürebilir ve progresif seyreden bir düşkünlük, kilo kaybı ve sebat eden lenfadenopatiler görülür (2,7). Türkiye'de insanlarda görülen tularemi hastalığı 2005 yılından bu yana C grubu Bildirimi Zorunlu Hastalıklar arasındadır (8-10).

Hastalığın doğrudan ve dolaylı bulaştığı bilinir, ancak, etken genellikle oral yolla alındığında salgınlara neden olabilmektedir. Hastalığın ülkelere ya da bölgelere göre bulaş yolları değişmektedir (11). Kuzey Amerika'da tavşan, kene sivrisinek ve hayvan leşleri ile; İskandinav ve Baltık ülkelerinde sivrisinek; Avrupa ve Asya ülkelerinde tavşan, fare,

sıçan, kontamine su; Japonya'da tavşan avı ve sincaplar; İsveç'te tarla faresi ve su; Türkiye'de su ile bulaşmaktadır (7,11,12). Mikroorganizma haftalarca ve aylarca suda, çamurda ve hayvan karkaslarında canlı kalabilir. Dezenfektanlara duyarlıdır (1). Bakterinin bulaş yolları; deri, mukoza, konjunktiva veya inhalasyon yoluyla olabileceği gibi, iyi pişmeden tüketilen gıdalar veya su aracılığı ile de olabilir. Bulaştırıcılık çok küçük dozlarla bile olabilir. Bulaş için subkutan yolla 10 bakteri, inhalasyonla ise 10-50 bakteri yeterlidir. Kolaylıkla bulaşarak epidemilere neden olabilir (6,13).

Endemik bölgelerde tularemi tanısı koymak için önce hastalığın düşünülmesi şarttır. Farklı klinik tablolarla seyretmesi nedeniyle çok sayıda enfeksiyon hastalığı ile karışabilmektedir. Endemik bölgelerde beta-laktam antibiyotik tedavisine cevap vermeyen tonsillit ve servikal lenfadenomegalili vakalarda mutlaka tularemi de düşünülmelidir. Ülkemiz için suların düzenli klorlanması ve kaynağı belli olmayan suların kaynatılmadan içilmemesi epidemileri önlemek için alınacak en önemli tedbirlerdir (1).

Son yıllarda vaka sayısının giderek artması, bölgesel olarak başlayan hastalığın zamanla diğer bölgelere yayılması ve dönem dönem epidemiler şeklinde seyretmesi gibi nedenlerle ülkemizde tularemi tekrar güncellik kazanmıştır (9).

Afyonkarahisar İli Dinar İlçesi'nde tularemi vaka sayısında artış olduğunun gözlenmesi üzerine, salgının boyutunun ve bulaş kaynağının tespiti, koruma-kontrol önlemlerinin alınması ve ileride oluşabilecek salgınlara önlenmesi amacıyla salgın incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Afyonkarahisar İli Dinar İlçesi'nde tularemi vakalarının olduğu bilgisi 26 Ocak 2015 tarihinde Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK) Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyolojisi (EUCSE) Daire Başkanlığı'na bildirilmiştir. Bu tarihten itibaren vaka bulunması

ve durum saptanması amacıyla, EUCSE, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı, Afyonkarahisar Halk Sağlığı Müdürlüğü ve Dinar Toplum Sağlığı Merkezi ile birlikte takip edilmeye başlanmıştır.

Öncelikle Afyon Halk Sağlığı Müdürlüğü (HSM) tarafından gerekli koruma ve kontrol önlemlerinin alınması sağlanmıştır. Bu kapsamda Afyon HSM, ilçedeki aile hekimlerini telefonla arayarak bilgilendirmiş ve hekimlerden tularemi vakaları konusunda duyarlı olmalarını istemiştir. Bölgede tularemi vakaları olduğu fark edilmeden önce klinisyenler tarafından hastalara genellikle tonsillit ve lenfadenit tanıları konduğu saptanmıştır. Bir ön değerlendirme yapmak amacıyla Dinar Devlet Hastanesi'nden ve bölgedeki aile hekimlerinden, salgının saptandığı yıl ve bir önceki yılın Aralık-Ocak döneminde tonsillit ve lenfadenit tanılarında birisi ile başvuran hastaların listesi istenmiştir. Ayrıca ortak maruziyetin bulunması amacıyla, bir vaka bilgi formu tasarlanmış ve tularemi şüphesiyle numune alınan tüm hastalardan bu form ile bilgi toplanmıştır. Şubat ayının ortalarına doğru bölgede vaka sayısında artış görülmüş, bunun üzerine salgın boyutunun ve bulaş kaynağının tespiti için yerinde epidemiyolojik çalışma

yapılmasına karar verilmiştir. 17 Şubat 2015 tarihinde ilçede bir saha araştırması başlatılmış ve 15 Mart 2015 tarihine kadar pozitif çıkan her vaka araştırmaya dâhil edilmiştir.

Vaka kontrol çalışması için vaka tanımı ve kontrol seçim kriterleri geliştirilmiştir. Anketler, yüz yüze görüşme yöntemiyle vaka ve kontrollere uygulanmıştır. Anket formunda sosyodemografik özellikler, hastalık ve kliniğine ilişkin özellikler ve olası risk faktörlerine yönelik sorular bulunmaktadır.

Salgın incelemelerinde aynı mahalleden ya da komşudan kontrol seçildiğinde genellikle karşılaşılan sorun şebeke suyu kullanımı ve risk faktörlerinin benzer düzeyde bulunmasıdır. Bu benzerlik, analiz yaparken örnek büyüklüğünü artırmayı zorunlu hale getirmektedir. Bu salgında vaka sayısı az olduğundan vakanın iki kontrolü aynı mahalleden, iki kontrolü de o an vaka çıkmamış uzak mahalleden seçilmiştir (Şekil 1).

Çalışmada vaka tanımı "10 Aralık 2014-15 Şubat 2015 tarihleri arasında Dinar ilçesinde bulunan ve laboratuvar sonucu mikroaglütinasyon testi ile *Francisella tularensis* antikorları pozitif saptanan kişiler" olarak belirlenmiştir.



Şekil 1. Epidemiyolojik çalışma tasarımı

Kontroller ise “belirtilen tarihler arasında ilçede bulunan; yüksek ateş, boğaz ağrısı, lenf bezi büyümesi (beze) şikâyetlerinden herhangi biri bulunmayan kişiler”den seçilmiştir.

Yakın kontroller, vakalar ile görüşme yapıldıktan hemen sonra kontrol seçim yönergesine uygun olarak en yakın komşularından seçilmiştir.

Uzak kontroller ise vaka bulunmayan mahallelerden, rastgele gidilen bir hanede, kontrol seçimi yönergesinde yer alan kriterlere uygun olan kişilerden seçilmiştir. Vaka tanımı ve kontrol seçim kriterlerine uyan toplam 29 vaka ve 116 kontrol bulunmuştur.

Çalışmada vakalarla yakın kontroller, vakalarla uzak kontroller ve vakalarla tüm kontroller karşılaştırılmak suretiyle üç ayrı analiz yapılmıştır. Analizlerde yüzde dağılımları, atak hızı, olası risk faktörlerini değerlendirmek için %95 güven aralığı (GA), tahmini rölatif risk (TRR), gruplar arası farkın karşılaştırılmasında ki-kare ve ortalamalar arası farkın karşılaştırılmasında t-testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Ayrıca karıştırıcı faktörlerin kontrolü amacıyla lojistik regresyon yapılmıştır.

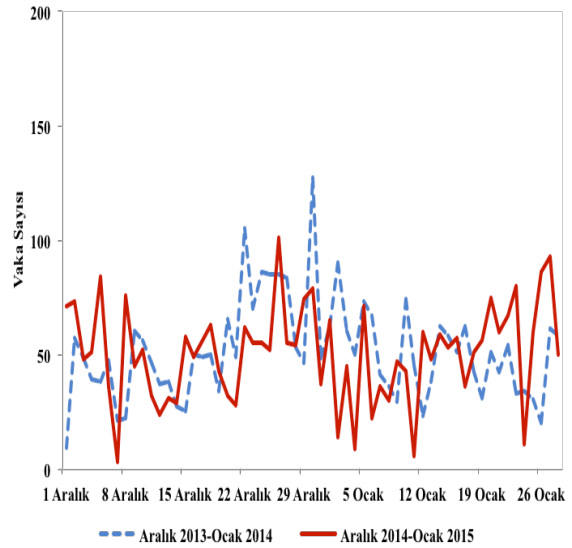
Çevre incelemeleri için su kaynakları, su depoları ziyaret edilmiştir. Ana su kaynakları, depolar ve kontrol izlem noktalarından toplam 12 adet su numunesi alınması sağlanmıştır.

Su örneklerinde tularemi tanısı için kültür metodu, mikrobiyolojik inceleme için Membran Filtrasyon Metodu TS EN ISO (9308-1 ve 7899-2) uygulanmıştır. Ayrıca tularemi şüphesi ile başvuran hastalardan klinik örnekler alınmıştır. Bu örnekler, THSK Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı’nda incelenmiştir. Serum örneklerinde *Francisella tularensis* antikor varlığını belirlemek amaçlı mikroaglutinasyon testi kullanılmış; klinik tablo ile uyumlu 1/160 titre ve üzeri sonuç veya konvelasan serumda en az dört kat titre artışı pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Bu salgın incelemesinde Afyonkarahisar ili Dinar İlçesinde görülen tularemi vakaları ve vaka sayısındaki artış iki ay boyunca izlenmiş ve gerekli kontrol önlemleri alınmıştır.

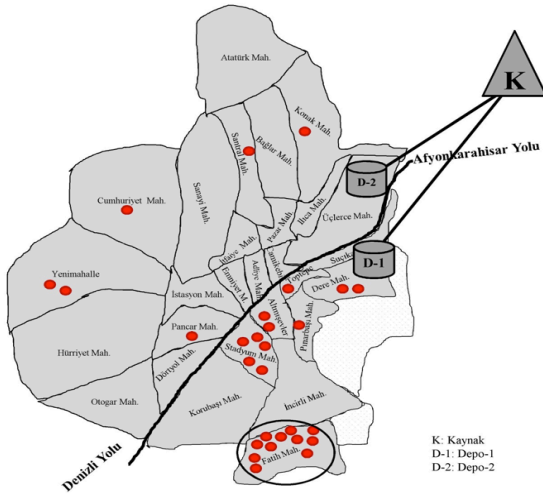
Çalışmada tularemi vakalarının sağlık kurumlarına genellikle tonsillit ve lenfadenit tanılarını ile başvurusu nedeniyle, vaka bulmak için bu tanılarla sağlık kurumlarına başvuran kişilere ait verilerin incelenmesi amaçlanmıştır. Aile Sağlığı Merkezlerinden veri alınamaması nedeniyle yalnızca Dinar Devlet Hastanesi kayıtları değerlendirilmiştir. Bu tanılarda bir önceki yıla göre artış olup olmadığını anlayabilmek için önceki yıl aynı dönemde aynı tanılarla alan kişi sayıları karşılaştırılmıştır. Aralık 2014 - Ocak 2015 döneminde, bir önceki yıl aynı döneme göre hastaneye bu tanılarla başvuru sayılarında önemli bir artış olmadığı görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Tonsillit ve lenfadenit tanılarını ile Dinar Devlet Hastanesi’ne başvuran hasta sayısı, Dinar, 2015

15 Mart 2015 itibarıyla toplam vaka sayısı 29 kişidir. Vakaların ve su kaynaklarının Dinar ilçesindeki coğrafi dağılımı Şekil 3’de verilmiştir. Afyon-Denizli karayolu ilçeyi ikiye bölmektedir. Dinar İlçesi’nin nüfusunun en yoğun olduğu ve TOKİ Toplu Konutlarının bulunduğu Fatih mahallesinde vaka sayısının fazla olduğu görülmektedir.

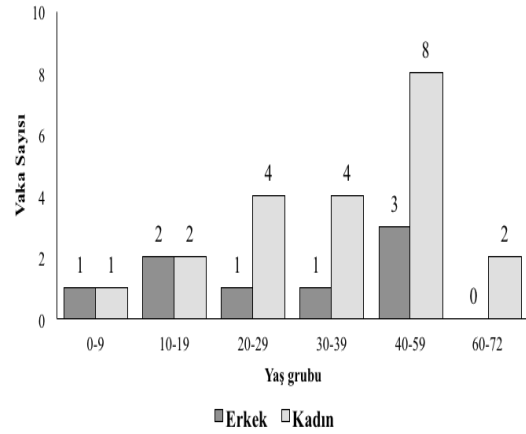
İlçeye içme suyu, 8 km uzaklıkta Pınarbaşı mevkiindeki kaynaktan sondaj ile çekilen suyun şehre yakın yüksek kesimde bulunan iki ayrı su deposunda depolanmasıyla sağlanmaktadır. Depo 1 yolun güneyinde kalan mahallelere, Depo 2 yolun kuzeyinde kalan mahallelere su dağıtmaktadır (Şekil 3).



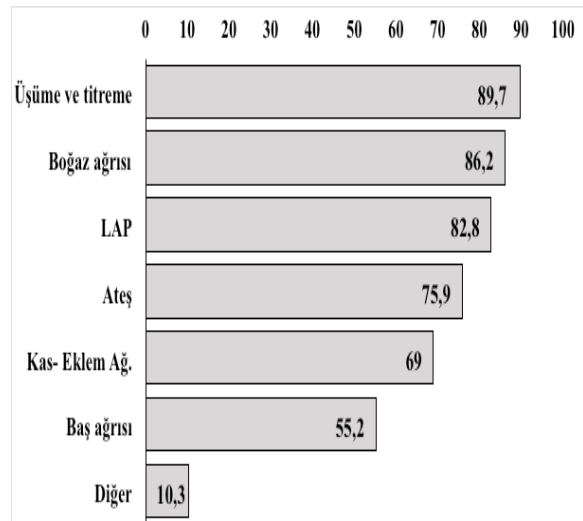
Şekil 3. Vakaların ve su kaynaklarının coğrafi dağılımı (Dinar, 15 Mart 2015)

Vakaların her yaş grubunda görülmele birlikte yetişkin yaş grubunda daha fazla olduğu saptanmıştır. Kadın vakaların erkek vakalara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4).

Vakaların çoğunda grip benzeri belirtilerin (ateş, baş ağrısı, kas ağrısı) olduğu görülmüştür. Vakaların %86,2’sinde boğaz ağrısı ve %82,8’inde boyunda veya kulak çevresinde lenf bezi büyüklüğü (LAP) bulunmaktadır (Şekil 5).



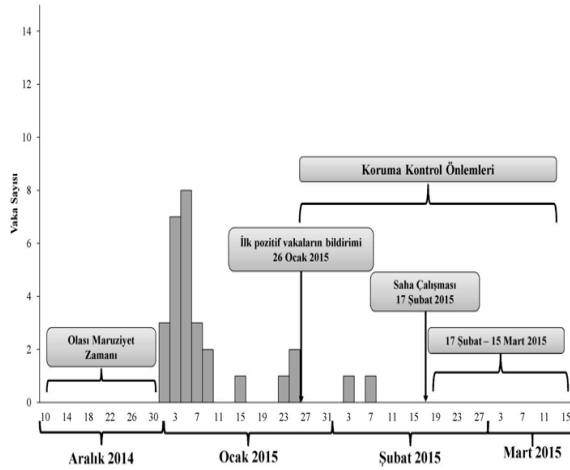
Şekil 4. Vakaların cinsiyete ve yaş grubuna göre dağılımı (Dinar, 15 Mart 2015)



Şekil 5. Vakaların Semptom Dağılımı (Dinar, 15 Mart 2015)

Tularemi hastalığının klinik özellikleri nedeniyle hastalara genellikle geç tanı konmakta ve hastaların bildirim hastalığın başlamasından yaklaşık 1-2 ay sonra yapılmaktadır. Bu salgında ilk vaka 26 Ocak 2015’te bildirilmiş ve 15 Mart 2015 tarihine kadar çıkan vakalar çalışmaya dâhil edilmiştir. Tularemi vakalarının bildirildiği 26 Ocak 2015’ten itibaren koruma ve kontrol önlemleri alınmıştır (Şekil 6).

Vaka sayısı Ocak ayının ilk haftasında pik yapmış, salgın 7 Şubat'taki son vaka ile sonlanmıştır. Salgın eğrisi olayın tek kaynaklı bir salgın olduğunu doğrular niteliktedir. Ancak salgın incelemesi yapıldığında, 26 Ocak tarihinde ilk kez bildirim yapılan olayda, ilk vakanın şikâyetlerinin 1 Ocak tarihinde başladığı saptanmıştır. Tulareminin inkübasyon süresinin 1-14 (en uzun 21 gün) olduğu değerlendirildiğinde, olası maruziyet zamanının 10-31 Aralık 2014 tarihleri arasında olabileceği düşünülmüştür (Şekil 3).



Şekil 6. Vakaların şikâyet başlangıç tarihine göre dağılımı (Dinar, Ocak-Mart 2015)

En küçük vaka beş, en büyük vaka ise 72 yaşında olup vakaların yaş ortalaması 36,7'dir. Vakalar ile kontrollerin yaş ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($t=3,46$ $p=0,001$). Vakaların yaş ortalaması, kontrollerin yaş ortalamasından küçüktür.

Çalışmaya katılan kişilerin %96,6 (140/145)'sının içme suyu olarak şebeke suyu kullandığı saptanmıştır.

Her bir risk faktörü için; vakalarla yakın kontroller, vakalarla uzak kontroller olası risk faktörlerine maruz kalma açısından değerlendirilmiştir. Tularemi enfeksiyonu için suyun kaynatılıp içilmesinin koruyucu bir önlem olması nedeniyle kişilere içme suyunu kaynatıp kaynatmadıkları da sorulmuş, hiç kimse suyu kaynatıp içmediği için suyu kaynatmanın etkisine

yönelik bir değerlendirme yapılmamıştır. Vakalara ve kontrollere kuyu suyu, kaynak/pınar/göze suyu ve mahalle çeşmesi suyu kullanımları sorulmuştur. Bu sulardan hiçbirinin kullanılmadığı öğrenilmiştir.

Yakın ve uzak kontrollerin olası risk faktörleri açısından birbirine benzer özellikte olup olmadığı değerlendirilmiştir. İki kontrol grubu incelenen özellikler açısından benzer bulunmuştur. Bu nedenle yakın ve uzak kontrollerin ayrı ayrı değerlendirilmesine gerek olmadığı düşünülmüş ve iki kontrol grubu birleştirilmiştir. Bu aşamadan sonraki analizlerde vakalar tüm kontrollerle karşılaştırılmıştır.

İncelenen tüm olası risk faktörlerine maruz kalma düzeyi vaka ve kontrollerde benzer bulunmuş, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 1).

İncelemede vakaların belirli bir su deposunun su sağladığı yerlerde fazla olduğunun görülmesi üzerine su depolarının salgında önemli bir faktör olabileceği ve kontaminasyonun bu depolar düzeyinde olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle vakalar ve kontroller tüketilen suyun bağlı olduğu su deposuna göre de karşılaştırılmıştır.

Yaş karıştırıcı bir faktör olabileceğinden oluşturulan lojistik modele tüketilen suyun bağlı olduğu su deposu ve yaş değişkenleri konulmuştur (Tablo 2).

Yaş kontrol edildiğinde, vakalarda kontrollere göre Depo-1 den su içme tahmini rölatif riski 3,6 kat (TRRadj: 3,6 (1,5-8,7)) bulunmuştur.

Saha çalışması sırasında ilçedeki su kaynağı ve su depoları ziyaret edilmiştir. Su kaynağının ve depoların içinde ve çevresinde ölü rodent ve rodent artığına rastlanmamıştır. Depoların son bakımlarının Kasım ayında yapıldığı öğrenilmiştir. Aralık ve Ocak aylarında rutin alınan su örneklerinde herhangi bir uygunsuzluk saptanmamış ve bakiye klor düzeyleri 0,2-0,3 ppm düzeyinde uygun olarak bulunmuştur. Salgın için ana su kaynakları, depolar ve kontrol izlem noktalarından alınan su numunelerinde tularemi etkeni saptanamamıştır (Tablo 3).

Tablo 1. Vaka ve tüm kontrollerde olası risk faktörlerinin değerlendirilmesi (Dinar, 15 Mart 2015)

Değişken		Vaka		Tüm Kontrol		TRR _{TK} (%95 GA)
		n	%	n	%	
Cinsiyet	Erkek	8	27,6	27	23,3	1,3 (0,5-3,2)
	Kadın	21	72,4	89	76,7	
İl/İlçeye Seyahat	Evet	9	31,0	26	22,4	1,6 (0,6-3,8)
	Hayır	20	69,0	90	77,6	
Köye Seyahat	Evet	4	13,8	15	12,9	1,1 (0,3-3,5)
	Hayır	25	86,2	101	87,1	
Toplu etkinlik katılım	Evet	0(1)*	0,0	5	4,3	0,7 (0,1-6,8)
	Hayır	29	100	111	95,7	
Doğada aktiviteye katılım	Evet	0(1)*	0,0	3	2,6	1,2 (0,1-13,0)
	Hayır	29	100,0	113	97,4	
Doğada uğraş	Evet	1	3,4	2	1,8	2,1 (0,1-23,3)
	Hayır	28	96,6	114	98,2	
Ava gitme	Evet	1	3,4	3	2,6	1,3 (0,1-13,4)
	Hayır	28	96,6	113	97,4	
Av hayvanı ile temas	Evet	1	3,4	2	1,7	2,1 (0,2-23,3)
	Hayır	28	96,6	114	98,3	
Av eti yeme	Var	0(1)*	0,0	2	1,8	1,8 (0,2-21,5)
	Yok	29	100,0	109	98,2	
Hayvan besleme / bakıcılığı	Evet	1	3,4	4	3,4	1,0 (0,1-9,3)
	Hayır	28	96,6	112	96,6	
Çevresinde kemirici artışı	Evet	1	3,4	2	1,7	2,0 (0,2-23,3)
	Hayır	28	96,6	114	98,3	
Çevresinde ölü kemirici varlığı	Evet	0(1)*	0,0	1	0,9	3,9 (0,2-65,3)
	Hayır	29	100,0	115	99,1	
Herhangi kemirici ile temas	Evet	-	-	-	-	**
	Hayır	29	100,0	116	100,0	
Kene teması	Evet	-	-	-	-	**
	Hayır	29	100,0	116	100,0	
Gölet, dere, ırmak suyu ile temas (yüzme, çamaşır yıkama)	Evet	0(1)*	0,0	1	0,9	3,8 (0,2-63,1)
	Hayır	29	100,0	111	99,1	
Musluk suyunu içme amaçlı kullanma	Evet	29	100,0	111	95,7	1,3 (0,1-11,6)
	Hayır	0(1)*	0,0	5	4,3	
Musluk suyu kaynatmama	Evet	1	3,4	0(1)	0,0	4,1 (0,3-68,3)
	Hayır	28	96,6	116	100,0	
Musluk suyuyla çiğ sebze yıkama	Evet	29	100,0	116	100,0	**
	Hayır	-	-	-	-	
Musluk suyunu genel temizlik için kullanma	Evet	-	-	-	-	**
	Hayır	29	100,0	116	100,0	
Damacana kullanımı	Evet	3	10,3	8	6,9	1,5 (0,4-6,3)
	Hayır	26	89,7	108	93,1	
Su kesintisi	Evet	1	3,4	8	6,9	0,5 (0,1-4,5)
	Hayır	25	96,6	108	93,1	
Musluktan bulanık su akması	Evet	1	3,4	1	0,9	4,2 (0,3-69,7)
	Hayır	27	96,6	114	99,1	
Evde su deposu	Evet	6	20,7	17	14,7	1,5 (0,5-4,3)
	Hayır	23	79,3	99	85,3	
Çiğ sebzeleri yemeden önce akan sudan geçirme	Evet	16	55,2	70	60,3	0,8 (0,4-1,9)
	Hayır	13	44,8	46	39,7	
Çiğ sebzeleri yemeden önce suda bekletme	Evet	10	34,5	23	19,8	2,1 (0,9-5,2)
	Hayır	19	65,5	93	80,2	
Çiğ sebzeleri yemeden önce sirkeli suda bekletme	Evet	2	6,9	12	10,3	0,6 (0,1-3,1)
	Hayır	27	93,1	104	89,7	
Çiğ sebzeleri yemeden önce çamaşır sulu suda bekletme	Evet	-	-	-	-	**
	Hayır	29	100,0	116	100,0	

* TRR hesaplamak için "1" eklenmiştir.

** Analiz edilememiştir.

Tablo 2. Vaka ve kontrollerde depolara göre şebeke suyu tüketimi (Dinar, 15 Mart 2015)

Depo Adı	Vaka		Kontrol		TRR _{adj} * (%95 GA)
	n	(%)	n	(%)	
Depo-1	20	69,0	44	37,9	3,6 (1,5-8,7)
Depo-2	9	31,0	72	62,1	

*Yaş kontrol edildiğinde

Tablo 3. Alınan Numune Türleri ve Sonuçları (15 Mart 2015)

Numune Türü	Sayısı	Sonuç
Su	12	Etken Saptanmadı
Klinik	68	29*

*Yaş kontrol edildiğinde

Salgın incelemesi tamamlandıktan sonra vaka bulmak amacıyla tularemi şüphesi ile hastanelere başvuran hastalardan 22 Mart 2015 tarihine kadar numune alınmasına devam edilmiştir. Bu tarihten sonra ilçeden tularemi şüphesiyle hastalardan numune alımı ve gönderimi sona ermiştir.

TARTIŞMA

Afyonkarahisar İli Dinar İlçesinde görülen bu salgının nedeni kontamine su kaynağı kullanımıdır. Kontamine kaynağın da Depo 1 olduğu düşünülmüştür. Salgında vakaların çoğu Depo 1'in beslediği alanlarda görülmüştür. Depo 2'nin beslediği bölgelerde de vaka saptanmasının; bu vakaların eğitim, iş gibi nedenlerle Depo 1'in beslediği bölgelerde bulunmaları olabileceği varsayılmıştır. Bu vakalar etkene burada maruz kalmış olabilirler. Ancak çalışmada buna yönelik bir değerlendirme yapılmadığı için, bu vakaların o dönemde bu bölgeye gidip gitmedikleri kesin olarak bilinmemektedir. Bu durum çalışmadaki önemli kısıtlılıklardan biridir.

Depo 1'in salgındaki su kaynağı olduğu saptanmasına rağmen kontaminasyon noktası ya da noktaları bulunamamıştır. Bunun birinci nedeni; tularemi hastalığının klinik özellikleridir. Hastalığa geç tanı konması, hastaların uzun süre farklı tedaviler alması, ilk maruz kalma döneminin genellikle tespit edilememesi uygun zamanda ve uygun yerlerden numune alınmasını engellemektedir. Yapılan çalışmada vakaların semptom başlama tarihi ile tularemi tanısı alma tarihi arasında 1-2 aylık süre vardır. Su

deposu kaynaklı bir salgında daha çok vaka çıkması beklenirken bu çalışmada iki aylık sürede sadece 29 vaka bulunmuştur. Hastalığın özellikleri, genellikle vakaların asemptomatik seyretmesi ve çalışmada aile sağlığı merkezi kayıtlarının değerlendirilememesi nedeniyle bulunan vaka sayısının beklenenden az olabileceği düşünülmüştür (9,14).

Aradan geçen zamanda tularemi etkeni olan *F. tularensis* su kaynağından uzaklaşmış olabilir. Bakterinin tespit edilebilmesi için klorlanmamış sudan örnek almak gerekmektedir. Ancak Türkiye'de görülen tularemi salgınlarının genellikle su kaynaklı olduğu bilindiğinden, bu tür salgınlarda vaka tespit edildiği anda erken müdahale amacıyla süper klorlama yapılmaktadır. Kontaminasyon kaynağının belirlenememesinin diğer bir nedeni de bu olabilir. Ayrıca uygun fiziksel şartlar olmadığından ana su kaynağından da numune alınamamıştır. Bu nedenle kontaminasyon noktasının ana su kaynağı olup olmadığı da belirlenememiştir. Yapılan çevresel incelemede de su kaynaklarının gözlenebilen noktalarında herhangi bir hasar, çatlak, kırık, sızıntı saptanamamıştır.

Su kaynaklı tularemi salgınlarında genellikle ölü hayvan ya da hayvan kalıntılarının suya karışması sonucu suyun kirlendiği bilinmektedir (15-17). Dr. Tahsin Berkin ve Dr. Talat Vasfi Özel'in 1936 ve 1937 yıllarında yaptıkları detaylı epidemiyolojik ve laboratuvar araştırmaları, tulareminin Trakya'da çoğunlukla su kaynaklı olduğuna işaret etmektedir. Askerleri garnizonun yakınında Kaynarca Deresi'nin varlığı ve hasta erlerin bu dereye yıkanması, hastalığın daha çok dere köylerinde epidemi yapması, pirinç tarlalarında çalışanlarda, dere ve ark suyu içenlerde ve bu sulara yıkananlarda tulareminin daha sık görülmesi bu görüşü desteklemiştir. Ancak sudan bakteri izole edilememiş, bakterinin doğada hangi hayvanlarda bulunduğu ve suları ne şekilde kirlettiği de gösterilememiştir. Aynı çalışmada doğadan toplanan tavşan, kene, tahtakurusu gibi hayvanlardan *F. tularensis* izole edilememiştir (18,19).

İncelediğimiz salgında da ana su kaynağı ve depoların çevresinde herhangi bir hayvan kalıntısına rastlanamamıştır.

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından yürütülen Tularemi Sürveyansının 2005-2012 yıllarına ait verilerine göre Türkiye’de, İç Anadolu (%42,1), Karadeniz (%29,4) ve Marmara (%16,9) bölgelerinde vaka sayılarının fazla olduğu saptanmıştır. 2014 yılı Tularemi sürveyans verisi incelendiğinde 65 ilden bildirilen toplam 1979 vakanın en sık İç Anadolu (%27,8), Karadeniz (%21,2) ve Marmara (%18,0) bölgelerinde olduğu tespit edilmiştir. Aynı verilere göre bildirilen vakaların sadece %3,9’u (2005- 2012 yılları arasında %5,3’ü) Ege bölgesinde bulunmaktadır (20,21). Aynı bölgede 21-25 Nisan 2014 tarihleri arasında İzmir ili Ödemiş ilçesinde 16 vakanın etkilendiği bir tularemi salgını daha görülmüştür (22). Afyonkarahisar ili Sandıklı ilçesinde 2010 yılında bir başka tularemi salgını yaşanmış ve bu salgında incelenmiştir (23).

Tularemi sürveyansı verilerine göre vakaların çoğu klinisyenler tarafından orofarengeal form tanısı almaktadır. Yapılan su analizlerinde de birçok odakta *F. tularensis* etkeninin saptanması, Türkiye’de en önemli bulaş yolunun su olduğunu desteklemektedir (2,15-17). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Programları Başkan Yardımcılığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları tarafından 2010-2013 yılları arasında Türkiye genelinde toplam 219 odaktan alınan su örneklerinden 42 (%19)’sinde *F. tularensis* saptanmıştır (20).

Tularemi her yaş grubunda görülebilir. Dünyada tüm yaş kategorilerinde insidans erkeklerde daha yüksektir (24). Türkiye’de 2005-2010 yılları arasında tanı konulan tularemi vakalarının tüm yaş gruplarında görülmekle birlikte, 30 yaşın üstündeki bireylerde ve kadınlarda erkeklere göre daha sık olduğu dikkat çekmektedir. Tularemi tüm yaş gruplarında görülmesine rağmen, çocuk yaş gruplarında tanı konulamamasına bağlı olarak daha az oranda bildirilmektedir. Ülkemizde, son yıllarda bildirilen

çocuk vaka sayısında belirgin bir artış gözlenmekte olup bildirilen tularemi vakalarının yaklaşık %10’unu çocuk vakalar oluşturmaktadır (4,9). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2014 yılı sürveyans verilerine göre vakaların %47,8’inin 30 yaş üzerinde olduğu ve hastalığın kadınlarda daha sık (%54,3) görüldüğü tespit edilmiştir (20). Bu çalışmamızda da vakaların yarısından fazlasının 30 yaş üzerinde olduğu ve vakalarda hastalanma riskinin de erkeklerde 3 kat olduğu saptanmıştır. Çalışmada ilk vakaların çıkması ile birlikte ilçedeki tüm vakalar bulunmaya çalışılmıştır. Vakaların özellikle aranması nedeniyle çocuklara da ulaşılabilmiştir. Bu nedenle literatürde çocuklara tanı konulmasının zorluğu vurgulanmasına rağmen bu vakalar arasında çocuklar da bulunmaktadır. Vakalar ile kontrollerin yaş grupları arasındaki fark da bu nedenle olabilir. Bu yaş farkı ileri analizlerde kontrol edilmeye çalışılmıştır. Literatürde tularemi hastalığı için yaşa bağlı bir fark belirtilmediğinden çalışma planlanırken yaş eşleştirilmesi yapılması düşünülmemiştir.

Kuzey Amerika ve Avrupa’da erkeklerde daha sık görülen hastalığın Türkiye’de kadınlarda daha sık görülmesi kadınların kültürel nedenlerle özellikle kırsal kesimde, daha fazla ev ortamında kalarak kontamine su ve gıda ile daha fazla temasta olmaları, yaşam alanlarında etkeni taşıyan rezervuar hayvan çıkartılarına daha fazla maruz kalmaları ile açıklanmaktadır (9,14).

Alınan su ve klinik numunelerde mikroorganizma izole edilememesine rağmen, vakalarda daha çok grip benzeri belirtilerin görülmesi, genellikle boyunda veya kulak çevresinde lenf bezi büyüklüğü bulunması, tulareminin orofarengeal formunun çok olması salgının su kaynaklı olduğunu destekleyen bulgulardır.

Tularemi’nin dünyada ve Türkiye’de daha yoğun olarak nehir ve göller etrafında görülmesi; kontamine su veya gıdanın orofarengeal tularemi’de temel geçiş yolu olması; kişiden kişiye bulaşmayan *F. tularensis*’in ortak kullanılan su yolu ile insana geçişinin gösterilmesi bu vaka kümelenmesinde

kontamine su kullanımı ile ilişkili bir orofarengal tularemi salgını olduğunu düşündürmektedir (25).

Bu salgında bazı halk sağlığı eylemleri de gerçekleştirilmiştir. İlçedeki her iki su deposunun suyu boşaltılarak temizlendikten sonra tekrar kullanıma sunulmuştur. Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından su numunesi alma periyodları sıklaştırılmış ve numune noktalarının sayısı artırılmıştır. İlçedeki Aile Hekimleri ve klinisyenler telefonla aranarak bilgilendirilmiş ve tularemi vakaları konusunda daha duyarlı olmaları

istenmiştir.

Benzer salgınların tekrar yaşanmaması için; su depolarının düzenli denetimi, bakiye klor ölçümlerinin düzenli takibi, hastalığın görüldüğü bölgelerde bu hastalığa yönelik olarak halkın bilgilendirilmesi ve hekimlerde farkındalığın artırılmasına yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Programları Başkan Yardımcılığı Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığına, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığına, Afyonkarahisar Halk Sağlığı Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar Şube Müdürlüğü ve Dinar Toplum Sağlığı Merkezi personeline çalışmadaki katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Helvacı S. Tularemi. Topçu Willke A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. Baskı, 1. Cilt, Nobel Tıp Kitapevleri, 2008: 990-5.
2. WHO Guidelines on Tularemia. <http://www.cdc.gov/tularemia/resources/whotularemiamanual.pdf> (27.11.2015).
3. Kılıç S. A General Overview of Francisella tularensis and the Epidemiology of tularemia in Turkey. FLORA 2010; 15 (2): 37-58.
4. Kılıç S. Tularemi: Etken ve Epidemioloji. Türkiye Klin Enfek Hast Özel Sayısı, 2014; 7 (2): 52-61.
5. Gürcan Ş. Tularemia in Turkey. Balkan Med J 2014; 31: 3-10.
6. Petersen JM, Schriefer ME, Araj GF. Francisella and Brucella. In: Versalovic J, eds. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington D.C.: ASM Press; 2011; 751-69.
7. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. Ann N Y Acad Sci 2007; 1105: 1-29.
8. Kılıç S, Yeşilyurt M. Tularemi: Güncel tedavi seçeneklerine güncel bir bakış. Klimik Derg, 2011; 24 (1): 2-10.
9. Tularemi Saha Rehberi. <http://www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-71840/h/tularemi-saha-rehberi.pdf> (27.11.2015).
10. Türkiye Sağlık Raporu 2014. <https://sosyolojivefelsefe.files.wordpress.com/2015/01/tc3bcrkiye-sac49flc4b1k-raporu-2014.pdf> (27.11.2015).
11. Eliasson H, Broman T, Forsman M, Bäck E. Tularemia: current epidemiology and disease management. Infect Dis Clin North Am, 2006 Jun; 20 (2): 289-311.
12. Arslanyılmaz M, Aslan D, Akın L, Aktaş D. Tularemi: Güncel değerlendirmeler. Türk Hij Den Biyol Derg, 2014; 71 (2): 99-106.
13. Gedikoğlu S. Francisella tularensis. Topçu Willke A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı, 2. Cilt, Nobel Tıp Kitapevleri, 2008: 2252-55.
14. Aktas D, Celebi B, Isik ME, Tütüs C, Oztürk H, Temel F, et al. Oropharyngeal tularemia outbreak associated with drinking contaminated tap water, Turkey, July-September 2013. Emerg Infect Dis, 2015; 21 (12): 2194-96. doi:10.3201/eid2112.142032.

15. Leblebicioglu H, Esen S, Turan D, Tanyeri Y, Karadenizli A, Ziyagil F, et al. Outbreak of tularemia: A casecontrol study and environmental investigation in Turkey. *Int J Infect Dis*, 2008; 12 (3): 265-9.
16. Kilic S, Celebi B, Acar B, Ataş M. In vitro susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* from Turkey. *Scand J Infect Dis*, 2013; 45 (5): 337-41.
17. Kılıç S, Birdsell DN, Karagöz A, Çelebi B, Bakkaloglu Z, Arikian M, et al. Diverse *Francisella tularensis* from water sources match those found in humans, Turkey. *Emerg Infect Dis*. Volume 21, Number 1-January 2015
https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/14-1087_article
18. Gotschlich E, Berkin T. The epidemiological and bacteriological investigation related to tularemia in Thrace in 1936. *Turk Hij Tec Biol Der* 1938; 1: 115-34.
19. Oz TV. Dr. Talat Vasfi Oz' investigation of tularemia in Thrace in 1937 summer. *Turk Hij Tecr Biyol Derg* 1938; 1: 1-30.
20. THSK Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Programları Başkan Yardımcılığı, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı İstatistikleri 2014 (Yayınlanmamış Rapor).
21. Kılıç S. Ülkemizde Önem Kazanan Zoonotik Hastalıkların Güncel Durumu: "Tularemia". 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi-2013, 10-13 Kasım 2013, Antalya.
22. Görpelioğlu S, Demiralp N, Çelebi B, Sezen F, Zhu B. P, Temel F. THSK İzmir İli, Ödemiş İlçesi Hamamköy'de Tularemia Salgını İnceleme Raporu, Nisan 2014 (Yayınlanmamış Rapor).
23. Demirdal T, Demirturk N, Kilic S. Tularemia outbreak in Afyonkarahisar, Turkey. (Poster presentation no: 088). The 4th Euroasia Congress of Infectious Diseases, 1-5 June 2011, Sarajevo, Bosnia & Herzegovina.
24. Eliasson H, Lindback J, Nuorti JP, Arneborn M, Giesecke J, Tegnell A. The 2000 tularemia outbreak: a case-control study. *Emerg Infect Dis*. 2002 Sep; 8 (9): 956-60.
25. Olgen K, Kilic S, Kurtcebe O, Celebi B, Torunoglu MA, Doganay M. "Effects of climate variability on tularemia outbreaks in Turkey: A preliminary study". (Poster presentation no: 019) International Symposium on *Francisella tularensis* and Tularemia, 19-23 June 2013, Urgup, Nevsehir, Turkey.

HbA2 ölçümü için BioRad D-10TM ve Tosoh HLC 723 G8 HPLC sistemlerinin karşılaştırılması

Comparison of the BioRad D-10TM and Tosoh HLC 723 G8 HPLC instruments for the detection of HbA2

Güzin AYKAL¹, Fazıla ATAKAN-ERKAL², Ayşenur YEĞİN¹, Esin EREN¹, Necat YILMAZ¹

ÖZET

Amaç: Özellikle Akdeniz bölgesinde önemli bir halk sağlığı sorunu olan hemoglobin bozuklukları taramasında hemoglobin sub tiplerini ayırt etmek amacıyla en yaygın kullanılan yöntem HPLC (High Performance Liquid Chromatography)'dir. Pek çok marka ve model HPLC sistemleri ile hemoglobinopati taraması yapılmakta ancak sistemlerin birbirleri ile uyumu bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı; D-10TM Hemoglobin testingsystem (BioRad,Hercules,USA) marka HPLC cihazı ile Tosoh HLC 723 G8 (TosohBioscience, Japan) HPLC cihazını hemoglobinopati tanı ve taraması açısından önemli olan HbA2 parametresi ölçümü bakımından karşılaştırılmasıdır.

Yöntemler: Çalışmaya Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Bölümüne 1-31 Ocak 2016 tarihleri arasında talasemi taraması için başvuran 12'si erkek, 18'i kadın toplam 30 kişi alındı. Her iki cihazda tek seferde çalışılan hemoglobin A2 (HbA2) değerlerinin farkları için bağımlı iki grup ve iki ölçüm fark testleri, istatistiksel uyum ve ilişki analizi için iki-yönlü rastgele sınıf içi korelasyon katsayısı (SKK), Cohen's kappa katsayısı, korelasyon katsayısı (r) ve Bland Altman Analizi yapıldı. Sonuçlar uygun grafiklerle sunuldu.

Bulgular: Analizler sonucunda Tosoh HLC 723 G8 cihazında örneklerin 14'ü (%46.66) ve BioRad D-10TM cihazında örneklerin dokuz'u (%30) B-talasemi taşıyıcısı olarak saptandı. Her iki cihazda

ABSTRACT

Objective: HPLC (High Performance Liquid Chromatography) is the most commonly used method to differentiate the subtypes of hemoglobin in screening for hemoglobinopathy which is a major public health care problem especially in Mediterranean region. Today, different models and trademarks of HPLC equipment have been used in screening for hemoglobinopathy. However, the agreement of the results of the analyses performed by these types of equipment are unknown. In this study, the aim was to investigate the agreement between the results of the analyses of HbA2 values with D-10TM Hemoglobin testing system (BioRad,Hercules,USA) and Tosoh HLC 723 G8 (TosohBioscience, Japan) trademark.

Methods: A total of 30 individuals, 12 males and 18 females, applied to the Antalya Training and Research Hospital laboratory between January 1 and January 31, 2016 for thalassemia screening were included to this study. Statistical correlations of hemoglobin A2 (HbA2) values, analyzed in each analyzer as a single analysis from each sample, were evaluated using two-way random intraclass correlation coefficient (ICC), Cohen's kappa coefficient, correlation coefficient (r) and Bland Altman analysis. Results are presented with graphics.

Results: As a result of the analysis, 14 of the samples (46.66%) were detected as - thalassemia carrier with Tosoh HLC 723 G8 system and nine of the samples (30%) were detected as - thalassemia carrier with BioRad D-10TM system. There was significant difference in HbA2 values measured with both systems ($z = -4.487$;

¹ Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Lab, Antalya

² Antalya Halk Sağlığı Laboratuvarı, Biyokimya Lab, Antalya



İletişim / Corresponding Author : Güzin AYKAL

Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı 07100 Antalya - Türkiye

Tel : +90 505 474 66 96

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

Geliş Tarihi / Received : 19.03.2016

Kabul Tarihi / Accepted : 26.03.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.46762

Aykal G, Atakan-Erkali F, Yeğini A, Eren E, Yılmaz N. HbA2 ölçümü için BioRad D-10TM ve Tosoh HLC 723 G8 HPLC sistemlerinin karşılaştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(3): 245-252

ölçülen HbA2 değerleri arasında anlamlı fark saptandı ($z = -4.487$; $p < 0.001$). HbA2 değerleri için sınıf içi korelasyon katsayısı 0.898, uyum katsayısı 0.783, Spearman korelasyon katsayısı 0.944, Cohen's Kappa değeri 0.658 ve Bland Altman Analizi sonucu yanlılık değeri 0.75 (Alt Limit: -0.49; Üst Limit: 1.99) olarak bulundu.

Sonuç: Korelasyon, regresyon ve diğer istatistiksel analizlere göre her iki cihaz arasındaki uyum yetersiz olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler: hemoglobinopati, HPLC, HbA2.

$p < 0.001$). For HbA2 values; intraclass correlation coefficient was 0.898, coefficient of concordance was 0.783, Spearman correlation coefficient was 0.944, Cohen's Kappa value 0.658 and Bland Altman analysis bias value was 0.75 (Lower Limit: -0.49; Upper Limit: 1.99).

Conclusion: According to the regression, correlation and other statistical analyses, agreement between the results of HbA2 values measured by the two analyzers were found to be insufficient.

Key Words: hemoglobinopathy, HPLC, HbA2.

GİRİŞ

Hemoglobinopati, hemoglobin molekülünün polipeptid zincirindeki yapısal değişiklikler veya sentez bozukluklarından kaynaklanan bir kan hastalığıdır. Hemoglobin varyantları, genetik değişikliklerin sonucu olarak talasemilerde olduğu gibi hemoglobin zincirinde sentez azlığı veya yokluğu şeklinde ya da hemoglobin S (HGS) gibi anormal hemoglobin türleri olarak izlenir. Günümüzde 700'den fazla varyant bilinmektedir (1,2). β -talasemi ya da diğer adıyla Akdeniz anemisi, dünyada ve ülkemizde en sık görülen kalıtsal kan hastalığı olup, dünya nüfusunun yaklaşık %1.5 kadarı β -talasemi taşıyıcısıdır (3,4).

Otozomal resesif geçişli olan β - talasemi, globin zincirinin az üretilmesi ya da hiç yapılmaması sonucu ortaya çıkan ve klinik tablosu oldukça değişken olan bir hastalıktır. Talasemi majör, talasemi intermedia ve talasemi taşıyıcılığı olmak üzere üç klinik formda seyreden β -talaseminin ilk iki formu tıbbi takip ve tedavi gerektirirken, talasemi taşıyıcılığında klinik ve fenotipik özellikler normal olup, ancak özel testlerle ortaya çıkartılabilmektedir (5-7). Talasemi bozukluklarının önlenmesi amacıyla genetik danışmanlık verilebilmesi için β -talasemi taşıyıcılığının doğru tanısı şarttır. Hemoglobin (HbA2)

fraksiyonundaki artışın belirlenmesi en tipik tanısal belirteç olduğundan hastalığın tanısında anahtar rol oynamaktadır (8).

Gerek talasemi gerekse diğer hemoglobinopatilerin tanısı ve taramasında hemoglobin alt tiplerinin ayrıştırılması ve değerlendirilmesi temel esastır (4). Hemoglobin anormalliklerinin laboratuvar tanısı, HbS gibi yapısal varyantları veya HbA2 gibi normal hemoglobinlerdeki anormal yükselmeleri tanımlamaya dayanmaktadır (9). Günümüzde hemoglobin alt tiplerinin ayrımı için selüloz asetat elektroforezi, kromatografik mikrokolonlar, kapiller elektroforez ve katyon değiştirici yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılan metotlar arasındadır (4). HbA2 birçok laboratuvar yöntemi ile ölçülebilmektedir ve esas olarak bu hemoglobin fraksiyonunun diğerlerinden ayrılması elektrik yüklerine göre yapılmaktadır (10). Son yirmi yıl içinde, HPLC HbA2 ölçümü için tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (4,8).

Katyon-değiştirici, HPLC sistemi, hemoglobin türlerinin oldukça hızlı ve doğru tanımlanması için otomatize edilmiştir (9). Bu yöntemde, numuneler tampon ve tuzla karıştırılmakta ve bir iyon değiştirme

kolonu üzerine enjekte edilmekte, hemoglobinler geçiş işlemi sırasında fiziksel özelliklerine (örneğin yüzey yükü, hidrofilik gruplar vb) göre ayrılmaktadırlar (2). HPLC, HbA2, hemoglobin F (HbF), hemoglobin A0 (HbA0) ve bunun yanında HbS, hemoglobin C (HbC), ve benzeri patolojik hemoglobin varyantlarını ayırmada güvenilir bir yöntemdir (4). İyi analitik performans, tam otomatize ve bu işe özel cihazların kullanım kolaylığı bu yöntemin avantajlarıdır (8). Hemoglobin alt tiplerinin ayırmak zahmetli ve zor bir süreç olduğundan hem HPLC hem de diğer metotlar eğitilmiş ve uzman personel gerektirmektedir (4).

Hemoglobinopati tarama ve tanısında genel olarak izlenen yol; hemoglobin, hematokrit ve diğer eritrosit endekslerinin tespiti, HbF ve HbA2 analizlerini de içeren hemoglobin alt tiplerinin ayrıştırılması ve sonunda kesin tanı için DNA analizini kapsamaktadır (4).

Son yıllarda tıp teknolojisi alanında yaşanan büyük gelişmeler tıp laboratuvarlarında oldukça fazla marka ve model cihazın kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Bu cihazların birbiri ile uyumunu araştırmak ise ilgili uzmanlar için bir sıkıntıdır. Bu nedenle bu çalışmada; D-10TM Hemoglobin Testing System (BioRad ,Hercules, USA) marka HPLC cihazı (Sistem 1) ile Tosoh HLC 723 G8 (Tosoh Bioscience, Japan) HPLC cihazının (Sistem 2) HbA2 parametresinin ölçümü bakımından karşılaştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Bölümüne 1-31 Ocak 2016 tarihleri arasında talasemi taraması için başvuran 12'si erkek, 18'i kadın toplam 30 kişi alındı. Bu kişilerin antekübital venlerinden EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit)'li tüplere kan örnekleri alındı. Alınan bu örnekler her iki cihazda da tek seferde, eş zamanlı çalışıldı ve sonuçlar kaydedildi.

Sistem 1 ve Sistem 2'de cihazlara spesifik iyon değiştirici HPLC kolon ve tamponları kullanıldı. Bu cihazlar çalışılan numuneye önceden herhangi bir

işlem gerektirmeyen örnek dilüsyonunu ve hemolizini otomatik yapan HPLC sistemleridir (3,9).

Genel olarak HPLC sistemleri ile hemoglobinin alt tiplerinin ayrılması

Sistem 1 ve Sistem 2 HPLC cihazlarında hemoglobinler alt fraksiyonlarına iyon değişim HPLC yöntemi ile ayırmaktadırlar. Numuneler analiz için aspire edildikten sonra hemoliz edici solüsyon ile dilüe edilmektedir. Dilüe ve hemolize olmuş numune filtreden geçerek kolona enjekte edilmektedir. Sistem 2'de tuz konsantrasyonları ve pH'ı farklı üç solüsyon (eluent 1, 2, 3) kullanılarak hemoglobinler alt fraksiyonlarına ayrılırken bu amaçla Sistem 1'de iki solüsyon (eluent 1, 2) kullanılmaktadır. Hemoglobin fraksiyonunun enjeksiyon zamanından ayrılaştığı noktaya gelene kadar geçen alıkoyma süresi retansiyon zamanı olarak bilinmektedir. Hemoglobinopati programında HbF, A0, A2 ve diğer anormal hemoglobinleri tanımlamak için belirlenen retansiyon zamanları kullanılmaktadır. Kolondan çıkan elüatlardaki hemoglobin alt tiplerini dedektörler saptamakta ve buna bağlı olarak kromatogramlar otomatik olarak sistem tarafından çizilmektedir (3).

İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler frekans, yüzde, ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleri ile sunuldu. Sayısal veriler için normal dağılım varsayımı Shapiro-Wilk testi ile yapıldı. Kadın ve erkeklerin eritrosit endeksleri ve cihaz ölçümleri normal dağılım varsayımı sağlandığı durumda İki Bağımsız Örneklem t Testi, sağlanmadığı durumda Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Taşıyıcı ve normal grupların HbA2 ölçümleri arasındaki farklarda Mann-Whitney U testi kullanıldı. Cihazlardan elde edilen bulguların normal ve taşıyıcı olma durumları arasındaki fark için McNemar testi, bu iki sonuç arasındaki uyum Kappa testi ile incelendi. İki cihazdan elde edilen ölçüm değerleri arasındaki farkın analizinde normal dağılım varsayımı sağlanmadığı

için Wilcoxon Eş Testi, ölçümler arasındaki ilişkide Spearman Korelasyon Testi kullanıldı. Ölçümler arasındaki istatistiksel uyum için sınıf içi korelasyon katsayısı (SKK) (iki-yönlü rastgele) (10) ve uyum (concordance) korelasyon katsayısı (11,12) kullanıldı. Cihazların uyumu ve yanlışlık durumunun tespiti için Youden ve Bland Altman grafiği (13) oluşturuldu. Bland Altman grafiğinde x eksenini, gerçek değer en iyi tahmin edicisi olan aynı denek üzerinden iki metot ile elde edilen ölçümlerin ortalama değerleri oluşturmaktadır. Y eksenini ise, iki metot ile aynı denek üzerinden elde edilen ölçümler arasındaki fark değerleri oluşturmaktadır. Bland Altman grafiği, ortalamalar (gerçek değer) ve farklar (hata) arasındaki olası bir korelasyonun değerlendirilmesine de imkan vermektedir. Youden grafiği tanısal testin iki cihazdaki performansını karşılaştırmaktadır.

Analizler SPSS 15.0 ve MedCalc 11.0 paket programları ile yapıldı.

BULGULAR

Çalışmaya Sistem 1 ve Sistem 2’de her cihaz için de HbA2 kesi değeri %3.5 olarak alındı. Kadın ve erkeklerin eritrosit endeksleri ve cihazlara göre HbA2 değerleri arasındaki farklar Tablo 1’de verildi. Yapılan iki grup fark testlerine göre erkeklerin Hb, Htc ve OEH düzeyleri kadınlardan anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.05$). OEHB, Sistem 2 ve Sistem 1 HPLC cihazlarından ölçülen HbA2 ölçümlerinin cinsiyete göre fark yaratmadığı tespit edildi ($p > 0.05$).

Her iki HPLC cihazında ölçülen HbA2 değerlerinin taşıyıcı ve normal gruplara göre ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 2’de verildi. %3.5 kesim noktasına göre taşıyıcı ve normal olarak belirlenen grupların ölçümleri arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($p < 0.001$).

Elde edilen numunelerin her iki cihazda da çalışması sonucunda Sistem 2 cihazında örneklerin 14 (%46.66)’ü ve Sistem 1 cihazında örneklerin dkozu (%30)’u B-talasemi taşıyıcısı olarak saptandı.

McNemar Testine göre iki cihazdan elde edilen talasemi taşıyıcılığını bulma oranları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.063$). Detaylı olarak incelenecek olursa, Sistem 2 cihazına göre taşıyıcı olarak bulunan 14 hastanın dokuzu Sistem 1 cihazına göre taşıyıcı olarak bulundu, Sistem 2 cihazına göre normal olan 16 hastanın tamamının Sistem 1’e göre de normal olduğu görüldü. Sistem 1’in taşıyıcı olarak gördüğü dokuz hastanın tamamını Sistem 2 de taşıyıcı olarak gördü, Sistem 1’in normal olarak gördüğü 21 kişinin 16’sını Sistem 2 normal kabul etti. Toplam uyum oranı %83.3 (25/30) olarak belirlendi. Yapılan Kappa uyum testine göre iki ölçüm cihazından elde edilen bulgular arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı ve önemli düzeyde yüksek bulundu ($p < 0.001$; $\kappa = 0.658$) (14).

Sistem 1 ve Sistem 2 ile ölçülen HbA2 değerlerinin uyumu ile ilgili tüm sonuçlar Tablo 3’de sunuldu. Bland-Altman, Youden ve korelasyon grafikleri Şekil 1’de verildi. Sistem 2 cihazına göre ölçülen HbA2 değeri ortalaması 3.69 ± 1.55 (Medyan:3.1 min:1.1-maks:7.1), Sistem 1 cihazına göre ölçülen HbA2 değeri ortalaması 2.94 ± 1.25 (Medyan:2.6 min:1-maks:7.5)’di. Bu iki ölçüm arasındaki fark anlamlı bulunmuş olup Sistem 2’nin HbA2 değerini daha yüksek ölçtüğü görüldü ($p < 0.001$). Spearman korelasyon testine göre ölçümler arasındaki korelasyon anlamlı bulundu ($r = 0.944$; $p < 0.001$).

İki cihazın uyumunu incelemek için yapılan sınıf içi korelasyon katsayısı (SKK) 0.898, uyum korelasyon katsayısı (UKK) ise 0.783 olarak belirlendi.

Bu sonuçlara benzer şekilde Bland-Altman grafiğinde iki cihaz ölçümlerinin ortalamaları arasında %0.75 fark olduğunu ve diğer farkların güven aralıklarında saçıldığı görüldü. Yine Bland-Altman ve Youden grafiklerine göre her iki cihaz sonuçlarının %1-3 aralıklarında uyumunun iyi olduğunu, bununla birlikte %3’den büyük değerlerde Sistem 2 cihazının Sistem 1 cihazına göre daha yüksek ölçüm yaptığını saptandı.

Tablo 1. Kadın ve erkeklerin eritrosit endeksleri ve HbA2 ölçümleri arasındaki farklar

	Kadın (n=19)					Erkek (n=11)					P
	Ort	SS	Med	Min	Max	Ort	SS	Med	Min	Max	
Hb^a											
Erkek:14-18 g/dl Kadın:12-16 g/dl	10,84	1,54	10,56	7,7	13,7	13,51	2,66	14,6	8,7	16,6	0,009 ^c
Htc^a											
Erkek:38-50 % Kadın:34-44 %	34,15	4,58	34,2	23,5	42,6	42,24	7,3	46,1	28,2	50,5	0,001 ^c
OEH^b											
78-93 um3	70,46	11,28	67,9	59	90,7	80,21	14	84,3	56,3	94,8	0,045 ^c
OEhb^b											
25-32 pg	22,27	4,26	20,2	18	29,9	25,67	5,34	27,4	17	31,2	0,093
A2(TOSOH)^b	3,73	1,57	3,1	1,5	6,3	3,64	1,57	3,1	1,1	7,1	0,863
A2(D-10)^b	2,87	0,97	2,8	1,7	4,5	3,07	1,68	2,6	1	7,5	0,914

^a İki bağımsız örneklem t Testi; ^b Mann-Whitney U Testi; ^c p<0,05

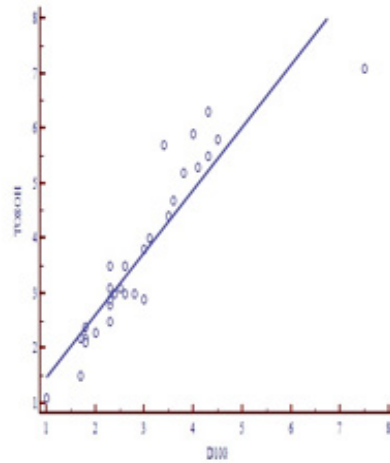
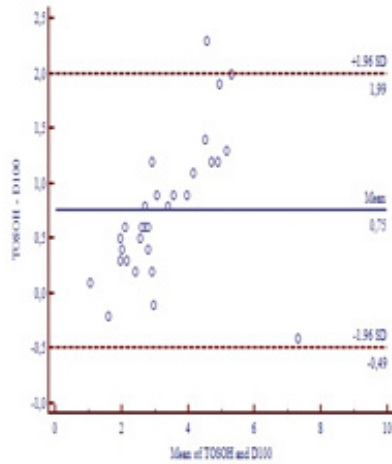
Tablo 2. Cihazlardan elde edilen HbA2 değerlerinin taşıyıcı ve normal gruplara göre farkları

	Taşıyıcı		Normal		P
	(n) Ort±std	Medyan (Min-Max)	n) Ort±std	Medyan (Min-Max)	
TOSOH- HbA2					
(%2,0-%3,5) ^a	(14) 5,1 ± 1,1	5,25 (3,5-7,1)	(16) 2,6 ± 0,5	2,65 (1,1-3,1)	<0,001 ^b
D10-HbA2					
(%2,1-%3,5) ^a	(9) 4,4 ± 0,4	4,1 (3,5-7,5)	(21) 2,3 ± 0,5	2,3 (1-3,4)	<0,001 ^b

^aReferans aralıklar; ^b p<0,05; Mann-Whitney U Testi

Tablo 3. Tosoh HLC 723 G8 - BioRad D100 cihazlarının uyumlarına ait istatistiksel göstergeler

Tosoh-D100	HbA2 (%)
Wilcoxon Eş Testi	$z = -4,487$; $p < 0,001$
Mc Nemar Testi	$p = 0,063$
Korelasyon katsayısı-Spearman's rho	$r = 0,944$; $p < 0,001$
Bias	0,75 %95 GA (0,51-0,99) Alt Limit: -0,49; Üst Limit: 1,99
Sınıfıçi korelasyon katsayısı	0,898 (%95 GA 0,798-0,950)
Uyum korelasyon katsayısı	0,783 (%95 GA 0,643-0,872)
Kappa katsayısı	0,658 (%95 GA 0,4-0,915); $p < 0,001$



Şekil 1. A) Bland-Altman grafiği

B) Youden grafiği

TARTIŞMA

Türkiye’de yaklaşık 1.300.000 talasemi taşıyıcısı ve 4.500 kadar talasemi hastası vardır (5). Ülkemizde B-talasemi taşıyıcılığı sıklığı %2.1 dolayındadır. Bu sayı farklı bölgelerde artmakta, taşıyıcılık sıklığı %13’e kadar yükselmektedir (Antalya %13, Edirne %6.4, Urfa %6.4, Aydın %5.1, Antakya %4.6, İzmir %4.8, Muğla %4.5, İstanbul %4.5) (3). Bu açıdan doğru HbA2 ölçümü bu kalıtsal hastalığın önlenmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Dünyada da nüfus hareketliliği nedeniyle HbA2 ölçüm yöntemlerine artan bir ilgi mevcuttur (8). Günümüzde kullanımı ve yorumlama kolaylığı nedeniyle hemoglobin varyantlarının tespiti için HPLC tekniğinin kullanılması tercih edilir olmuştur. Dünyada hemoglobin varyantları taranması için birkaç ticari HPLC yöntemi bulunmaktadır (2).

Fleiss, uyumun çok iyi olması için SKK’nın 0.90’ın üzerinde olması gerektiğini bildirmiştir (15). Lin ise UKK’nın 0.90-0.95 arasında bulunmasını “orta dereceli uyum” olarak değerlendirmiştir (11, 12). Buna göre iki cihaz arasında HbA2 uyumunun çok iyi olmadığı anlaşılmaktadır.

CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute)’nin metot karşılaştırma protokolüne (EP-9) göre korelasyon katsayısının, tek başına yeterli olmamakla birlikte, 0.97’ten büyük olması önerilmektedir (16). Buna göre bulunan korelasyon katsayısının yeterli uygunlukta olmadığı görülmektedir. Bu değerler güven aralıklarına göre değerlendirildiğinde iki cihazın HbA2 ölçümü için uyumsuz oldukları ve HbA2 değerleri bakımından iki cihaz arasında anlamlı fark olduğu gözlenmektedir.

Çalışmamızda kullanılan iki HPLC cihazı arasındaki farklar sonuçlara da yansımış olabilir. Her şeyden önce iki cihazın kalibrasyon metotları birbirinden farklıdır. Sistem 1 cihazında Hb A2, Hb F ve Hb A1c kalibrasyonu yapılırken; Sistem 2 cihazında Hb A2 ve Hb F kalibrasyonu yapılmaktadır. Ayrıca her iki cihazda da hemoglobinlerin birlikte elüe olmaları söz konusudur. Sistem 1 cihazında Hb D ve Hb E, Hb A2 ile birlikte elüe olabilir ve Hb F %16’nın üzerindeyken HbA1c ile birlikte elüe olabilir. Sistem 2 cihazında ise Hb E Hb A2 ile birlikte elüe olmaktadır. Sistem 1 cihazında iki farklı tuz konsantrasyonu ve pH’a sahip elüsyon tamponu kullanılırken ve Sistem 2 cihazında üç farklı elüsyon tamponu kullanılmaktadır. Her iki cihazda da demir eksikliği anemisi hastalardaki Hb A2 yüksekliğini maskeleyebilmektedir.

Tanımlanmış bir referans sistemi ve ortak bir kalibrasyon materyali olmadığından çeşitli HbA2 yöntemlerin uyumsuzluğu bir sürpriz değildir. Bu amaçla son yıllarda IFCC bünyesinde HbA2 standardizasyon çalışma grubu oluşturulmuştur(8).

Çalışmamızın zayıf yönü hemoglobin A2 ve F ölçümünde altın standart olan kolon kromatografisi ve alkali denatürasyon ile karşılaştırılmamasıdır. Aynı şekilde kapiller elektroforez ile de karşılaştırma yapılmadı. Diğer taraftan bu yöntemler rutin laboratuvarlarda çok nadiren kullanılmaktadır.

Sonuç olarak, yaptığımız istatistiksel analizlere göre Sistem 1 ve Sistem 2 HPLC cihazları arasında HbA2 yönünden uyumun yeterli olmadığını bulduk. HbA2 gibi tanısal değeri olan bir parametre çalışılırken, rutin laboratuvar sürecinde HPLC cihazları arasında değerlendirme farkları olabileceğini göz önünde bulundurmak gerektiğini vurgulamak isteriz.

KAYNAKLAR

1. Alphabetical hemoglobin variants list. Hemoglobin, 1996; 20(3): 313-35.
2. Gosselin RC, Carlin AC, Dwyre DM. Comparison of the BioRad Variant and Primus Ultra2 high-pressure liquid chromatography (HPLC) instruments for the detection of variant hemoglobins. Int Jnl Lab Hem, 2011; 33: 159-67
3. Sönmez Ç, Kaymak AÖ, Güntaş G. Halk sağlığı problemi olan talasemilerde laboratuvar. Turk Hij Den Biyol Derg, 2014; 71(4): 221-28.
4. Ellidağ HY, Eren E, Tosun SA, Yılmaz N. Talasemi taramasında Primus Ultra2 Analyzer ve Tosoh HLC-723 G8 HPLC sistemlerinin karşılaştırılması. Türk Klinik Biyokimya Derg, 2013; 11(3): 99-104.
5. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. Clin Chem, 2000; 46: 1284-90.
6. Rund D, Rachmilewitz E. B-Thalassemia. N Engl J Med, 2005; 353: 1135-46.
7. Çatak B, Sütlü S, Kılınç S, Badıllıoğlu O, Canatan D. Burdur'da ilköğretim 8. sınıflarda B-talasemi taşıyıcılık sıklığı. Cumhuriyet Med J, 2013; 35: 193-8.
8. Paleari R, Gulbis B, Cotton F, Mosca A. Inter laboratory comparison of current high-performance methods for HbA2. Int Jnl Lab Hem, 2012; 34: 362-8
9. Greene DN, Pyle AL, Chang JS, Hoke C, Lorey T. Comparison of Sebia Capillary Flex capillary electrophoresis with the Bio Rad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. Clin Chim Acta, 2012; 413: 1232-8
10. Anonymous. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies, Br J Haematol, 1998; 101(4): 783-92.
11. Lawrence I, Lin K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. Biometrics, 1989; 45(1): 255-68.
12. Statistical Calculators, Lin's Concordance: <http://www.niwa.co.nz/online-services/statistical-calculators/concordance>. (31.1.2016)
13. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet, 1986; I: 307-10.
14. Viera AJ, Garrett JM. Understanding inter observer agreement: the kappa statistic. Family Medicine, 2005; 37(6): 360-63.
15. Fleiss JL. The design and analysis of clinical experiments. New York, John Wiley and Sons, 1986: 1-32.
16. A Good Example. http://www.medical.siemens.com/siemens/nl_NLDIAG/gg_diag_FBAs/files/EP_Evaluator/Webinars/02-EE9-Mods-FALL_2010.pdf (15.1.2016)

Environmental risk assessment under the pollutants exposure with using four lichen species and molecular assay in cement plant, Aşkale-Erzurum (Turkey)

Aşkale-Erzurum Çimento fabrikası etrafında kirleticilere maruz kalmış dört farklı liken türü kullanılarak yapılan moleküler boyutta çevresel risk değerlendirmesi

Rasim HAMUTOĞLU¹, Ali ASLAN², Sümer ARAS³, Demet CANSARAN-DUMAN¹

ABSTRACT

Objective: The aim of the study is to determine the genotoxic effects of various environmental pollutants around cement factory in Aşkale-Erzurum. It was studied four lichen species which include *Pseudevernia furfuracea*, *Lobaria pulmonaria*, *Cetralia islandica* and *Usnea longissima*.

Methods: The main observation or changes in the protein assay and RAPD patterns included appearance of new bands and/or disappearance of normal bands compared with the control samples.

Results: Although significant amount of decrease in protein content of the samples exposed to pollutants has been observed 50 m away from cement factory, no changes was detected in the protein content of lichen samples 100 m and 200 m away from cement factory. Among the four studied species, *P. furfuracea* revealed to have the highest level of band appearance and disappearance. Following the exposure to the pollutants of 1, 2 and 3 district situated at a distance of 50, 100, 200m to the cement factory, *P. furfuracea* with a control bands were observed respectively. Moreover 31, 13 and 15 bands from the control species disappeared in sites 1, 2 and 3 in *P. furfuracea* samples. Furthermore, the highest polymorphism value was obtained (P% = 86,6%) in *U. longissima* and *L. pulmonaria* by the OPC04 primer, and the lowest polymorphism was

ÖZET

Amaç: Aşkale-Erzurum çimento fabrikasının etrafında çeşitli çevresel kirleticilerin genotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla *Pseudevernia furfuracea*, *Lobaria pulmonaria*, *Cetralia islandica* ve *Usnea longissima* isimli dört liken türü kullanılmıştır.

Yöntemler: Çevresel kirleticilere maruz kalmış örnekler ile kontrol örneklerinin protein boyutunda ve moleküler boyutta da RAPD bantlarında yeni bant oluşumu ve/veya bant kaybolması olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Bulgular: Çimento fabrikasına 50 m uzaklıkta kirleticilere maruz kalan örneklerde protein içeriğinde belirgin bir düşüş gözlenmiş olmasına karşın çimento fabrikasına 100 m ve 200 m uzaklıktaki liken örneklerinde protein içeriğinde herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. Çalışılan dört tür arasında *P. furfuracea* bant görünümü ve bant kaybolma oranı en yüksek olan türdür. Çimento fabrikasına 50, 100 ve 200m. uzaklıkta bulunan 1., 2. ve 3. bölgeler kirleticilere maruz kaldıktan sonra *P. furfuracea*'da (kontrol bant sayısı 83) sırasıyla 19, 45 ve 51 bant gözlenmiştir. Buna ek olarak yine 1., 2. ve 3. bölgelerdeki *P. furfuracea* örneklerinde sırasıyla 31, 13 ve 15 bant kaybolmuştur. Ayrıca, en yüksek polimorfizm değeri OPC04 primeri ile *U. longissima* ve *L. pulmonaria* (P%= % 86.6) liken türlerinde ve en düşük polimorfizm oranı (P%= 45.4%) OPC01 primeri ile

¹ Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara, Turkey

² Ataturk University, Kazım Karabekir Education Faculty, Department of Biology, Erzurum, Turkey

³ Ankara University, Faculty of Science, Biotechnology Section, Department of Biology, Ankara, Turkey



İletişim / Corresponding Author : Demet CANSARAN-DUMAN

Ankara University, Biotechnology Institute, Tandoğan, Ankara, Turkey

Tel : +90 533 344 47 44

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

Geliş Tarihi / Received : 25.12.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 14.04.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.57805

Hamutoğlu R, Aslan A, Aras S, Cansaran-Duman D. Environmental risk assessment under the pollutants exposure with using four lichen species and molecular assay in cement plant, Aşkale-Erzurum (Turkey). Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(3): 253-266

yielded (P%= 45,4%) in *L. pulmonaria* by the OPC01 primer. According to this study site 1, which is the nearest site to the cement factory (50m), has the highest appearance and disappearance band. As the samples from site 1 revealed the lowest level of GTS values might led to a high level of genotoxic effect in the four lichen species.

Conclusion: This study provides preliminary evidence to the biological effects and genotoxicological consequences caused by various environmental contaminants with the use of four different lichen species collected from around cement factory. The use of indicator organisms as a biomarker in the early detection of genotoxic agents showed reliable sensitivity in terms of estimating the level of damage caused by air pollution.

Key Words: lichen, genotoxicity, risk assessment, pollutant

L. pulmonaria'da elde edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre; çimento fabrikasına en yakın (50 m) yer olan bölge 1'de en yüksek bant artışı ve bant kaybolması tespit edilmiştir. Genetik Kalıp Stabilitesi (GKS) değerlerinin düşük seviyede ortaya çıktığı bölge 1'de dört liken türünde genotoksik etki yüksek düzeyde belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışma, çimento fabrikası etrafında toplanan dört farklı liken türünün kullanılması ile çeşitli çevresel kirlleticilerin neden olduğu genotoksik ve biyolojik etkinin ön belirteci olarak bilgi vermektedir. Genotoksik ajanların erken uyarı durumunun belirlenmesinde biyomarkır olarak indikatör organizmalar ile birlikte kullanılmasının, hava kirliliğinin yol açtığı hasar düzeyinin yorumlanmasında güvenilir olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: liken, genotoksite, risk değerlendirmesi, kirliteci

INTRODUCTION

Air pollution represents a serious threat to both the environment and to human health. Biomonitoring helps us to understand the possible ecotoxicological impacts of such contamination by providing valuable information on environmental pollution and improving the process of risk assessment through measurement of the physiological responses of individuals (1). Millions of tons of toxic pollutants such as; ozone, particulate matter, carbon monoxide, nitrogen oxides, sulfur dioxide and lead are released into air each year. Mobiles (cars, buses, trucks, etc.) and industrial sources (factories, refineries, power plants, etc.) are the major reasons of such kind of contamination. Furthermore polycyclic aromatic compounds (PACs), heavy metals and halogenated aliphatic hydrocarbons, have been shown to be genotoxic to the living organisms (2). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are capable of making covalent interactions with nucleophilic centres of DNA (3). They also cause base pair substitutions, frameshift mutations, deletions, S-phase arrest,

strand break age and a variety of chromosomal alterations (4-6). Further studies have pointed out that in humans long-term exposure to air pollution is one of the factors involved in the development of cancer (7-9).

Lichens have a high surface ratio and ion exchange properties, and lack variability in morphology throughout the growing season. All this may explain why lichens are sensitive to environmental pollution and have been widely used as biomonitors of environmental pollution (10-14). Especially epiphytic lichens are effective air pollution biomonitors (15), because they rely on atmospheric dry and wet deposition for their mineral nutrition (16) and respond to environmental pollution by changing frequency (17). In heavily polluted areas such as urban areas lichens are often absent. In such cases transplant techniques have been used to monitor air pollution: one of these techniques consists exposing bags containing lichen in the studied area, to measure concentrations of contaminants in the

lichen samples (14, 16, 18-24).

A number of researchers have shown the genotoxic potential of 2,4-D that were investigated by using different test systems including chromosome aberration assay, micronucleus and comet assay technique that monitor genotoxic effects on plants (25-28). The advantage of measuring the direct effects of genotoxins on DNA mainly depends on its sensitive and non-time consuming properties (25). The development of several PCR-based techniques, provides many advantages in the analysis of genetic toxicology (29). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) method; a PCR-based technique which is simple, fast and capable of detecting not only point mutations but also temporary alteration of DNA that may not finally manifest themselves as mutation in future and allow detection of low doses of pollutants. The purpose of genotoxicity testing is to determine if a substrate will influence genetic material or may cause cancer. Ames test, in vitro toxicology test, in vivo tests and Comet assays are one of the most common tests for genotoxicity. Many studies displayed that RAPD may potentially form the basis of novel biomarker assay to detect DNA damage and mutational events in cells of bacteria, plants, invertebrate and vertebrate animals (27, 30). Although there are several studies on the genotoxic effects of heavy metals on various organisms, studies about lichens about genotoxicity have started in our laboratory in recent years and few reports have been published (22-24, 31-35). Genotoxicity studies with lichen species demonstrated the possible ecotoxicological impacts of such contamination by providing valuable information on environmental pollution and improving the process of risk assessment through RAPD analyses (22-24, 31-35).

The cement industry produced cement dust which contains metals such as Cd, Cr, Cu, Ni and Pb (36). Although cement factories are generally established far from city centers, local areas are affected negatively. Schuhmacher et al. (36), demonstrated

that cement dust and associated chemicals can spread over a large area through wind and rain, accumulate in lichens, plants, animals and soils, downwind from the cement plant (36). Different types of contamination originating from industrial and agricultural activities may have harmful impact on organisms (37).

The aim of the current study was to evaluate the in situ DNA integrity and protein profile in four lichen species (*Pseudevernia furfuracea*, *Lobaria pulmonaria*, *Cetraria islandica* and *Usnea longissima*) by using the molecular technique. For this purpose, four lichen species were collected from Giresun which were not exposed to any kind of contamination. Four lichen species exposed to pollutants in Aşkale cement factory affected heavily by industries. Biomarkers are used to evaluate the effects of exposure to chemical contaminants and detect responses to environmental stress in lichen species.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The cement factory area is located in eastern Turkey (N 39° 55' 31", E 40° 40' 12"). The area has a terrestrial climate characterized by hot and dry summers and cold, snowy winters. The major type of plant cover is steppe. Forests are located in the higher parts of mountains in the north and northeast. Forests include *Pinus sylvestris*, *Picea orientalis*, *Fagus orientalis*, *Quercus petraea*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies nordmanniana*, *Ulmus minor* and *Fraxinus excelsior* species and conifers, mostly at altitudes of 700-2500 m. The Aşkale cement plant is located 55 km west of Erzurum city. The cement plant has been operating in the area since 1974.

Lichen material

Pseudevernia furfuracea, *Lobaria pulmonaria*, *Cetraria islandica* and *Usnea longissima* lichen species were collected from three different locations

in Dereli-Giresun, Eastern Anatolia, Turkey, in July 2008. The samples collected from the Dereli-Giresun which were supposedly not exposed to any kind of contamination were used as control in experiments. Three different control samples for four different lichen species collected randomly from different substrates of their own were used in this study. The samples were exposed to air at different sites (Site 1, 2 and 3), according to the far from the cement factory by using bag technique for 4, 8 and 12 months in 2008. Lichen species were transplanted on trees placed 50 (site 1), 100 (site 2) or 200 m (site 3) downwind from the combustion unit of the plant, as three replicas. Lichens samples were collected after four, eight and twelve months of transplantation. Among three sites, Site 1 (50 m) is closer to the cement factory in Aşkale, Erzurum. On the other hand, Site 2 (100 m) and 3 (200 m) are close to the cement factory.

Total Soluble Protein Level

Four different lichen thallus were homogenized (1:1, w/v) with 0,2 M phosphate buffer (pH 7.0) with a cold mortar and pestle. The homogenate was centrifuged at 27.000 x g for 20 min. The supernatant was used for assays of total soluble protein content. The total soluble protein content of the lichen extracts was determined according to Bradford method (38), with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Experiments were repeated three times.

Genomic DNA isolation and RAPD procedures

Genomic DNA extraction was performed according to the protocol defined by Aras and Cansaran (39). Concentration and purity of DNA were measured at 260 nm and by 260 nm/280 nm absorbance ratios with nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA).

Standard 10-base primers supplied by Operon Technologies Inc. (Alameda, CA, USA) were used to screen RAPD variation. Fourteen oligonucleotide primers [CGCCCGCAGT (B389), TTCGAGCCAG

(OPC01), GTGAGGCGTC (OPC02), GGGGGTCTTT (OPC03), CCGCATCTAC (OPC04), TGTCTGGGTG (OPC10), CTGTTGCTAC (OPO03), CAGCACTGAC (OPO07), GGTGCACGTT (OPO19), CGGATCGACA (P437), CAGGCCCTTC (TubeA01), TGCCGAGCTG (TubeA02), AGTCAGCCAC (TubeA03), AGTCAGCCAC (TubeA03)] were screened and among them five primers [OPC01, OPC02, OPC03, OPC04, OPC10] were amplified clear and reproducible bands. PCR was performed in a reaction volume of 25 µl containing 200 ng genomic DNA, 2.5 µl 10 x reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 20 µM dNTPs, 0.2 µM of primer and 0.5 unit of Taq polymerase (Promega, Madison, USA) and ddH₂O was added to the standard volume. The PCR programme consisted of the following steps: initial denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 36°C for 1 min at 35 cycles, extension at 72°C for 45 sec and a final extension at 72°C for 8 min. Amplified samples were loaded on %1.2 agarose gels (mixture of %50 agarose and %50 Nu Sieve GTG agarose, FMC Corporation, Wokingham, Berkshire, United Kingdom), and run at 100 V for 4 h. For detection of any other kinds of DNA contaminants, a negative control of PCR mix without any template DNA was also used. To test the reproducibility of the RAPD-PCR, experiments were repeated at least twice for each primer and faint bands were ignored and only reproducible bands obtained in repeated experiments were taken into account.

Statistical analyses

The SPSS (Statistical package software v.15.0 for Windows) was used to analyze the changes in total soluble protein content. Data were tested by analysis with variance analysis (ANOVA). Least significant difference test at 0.01 significance levels was performed. In the analysis of RAPD profiles; bands which appeared and disappeared in the control sample were considered as the criterion of the judgment (Table 1). Polymorphisms observed in RAPD profiles included disappearance of a control band and appearance of a new band (36) (Table 2). Genomic

Table 1. Changes of total bands in control, and of polymorphic bands and varied bands after 4, 8 and 12 months exposure in four lichen species, Aşkale, Erzurum, 2015

<i>Pseudevernia furfuracea</i>		Site 1 (50m)			Site 2 (100m)			Site 3 (200m)			A									
Primer	C	S1		S2		S3		S4		S5		S6		S7		S8		S9		
	TB	a	b	a	b	a	b	a	b	a		b	a	b	a	b	a	b	a	b
OPC 01	12	3	1	3	0	0	1	2	0	3	1	2	1	1	1	0	2	1	1	1
OPC 02	17	2	2	1	1	2	1	3	1	1	3	2	0	2	0	3	0	2	0	0
OPC 03	13	2	2	2	4	3	1	1	0	2	0	1	1	0	2	1	1	1	1	1
OPC 04	22	4	1	5	2	2	2	4	1	0	1	1	2	1	0	2	0	1	1	1
OPC 10	19	2	6	1	4	1	3	1	0	1	2	1	0	1	1	1	2	0	3	3
	83	13	12	12	11	8	8	11	2	7	7	4	5	4	7	5	5	6	6	6
	a+b	25		23		16		13		14		11		9		12		11		
<i>Lobaria pulmonaria</i>		Site 1 (50m)			Site 2 (100m)			Site 3 (200m)			B									
Primer	C	S1		S2		S3		S4		S5		S6		S7		S8		S9		
	TB	a	b	a	b	a	b	a	b	a		b	a	b	a	b	a	b	a	b
OPC 01	11	2	0	3	1	0	0	3	0	2	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1
OPC 02	18	1	2	0	2	2	1	1	0	4	0	0	0	0	1	2	2	1	1	1
OPC 03	14	3	2	3	1	0	2	3	1	2	0	0	1	2	1	0	0	1	0	0
OPC 04	15	5	2	4	2	3	2	4	1	0	4	1	4	1	2	3	1	2	1	1
OPC 10	17	3	1	1	0	4	1	1	0	0	1	0	4	1	2	2	1	2	1	1
	75	14	7	11	6	9	6	12	2	8	6	2	9	4	6	7	5	6	4	4
	a+b	21		17		15		14		14		11		10		12		10		
<i>Cetrelia islandica</i>		Site 1 (50m)			Site 2 (100m)			Site 3 (200m)			C									
Primer	C	S1		S2		S3		S4		S5		S6		S7		S8		S9		
	TB	a	b	a	b	a	b	a	b	a		b	a	b	a	b	a	b	a	b
OPC 01	10	0	2	1	1	1	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0
OPC 02	16	1	2	2	1	2	1	1	1	0	2	3	1	0	2	0	1	1	0	0
OPC 03	11	2	1	2	2	0	1	3	0	1	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0
OPC 04	17	4	3	2	2	4	1	3	3	2	0	0	4	2	0	3	2	2	1	1
OPC 10	15	2	2	4	1	3	1	0	2	1	3	2	0	1	1	0	3	1	3	3
	69	9	10	11	7	10	4	7	6	4	7	6	7	8	3	3	6	5	4	4
	a+b	19		18		14		13		11		13		11		9		9		
<i>Usnea longissima</i>		Site 1 (50m)			Site 2 (100m)			Site 3 (200m)			D									
Primer	C	S1		S2		S3		S4		S5		S6		S7		S8		S9		
	TB	a	b	a	b	a	b	a	b	a		b	a	b	a	b	a	b	a	b
OPC 01	12	1	0	0	2	1	0	0	1	0	2	1	1	1	2	1	0	0	0	0
OPC 02	13	0	3	1	2	0	3	1	0	0	1	0	2	0	1	0	1	0	3	3
OPC 03	11	0	2	3	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
OPC 04	15	3	3	1	4	3	1	1	4	2	3	2	2	0	2	1	1	1	0	0
OPC 10	15	5	1	1	2	2	2	3	1	1	1	1	1	2	0	1	2	0	2	2
	66	9	9	6	10	6	7	6	7	3	8	4	7	4	6	4	4	2	5	5
	a+b	18		16		13		13		11		11		10		8		7		

S1, S4, S7: 4 month S2, S5, S8: 8 month, S3, S6, S9: 12 month

S: Sample, C: Control sample, a: Appearance of new bands, b: Disappearance of control bands,

a+b: Indicates polymorphic bands, TB: Total bands.

template stability (%GTS) was calculated as where 'a' indicates the RAPD polymorphic profiles the total number of polymorphic bands obtained for the five primers) in each sample exposed to environmental pollution around the cement factory, Aşkale-

Erzurum, and 'n' is the number of total bands in the control (40). Changes in the RAPD patterns were expressed as decreases in GTS which is related to the change to the number of RAPD profiles generated by the lichen samples exposed to the polluted areas, in

Table 2. The polymorphism ratios of the primers

Primers	<i>Pseudevernia furfuracea</i>		
	TB	PB	Ratio (%)
OPC01	12	6	50.0
OPC02	17	9	52.9
OPC03	13	7	53.8
OPC04	22	18	81.8
OPC10	19	14	73.6
<i>Lobaria pulmonaria</i>			
OPC01	11	5	45.4
OPC02	18	13	72.2
OPC03	14	11	78.5
OPC04	15	13	86.6
OPC10	17	14	82.3
<i>Cetraria islandica</i>			
OPC01	10	7	70.0
OPC02	16	11	68.7
OPC03	11	8	72.7
OPC04	17	14	82.3
OPC10	15	11	73.3
<i>Usnea longissima</i>			
OPC01	12	7	58.3
OPC02	13	7	53.8
OPC03	11	8	72.7
OPC04	15	13	86.6
OPC10	15	12	80.0

Table 3. Changes of GTS for all primers in study

Sites	Samples	GTS ratio (%)			
		<i>Pseudevernia furfuracea</i>	<i>Lobaria pulmonaria</i>	<i>Cetraria islandica</i>	<i>Usnea longissima</i>
Site 1 (50m)	S1	69.87	72.00	72.46	72.72
	S2	72.28	77.33	73.91	75.75
	S3	80.72	80.00	79.71	80.30
Site 2 (100m)	S4	84.33	81.33	81.15	80.30
	S5	83.13	81.30	84.05	83.33
	S6	86.74	85.33	81.15	83.33
Site 3 (200m)	S7	89.15	86.66	84.05	84.84
	S8	85.55	84.00	86.95	87.87
	S9	86.74	86.60	86.95	89.39

S1,S4, S7: 4 month, S2,S5, S8: 8 month, S3, S6, S9: 12 month

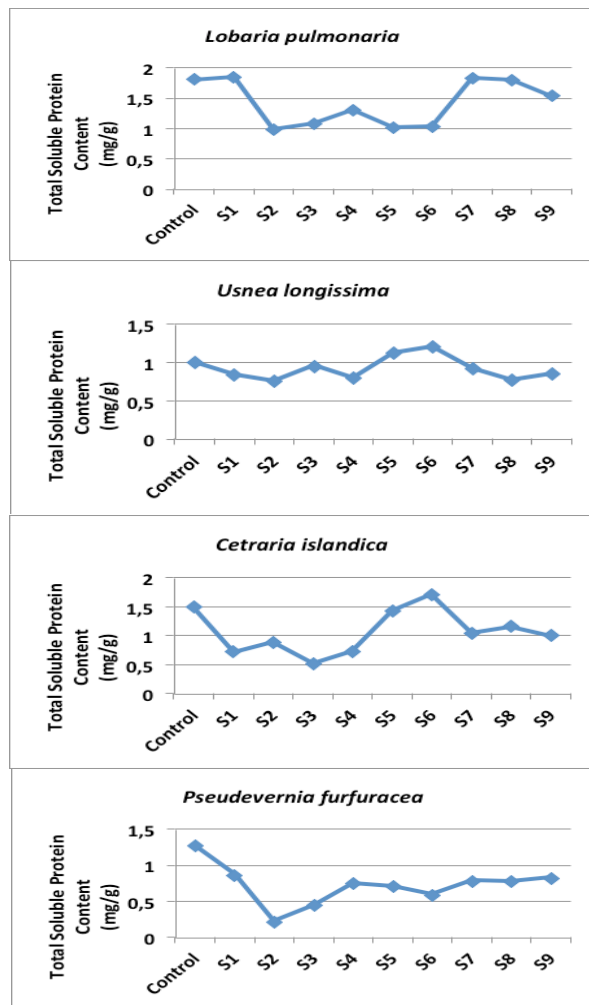
relation to profiles obtained from the control lichen samples (Table 3).

RESULTS

Effect of pollutants on total soluble protein level

The results showing the total soluble protein levels in four lichen species are presented in Fig. 1. Total soluble protein content profile of the control samples was similar to four examined lichen species. Total soluble protein content was significantly ($P<0.01$) changed with the exposure time to the

pollutants ($P<0.01$) (4, 8 and 12 months). It was shown that protein content changed with four lichen species after 8 month of exposure. When 50 m far from cement factory in Aşkale, protein content significantly decreased. At the other sites far from cement factory (100 and 200 m) were observed little changes compared with control *L. pulmonaria* lichen species (Fig 1). Compared with the four lichen species and protein levels of pollutants exposure, *P. furfuracea* was determination to the maximum change of protein contents in all sites and exposure



S1: *Lobaria pulmonaria*, 4 month, 50 m
 S2: *L. pulmonaria*, 8 month, 50 m
 S3: *L. pulmonaria*, 12 month, 50 m
 S4: *L. pulmonaria*, 4 month, 100 m
 S5: *L. pulmonaria*, 8 month, 100 m
 S6: *L. pulmonaria*, 12 month, 100 m
 S7: *L. pulmonaria*, 4 month, 200 m

S1: *Usnea longissima*, 4 month, 50 m
 S2: *U. longissima*, 8 month, 50 m
 S3: *U. longissima*, 12 month, 50 m
 S4: *U. longissima*, 4 month, 100 m
 S5: *U. longissima*, 8 month, 100 m
 S6: *U. longissima*, 12 month, 100 m
 S7: *U. longissima*, 4 month, 200 m

S1: *Cetraria islandica*, 4 month, 50 m
 S2: *C. islandica*, 8 month, 50 m
 S3: *C. islandica*, 12 month, 50 m
 S4: *C. islandica*, 4 month, 100 m
 S5: *C. islandica*, 8 month, 100 m
 S6: *C. islandica*, 12 month, 100 m
 S7: *C. islandica*, 4 month, 200 m

S1: *Pseudevernia furfuracea*, 4 month, 50 m
 S2: *P. furfuracea*, 8 month, 50 m
 S3: *P. furfuracea*, 12 month, 50 m
 S4: *P. furfuracea*, 4 month, 100 m
 S5: *P. furfuracea*, 8 month, 100 m
 S6: *P. furfuracea*, 12 month, 100 m
 S7: *P. furfuracea*, 4 month, 200 m

Figure 1. *Lobaria pulmonaria*, *Usnea longissima*, *Cetraria islandica*, *Pseudevernia furfuracea* species of Total Soluble Protein Content (mg/g)

times.

The RAPD-PCR profiles of the control and exposed samples in cement plant (Aşkale-Erzurum)

In the current study the genotoxic effects of various environmental pollutants were studied with the *Pseudevernia furfuracea*, *Lobaria pulmonaria*, *Cetraria islandica* and *Usnea longissima* that were exposed to various pollutants around the cement factory in Aşkale-Erzurum. Control sites are located far away from the allocation units. Table 1 represents the summation of all polymorphic bands in RAPD profile and Figure 2 presents all RAPD bands of selected primer. The DNA concentrations measured for the samples were in the range of 887 ng/μl to 4149 ng/μl, and the 260 nm/280 nm ratios ranged from 1.81 to 1.99. The total number of bands obtained in control samples by RAPD analyses were 83, 75, 69 and 66 for four lichen species (*P. furfuracea*, *L. pulmonaria*, *C. islandica* and *U. longissima*) used in the study, respectively. According to the results, each primer generated 10-22 bands with an average of 16.6, 15.0, 13.8 and 13.2 bands per primer for four lichen species, respectively.

RAPD profiles of the control and exposed samples around the cement factory showed significant differences (Table 1). In this regard, the main observation or changes in the RAPD patterns included appearance of new bands and/or disappearance of normal bands compared with the control samples. Furthermore, all primers resulted in alteration of a few amplification products gave complicated patterns of gains or losses. Although *P. furfuracea* species showed the highest levels of disappearance of new bands in the polluted samples, *U. longissima* displayed the lowest levels of band changes. Total number of bands were more in *P. furfuracea* species (83 in control, site 1: 64 (a+b); site 2:38 (a+b); site 3: 32 (a+b) as compared to other lichen species. The lowest number of bands that appeared was observed in the *U. longissima* samples

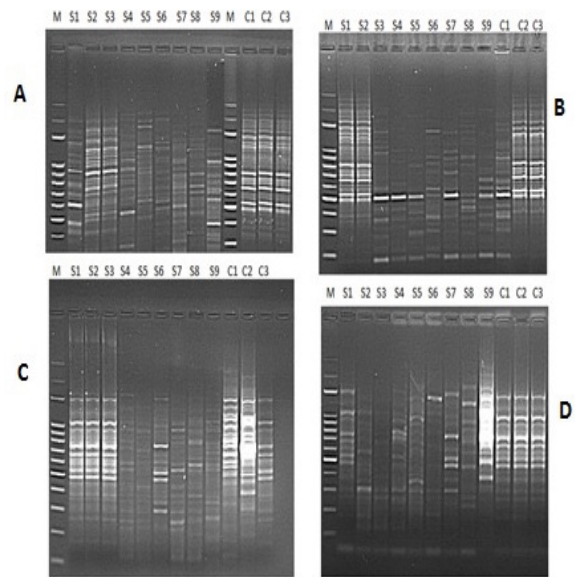


Figure 2. RAPD profiles generated by OPCO2 primer from *Peltigera praetextat* and *Usnea longissima* exposed to polluted areas in Aşkale-Erzurum.

Lane M, Molecular weight marker (100 bp. ladder)

M: Marker, N: Negative Control, C1-C2-C3: Control, S1-S4-S7-S10: 4 months, S2-S5-S8-S11: 8 months, S3-S6-S9-S12: 12 months, Site 1: 10 m, Site 2: 50 m, Site 3: 100 m, Site 4: 200 m.

(66 in control, site 1: 47 (a+b); site 2:35 (a+b); site 3:

25 (a+b) (Table 1). After four month of exposure, 13, 14, 9 and 9 extra bands appeared at site 1 (50 m far from the cement factory) in *P. furfuracea*, *L. pulmonaria*, *C. islandica* and *U. longissima*, respectively. Compared with the examined four lichen species, totally 19, 45 and 51 unexposed RAPD bands were appeared in *P. furfuracea* from sites 1, 2 and 3 (50, 100 and 200 m far from cement plant, respectively) after exposed to pollutants in cement plant in Aşkale-Erzurum (Table 1). Totally 19, 31 and 41 normal RAPD bands appeared in control sample of *U. longissima* from the sites 1 (50, 100 and 200 m far from cement plant) (Table 1). In addition to this, 31, 13 and 15 new bands disappeared in the *P. furfuracea* samples from sites 1, 2 and 3 of exposed pollutants. The polymorphisms were occurred as disappearance or appearance of the

bands in exposed samples compared to the control. The polymorphism ratios of the primers were given in Table 2. The polymorphic bands obtained by RAPD primers showed variability for each site for four lichen species. The highest polymorphism value obtained is P% = 86.6% in *U. longissima* and *L. pulmonaria* by the primer OPC04, and the lowest polymorphism value observed is P% = 45.4% in *L. pulmonaria* by the primer OPC01. The genomic template stability (GTS) which is a quantitative measurement reflects changes in RAPD patterns was calculated for each five primers and presented at Table 3. It was observed that average GTS values were decreased obviously with an nearest a site to cement plant. An obvious decrease in GTS values was observed as the sample collection site gets closer to the cement plant. The results were interpreted for genotoxic effect, considering the sampling points where the lichens were exposed to pollutants around the cement factory in Aşkale-Erzurum.

DISCUSSION

With fast economic development and industrialization, a vast range of genotoxic chemicals were produced, and spread to the environment. These chemicals adversely affect living organisms, and often lead to serious diseases in human beings. Atmospheric pollution is composed of mixed pollutants and the inherent complexity of the composition and subsequent reaction products make it very difficult to estimate the ambient genotoxicity risk of air by traditional pollution measurements. The best way to determine environmental genotoxicity could be the direct quantification of the genotoxic effect (i.e., DNA damage) (38) of the pollutant to a living organism. Due to highly conserved structure of the genetic material, it is possible to use a broad variety of species including bacteria, yeasts, lichens, animals and plants in genotoxicity tests (30, 31, 41). In this study, we suggest that molecular and biological assays examined in *Pseudevernia furfuracea*, *Lobaria pulmonaria*, *Cetraria islandica* and *Usnea longissima* species could

be used together as reliable and powerful biomarkers to determine genotoxic effects of pollutants in ecotoxicology.

Developing an understanding of the mechanisms of heavy metal tolerance in organisms at a biochemical and molecular level is the focus of today's ongoing research efforts. Toxicant induced population genetic effects may arise from the direct action of the toxicant at the DNA level (mutagenic effects) (35) or may indirectly result from population mediated process that are related to the toxicant exposure (36). Initially protein markers (i.e. allozymes) were used to infer the population genetic effects of toxicant exposure (38), but currently a wide variety of DNA markers/techniques are available. These techniques can be applied to infer all routes through which toxicants may affect the genetic structure of exposed organisms. After proper optimisation condition, the RAPD is a reliable, sensitive and reproducible assay, and therefore can be applied to genotoxicity studies. Toxic chemicals induce several cellular stress responses and damage different cellular components such as membranes, proteins and DNA (26, 42, 43). Mohd-Anwar et al. (2012) reported that, when 14 days old rice seedlings were treated with different As (III) concentrations for different time periods, protein content was significantly decreased at a higher concentration (300 µM) and duration (96 h), however at a lower concentration (50 µM) less changes were observed (44). Similar effect on protein content was observed in the current study. In this studies revealed that total soluble protein content considerably changes to pollutants exposure in four lichen species in cement factory after the different time arrivals.

In recent years, lichens have begun to be used as good bioindicators of genetic toxicity of environmental pollutants (22-24, 31-35). Genotoxicity as a result of metal toxicity is also described to play a major role in DNA-damage induction (33, 45). In this study, probable DNA damages induced by various environmental pollutants, were reflected by changes in RAPD profiles:

disappearance of normal RAPD bands and appearance of new PCR products occurred in the profiles. In the study three controls collected randomly from different substrates of their own was used. In all experiments three control species revealed the same band pattern. The profiles of informative primer OPC04 in examined four lichen species are shown in Fig. 2. The highest number of band changes (25) was detected in *P. furfuracea* lichen species from site 1 (far from 50 m in cement factory) after four months exposure of pollutants.

The objectives of this study were to determine the impact of distance from the combustor of the cement plant (predominant wind direction) and the effect of duration of exposure on bioaccumulation in the four lichens species. Previous studies indicated that nickel, Cd, Cr, Cu and Pb accumulated in lichen thalli with the greatest accumulation within 50 m far from the plant and exposure time, while the concentrations of Al was not consistently impacted by distance from the plant and duration of exposure (21). When four lichen species were compared according to their heavy metal accumulation, *P. furfuracea* was found to be the highest accumulator of pollution sources (21). *P. furfuracea* was observed as the most effective indicator of cement dust pollution. As the results of the current studies revealed the highest level of band variation, in other words genotoxic effect, *P. furfuracea* might be considered as a good candidate for genotoxicity indicator. In this study and previous study were parallel results of *P. furfuracea* lichen species which have the most heavy metal capacity and reflects of genotoxic effect. Our results show that a heterogenous mixture of pollutants might have contributed to the changes in the DNA-band patterns revealed by RAPD analysis, reflecting the induction of DNA damage in *P. furfuracea*.

The appearance of a new DNA band could occur because some oligonucleotide priming sites could become accessible to oligonucleotide primers after structural change or because some changes in DNA

sequence have occurred due to mutations, large deletions, and/or homologous recombination (46). Appearance of new bands may also be the result of genomic template stability related to the level of DNA damage, the efficiency of DNA repair and replication (47). The results indicate that GTS level in *P. furfuracea* was the most affected lichen species by the pollution around cement factory (Aşkale, Erzurum).

In a previous study conducted in parallel with the same samples, some of the heavy metal concentrations were determined and the lowest levels of heavy metals were found in *U. longissima* (21). RAPD patterns generated for four different lichen species from polluted sites are clearly different from the control group and exhibit a distinct change with increasing concentrations of pollutants. Our results indicate that site 1 which is the nearest to the cement factory has high pollutants levels (21) and therefore may lead to a high level of genotoxic effect in the four lichen species as the samples from this location revealed the lowest GTS. The highest GTS values which may be considered as lowest genotoxic effect were detected in the samples from site 3 which is distinguished from other sampling locations by pollutants in cement factory.

However, to our knowledge, little information is available on lichens about their potential genotoxicity indicator capacity against pollutants. DNA alterations in the exposed *P. furfuracea* samples and *Evernia prunastri* samples were aimed to be described by RAPD analysis, in order to reveal the pattern of genetic variation influenced by the various environmental pollutants (23, 32, 34). Thus, the findings in the current study confirmed the idea that environmental pollutants, mainly heavy metals cause DNA damages in organisms and demonstrate the potential of RAPD analyses to monitor the level of genotoxicity in lichens. According to a previous study by Cansaran-Duman et al. (2011), the highest number of band changes in *E. prunastri* were found at (sites 8 and 10) close to iron steel factory in Karabük (34). In this study, *P. furfuracea* appears to

reveal higher genotoxic effects than *L. pulmonaria*, *C. islandica* and *U. longissima* the samples from around cement factory, Aşkale-Erzurum. Heavy metals are a major component of air pollution and many studies have shown that concentrations of absorbed heavy metal elements in lichen samples rise as they get closer to polluted sites like busy motorways and steel mills and also depending on the exposure time. In this study, at site 1, which is the nearest to the cement factory, genotoxicity ratios in the samples were much higher than the values obtained for other sites. In this study, lichen samples exposed close to a pollution source were compared in order to provide genotoxicity information of mixed pollutants found in the air. High number of polymorphic bands was observed in the *P. furfuracea* samples taken from areas close to the cement factory (site 1).

The present study shows the suitability of the lichen samples for the detection of genotoxicity and also provides information about the level of

potential genotoxic agents around a cement factory. To our knowledge, there is no single study as yet on genotoxicity assessments in lichen species in cement factory. Our findings confirm that lichen species *P. furfuracea*, *L. pulmonaria*, *Cetraria islandica* and *U. longissima* can be used to monitor genotoxicity. Particularly *P. furfuracea* is revealed as a good indicator of genotoxicity in this respect. As lichens grow very slowly and are rarely encountered in polluted areas, lichen transplantation seems to be a promising method for monitoring pollutants effects and genotoxicity testing. Biomarkers can provide valuable information on exposure of pollutants and be used to measure a wide range of risk assessment of pollutants on organisms at the molecular level. This study reveals to allow visual integration of a set of early warning responses measured with biomarkers and lichen species provide valuable data for taking preventive measures.

KAYNAKLAR

1. Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp Biochem Physiol C Toxic Pharmacol*, 2007; 146(3): 281-300.
2. Grant WF. Higher plant assay for the detection of genotoxicity in air polluted environments. *Ecosyst Health*, 1998; 4(4): 210-29.
3. Piraino F, Aina R, Palin L, Prato N, Sgorbati S, Santagostino A et al. Air quality biomonitoring: assessment of air pollution genotoxicity in the Province of Novara (North Italy) by using *Trifolium repens* L. and molecular markers. *Sci Total Environ*, 2006; 372(1): 350-9.
4. Baird WM, Chemerys RA, Diamond L, Meedel TH, Whittaker JR. Symposium: carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in the marine environment. In: Richards NL, Jackson BL (eds). U.S. Environ. Protection Agency Rep, 1982; 191-200.
5. Singer B, Grunberger D. *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*. New York: Plenum Press, 1983.
6. Dipple A. Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenesis: an introduction. *ACS Symp. Amer. Chem. Soc. (Eds R.D. Harvey)* Washington; 1985:283: 1-17.
7. Sawicki E. *Air Pollution and Cancer in Man*, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France. 1977;16: 127-57.

8. Cohen AJ, Pope CA. Lung cancer and air pollution. *Environ Health Perspect*, 1995; 103(8): 219-24.
9. Jerrett M, Arain A, Kanaroglou P, Beckerman B, Potoglou D, Sahuvaroglu T. A review and evaluation of intraurban air pollution exposure models. *J Expo Anal Environ Epidemiol*, 2005; 15(2): 185-204.
10. Nimis PL, Lazzarin G, Lazzarin A, Skert N. Biomonitoring of trace element with lichens in Veneto. *Sci Total Environ*, 2000; 255(1-3): 97-111.
11. Cansaran- Duman D, Aras S. Heavy metal accumulation of five biomonitor lichen species in the vicinity of iron-steel plant in Karabük, Turkey and their comparative analysis. *Turk Hij Den Biol Derg*, 2012; 69(4): 179-92.
12. Cansaran-Duman D, Atakol O, Atasoy İ, Kahya D, Aras S, Beyaztaş T. Heavy metal accumulation in *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf from the Karabük Iron-Steel Factory in Karabük, Turkey. *Naturforsch C*, 2009; 64(9-10): 717-23.
13. Giardano S, Adamo P, Sorbo S, Vingiani S. Atmospheric trace metal pollution in the Naples urban area based on results from moss and lichen bags. *Environ Pollut*, 2005; 136(3): 431-42.
14. Adamo P, Giordano S, Vingiani S, Castaldo-Cobianchi R, Violante P. Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy). *Environ Pollut*, 2003; 122(1): 91-103.
15. Conti ME, Cecchetti G. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment, a review. *Environ Pollut* 2001; 114(3): 471-92.
16. Bargagli R. Trace Elements in Terrestrial Plants, An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery. Berlin, Springer, 1998.
17. Nimis PL. Linee guida per la bioindicazione degli effetti dell'inquinamento tramite la biodiversità dei licheni epifiti, Atti Workshop 'Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale', 26-27 Novembre, Roma. Anpa-Serie Atti 1998; 267-77.
18. Aslan A, Budak G, Karabulut A. The amounts Fe, Ba, Sr, K, Ca and Ti in some lichens growing in Erzurum province (Turkey). *J Quan Spec Rad Tran*, 2004; 88(4): 423-31.
19. Aslan A, Budak G, Tıraşoğlu E, Karabulut A. Determination of elements in some lichens growing in Giresun and Ordu province (Turkey) using energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *J Quan Spec Rad Trans*, 2006; 97(1): 10-9.
20. Aslan A, Çiçek A, Yazıcı K, Karagöz Y, Turan M, Akkuş F, et al. The assessment of lichens as bioindicator of heavy metal pollution from motor vehicles activities. *African J Agri Res*, 2011;6 (7): 1698-1706.
21. Çiçek A, Kopal AS, Aslan A, Yazıcı K. Accumulation of heavy metals from motor vehicles in transplanted lichens in an urban area. *Comm Soil Sci Plant Anal*, 2008; 39(1-2): 168-76.
22. Cansaran-Duman D. Study on accumulation ability of two lichen species *Hypogymnia physodes* and *Usnea hirta* at Iron-Steel Factory site, Turkey. *J Environ Biol*, 2011; 32(6): 839-44.
23. Cansaran-Duman D, Aras S, Atakol O, Atasoy İ. Accumulation of trace elements and the assessment of the genotoxicity in the lichen *Pseudevernia furfuracea* transplanted to a polluted site in Ankara. *Ekoloji*, 2012; 21(85): 1-14.
24. Cansaran-Duman D, Altunkaynak E, Aras S. Heavy metal accumulation and genotoxicity indicator capacity of the lichen species, *Ramalina pollinaria* collected from around and iron steel factory in Karabük, Turkey. *Turk J Bot*, 2014 38: 477-90.
25. Xue-Mei Q, Pei-Jun L, Wan L, Li-Jing X. Multiple biomarkers response in maize (*Zea mays* L.) during exposure to copper. *J Environ Sci*, 2006; 18(6): 1182-8.
26. Cenkci S, Yıldız M, Çiğerci İH, Bozdağ A, Terzi H, Terzi ES. Evaluation of 2,4-D and *Dicamba* genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2010; 73(7): 1558-64.

27. Soydam-Aydın S, Gökçe E, Büyük İ, Aras S. Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters. *Mutat Res*, 2012; 746(1):49-55.
28. Soydam-Aydın S, Başaran E, Cansaran-Duman D, Aras S. Genotoxic effect of cadmium in okra seedlings: comparative investigation with population parameters and molecular markers. *J Environ Biol*, 2013; 34(6): 985-90.
29. Liu W, Yang Y, Zhou Q, Xie L, Li P, Sun T. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere*, 2007; 67(6): 1155-63.
30. Körpe DA, Aras S. Evaluation of copper-induced stress on eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings at molecular and population levels by use of various biomarkers. *Mutat Res*, 2011;719 (1-2): 29-34.
31. Aras S, Kanlıtepe Ç, Cansaran-Duman D, Halıcı MG, Beyaztaş T. Assessment of air pollution genotoxicity by molecular markers in the exposed samples of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf in the province of Kayseri (Central Anatolia). *J Environ Monit*, 2010;12(2): 536-43.
32. Aras S, Beyaztaş T, Cansaran-Duman D. Evaluation of genotoxicity of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf by RAPD analysis. *Genet Mol Res*, 2011;10 (4): 3760-70.
33. Beyaztaş T, Aras S, Cansaran-Duman D. Likenlerde ağır metal birikiminin DNA üzerindeki etkileri. *Turk J Sci Rev*, 2008; 1(2): 37-43.
34. Cansaran-Duman D, Atakol O, Aras S. Assessment of the air pollution genotoxicity by RAPD in *Evernia prunastri* L. Ach. From around iron-steel factory in Karabük, Turkey. *J Environ Sci Chine*. 2011; 23(7): 1171-8.
35. Vardar Ç, Başaran E, Cansaran-Duman D, Aras S. Air-quality biomonitoring: assessment of genotoxicity of air pollution in the Province of Kayseri (Central Anatolia) by use of the lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf and amplified fragment-length polymorphism markers. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2014; 759: 43-50.
36. Schuhmacher M, Nadal M, Domingo JL. Environmental monitoring of PCDD/Fs and metals in the vicinity of a cement plant after using sewage sludge as a secondary fuel. *Chemosphere*, 2009; 74(11): 1502-8.
37. Hallegraef GM. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 1993; 32(2):79-99.
38. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248-54
39. Aras S, Cansaran D. Isolation of DNA for sequence analysis from herbarium material of some lichen specimens. *Turk J Bot*, 2006; 30: 449-53.
40. Atienzar FA, Conradi M, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo [a] pyrene. *Environ Toxicol Chem*, 1999; 18(10): 2275-82.
41. Poli P, Buschini A, Restivo FM, Ficarelli A, Cassoni F, Ferrero I, et al. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis*, 1999; 14(6): 547-56.
42. Tuan TA, Popova LP. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turk J Bot*, 2013; 37:1-13

43. Altınözlü H, Karagöz A, Polat T, Ünver İ. Nickel hyperaccumulation by natural plants in Turkish serpentine soils. *Turk J Bot*, 2012; 36: 269-80.
44. Mohd-Anwar A, Rashmi G, Gupta M. Comparative biochemical and RAPD analysis in two varieties of rice (*Oryza sativa*) under arsenic stress by using various biomarkers. *J Hazard Mat*, 2012; 217-218: 141-8.
45. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*, 1990; 9(1): 1-32.
46. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol*, 2003; 192(2-3): 95-117.
47. Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu Rev Plant Biol*, 2010; 61: 535-59.

Olgu sunumu; Yanıkta izole edilen *Bacillus licheniformis*

Case report: The burn isolated *Bacillus licheniformis*

Nezire Mine TURHANOĞLU¹, Demet GÜR-VURAL¹

ÖZET

Bacillus licheniformis doğada yaygın olarak bulunabilen, saprofitik bir bakteri olup insanlarda bakteriyemi, peritonit, gıda zehirlenmeleri gibi hastalıklara neden olabilmektedir. Medikal olarak kullanılan basitrasinin antibiyotiğinin endüstriyel kaynağıdır. *Bacillus licheniformis*'ten kültür oluşturulması ile elde edilen proteaz, biyolojik yıkama tozlarında, ilaç, deri ve gıda endüstrilerinde kullanılır. *Bacillus licheniformis* SB 3086 suşu aynı zamanda süs bitkilerinde ve çimlerde fungal hastalıkları önlemek ve tedavi etmekte kullanılmaktadır. Karın zarı iltihabı, göz iltihabı gibi enfeksiyonlarda üretilmeleri ile ilgili çalışmalar varken yaradan izole edildiğine dair yayına rastlanmamıştır. Çalışmamızda 3. derece yanık ile hastanemize başvuran 69 yaşındaki hastanın yarısından alınan kültür örneğinde *Bacillus licheniformis* üretilmiştir. Kanlı agar besiyerinde üreyen oldukça tipik büllerden oluşan kolonilerden yapılan gram boyamada gram pozitif basiller görülmüştür. Antibiyotik duyarlılık testinde ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, klindamisin, gentamisin, rifampisin, kinupristin+dalfopristin ve kinolonlara duyarlı, kotrimoksazole dirençli olduğu görülmüştür. Basitrasinin+neomisin sülfat ve nitrofurazon pomad kullanan hastanın sonraki kültürlerinde üreme saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus licheniformis*, yara kültürü, enfeksiyon

ABSTRACT

Bacillus licheniformis, a saprophytic bacteria which can be found widely in nature can cause diseases such as food poisoning, peritonitis and bacteremia in humans. It is used as a medical industrial source for Bacitracin antibiotics which is used as a medical industrial sources of Bacitracin antibiotics. Protease which is obtained by culturing *Bacillus licheniformis* is used in biological washing powders, drug, leather and food industries. The *Bacillus licheniformis* SB 3086 strain is also used to prevent and treat fungal diseases in ornamental plants and turf. While there are researches on the production of *Bacillus licheniformis* SB3086 in infections such as peritonitis, eye inflammation there is no publication regarding its production in wounds. In this study, *Bacillus licheniformis* was produced in the wound culture taken from a 69-years-old patient who was admitted to our hospital with 3rd degree burns. Gram-positive bacilli in the gram stain made from breeding colony consisting of a fairly typical blisters were seen in blood agar. In the antibiotic susceptibility tests, it was found to be sensitive to ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, clindamycin, gentamicin, rifampicin, quinupristin+dalfopristin and quinolons. It has been shown to be resistant to cotrimoxazole patient which is used Bacitracin+neomycin sulfate and nitrofurazone pomade was not detected in subsequent culture.

Key Words: *Bacillus licheniformis*, wound culture, infection

¹Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Kliniği, Diyarbakır



İletişim / Corresponding Author : Nezire Mine Turhanoglu

Diyarbakır Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Kliniği 21100 Diyarbakır / Türkiye
Tel : +90 532 256 55 47 E-posta / E-mail : mturhanoglu@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 09.04.2015
Kabul Tarihi / Accepted : 01.01.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.16023

Turhanoglu N.M, Gur-Vural D. Olgu sunumu; Yanıkta izole edilen *Bacillus licheniformis* Türk Hij Den Biol Derg, 2016; 73(3): 267-270

GİRİŞ

Bacillus licheniformis, Gram pozitif ve termofilik bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklığı 50° C civarında olmakla birlikte daha yüksek sıcaklıklarda da canlı kalabilmektedir. Hareketli, spor oluşturan, fakültatif anaerobik çubuk şeklinde olan *Bacillus subtilis* grubunda yer alan bir bakteridir. *Bacillus anthracis* gibi poli-D-glutamat kapsüle sahiptir. Doğada yaygın olarak bulunabilen saprofitik bir bakteri olup, ancak tozlarla yayılan yüksek dirençli endosporları herhangi bir yerden izole edilebilmektedir. *Bacillus* türleri yaklaşık 50 yıldır tıbbi destek ürünü adı altında kullanılıyor olmasına rağmen, bu konudaki bilimsel çalışmalar yaklaşık son 15 yıldır yapılmaktadır. Üzerinde en çok çalışılan *Bacillus* türleri; *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*'tir. Ancak antibiyotik direnç etkenini barındıran suşlar ile enterotoksin ve/veya emetik toksin üretebilen suşlar sorun oluşturabilmektedir (1). Ayrıca hamurun sporları ile kontamine olmasından kaynaklanan ve sünmeye neden olan rop hastalığına neden olmaktadır (2).

B. licheniformis kontamine olmuş pişmiş et ve sebze tüketen insanlar için toksijeniteye ve gıda zehirlenmelerine neden olur. *B. licheniformis* insanlarda septisemi, karnı zarı iltihabı, korneal ülser, göz iltihabı enfeksiyonlarından sorumludur. Genelde toksinleri ile diyare ve kusma-bulantı şeklinde gıda zehirlenmelerinde rol oynamaktadır (3). Ayrıca sığırlarda kan zehirlenmesi ve düşüklerle de ilişkilidir. *B. licheniformis* süt ürünlerinde de yaygın bir kontaminanttır. *B. cereus* toksinlerinin dokümantasyonu fazla olmakla birlikte *B. licheniformis*'in ürettiği toksinler henüz kanıtlanamamıştır. Gıda kaynaklı *B. licheniformis* salgınları pişmiş et ve sebze tüketimleri ile ilişkilidir. Endüstride amilaz ve proteaz üretimlerinde kullanılmaktadır.

B. licheniformis'ten kültür oluşturulması ile elde edilen proteaz, deterjan endüstrisinde biyolojik yıkama tozlarında; ilaç endüstrisinde; deri endüstrisinde; et, süt, bira gibi gıda endüstrilerinde; boynuz, tüy, saç gibi proteinlerin hidrolizinde; x ray filmlerindeki gümüşün geri kazanılmasında; tekstilde protein bağlı zincirlerin kaldırılmasında ve daha birçok endüstri alanında kullanılır. Optimum 9-10 pH değerinde olan proteaz yıkama deterjanlarına ilave edilerek giysilerdeki protein

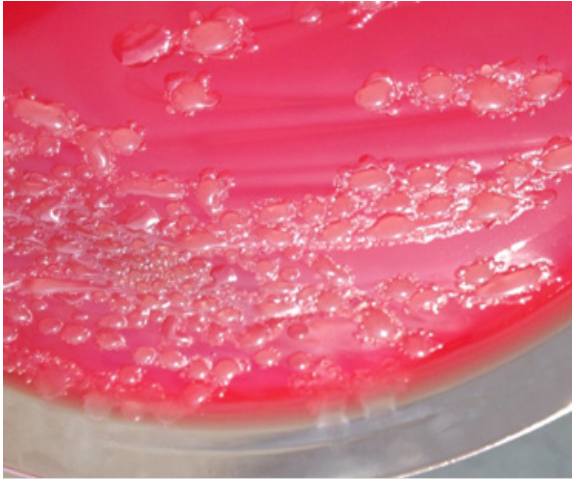
içeren kirlerin çıkartılmasını sağlar. *B. licheniformis* SB 3086 suşu, süs bitkilerinde ve çimlerde fungal hastalıkları önlemek ve tedavi etmekte de kullanılmaktadır (3,4). Ayrıca, medikal olarak kullanılan basitrasin antibiyotığının endüstriyel kaynağı da bu bakteridir.

OLGU SUNUMU

69 yaşındaki erkek hastanın sağ uyluk arka üst yüzde %6'lık alanda ve sağ bacadaki ip şeklinde 2. ve 3. derece eliptik yanık ve sağ ayak dış malleol üstünde %1'lik alanda 3.derece yanık ile hastanemiz yanık ünitesine başvurmuştur (Şekil.1). Yarasından alınan kültür örneği kanlı agar, EMB ve Sabouraud dekstroza agar besiyerine ekim yapılarak, 37°C de 18-24 saat inkübasyona alınmıştır. Kanlı agar besiyerinde üreyen oldukça tipik büllerden oluşan kolonilerden yapılan gram boyamada gram pozitif basiller görülmüştür (Şekil.2). İzolatın tanımlanması ve antibiyotik duyarlılığı VITEK 2 (bioMérieux, France) tam otomatize cihazında yapılmış, sonuç alınamaması üzerine izolatmatriks-araçlı lazer dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) sistemi ile çalışılarak *B.licheniformis* olarak tanımlanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testinde penisilin, ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, klindamisin, gentamisin, rifampisin, vankomisin, kinupristin/dalfopristin ve kinolonlara duyarlı, kotrimoksazole dirençli olduğu görülmüştür.



Şekil 1. 69 yaşındaki erkek hastanın *B.licheniformis* ile enfekte yarası



Şekil 2. Kanlı besiyerinde gram pozitif basil kolonilerinin görünümü

Hastanın kan ve idrar örneklerinden yapılan kültürlerinde üreme olmamıştır. Protein-albumin seviyeleri ve hemogram normal sınırlar içindedir. Hastadan CRP istenmemiştir. Kan ve idrar kültürlerinde üreme olmamıştır. Basitrasin/neomisin sülfat ve nitratrafurazon pomad kullanan hastanın tedavi sonrasında yapılan yara kültüründe üreme saptanmamıştır. Hastanemiz Yanık Ünitesinde üç ay yattıktan sonra şifa ile taburcu olmuştur.

TARTIŞMA

Genellikle gıda endüstrisinde ağırlıklı olarak kullanılan bu bakterinin, travma sonrası kornea ülseri gibi ciddi enfeksiyonlarda rol aldığını Tabbara ve Tarabay yaptıkları çalışmada bildirmişlerdir (5). Peritonit, septisemiye neden olduğu ve ayrıca barsak perforasyonu sonucu bakteriyemi geliştiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (6). Pessa ve Howard intravenöz kataterde de üretebileceğini göstermiştir (7).

Aslında, *B. anthracis* ve *B. cereus* hariç çoğu *Bacillus* türleri, özellikle immün sistemi sağlıklı

bireylerde, insan patojenleri olarak dikkate alınmamaktadırlar. Ancak bu olguda enfeksiyon yerinden alınan ilk örnekten saf olarak üretilmiş olması, antibiyotik kullanılmadan önce alınan örnek tekrarlarında da saf olarak üretilmesi, hastanın genel durumunun kliniğiyle uyumlu olması nedeni ile enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmiştir.

Ancak, hastanın yanık kliniğinde yatarken yarasında saptanan bu bakterinin nasıl bulaştığı konusunda herhangi bilgiye sahip değiliz. Literatürde yapılan incelemelerimize göre bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonlar içinde ilk kez bizim çalışmamız da yaradan üretildiği belirlenmiştir. Yaradan izole edildiği ile ilgili herhangi bir başka kaynağa rastlanılmamıştır. Etkenin yol açtığı kolonilerinin büller tarzında olması ve öze ile dokunulduğunda patlayarak sıvı şeklinde dağılması tipik olup bu bakterinin yaradan izole edilmesi oldukça dikkat çekicidir.

Jeon ve ark. 2012'de yayınladıkları vaka raporunda, bakteriyemi ve mediastinite bağlı olarak özofagus perforasyonu olan bir hastada, 16S RNA gen dizilimi ile *B. licheniformis* ve *B. subtilis*'in birlikte enfeksiyon sebebi olduklarını tespit etmişlerdir (8).

Mochiduki ve ark. akt miyeloid lösemili'li hastanın beyin absesinden *B. licheniformis*'in etken ajan olarak izole edildiğini, genelde kontaminant olarak kabul edilen bu bakterinin, immün sistemi baskılanmış kişilerde etken ajan olarak kabul edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (9).

Fransa'dan bildirilen olgu raporunda, göz travmasından kaynaklanan basiller endoftalmi gelişen dört hastada *B. cereus* veya *B. licheniformis* etken olarak gösterilmiştir (10).

Santini ve ark. yapmış olduğu başka bir çalışmada, akut protez aort kapak operasyonu sonrasında aortik alandan intraoperatif alınan kültürde *B. licheniformis*'in saf olarak ürediğini bildirmiştir (11).

KAYNAKLAR

1. Erem F, Küçükçetin A, Certel M. *Bacillus* türlerinin probiyotik olarak değerlendirilmesi. GIDA, 2013; 38: 247-54.
2. Var I, Zorlugenc B, Kabak B, Uzunlu S. Un, ekmekek ve yaş pastalarda rop hastalığına neden olan *Bacillus sporlarının incelenmesi*. Dünya Gıda Derg, 2012; (02): 74-8.
3. Kalaylı E, Beyatlı Y. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA'ları. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Derg, 2003; 12: 4-35.
4. Afşin Afşin M, Kaya S. Katı faz fermantasyon (solid state fermentation; SSF) yöntemiyle *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den proteaz üretimi. 2010; Dicle Uni Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi. .
5. Tabbara, KF, Tarabay N. *Bacillus licheniformis* corneal ulcer. Am J Ophthalmol, 1979; 87: 717-19.
6. Sugar AM, McCloskey RV. *Bacillus licheniformis* sepsis. J Am Med Assoc, 1977; 238: 11-20.
7. Pessa, M.E, Howard R.J. Complications of Hickman Broviac catheters. Surg Gynecol Obstet, 1985; 161: 257-60.
8. Jeon YL, Yang JJ, Kim MJ, Lim G, Cho SY, Park TS, et al. Combined *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* infection in a patient with oesophageal perforation. J Med Microbiol, 2012; 61: 1766-69. .
9. Mochiduki Y, Amemiya T, Yabe M. Brain abscess induced by *Bacillus licheniformis* complications in acute myeloid leukemia (AML). J Japanese Assoc Infect Dis, 2007; 81: 592-6..
10. Maucour MF, Brugniart C, Ducasse A, Brasme L, Bajolet O. Bacillaryendophthalmitis. Fourcasereports. J Fr Ophtalmol, 1999; 22: 371-6.
11. Santini F, Borghetti V, Amalfitano G, Mazzucco A. *Bacillus licheniformis* prosthetic aortic valve endocarditis. J Clin Microbiol, 1995; 33: 3070-73. .

European Union approach in monitoring drinking water quality: Emergency case management and risk analysis for the protection of public health

İçme suyu kalitesinin izlenmesinde Avrupa Birliği yaklaşımı: Halk sağlığının korunması için acil durum yönetimi ve risk analizi

Dilek DİKMEN¹, Hasan IRMAK¹

ABSTRACT

EU twinning light project entitled "Emergency case management and risk analysis in drinking water for the protection of public health" was implemented within the frame of Support Activities to Strengthen the European Integration Process SEI-2009 programming by the Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey, Consumer and Employee Safety Vice-Presidency, Environmental Health Department with the cooperation of Italy - the Istituto Superiore di Sanita, (Italian National Institute of Health - ISS), Inland Water Hygiene Section, Environmental Primary Prevention Department for six months period between January 2013 and June 2013. The aim of the Project was to strengthen the Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey in the field of drinking water by means of building institutional capacity for risk assessment, early warning and management of emergency cases in line with EU Drinking Water Legislation (98/83/EC). The project had four mandatory results. Result 1 was to improve the risk assessment capacity of Ministry of Health - Public Health Institution of Turkey in drinking water. Result 2 was to develop methodologies for identifying contamination in drinking water. Result 3 was to improve the early warning capacity of the Ministry of Health - Public Health Institution of Turkey in drinking water. Result 4 was to improve the emergency case management capacity of the Ministry of Health - Public Health Institution of

ÖZET

AB Entegrasyon Sürecinin Desteklenmesi Faaliyetleri - SEI 2009 programlaması kapsamında "İçme Sularında Halk Sağlığının Korunması için Acil Durum Yönetimi ve Risk Analizi" başlıklı kısa süreli eşleştirme projesi Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Çevre Sağlığı Daire Başkanlığı) tarafından İtalya - the Istituto Superiore di Sanita, (İtalya Ulusal Sağlık Enstitüsü - ISS), İç Suların Hijyeni Birimi, Çevre Birincil Önleme Bölümü işbirliğinde Ocak 2013 ile Haziran 2013 tarihleri arasında altı ay süre ile yürütülmüştür. Projenin amacı içme suyu alanında risk değerlendirmesinin, erken uyarı ve acil durum yönetiminin AB içme suyu mevzuatı (98/83/EC) ile aynı doğrultuda gerçekleştirilmesi için kurumsal kapasitenin oluşturulmasında Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun güçlendirilmesidir. Proje dört zorunlu hedeften oluşmuştur. 1. hedef: içme suyunda Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun risk değerlendirme kapasitesinin geliştirilmesidir. 2. hedef: içme suyunda kontaminasyonların tanımlanmasına yönelik metodolojilerin oluşturulması; 3. hedef: Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun içme suyundaki erken uyarı kapasitesinin geliştirilmesi ve 4. hedef: Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun içme suyundaki acil durum yönetim kapasitesinin

¹The Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey, Ankara, Turkey



İletişim / Corresponding Author : Hasan IRMAK

Adnan Saygun Cad. No: 55 E Blok Park Girişi No: 7 Sıhhiye 06420 Ankara - Türkiye

Tel : +90 532 666 10 38

E-posta / E-mail : hsn.irmak@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 28.04.2016

Kabul Tarihi / Accepted : 14.06.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.83436

Dikmen D, Irmak H. European Union approach in monitoring drinking water quality: Emergency case management and risk analysis for the protection of public health Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(3): 271-278

Turkey in drinking water. The all project mandatory results were successfully reached. Besides extensive trainings and workshops, four guidance documents concerning the instructions for decision-making following non-compliance results in drinking water monitoring, identification of contamination, early warning and emergency case/crisis management in drinking water were prepared, published and distributed. The technical and institutional capacity of the Ministry of Health in the field of drinking water were improved both at the central level and provincial level involving 81 provinces.

Key Words: drinking water, public health, 98/83/EC directive, twinning project, emergency case management, risk analysis

geliştirilmesidir. Projenin tüm zorunlu hedeflerine başarıyla ulaşılmıştır. Kapsamlı eğitim ve çalıştayların yanı sıra içme sularının izlenmesi esnasında karşılaşılan uygunsuzluk durumlarında karar verme süreci, içme sularında kirliliğin belirlenmesi, erken uyarı, acil durumlar ve kriz yönetimi konularında dört rehber kitap hazırlanmış, bastırılmış ve dağıtılmıştır. Sağlık Bakanlığının teknik ve kurumsal kapasitesi hem merkezi düzeyde hem de 81 il düzeyinde olmak üzere güçlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: içme suyu, halk sağlığı, 98/83/EC direktifi, eşleştirme projesi, acil durum yönetimi, risk analizi

INTRODUCTION

High quality, safe and sufficient drinking water is essential for our daily life, for drinking, food preparation and for many other purposes, such as washing, cleaning, hygiene or watering our plants.

The European Union has a history of over 30 years of drinking water policy. This policy ensures that water intended for human consumption can be consumed safely on a life-long basis, and this represents a high level of health protection. The main pillars of the policy are to: ensure that drinking water quality is controlled through standards based on the latest scientific evidence; secure an efficient and effective monitoring, assessment and enforcement of drinking water quality; provide the consumers with adequate, timely and appropriately information; contribute to the broader EU water and health policy (1).

COUNCIL DIRECTIVE 98/83/EC OF 3 NOVEMBER 1998 ON THE QUALITY OF WATER INTENDED FOR HUMAN CONSUMPTION

The Drinking Water Directive, Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of

water intended for human consumption concerns the quality of water intended for human consumption. Its objective is to protect human health from adverse effects of any contamination of water intended for human consumption by ensuring that it is wholesome and clean (2).

The Drinking Water Directive applies to; all distribution systems serving more than 50 people or supplying more than 10 cubic meter per day, but also distribution systems serving less than 50 people/supplying less than 10 cubic meter per day if the water is supplied as part of an economic activity; drinking water from tankers; drinking water in bottles or containers; water used in the food-processing industry, unless the competent national authorities are satisfied that the quality of the water cannot affect the wholesomeness of the foodstuff in its finished form.

The Drinking Water Directive doesn't apply to; natural mineral waters recognised as such by the competent national authorities, in accordance with Council Directive 80/777/EEC of 15 July 1980

on the approximation of the laws of the Member States relating to the exploitation and marketing of natural mineral waters and repealed by Directive 2009/54/EC of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters; and waters which are medicinal products within the meaning of Council Directive 65/65/EEC of 26 January 1965 on the approximation of provisions laid down by law, regulation or administrative action relating to medicinal products and repealed by Directive 2001/83/EC of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.

The Directive laid down the essential quality standards at EU level. A total of 48 microbiological, chemical and indicator parameters must be monitored and tested regularly. In general, World Health Organization's guidelines for drinking water and the opinion of the Commission's Scientific Advisory Committee are used as the scientific basis for the quality standards in the drinking water.

When translating the Drinking Water Directive into their own national legislation, Member States of the European Union can include additional requirements e.g. regulate additional substances that are relevant within their territory or set higher standards. Member States are not allowed, nevertheless, to set lower standards as the level of protection of human health should be the same within the whole European Union.

Member States may, for a limited time depart from chemical quality standards specified in the Directive (Annex I). This process is called derogation. Derogations can be granted, provided it does not constitute a potential danger to human health and provided that the supply of water intended for human consumption in the area concerned cannot be maintained by any other reasonable means.

The Directive also requires providing regular information to consumers. In addition, drinking water quality has to be reported to the European Commission every three years. The scope of reporting is set out

in the Directive. The Commission assesses the results of water quality monitoring against the standards in the Drinking Water Directive and after each reporting cycle produces a synthesis report, which summarizes the quality of drinking water and its improvement at a European level. Further principles laid in the Directive are; Planning; Regulation (obligations of the Member States and the Commission); Monitoring; Information and Reporting (3).

THE COMMISSION DIRECTIVE 2015/1787 OF OCTOBER 2015 AMENDING ANNEX II AND III TO COUNCIL DIRECTIVE 98/83/EC ON THE QUALITY OF WATER INTENDED FOR HUMAN CONSUMPTION

The Commission performed in 2014 a public consultation on the quality of drinking water in the EU in order to assess the need for improvements on EU drinking water legislation. This consultation led to revision of Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption (Drinking Water Directive) (4). The Drinking Water Committee gave a positive opinion to adapt the Annexes to scientific and technical progress. The amendments will give an opportunity to monitor drinking water parameters at more appropriate frequencies. The new Annex II provides an option to perform the drinking water monitoring in around 100,000 water supply zones in Europe in a more flexible way, provided a risk assessment is performed ensuring full protection of public health. It follows the principle of 'hazard analysis and critical control point' (HACCP) used already in food legislation, and the water safety plan approach laid down in the WHO Guidelines for Drinking Water Quality. These amendments will allow a better and more problem-oriented monitoring of small water supplies. The new monitoring and control system allows to reduce unnecessary analyses and to concentrate on those controls that matter (4).

The Directive 2015/1787 amending Annex II and III to Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption was adopted by the Commission on 6th October 2015 and entered into force on 27th October 2015 (4, 5). The Member States have 24 months to transpose the provisions of this new legislation into their national legislation (4, 6).

The Member States can now decide, on the basis of a risk assessment which parameter to monitor given that some drinking water supply zones do not pose any risk for finding hazardous substances. They can also choose to increase or reduce the frequency of sampling in water supply zone as well as to extend the list of substances to monitor in case of public health concerns. The flexibility in the monitoring of parameters and the frequency of sampling is to ensure protection of public health (6).

Concerning radioactive substances in drinking water, in 2013 a Council Directive 2013/51/EURATOM was adopted, to be transposed by 28 November 2015, superseding the radioactivity requirements in Directive 98/83/EC (4, 7).

TURKISH LEGISLATION

The Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 has been fully transposed to the Turkish legislation by the Ministry of Health with the By-law on Water Intended for Human Consumption, which was published in the Official Gazette No.25730, dated 17 February 2005. The By-law was amended in 2009, 2013 and 2014. The amendments were published in the Official Gazettes 31.7.2009 dated 27305 numbered, 7.03.2013 dated 28580 numbered and 11.04.2014 dated 28969 numbered (8).

The Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey is responsible for the enforcement and implementation of the provisions of the By-law.

In the administrative system of supplying safe

drinking water, various institutions have different functions and responsibilities. The Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey is responsible for determining the quality standards of drinking water, monitoring of these standards and making legislation concerning these areas. The other related institutions are the Ministry of Environment and Urbanization, the Ministry of Forestry and Water Affairs, Municipalities and Special Provincial Administrations, the General Directorate of State Hydraulic Works, Bank of Provinces and the Ministry of Food, Agriculture and Animal Husbandry (9).

TWINNING

Twinning is a European Union instrument for institutional cooperation between Public Administrations of EU Member States and of beneficiary countries. It was originally designed in 1998 to help candidate countries of the time to acquire the necessary skills and experience to adopt, implement and enforce EU legislation. Twinning projects bring together public sector expertise from EU Member States and beneficiary countries with the aim of enhancing peer to peer activities. They must yield concrete mandatory operational results for the beneficiary country. Beneficiaries include candidate countries and potential candidates to EU membership, as well as countries covered by the European Neighbourhood Policy. More specifically, in the IPA region, Twinning aims to provide support for the transposition, implementation and enforcement of the EU legislation (the Unionacquis). It builds up capacities of beneficiary countries' public administrations throughout the accession process, resulting in progressive, positive developments in the region. Twinning strives to share good practices developed within the EU with beneficiary public administrations and to foster long-term relationships between administrations of existing and future EU countries.

“Twinning Light” is designed to offer a more flexible, mid-term approach up to six months (10). Twinning light can be used to tackle any self-contained institutional issues arising from the acquis communautaire provided the subject addressed is of limited scope, that is the structures needed to give effect to the acquis are not complex or the existing ones need little adjustment. The likeliest scenario would be implementation of a specific measure rather than reform of the general or legal framework. Twinning light projects are self-contained and cannot be used to supplement full Twinning projects, which are also self-contained and involve the obligation to deliver their own guaranteed result. Twinning light consists of the provision by the Member State of a package of services, generally involving one or more short missions (e.g. one or two weeks at a time) by selected officials, and/or, less frequently, civil servant experts staying for lengthier, intermediate periods. The financial ceiling for twinning light projects is €250,000 and their duration limited to six months; in exceptional cases this can be extended to eight months (11).

To strengthen the Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey in the field of drinking water by means of building institutional capacity for risk assessment, early warning and management of emergency cases in line with EU Drinking Water Legislation (98/83/EC) EU twinning light project under the title of “Emergency case management and risk analysis in drinking water for the protection of public health” was taken by the Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey.

The twinning light project was implemented within the frame of Support Activities to Strengthen the European Integration Process SEI-2009 programming with Italy for six months period between January 2013 and June 2013.

Cooperation was provided between Italy - the Istituto Superiore di Sanita, (Italian National Institute of Health - ISS), Inland Water Hygiene Section, Environmental Primary Prevention Department and Public Health Institution of Turkey, Environmental Health Department.

In the broader sense the aim of the project was to improve the drinking water sector for the protection of public health. It was expected from the project to provide improvement in the current risk assessment and emergency case management capacities of the Public Health Institution of Turkey in the field of drinking water.

PROJECT IMPLEMENTATION METHODOLOGY

The project was established on the four main targets. Result 1. Improvement of the risk assessment capacity of Public Health Institution of Turkey in drinking water. Result 2. Development of methodologies for identifying contamination in drinking water. Result 3. Improvement of the early warning capacity of the Public Health Institution of Turkey in drinking water. Result 4. Improvement of the emergency case management capacity of the Public Health Institution of Turkey in drinking water.

The methodology of the project implementation includes; current situation assessment, evaluation of the Italy applications on 98/83/EC Drinking Water Directive, working group meetings for the exchange of information and developing methodologies and procedures, in place observations by study visits, trainings, workshops, guidance documents preparation, publication and distribution, implementation of the prepared methodology in pilot province (İstanbul) and project steering committee meetings.

RESULTS

The all project results were successfully reached.

The workshops on health risk assessment, identification of contamination and development of methodologies, early warning and management of emergency cases in drinking water were conducted with the participation of the Public Health Institution of Turkey, Ankara, İstanbul, İzmir, Çanakkale, Giresun, Samsun, Bursa, Kayseri, Gaziantep, Diyarbakır, Antalya, Balıkesir and Erzurum Public Health Directorates.

Comprehensive result oriented trainings on the developed guidance documents and the related subjects were given to the technical staffs of the Public Health Institution of Turkey, Environmental Health Department and the Public Health Directorates of the 81 Provinces.

Developing methodologies and procedures for the evaluation of short term risks and long term risks, for assessment of the control points and identification of the contamination in drinking water through microbiological and chemical quality monitoring, to manage emergency cases / crisis in drinking water with the use of EU approach, to improve the current warning system were the major subjects discussed with the core working group.

In the working group meetings the major presentations done by the Italian experts were on “European framework, trends and Italian system”, “Unprecedented cyanobacterial bloom and microcystin production in a reservoir in the south of Italy: a model for emergency response and risk management”, “Chemical water quality standards: indicator parameters” “Microbiological water quality”, “Prevention and security measures against potential terrorist attacks to drinking water systems in Italy”, “Rapid methods for the analysis of bacterial indicators in drinking water”, “Web database of

procedures and methods for biological and chemical analysis of water”, “Methodologies to identify the microbiological contamination in drinking water from quality monitoring data”, “On line monitoring systems: a critical assessment” and “On line monitoring systems: practical experiences”, “WSPs for small water supplies in the European region”, “Screening of organic chemicals for the identification of unexpected pollution”, “Methodologies for the identification of chemical contamination in drinking water quality monitoring”, “Harmonisation of hygienic requirements for materials and products in contact with drinking water”, “Contamination from materials in contact with drinking water: Italian and European experiences”, “Water safety plans in buildings”.

Four guidance documents were prepared by the Italian experts, published and distributed. These documents were “Guidance on instructions for decision-making following non-compliance results in drinking water monitoring”, “Guidance on identification of contamination in drinking water”, “Guidance on early warning in drinking water”, “Guidance on management of emergency cases / crisis in drinking water” (12 - 15).

During the project İvedik water treatment unit in Ankara and İkitelli water treatment unit in İstanbul were visited. The local visit to İstanbul was also for the methodology practices.

During the project results oriented four trainings, four workshops, one study visit and one local visit were achieved.

CONCLUSION

The technical and institutional capacity of the Ministry of Health - Public Health Institution of Turkey at the central level and the Public Health Directorates of the 81 Provinces at the provincial

level were strengthened in the field of drinking water for risk assessment, early warning and management of emergency cases in line with EU Drinking Water Legislation (98/83/EC).

ACKNOWLEDGEMENT

This project was cofinanced by European Union and the Republic of Turkey. It is a twinning light partnership between Italy (Member State) and Turkey (Beneficiary).

We would like to express our deepest appreciation to all those who provided us technical and administrative assistance, expertise, knowledge, cooperation and coordination to complete this project successfully. We thank our partner Italian National Institute of Health (Istituto Superiore Di Sanita-ISS, contractor), Water Research Institute (IRSA) of the Italian National Research Council (CNR),

Studiare Sviluppo (mandated body), the Delegation of the European Union to Turkey, the Prime Ministry Undersecretariat of Treasury - Central Finance and Contracts Unit, the Ministry for EU Affairs, the Ministry of Health - Public Health Institution of Turkey - Environmental Health Department - Water Safety Unit.

We sincerely thank our Italian colleagues from ISS; Luca Lucentini (Italian project leader, Director of Inland Water Hygiene Unit, ISS), Enrico Veschetti, Emanuele Ferretti, Lucia Bonadonna, Laura Achene, Massimo Ottaviani, Federica Nigro Di Gregorio, Stefano Polesello and our Turkish colleagues from Public Health Institution of Turkey - Environmental Health Department, Dr. Hüseyin İltter (Department head), Zinnet Oğuz (Unit coordinator, key expert), Alper Köşger (IT expert) and all other Water Safety Unit staff.

KAYNAKLAR

1. Anonymous. http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/index_en.html (2015).
2. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption (OJ L 330, 5.12.1998, p.32-54).
3. Anonymous. http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/legislation_en.html (2015).
4. Anonymous. http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/review_en.html (2015).
5. The Commission Directive 2015/1787 of 6 October 2015 amending Annex II and III to Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption (OJ L 260, 7.10.2015, p.6-17).
6. European Commission-Press release “EU introduces more efficient monitoring of drinking water for better protection of public health” Brussels, 28 October 2015.
7. Council Directive 2013/51/EURATOM of 22 October 2013 laying down requirements for the protection of the health of the general public with regard to radioactive substances in water intended for human consumption (OJ L 296, 7.11.2013, p.12-21).
8. The Ministry of Health, the By-law on Water Intended for Human Consumption, Official Gazette No.25730, dated 17 February 2005. The By-law amendments Official Gazettes 31.7. 2009 dated 27305 numbered, 7.03.2013 dated 28580 numbered and 11.04.2014 dated 28969 numbered.
9. Anonymous. “Emergency case management and risk analysis in drinking water for the protection of public health” Project Fiche - SEI 2009, TR 09/IB/EN/04-TWL, 2012. (<http://www.formin.fi/public/download.aspx?ID=79205&GUID=%7BAF34C2C1-4A41-4631-A440-EBD37539BFEC%7D>)
10. Anonymous. http://ec.europa.eu/enlargement/tenders/twinning/index_en.htm 12/01/2016.
11. Anonymous. <https://eufunds.gov.mt/en/EU%20Funds%20Programmes/Other%20Programmes/Pages/Twinning-Light--Transition-Facility.aspx> (2015).
12. Anonymous. “Guidance on instructions for decision-making following non-compliance results in drinking water monitoring”, 2015.
13. Anonymous. “Guidance on identification of contamination in drinking water”, 2015.
14. Anonymous. “Guidance on early warning in drinking water”, 2015.
15. Anonymous. “Guidance on management of emergency cases/crisis in drinking water”, 2015.

Batı Nil Virüsü (BNV) ve Türkiye’de Batı Nil Virüsü’nün güncel durumu

West Nile Virus (WNV) and current status of West Nile Virus in Turkey

Yavuz UYAR, Esra BAKIR

ÖZET

Batı Nil virüsü (BNV) ilk kez 1937 yılında Uganda’da tanımlanmıştır. O günden bu yana dünyada yayılmaktadır. BNV, sivrisinek-kaynaklı (çoğunlukla *Culex*) bir insan patojeni olup Flaviviridae ailesinden Flavivirus cinsine aittir. BNV virüsü, tek zincirli bir RNA virüsüdür. BNV, doğal konakları olan vahşi kuşlardan sivrisinekler yoluyla bulaşmaktadır. Göçmen kuşlar BNV’nin coğrafik olarak yayılmasında rol oynamaktadır. Enzootik bulaşta, BNV birincil olarak sivrisinekler ve kuşlar arasında sirküle olmaktadır. BNV ile enfekte bir sivrisinek tarafından ısırılan insanlar, atlar ve diğer hayvanlar kör konaktır. İnsanlarda, 2-14 gün süren bir kuluçka dönemini klinik belirtiler izlemektedir. Hastalığın %80’i asemptomatik olarak seyretmektedir. %1’den daha az vakada, BNV ensefaliti ve ya menenjitisi görülebilir. BNV 2 genetik soya ayrılabilir. Genetik soy 1- BNV (lineage WNV 1), Afrika, Avustralya, Asya ve Akdeniz havzasında endemik olarak bulunmaktadır. Genetik soy 2- BNV (lineage WNV 2), Sahra altı Afrika’da endemiktir. Avrupa’da BNV enfeksiyonları 1950’den beri tanımlanmaktadır. Dünyada son 20 yıldır, artmış oranda salgınlar gözlenmektedir. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı tarafından, Türkiye’de 2011 Ağustos ayının ikinci ve üçüncü haftalarında konfirme edilen üç vaka bildirilmiştir. Türkiye’den ilk kez 2010 yılında, 47 BNV olgusu bildirilmiştir. Ne yazık ki, BNV enfeksiyonunun özgül bir tedavisi bulunmamaktadır. Günümüzde, insanlara yönelik aşısı

ABSTRACT

West Nile virus (WNV) was first identified in Uganda in 1937. Since then, it has spread around the world. WNV is mosquito-borne (mainly of the genus *Culex*) human pathogen and belonging to family Flaviviridae, genus Flavivirus. The WNV is a single-stranded RNA virus. WNV is transmitted by mosquitoes with wild birds as its natural hosts. Migratory birds play a role in the geographic dispersion of WNV. During enzootic transmission, WNV circulates primarily between mosquitoes and birds. Mosquitoes with WNV bite and infect people, horses, and other animals, all of whom are “dead end” host. In humans, an incubation period of 2- 14 days precedes symptoms. Eighty percent of diseases are asymptomatic. In clinical cases, WNV is associated with febrile illness. In less than 1% of cases, WNV causes encephalitis or meningitis. The WNV can be classified into two lineages. Lineage 1 WNV strains have long been endemic in Africa, Australia, Asia and Mediterranean Basin. Lineage 2 WNV strains have been endemic in sub-Saharan Africa. Human WNV infection has been described in Europe since 1950. An increased number of outbreaks have been observed over the last twenty years on the world. Three cases were confirmed by Refik Saydam National Public Health Agency, all of them were identified during the 2nd and 3rd week of August 2011 in Turkey. In 2010, 47 West Nile fever cases were reported for the first time in Turkey. Unfortunately, there is no specific treatment for WNV infection. Currently, there is no human vaccine against

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD ve Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, İstanbul



İletişim / Corresponding Author : Yavuz UYAR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD ve Tıbbi Viroloji BD, İstanbul

Tel : +90 532 556 54 00

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

Geliş Tarihi / Received : 27.05.2016

Kabul Tarihi / Accepted : 31.05.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.32757

Uyar Y, Bakır E. Batı Nil Virüsü (BNV) ve Türkiye’de Batı Nil Virüsü’nün Güncel Durumu. Türk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(3): 279-292

da mevcut değildir ve hastalıktan korunma sivrisinek ile mücadeleye bağlıdır. Bu derlemede, Türkiye'den BNV ile ilgili bildirimlerin ve çalışmaların bir araya getirilmesi ve BNV literatürünün güncel durumunun gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: batı nil virüsü, sivrisinek, culex, batı nil ateşi, Türkiye, epidemiyoloji

WNV and prevention of the diseases in humans is based on mosquito control. In this study, it was aimed to collect about WNV reports and studies from Turkey and reviewed to current status of WNV in the literature.

Key Words: west Nile virus, mosquito, culex, west Nile fever, Turkey, epidemiology

GİRİŞ

Günümüzde hastalıkların önlenmesinde en son yıllarda Avrupa ve Amerika'da salgınlarla ortaya çıkan ve dünyanın tropikal bölgeleri dışında da yaygınlığı artmakta olan Batı Nil virüsü (West Nile virus: WNV, BNV), halk sağlığı otoriteleri açısından önemi günden güne artmakta olan bir virüstür. Dünyamızdaki ekolojik ve demografik dengelerin insan kaynaklı nedenlerden dolayı değişmesiyle birlikte, bazı vektör ve rezervuar türlerinin yaşam alanlarında da farklılaşmalar meydana gelmektedir. Virüsü bulaştıran sivrisinek türlerinin yaşam alanlarının genişlemesiyle birlikte, virüs hızlı bir coğrafi yayılımı sahip olmuştur. (1). Batı Nil virüsü, çoğunlukla birçok kuş türü ile ornitofilik sivrisinek türleri arasında döngüsü olan Afrika kökenli Flavivirus ailesinden bir virüstür (2).

BNV, ilk kez 1937 yılında Uganda'nın Batı Nil bölgesinde ateşli bir enfeksiyon hastalığı geçiren bir kadının kanından izole edilmiştir (3). 1950'lerden buyana, virüsün varlığını sürdürdüğü ekolojik niş dışında dolaştığı kanıtlanmıştır. Virüsün insanlarda ve/veya atlarda sebep olduğu BNV'ye bağlı nöroinvaziv rahatsızlıkların sayısı her geçen gün artmakta ve birçok farklı bölgeden, büyük salgınlar bildirilmektedir (1).

1. BNV Epidemiyolojisi

Virüs, ilk olarak 1937 yılında Afrika kıtasında Uganda'da tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda Avrupa, Asya ve Avustralya kıtalarında da birçok bölgede varlığı gösterilmiştir (4). BNV enfeksiyonları, Avrupa'da (Fransa, Romanya, Rusya, Yunanistan, vb) ve Akdeniz havzasında yer alan birçok ülkede (Cezayir, Fas, Tunus, İsrail, vb) ve 1999'dan itibaren de Amerika kıtasında tespit edilmektedir (5).

1999 yılından itibaren Kuzey Amerika'nın birçok eyaletinde görülmeye başlayan Batı Nil virüsü, yaşanan salgınlarla birlikte bu kıtadaki yayılımını sürdürmektedir. 2000'li yıllarda her yıl birçok vaka bildirimleri yapılmış olup vaka sayıları günden güne artış göstermektedir. Her yıl görülen salgınlarla birlikte, artık Amerika kıtası da BNV enfeksiyonları için endemik hale gelmiştir (6,7). 2011 yılında ABD'nin çeşitli eyaletlerinden vakalar bildirilmiştir Amerika'da bilinen en büyük BNV salgını 2012 yılında yaşanmıştır. (8). ABD'den 1999 yılı ile 2013 yılları arasında toplam 39.557 vaka, 17.381 nöroinvaziv rahatsızlık ve 1.667 ölüm bildirilmiştir (9).

Avrupada bilinen ilk BNV salgını 1962-1963 yılları arasında Fransa'da görülmüştür. Sonrasında 1985

yılından itibaren virüsün varlığı Avrupa'nın birçok bölgesinde görülen salgınlarla bildirilmiştir. Güney Avrupa, Doğu Avrupa ve Akdeniz Havzası boyunca yayılımını sürdüren virüs kıtada ciddi halk sağlığı problemi haline gelmiştir. 2000'li yıllardan itibaren ortaya çıkan salgınların neticesinde birçok Avrupa ülkesinde süreyans programları kurulmuştur. Etkili süreyans programları ile salgınlar izlenebilmekte ve vakalar hızla kayıt altına alınabilmektedir (10).

2011 yılında İtalya'da görülen büyük salgında süreyans çalışmaları etkili olmuş, bu sayede genotip 1 ve genotip 2'nin Avrupa'daki sirkülasyonu gösterilmiştir (11). 2010-2013 yılları arasında Avusturya, Bosna Hersek, Hırvatistan, Yunanistan, Macaristan, İtalya, Kosova, Makedonya, Sırbistan, Rusya Federasyonu, Ukrayna ve İspanya'da BNV vakaları bildirilmiştir. Özellikle Yunanistan ve Rusya'da 2010 -2013 yılları arasında her yıl yüksek oranda BNV etkinliği görülmüştür (12).

Ülkemizde ise BNV enfeksiyonu, ilk olarak 2010 yılında bir salgın şeklinde görülmüş ve rapor edilmiştir. Kalaycıoğlu ve ark. tarafından bildirilen süreyans bulgularına göre, 2010 ve 2011 yıllarında 47 olguya BNV enfeksiyonu tanısı konularak uluslararası bildiri yapılmış ve ülkemizde ilk kez akut BNV enfeksiyonları bir salgın şeklinde saptanmıştır (13).

2. Vektör Özellikleri ve Bulaş Yolları

İnsan ve at popülasyonlarında görülme sıklığının artmasıyla birlikte bu bölgelerdeki BNV ekolojisi daha iyi anlaşılır olmuştur. BNV'nin doğadaki varlığı, primer vektör *Culex* cinsi sivrisinekler ile kuşlar arasındaki enzootik bulaş döngüsü ile korunur. Bu sebeple *Culex* türü sivrisinekler bulaş döngüsünde en önemli vektörlerdir (14). Kuşlar ise virüsün doğal olarak çoğaldığı birincil konak, yüksek düzeyde viremi oluşturdıklarından dolayı da en önemli rezervuardırlar. Memeli konakta yüksek viremi oluşturmadığından, özellikle enfeksiyonun çoğunlukla görüldüğü insanlar ve atlar, daha çok tesadüfi konak (dead-end host) olarak kabul edilirler ve virüsün bulaş

döngüsünde önem taşımazlar (Şekil 1) (4,15). Virüsün insandan insana doğrudan bulaşı bildirilmemiştir, fakat insandan insana bulaşın kan transfüzyonu, organ transplantasyonu ve anne sütü ile mümkün olabildiği yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (4,16).

Ciddi salgınlarla ortaya çıkan virüsün artarak yayılım göstermesi göçmen kuşların Afrika'dan Avrupa'ya gerçekleşen hareketi ile açıklanmaktadır (17). Göçmen kuşların Afrika'da kışı geçirdikleri yerlerde virüs ile enfekte olduktan sonra Avrupa'ya göçleri ile birlikte virüsün kuzeye doğru taşınmasını ve göç yolları üzerinde bulunan bölgelerde vektör-rezervuar gibi eş zamanlı bulunması gereken faktörleri barındıran alanlarda salgınlara yol açmaktadır. Yerli viremik kuşlar da virüs yayılımına katkıda bulunuyor olsa da etkileri viremik göçmen kuşlarla uzun mesafe yayılımındaki kadar değildir. Göçmen kuşların davranışları salgınların zamanlaması ve şiddeti yönünden de kritik bir belirleyicidir (Şekil 2) (4,18,19). Virüsün rezervuarı olan kuşlardan vektörlere kadar tesadüfi ve değişken birçok faktör aracılığıyla, vakaların başlangıcı ve yayılım safhası izlenebilmektedir. Virüsün yayılımını ve yayılım hızını belirleyen faktörler arasında göz önünde tutulması gerekenler; vektör ile rezervuar popülasyonunun varlığı, yoğunluğu ve topluluğun virüs yönünden yeterli doyumluğa ulaşmasıyla birlikte iklim ve arazi özelliklerini içine alan yerel çevre şartlarıdır. BNV'nin yayılımını ve bunu takiben insanlara bulaşını belirleyen önemli bir risk faktörü de, sivrisineklerin beslenme davranışları ve konak seçimleridir. İtalya ve İspanya'da yapılan çalışmalarda özellikle birkaç kuş türünün sivrisinekler için major besin kaynağı olduğu bildirilmiştir (20-22).

BNV bulaş döngüsünde bir sivrisinek türünün, vektör olarak göz önüne alınabilmesi için sahip olması gereken bazı kriterler bulunmaktadır. Bunlar:

1. *In vitro* koşullarda sivrisinek tarafından beslenmek için alınan enfekte kanın, sivrisinek tarafından bulaştırılması ve BNV'nin etkili bir şekilde enfekte etmesi,

2. Sahadaki sivrisinek türlerinin yoğunluğunun yeterli düzeyde olması,

3. Sahadaki sivrisinek türlerinden BNV'nin izolasyon sıklığı (1,23).

Culex türü sivrisinekler, BNV'nin yayılımındaki majör vektör olarak kabul görmektedir. Ancak virüs farklı en az 11 cinse ait sivrisinek türünden de izole edilmiştir. Bunlar: *Aedes*, *Aedemomyia*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Culiseta*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Orthopodomyia*, *Psorophora* ve *Uranotania*'dir. Virüsün Avrupa ve Afrika'daki yaygın vektörleri; *Culex pipiens sensu stricto*, *Culex theileri*, *Ochlerotatus caspius*, *Culex univittatus* ve *Culex antennatus*'dur. Asya'daki majör vektörler; *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui* ve *Culex pseudovishnui*'dir. Avustralya'da başlıca vektör *Culex annulirostris*; Kuzey Amerika'da *Culex pipiens* ve *Culex restuans*, Batı Amerika'da *Culex tarsalis*, Güney Amerika'da ise *Culex quinquefasciatus*'dur (24,27).

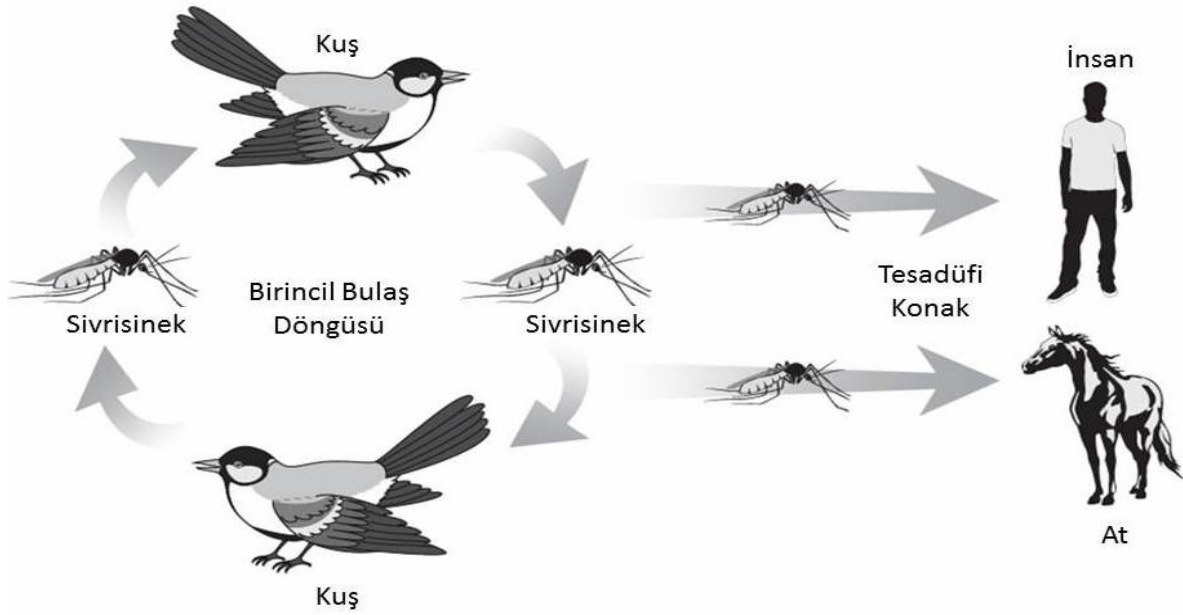
Virüs bulaşında ülkemizdeki yaygın vektör olarak *C. pipiens* gösterilmesine rağmen birçok sivrisinek türüne ait vektör kapasitesinin mevcudiyeti bilinmektedir. Ergunay ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Batı ve Güney bölgelerimizden toplanan *Ochlerotatus caspius* ve *C. pipiens* sivrisinek türlerinde BNV yönünden pozitiflik bulunmuştur. Aynı zamanda BNV pozitif havuzlara yapılan DNA barkodlama çalışmalarında pozitif olarak bulunan yedi örnekten altısının *C. quinquefasciatus* türü olduğu bildirilmiştir (28). 2005-2011 yılları arasında ülkemizde 11 farklı ilde sivrisineklerin toplanması ile yürütülen çalışmada, moleküler yöntemler ile *C. pipiens* grubunun detaylı incelenmesi sonucunda *C. pipiens*, *C. pipiens F. molestus* ve bulaşta etkinliği yüksek ve yaygın olarak görülen *C. quinquefasciatus* ilk kez saptanmıştır (29). Böylece *C. pipiens* dışında *C. quinquefasciatus* türünün yaygın vektör kapasitesinin, ülkemizdeki

BNV bulaş döngüsünde rol alacak kadar etkin olduğu belirlenmiştir. *C. quinquefasciatus*'un ülkemizde yaygın tür olmasının yanı sıra hem kuşlardan hem de memelilerden beslenmesiyle sebebiyle de BNV açısından etkili vektör olduğu düşünülmektedir (29,30).

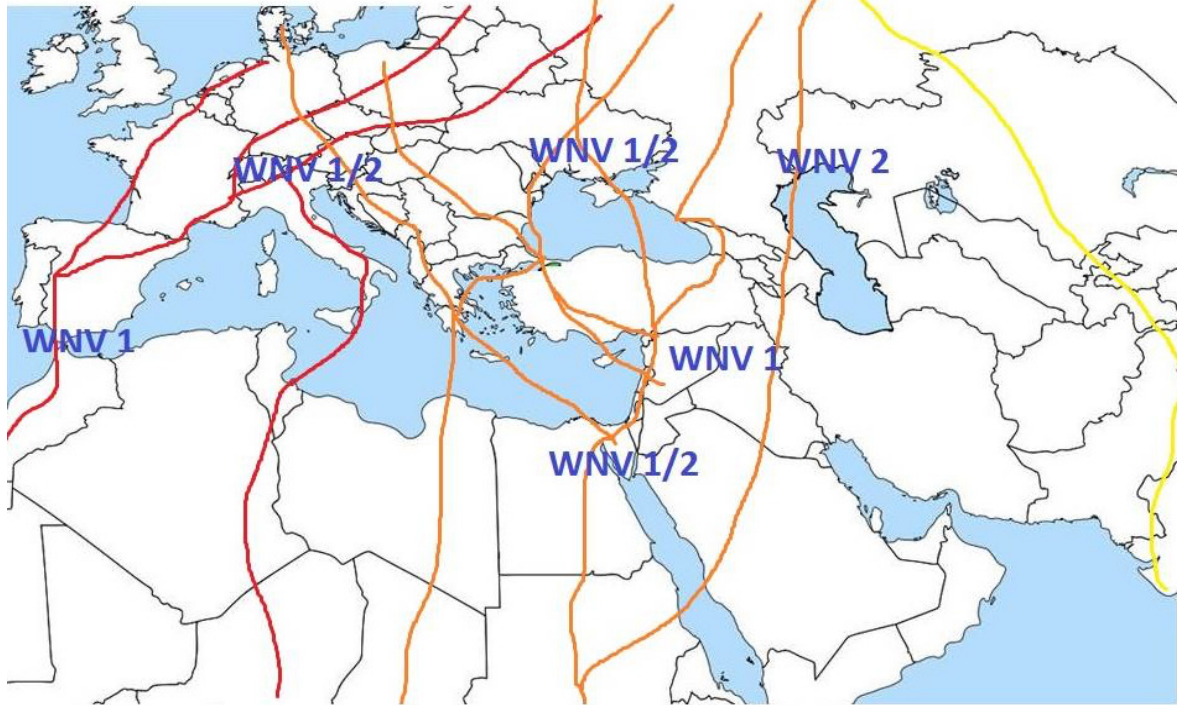
3. BNV'nin Morfolojik ve Genetik Yapısı

BNV'nin taksonomik özelliklerine göre, Flaviviridae ailesinin Flavivirus cinsinde yer alan pozitif polariteli bir RNA virüsüdür. Virüsün yapısı şematik olarak Şekil 3'de verilmiştir (31). Flavivirus cinsi içinde yer alan virüsler klasik serolojik kriterlere dayanılarak antijenik özelliklerine göre alt gruplara ayrılmıştır. BNV, Flaviviridae ailesinde yer alan Japanese Encephalitis virüsü (JEV) serokompleksi içinde yer almakta olup bu kompleks ile yakın antijenik ilişkilidir (2).

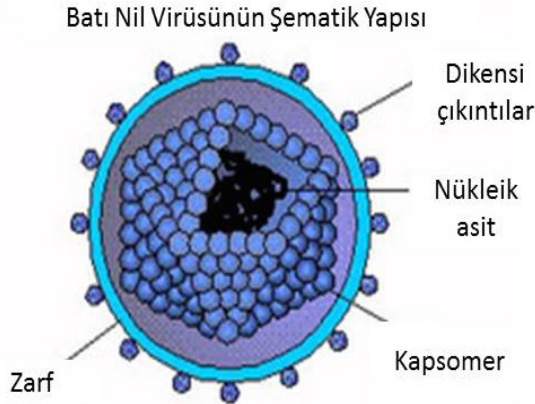
Yapılan filogenetik çalışmalar sonucu BNV izolatlarının zarf (envelop, E) proteinlerindeki aminoasit değişiklikleri ve delesyonlarına göre genetik ve coğrafik olarak çeşitlilik gösteren bir virüs oluşu belirlenmiştir (32). Genotip 1, 2 ve 5 insanlarda görülen önemli salgınlarla ilişkilendirilmektedir (33,34). Genotip 1 BNV izolatları tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup hem virülan hem de atenüe suşları içermektedir ve dağılımlarına göre üç alt dalda (clade) gruplandırılmıştır. Genotip 1-1a dağılımı Afrika, Avrupa, Orta Doğu, Asya ve Amerika suşlarını içerirken, Genotip 1-1b Avustralya'da saptanan Kunjin virus suşlarını ve Genotip 1-1c ise Hindistan suşlarını içermektedir. Genotip 2 ise özellikle Sahra Altı Afrika ve Madagaskar'da bulunan suşları içermektedir. Genotip 2'ye ait suşların, Genotip 1'e ait suşlara göre daha az virülan özellikte olduğu kabul edilmektedir. Fakat yakın dönemde Avrupa'da Genotip 2' ye ait birkaç virülan suş saptanmıştır (32,35).



Şekil 1. Batı Nil virüsünün bulaş döngüsü



Şekil 2. Ülkemizin de yer aldığı coğrafyada ana kuş göç yolları ve sıklıkla saptanan Batı Nil Virüsü (WNV) genotipleri



Şekil 3. Batı Nil Virüsü'nün şematik yapısı

Son çalışmalarda ise her iki suşun da yüksek ve düşük nöroinvazivite ile ilişkili fenotiplerinin olduğu gösterilmiştir. Her iki suşun da virülan ve attenüe türleri içermekte olduğu ve patojenitelerindeki bu farklılığın ise virüsün prM, E veya yapısal olmayan proteinlerindeki özgül bölgeleri kodlayan nükleotidler ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (36). Son zamanlarda yapılan filogenetik analizler sonucu başka genetik kökenlerin varlığı da bildirilmiştir. Genotip 3'e ait suşların 1997 ve 1999 yıllarında Çek Cumhuriyeti'nde toplanan sivrisineklerde yapılan çalışmalarda yalnızca sivrisinek hücrelerini enfekte eden izolatları temsil ettiği deneysel olarak gösterilmiştir (37). Genotip 4, 1998'den beri Rusya'da sirkülasyonu olan ve Güney-Batı Kafkaslarda kenelerden elde edilen izolatlar ile Volga Nehri deltasında sürüngen ve sivrisinek izolatlarını içermektedir. Genotip 5 ise 1955'den beri varlığı bilinen Hindistan izolatları Genotip 1-1c ile ilişkilendirilmektedir (38,39).

4. BNV Enfeksiyonu Klinik Bulguları

BNV ile enfekte olan bireylerde enfeksiyon genellikle asemptomatik serokonversiyon yada subklinik enfeksiyonlar şeklindedir. BNV enfeksiyonu inkübasyon periyodu 2-15 gün arasındadır ve grip benzeri hastalık şeklinde ortaya çıkmaktadır (40). Enfekte bireylerin %20'sinde ateşli hastalık olarak bilinen "Batı Nil Ateşi" görülürken, %1'den az sayıda bireyde nöroinvaziv rahatsızlıklar şeklinde ortaya çıkmaktadır (41). Nöroinvaziv olguların %55-60'ının ensefalit ile sonuçlandığı, bunun da %20'sinin ölüm ile seyrettiği tahmin edilmektedir (42). Batı Nil virüsü enfeksiyonlarının semptomları baş ağrısı, ani ateş, sırt ağrısı, deride kızarıklıklar, lenfadenopati şeklinde görülmektedir. Daha şiddetli olgularda ise baş ağrısı ile birlikte görülen yüksek ateş, vücut kaslarında zayıflık, boyunu dik tutamama, uyuşukluk, zihinsel karışıklık, koma, kas titremeleri, konvülsiyonlar ve sonuçta paralizi şeklindedir. BNV benzeri klinik semptomlar gösteren, ensefalit, aseptik menenjit ve ateşli hastalık etkeni birçok patojen bulunmaktadır (41,43).

Ülkemizde BNV enfeksiyonu, Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan yönetmelik ile bildirim zorunlu bulaşıcı hastalıklar listesinde yer almıştır (44). Sağlık Bakanlığı Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Rehberi'ne göre tanı ve bildirim için gerekli olası ve kesin tanı kriterleri şunlardır (45):

- Serumda özgül anti-BNV IgM, yüksek titrede IgG antikor yanıtı ile birlikte pozitif bulunmuş ise "olası tanı" bulgusudur.
- IgM antikorları sağlam bir kan-beyin bariyerini geçemez. Bu nedenle, BOS örneğinde özgül anti-BNV IgM antikor titresi pozitifliği, akut santral sinir sistemi enfeksiyonunu gösterir; "kesin tanı" bulgusudur.
- Kanda IgM antikorları 2-3 ay kadar devam edebilir. IgM antikorları için diğer filavirüslerle çapraz reaksiyon olasılığı akıldan tutulmalıdır.

ç. Serumda saptanan anti-BNV IgM ve IgG titreleri nötralizasyon testi ile doğrulanıyorsa “kesin tanı” bulgusudur.

d. Çok kısa süren viremi nedeniyle virüsün serum ve BOS’tan izolasyonu hayli güçtür. Daha çok beyin biyopsilerinden izole etmek mümkündür. Virüsün izolasyonu yapılabildiyse “kesin tanı” bulgusudur.

e. Kan veya BOS’tan BNV nükleik asidinin tespiti “kesin tanı” bulgusudur.

5. Laboratuvar Tanısı

BNV tanısında hastanın klinik özelliklerine ve hikayesine dayanılarak enfeksiyonun varlığından şüphelenilebilir. Fakat tanı konulabilmesi için spesifik laboratuvar testlerinin sonuçları gereklidir. BNV enfeksiyonlarının tanısında virüsün hücre kültüründe izolasyonu, viral antijen tayini ya da moleküler yöntemler ile nükleik asidin saptanması ve virüse karşı oluşan özgül IgM ve IgG gibi antikorların gösterilmesi gibi yöntemler kullanılmaktadır (46-48).

Tanıda, virüs izolasyonu altın standart olmasına rağmen yüksek viremi izlenen vektörler ve kuşlar haricinde, insanlarda ortaya çıkan viremi düşük düzeyde olduğundan genellikle virüs izolasyon çalışmalarında istenilen başarı elde edilememektedir. Bu sebeple tanı için serolojik yöntemler en uygun yaklaşım olarak görülmektedir. Hastalık şüphesi olan kişilerde ve klinik belirtilerin görüldüğü dönemde, serum, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve diğer vücut sıvılarında virüs teşhis edilebilmektedir (41,49). ELISA ile serolojik tanıda flaviviruslar (Sarı humma, hepatit C, TBE, Zika ...) arasında görülen çapraz reaksiyonlar göz önünde tutulmalı ve yalnızca tarama testi olarak kullanılmalıdır. Pozitif bulunan örneklerde Plak redüksiyon ve nötralizasyon testleri (PRNT) gibi virüs spesifitesini belirleyen yöntemler ile gerekli doğrulamanın yapılması gerekmektedir (48,42).

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından yayımlanan Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Rehberi’ne göre klinik veya epidemiyolojik duruma

göre kullanılacak testler için tercih sıralaması şu şekilde verilmiştir (45):

A. BNV enfeksiyonu şüphesi (nöroinvaziv hastalık ve/veya BNV ateşi)

1. MAC EIA (antibody Capture IgM ELISA)

2. İndirekt IgG ELISA

3. IFA (İmmünfloresan Antikor)

4. Hücre Kültüründe virüs izolasyonu

5. RT-PCR (Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi)

6. rRT-PCR (Real-time -gerçek zamanlı- Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi)

7. PRNT90 (Plak redüksiyon nötralizasyon testi 90)

B. Seroprevalans çalışmaları

1. PRNT90 (Plak redüksiyon nötralizasyon testi 90)

2. İndirekt IgG EIA

3. IFA

4. Epitop blocking EIA

C. Kan ve organ bağışlarının taranması tercih sırasına göre testler

1. Nükleik asit tabanlı testler

6. Tedavi ve Korunma Yöntemleri

Dünyanın çeşitli bölgelerinde ve son yıllarda da ülkemizde kamu sağlığı açısından endişe yaratan BNV’ye karşı geliştirilmiş spesifik bir tedavi ve aşı bulunmamaktadır. Fakat enfeksiyona karşı kullanılmak üzere, tedavi edici çeşitli ajanlar geliştirmesine yönelik çalışmalar sürdürülmektedir (50). Yıllan yıla salgınları tahmin zorluğu ve hastaların gecikmiş tanısı, spesifik tedavi geliştirilmesi için yapılan klinik denemelerde problemlere neden olmaktadır (43).

Enfeksiyonun semptomatik olarak görüldüğü hastalarda öncelikle destek tedavisi uygulanmaktadır. Bu amaçla, baş ağrısı/kas ağrısı, ateş ve bulantı/kusma gibi enfeksiyon varlığına ait belirtileri gösteren hastalar için öncelikli olarak analjezik, antipiretik ve

antiemetik ilaçlar kullanılabilir (51).

Toplumda BNV risklerini azaltmada sivrisinek kontrolü, insan ve çevre faktörlerinin modifikasyonu ile aktif süveyans programlarını içeren entegre bir yaklaşım gerekmektedir. Kişisel koruyucu önlemler BNV'ye karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Alınabilecek birçok kişisel önlem ile enfeksiyon riski azaltılabilir. Riskli bölgelerde sivrisinek maruziyetine karşı, cibinlik, sinek kovucu, sivrisinek tuzakları ve diğer cihazların kullanılması sivrisinek sokma riskini azaltmada etkili yöntemlerdir (52).

Toplum düzeyinde önlem alınabilmesi için hastalığın kontrolü amacıyla öncelikle bölgedeki ve çevredeki olguların izlenmesi, sivrisinek larva haritasının bilinmesi ve güncellenmesi, yetişkin sivrisinek kontrolü, atlardaki enfeksiyonun ve kuşlardaki ölümlerin izlenmesi gerekmektedir. Alınacak önlemlerin uygulaması BNV aktivitesinin mevcut olduğu bölgelerin yerel yönetimleri tarafından uygulanmalıdır. Bunlar arasında da; vektörlerin larva ve erişkin formlarının kitlesel olarak yok edilmesini kapsayan ilaçlama çalışmaları, bulaş ve korunma konusunda halkın eğitimi, kuşlar, diğer hayvanlar, sivrisinekler ve insanlarda süveyans çalışmalarının programlanması yer almaktadır. Bireysel ve toplum bazında alınacak önlemlerin yanı sıra bir bölgede kuş ve at ölümlerinin sık gözlemlendiği durumlarda vakit kaybedilmeden ilgili sağlık kuruluşlarına haber verilmelidir (4,53)

Dış ortamlara dayanıklı olmayan BNV ısı, lipid çözücüler veya deterjan içeren dezenfektanlar içinde hızlı bir şekilde inaktive olur. Maruz kalacak deriye uygulanan DEET (N,N-dietil-m-toluamid) ya da permetrin içeren kremler nispeten toksik olmayan ve etkili sinek kovuculardır. Kullanılacak bu tür önlemlerle birlikte sivrisinek sokma riskini azaltmada yardımcı kişisel koruyucu önlemler teşvik edilmelidir (43).

7. BNV'nin Türkiye'deki Güncel Durumu

BNV varlığının ülkemizde çeşitli çalışmalarla gösterilmesine karşın tüm bölgelerimizdeki seroprevalansının dağılımına ilişkin veriler henüz sınırlıdır (Tablo 1). Fakat BNV'ye dair artan insan ve hayvan vaka olguları ile sivrisinek süveyans çalışmalarında elde edilen veriler virüsün ülkemizde halk sağlığı açısından önem arz eden bir problem haline dönüştüğüne işaret etmektedir (29).

Virüsün ülkemizdeki varlığına ilişkin ilk veriler 1970'li yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarla elde edilmiştir. Radda ve ark. Ankara ve Hatay'da yaptığı çalışmada, hemaglütinasyon inhibisyon (HI) ve nötralizasyon testi (NT) ile %0.9-%20 arasında değişen pozitiflik saptanmıştır (53). Ari ve ark. 1970'li yıllarda yaptığı çalışmada da İstanbul, Ankara, İzmir ve Konya illerinde seropozitiflikler saptanmıştır (55). Meço tarafından Güneydoğu Anadolu bölgesinde 937 kişinin serum örneğiyle yapılan çalışmada %42,8 oranında yüksek bir seropozitiflik saptanmıştır (56). Ancak bu ve benzeri çalışmalarda elde edilen seropozitiflik oranlarının yüksek olması, hemaglütinasyon inhibisyon yönteminde Flavivirüsler arasında antijenik çapraz reaksiyonlara bağlı olarak ortaya çıkan bir sonuca işaret etmektedir (56). Yine Serter tarafından 1980 yılında Ege bölgesi kaynaklı bir başka çalışmada ise hemaglütinasyon inhibisyon yöntemiyle %29,1 oranında seropozitiflik saptanmıştır (57).

2006 yılında Özkul ve ark tarafından yürütülen çalışmada 10 farklı ilden toplanan çeşitli hayvan ve insan serum örneklerinin incelenmesi sonucunda BNV seropozitiflikleri hayvanlarda %1-37,7, insanlarda ise %20,4 olarak bildirilmiştir (58).

Güneydoğu Anadolu bölgesinde Şanlıurfa ve Siverek'de 2007 yılında yapılan bir başka çalışmada, 181 sağlıklı kişiden alınan serum örneklerinin indirekt immüno Floresan yöntemiyle incelenmesi sonucunda seropozitiflik oranı %16 olarak bulunmuş ve bu

Tablo 1. Türkiye’de Batı Nil Virüsü (BNV) ile ilgili yapılan bildirimler, çalışmalar ve sonuçları

Araştırmacılar	Yayın Yılı	Yöntem	Çalışılan Popülasyon	Bölge / İl	Çalışmanın Sonucu
Radda ve ark. (54)	1971	HI, NT	Evcil Hayvan (serum) (214 koyun)	Ankara ve Hatay	BNV aktif %20-%0,9
Ari ve ark. (55)	1972	HI	İnsan (serum)	İzmir, İstanbul, Ankara, Konya	Seropozitiflik saptandı
Meço O. (56)	1977	HI	İnsan (serum)	Şanlıurfa, Mardin, Diyarbakır, Elazığ, Siirt	%38 - 42,8
Serter D. (57)	1980	HI, NT	İnsan (serum)	Ege Bölgesi	%29,1(HI) %21,5(NT)
Özkul A. (58)	2006	HI, NT	Katır (40), sığır (100), köpek (114), at (259), koyun (100) ve insan (88) (764 serum)	Hatay, Adana, Antalya, Muğla, İzmir, Urfa, Bursa, Ankara	Katır (%2,5), sığır (%4), köpek (%37,7), at(%13,5), koyun(%1) ve insan(%20,4)
Ergunay K. (59)	2007	IIFT, NT	İnsan (181sağlıklı kan donörü)	Şanlıurfa/Siverek	%16 (IIFT) %9,5(NT)
Ergunay K. (63)	2010	ELISA, IIFT, PRNT	Donör (2516 sağlıklı kan donörü)	Ankara, Konya, Yozgat, Sivas	%0,99 (ELISA, IIFT), %0,56(PRNT)
Hızel K. (64)	2010	ELISA, PCR	İnsan (2821 sağlıklı kan donörü)	Ankara	%2,4 (ELISA), BNV RNA(-)
Kalaycıoğlu H. (13)	2012	ELISA, IFA, PRNT	Rutin sürveyans (Klinik olgular)	Manisa, Sakarya, Muğla, Balıkesir, İzmir (15 il)	37 olası, 12 doğrulanmış vaka
Özkul A. (63)	2011	Real-time PCR, PRNT	İnsan (klinik vaka) ve at(180)	Ankara ve Eskişehir	İnsan/BNV RNA (+), at %31,6 (PRNT)
Ayturan Ş. (61)	2011	ELISA, PRNT	İnsan (1200 sağlıklı kan donörü)	Ankara	%1,6 (ELISA), %0,8 (PRNT)
Şahiner F. (60)	2012	Real time RT-PCR	İnsan (729 sağlıklı kan donörü)	Ankara	BNV RNA (-)
Yazıcı Z. (67)	2012	Real time RT-PCR	At(120)	Samsun, Sinop, Amasya, Tokat	BNV RNA (-)
Karakoç ZÇ. (62)	2013	ELISA, IFA, MNTA	İnsan (307 şüpheli vaka)	Mardin/Zergan nehri civarı	MNTA (%17)
Erdem H. (66)	2013	ELISA, IFA, NT, IgG Avidite	İnsan (18 klinik bulgulu vakalar, 296 sağlıklı kan donörü)	Edirne, Tekirdağ, Kırklareli, Çanakkale, İstanbul, Çorlu, Çerkezköy	Klinik vakalar;1 BNV RNA (+), 4 BNV RNA ve NT(+), 2 NT ve IgG avidite (+), Kan donörleri; %7,4 (ELISA) ve %1,7 (NT)
Albayrak H. (68)	2013	C- ELISA	Sığır (70), at(70), koyun (70), keçi (70), buffalo(70),	Karadeniz Bölgesi	%2,85 (keçi)
Ergunay K. (69)	2014	PRNT	At (389), ördek (423), koyun (102),insan (266)	Şanlıurfa, Kars, Van, Adana, Muğla, Mersin	PRNT ; At (Ş.Urfa- Van /%13,8 -%10,5), ördek (Kars/%9,9), İnsan (Mersin/%12,1) PCR; at (Adana, Mersin, Muğla/ %4,9-%8,2-%19), insan (Mersin/ BNV RNA (-))
Toplu N. (71)	2015	IHC, ISH, ELISA	At (5 /nörolojik semptomlu)	Ege Bölgesi	ELISA, ISH, IHC (pozitif)
Biçerlioğlu SU. (70)	2015	ELISA, real time PCR	İnsan (438 sağlıklı donör)	İzmir	%2,51 (ELISA)
Bakır E. (72)	2015	ELISA, IFA, PCR	İnsan (226 sağlıklı kan donörü)	Edirne, İstanbul, Kocaeli, Sakarya	%0,9 (ELISA), BNV RNA (-)

seropozitifliklerin %9,5'i plak redüksiyon nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır (59). 2009 yılında Ankara'da Ağustos ile Eylül ayları arasında toplanan 729 sağlıklı kan donörüne ait örneklerde real time-PCR ile yapılan çalışmalarda BNV RNA saptanamamıştır (60). 2009 yılında Ankara ilinde bulunan Hacettepe Üniversite'sine başvuran 1200 sağlıklı kan donörüne ait örneklerle yürütülen çalışmada ise ELISA ile %1.6 seropozitiflik saptanmıştır. Pozitif bulunan örneklerin %0.8'i ise PRNT ile doğrulanmıştır (61). 2009 yılında şüpheli vakaların varlığı üzerine yürütülen bir başka çalışma Türkiye'nin Suriye sınırına yakın bir bölgesi olan Zergan nehri civarındadır. 307 şüpheli vakaya ait örnekler arasında ELISA ile pozitif bulunan örnekler IFA ile değerlendirilmiştir. Pozitif bulunan örneklerin doğrulanması için mikronötralizasyon (MNTA) testi uygulanmış, %17 oranında pozitiflik saptanmıştır (62). Orta ve Kuzey Anadolu'da 2516 kan donörü ile yürütülen bir çalışmada ise ELISA tekniği ile %0,99 IgG sınıfı antikor pozitifliği saptanmıştır. Pozitif örneklerin PRNT yöntemi ile doğrulanması sonucunda %0,56'sının pozitif olduğu ve pozitif saptanan örnekler ile de virüsün Orta Anadolu'da varlığı gösterilmiştir (63). Hızal K ve ark. tarafından Ankara'da kan donörleriyle yürütülen çalışmada ELISA ile %2,4 seropozitiflik saptanırken, pozitif örneklerle yapılan PCR'da BNV RNA saptanamamıştır (64).

BNV'ye dair ülkemizdeki ilk resmi vakalar 2010-2011 yılları arasında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'ne 15 farklı ilimizden gelen BNV enfeksiyonu şüpheli hastaların örneklerinin incelenmesi sonucunda ortaya konmuştur. 47 olguya BNV enfeksiyonu tanısı konularak ülkemizde ilk kez akut BNV enfeksiyonları saptanmış ve uluslararası bildirim yapılmıştır. Vaka bildirimlerinin ağırlıklı olarak Batı illerimizden olması da virüsün Türkiye'nin batısında endemik hale geldiğine işaret etmektedir (13). Aynı yıllarda Ankara ve Eskişehir kaynaklı eş zamanlı olarak at ve insan BNV enfeksiyonu olguları saptanmış ve yapılan kısmi genom analizlerinde, ülkemizde dolaşımda bulunan virüsün "Lineage 1" izolatlarına benzerliği genetik analizler sonucunda ortaya konulmuştur. Aynı

çalışmada 180 at serumunda BNV spesifik antikorları %31,6 bulunmuştur (65).

2012 yılında Trakya bölgesinde akut klinik vakalar ile bölgesel rutin surveians çalışmaları için kan donörlerinden toplanan örneklerle yapılan laboratuvar çalışmalarında, klinik vakalara ait örneklerde BNV RNA pozitifliği saptanmıştır. Kan donörlerine ait örneklerde de ELISA ve NT ile %7,4 ve %1,7 oranlarında pozitiflik elde edilmiştir (66).

2012 yılında Samsun, Sinop, Amasya ve Tokat illerinde yürütülen bir çalışmada ise 120 at serumunda real time PCR ile BNV varlığı araştırılmış ancak viral RNA saptanmadığı bildirilmiştir (67). Albayrak ve ark.'nın yürüttüğü hayvan kaynaklı bir çalışmada ise yalnızca keçilere ait serum örneklerinde %2,85 oranında seropozitiflik saptanmıştır. Ülkemizin Batı, Orta ve Güney illerinin iklim şartlarının vektör aktivitesi yönünden Karadeniz Bölgesi'ne göre daha uygundur. Karadeniz Bölgesi'nde yapılan çalışmalarda elde edilen verilere bakıldığında vektör kapasitesinin sıcaklık, nem ve yağmur gibi iklim şartlarıyla olan anlamlı ilişkisi dikkat çekmektedir (68).

2011-2013 yılları arasında ülkemizde 15 farklı ilde, BNV dağılımını ve sıklığını göstermek amacıyla insan, at, koyun ve ördeklerden toplanan serum örnekleriyle yürütülen çalışmada PRNT ile BNV maruziyeti çeşitli oranlarda saptanan pozitiflikler ile gösterilmiştir. Elde edilen bu veriler ile ülkemizin birçok bölgesinde BNV'nin dağılımının yaygın olduğu görülmüştür (69).

İzmir'de 2010 yılında Ege Üniversitesi Kan Merkezi'ne başvuran sağlıklı 438 kan donöründe yapılan çalışmada tüm örneklerde BNV viral RNA'sı negatif olarak bulunmuştur. Fakat 11(%2,51) örnekte IgG antikor pozitifliği saptanmıştır (70). Ege Bölgesi'nde nörolojik semptomların görüldüğü at olgularında ise ELISA, immünohistokimyasal ve in situ hibridizasyon ile BNV yönünden pozitiflikleri gösterilmiştir (71).

Bakır, tez çalışmasında, BNV'nin dolaşımda olduğu Nisan-Eylül 2014 döneminde Marmara Bölgesi

illerinde yer alan kan donörlerinde yaptığı serolojik ve moleküler araştırmasında BNV viral genomunu saptayamamıştır. Örneklerin 84'ü İstanbul, 60'ı Edirne, 58'i Kocaeli ve 24'ü Sakarya iline ait olup BNV IgG ve IgM antikor varlığı ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. BNV IgG ve IgM antikor pozitifliğinin teyit edilmesi ise, indirekt immüno Floresan antikor (IFA) testi ile yapılmıştır. ELISA yöntemi ile BNV antikor (IgM ve IgG) varlığı aranan örneklerin iki (%0,9)'ünde özgül BNV IgM antikor pozitifliği ve iki (%0,9) örnekte BNV IgG antikor pozitifliği saptanmıştır. ELISA ile negatif

bulunan fakat anket verileri incelendiğinde arboviral enfeksiyonlar açısından yüksek risk faktörlerini bulundurduğu kabul edilen 42 donöre ait örneğe IFA testi uygulanmış ve 42 örneğin dört (%9,5)'ünde IgM antikor pozitifliği, dört (%9,5)'ünde ise IgG antikor pozitifliği saptanmıştır (72).

Sonuç olarak, bulaşta rol oynayan vektörlerin coğrafyamızda varlığıyla ve kuşların göç yollarının ülkemizden de geçmesiyle birlikte BNV dünyada olduğu gibi ülkemizde de sporadik ya da salgınlar şeklinde kendini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Rizzoli A, Jimenez-Clavero MA, Barzon L, Cordioli P, Figuerola J, Koraka P, et al. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Euro Surveill*, 2015 (a) May 21;20(20).
2. Murray KO, Walker C, Gould E. The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: A decade of advancements in research since its introduction into Western Hemisphere. *Epidemiol. Infect*, 2011; 139: 807-17.
3. Smithburn K, Hughes T, Burke A. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med*, 1940; 20: 471-92
4. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis*, 2005;11(8):1167-73.
5. Paz S. Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015; 5:370 (1665).
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). West Nile virus and other arboviral diseases - United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2013; 62(25): 513-17.
7. O'Leary DR, Marfin AA, Montgomery SP, Kipp AM, Lehman JA, Biggerstaff BJ, et al. The epidemic of West Nile virus in the United States. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2004; 4: 61-70.
8. Johnson MG, Adams J, McDonald-Hamm C, Wendelboe A, Bradley KK. Seasonality and survival associated with three outbreak seasons of West Nile virus disease in Oklahoma-2003, 2007, and 2012. *J Med Virol*, 2015; 87 (10): 1633-40.
9. Centers for Disease Control and Prevention, "West Nile virus statistics and maps," 2013, <http://www.cdc.gov/westnile/stats-Maps/>. (Erişim tarihi: 26.05.2016)
10. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004; 23 (3): 147-56.
11. Magurano F, Remoli ME, Baggieri M, Fortuna C, Marchi A, Fiorentini C, et al. Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clin Microbiol Infect*, 2012; 18 (12): E545-7.
12. European Centre for Disease Prevention and Control, "Historical data," 2013, http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/westnilefever/West-Nile-fever_maps/Pages/historical-data.aspx. (Erişim tarihi: 26.05.2016)

13. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, Oncul O, Tosun S, Karabay O, et al. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveill*, 2012 May 24; 17 (21).
14. Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E. West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. *Clin Microbiol Rev*, 2012; 25 (4): 635-48.
15. Hubálek Z, Halouzka J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*, 1999; 5 (5): 643-50.
16. Hayes EB, O'Leary DR. West Nile virus infection: a pediatric perspective. *Pediatrics*, 2004; 113 (5): 1375-81.
17. Rappole JH, Hubálek Z. Migratory birds and West Nile virus. *J Appl Microbiol*, 2003; 94 Suppl: 475-585.
18. Blitvich BJ. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim Health Res Rev*, 2008; 1: 71-86.
19. Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis*, 2000; 6 (4): 319-28.
20. Muñoz J, Ruiz S, Soriguer R, Alcaide M, Viana DS, Roiz D, et al. Feeding patterns of potential West Nile virus vectors in south-west Spain. *PLoS One*, 2012; 7 (6): e39549.
21. Hamer GL, Kitron UD, Goldberg TL, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, et al. Host selection by *Culex pipiens* mosquitoes and West Nile virus amplification. *Am J Trop Med Hyg*, 2009; 80 (2): 268-78.
22. Roiz D, Vazquez A, Rosà R, Muñoz J, Arnoldi D, Rosso F, et al. Blood meal analysis, flavivirus screening, and influence of meteorological variables on the dynamics of potential mosquito vectors of West Nile virus in northern Italy. *J Vector Ecol*, 2012; 37 (1): 20-8.
23. Turell MJ, O'Guinn M and Oliver J. Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg*, 2000; 62: 413-414.
24. Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, Oguinn ML, Andreadis TG, Blow JA. An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *J Med Entomol*, 2005; 42 (1): 57-62.
25. Balenghien T, Vazeille M, Grandadam M, Schaffner F, Zeller H, Reiter P, et al. Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2008; 8(5):589-95.
26. Rizzoli A, Bolzoni L, Chadwick EA, Capelli G, Montarsi F, Grisenti M, et al. Understanding West Nile virus ecology in Europe: *Culex pipiens* host feeding preference in a hotspot of virus emergence. *Parasit Vectors*, 2015(b)Apr 9;8:213.
27. Andreadis TG. The contribution of *Culex pipiens* complex mosquitoes to transmission and persistence of West Nile virus in North America. *J Am Mosq Control Assoc*, 2012; 28(4 Suppl):137-51.
28. Ergunay K, Gunay F, Erisoz Kasap O, Oter K, Gargari S, Karaoglu T, et al. Serological, molecular and entomological surveillance demonstrates widespread circulation of West Nile virus in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014; 24;8(7):e3028.
29. Gunay F, Alten B, Simsek F, Aldemir A, Linton YM. Barcoding Turkish *Culex* mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden diversity and new potential vectors. *Acta Trop*, 2015;143:112-20.
30. Kumari R, Kumar K, Rawat A, Singh G, Yadav NK, Chauhan LS. First indigenous transmission of Japanese Encephalitis in urban areas of National Capital Territory of Delhi, India. *Trop Med Int Health*, 2013;18(6):743-9.
31. Monini M, Falcone E, Busani L, Romi R, Ruggeri FM. West nile virus: characteristics of an African virus adapting to the third millennium world. *Open Virol J*, 2010; 22(4):42-51.
32. Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, 2002; 298: 96-105.
33. Sejvar JJ. West nile virus; an historical overview. *Ochsner J*, 2003; 5(3): 6-10.
34. Murgue B, Murri S, Triki H. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann NY Acad Sci*, 2001; 951: 117-126.
35. Ciccozzi M, Peletto S, Cella E, Giovanetti M, Lai A, Gabanelli E, et al. Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infect Genet Evol*, 2013; 17: 46-50.

36. Murray KO, Mertens E, Despres P. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res*, 2010; 41(6): 67.
37. Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis*, 2005;11(2):225-31.
38. Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int*, 2015:376230.
39. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett AD. Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol*, 2011;85(6):2964-74.
40. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis*, 2005; 11(8): 1174-9.
41. Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, Fyodorova M, Gaibani P, Gould E, et al. West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Infect*, 2013;19(8):699-704.
42. Sambri V, Capobianchi MR, Cavrini F, Charrel R, Donoso-Mantke O, Escadafal C, et al. Diagnosis of West Nile Virus Human Infections: Overview and Proposal of Diagnostic Protocols Considering the Results of External Quality Assessment Studies. *Viruses*, 2013; 5(10): 2329-48.
43. Gray TJ, Webb CE. A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. *Int J Gen Med*, 2014; 11(7):193-203.
44. Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 - 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (Erişim tarihi: 26.05.2016).
45. T. C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Rehberi, 2015. <http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/viroloji/UMS-V-MT-15-Bati-Nil-Virusu-enfeksiyonu.pdf> (Erişim tarihi: 26.05.2016).
46. Rossini G, Carletti F, Bordi L, Cavrini F, Gaibani P, Landini MP, et al. Phylogenetic analysis of West Nile virus isolates, Italy, 2008-2009. *Emerg Infect Dis*, 2011;17(5):903-6.
47. Busch MP, Kleinman SH, Tobler LH, Kamel HT, Norris PJ, Walsh I, et al. Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. *J Infect Dis*, 2008;198(7):984-93.
48. Sánchez MD, Pierson TC, McAllister D, Hanna SL, Puffer BA, Valentine LE, et al. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology*, 2005;336(1):70-82.
49. Tilley PA, Fox JD, Jayaraman GC, Preiksaitis JK. Nucleic acid testing for west nile virus RNA in plasma enhances rapid diagnosis of acute infection in symptomatic patients. *J Infect Dis*, 2006;193(10):1361-4.
50. Pliego Zamora A, Edmonds JH, Reynolds MJ, Khromykh AA, Ralph SJ. The in vitro and in vivo antiviral properties of combined monoterpene alcohols against West Nile virus infection. *Virology*, 2016;495:18-3.
51. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. West Nile virus: review of the literature. *JAMA*, 2013;310(3):308-15.
52. Debboun M, Strickman D. Insect repellents and associated personal protection for a reduction in human disease. *Med Vet Entomol*, 2013;27(1):1-9.
53. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). West Nile virus and other arboviral diseases - United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2013;62(25):513-17.
54. Radda, A. Antibodies against group A and B Arboviruses in domestic animals from Turkey. *EU Tip Fak Mec*, 1971;10:227-30.
55. Ari, A. Studies on activity and ecology of arboviruses in Turkey. *Turk Hij Tecr Biyol Derg*, 1972; 32:134-43.
56. Meço O. West Nile arbovirus antibodies with hemagglutinationinhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia. *Mikrobiyol Bul*, 1977;11:3-17.
57. Serter D. Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey. *Zbl Bakt S*, 1980; (9):155-61.
58. Ozkul A, Yildirim Y, Pinar D, Akcali A, Yılmaz V, Colak D. Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol infect*, 2006; 134(4):826-9.

59. Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S, Ustacelebi S. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2007; 7: 157-61.
60. Sahiner F, Avcı İY, Bedir O, Koru O, Sener K, Yapar M, et al. Investigation of West Nile virus RNA in blood donors by real-time RT-PCR. *Mikrobiyol Bul*, 2012;46(3):464-9.
61. Ayturan S, Aydoğan S, Ergünay K, Özcebe OI, Us D. Investigation of West Nile virus seroprevalence in Hacettepe University Hospital blood donors and confirmation of the positive results by plaque reduction neutralization test. *Mikrobiyol Bul*, 2011;45(1):113-24.
62. Karakoç ZÇ, Tüzüner BM, Ergonul O, Pierro A, Di Fonzo E, Koruk İ, et al. West Nile virus infection in the Mesopotamia region, Syria border of Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2013;13(10):739-43.
63. Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, Menemenliođlu D, Turan HM, Ozkul A, et al. West Nile virus seroprevalence in blood donors from Central Anatolia, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2010;10(8):771-5.
64. Hızal K, Yenicesu İ, Erdal B, Yeşilyurt E, Fidan İ, Kalkancı A, et al. Investigation of West Nile virus seroprevalence in healthy blood donors. *Mikrobiyol Bul*, 2010;44(3):425-30.
65. Ozkul A, Ergunay K, Koysuren A, Alkan F, Arsava EM, Tezcan S, et al. Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for circulation of lineage 1 viruses. *Int J Infect Dis*, 2013;17(7):546-51.
66. Erdem H, Ergunay K, Yilmaz A, Naz H, Akata F, Inan AS, et al. Emergence and co-infections of West Nile virus and Toscana virus in Eastern Thrace, Turkey. *Clin Microbiol Infect*, 2014;20(4):319-25.
67. Yazici Z, Albayrak H, Ozan E, Gumusova S. The first investigation of west Nile virus in horses using real time rt-PCR in middle black sea region in Turkey. *J Arthropod Borne Dis*, 2012;6(2):151-5.
68. Albayrak H, Ozan E. Seroepidemiological study of west Nile virus and rift valley Fever virus in some of Mammalian species (herbivores) in northern Turkey. *J Arthropod Borne Dis*, 2013;7(1):90-3.
69. Ergunay K, Gunay F, Erisoz Kasap O, Oter K, Gargari S, Karaoglu T, et al. Serological, molecular and entomological surveillance demonstrates widespread circulation of West Nile virus in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014;8(7):3028.
70. Biçeroğlu SU, Karataylı E, Bayram A, Turhan A, Deđirmenci A, Aydınok Y, et al. Investigation of West Nile virus among healthy blood donors in the western part of Turkey. *Turk J Med Sci*, 2015;45(1):84-8.
71. Toplu N, Ođuzođlu TÇ, Ural K, Albayrak H, Ozan E, Ertürk A, Epikmen ET. West Nile Virus Infection in Horses: Detection by Immunohistochemistry, In Situ Hybridization, and ELISA. *Vet Pathol*, 2015;52(6):1073-6.
72. Bakır E. Batı Nil Virüsü Varlığının Marmara Bölgesi Kan Donörlerinde Serolojik ve Moleküler Yöntemler İle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2015.

Yeni bir viral tehdit: Enterovirüs D68

A new viral threat: Enterovirus D68

Mustafa ALTINDIŞ¹, Tuba DAL²

ÖZET

Enterovirüs D68 (EV-D68) genellikle solunum yolu enfeksiyonlarından sorumlu olan zarfsız, tek zincirli, pozitif polariteli bir RNA virüsüdür. Picornaviridae ailesi içinde sınıflandırılır. Solunum yollarında diğer enterovirüslerin reseptörü olan α 2-3 siyalik asit yerine α 2-6 siyalik aside bağlanır. Özellikle çocuklarda üst solunum yolu ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının yanı sıra sinir sistemi enfeksiyonlarından da sorumlu olabilir. Polio benzeri felçlerle ilişkilidir. Virüs enfekte kişilerin tükürük, balgam, mukus gibi salgılarıyla bulaşır. Altta yatan solunum hastalığı ve astımı olan bebek ve çocuklarda, immunsupresif hastalarda ciddi komplikasyonlar ile ilişkilidir. Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da 2014 yılında geniş çaplı bir salgın gerçekleşmiştir. Ardından Avrupa, Tayland, Çin, Yeni Zelanda ve bazı Afrika ülkelerinde salgınlara yol açmıştır. EV-D68, 33°C'de üreyebilmesi ve aside toleransının düşük olması nedeniyle atipik bir EV olarak kabul edilir. Bu nedenle EV-D68 enfeksiyonlarının mevsimsel dağılımı sonbaharın başlangıcı ve kış aylarıdır. Virüs, hücre kültürlerinde üretilebilir ancak tanı genellikle moleküler yöntemlerden yararlanır. Tanı için, solunum yolu örnekleri, bazen de beyin omurilik sıvısı ve kan örnekleri kullanılır. Enterovirüs D68 virüsüne yönelik henüz özel bir aşı ve ilaç bulunmamaktadır. Hafif ve orta dereceli vakalar için destekleyici tedavi yeterli olabilmektedir. Ağır vakalar ise hastaneye yatış ve yoğun bakım gerektirir. Korunma için, enfekte hastaların yediklerini, içtiklerini paylaşmaktan, bu hastaları öpmek ve sarılmaktan kaçınılması ve el

ABSTRACT

Enterovirus D68 (EV-D68) is a non-enveloped single-stranded RNA virus with positive polarity that usually leads to respiratory tract infections. It is classified in the Picornaviridae family. It binds to α 2-6 sialic acid instead of α 2-3 sialic acid which is an EV receptor in respiratory tract. It may be responsible for the central nervous system infections especially in children, as well as the upper respiratory tract, and lower respiratory tract infections. It is associated with polio-like paralysis. The virus is transmitted by secretions of infected people such as saliva, sputum, and mucus. It is associated with serious complications in infants and children with the underlying respiratory disease and asthma, and immunosuppressive patients. In United States and Canada, in 2014, a large-scale outbreak occurred. Then, it led to outbreak in Europe, Thailand, China, New Zealand and in some African countries. EV-D68, due to reproduce at 33 °C and the low tolerance to the acid is considered an atypical EV. Therefore, seasonal distribution of EV-D68 infection is beginning of the autumn and winter months. The virus can be isolated in cell culture, but the diagnosis is often based on molecular methods. For diagnosis, respiratory samples, and sometimes cerebrospinal fluid and blood samples can be used. Currently, there is no specific vaccine and drug for EV-D68. Supportive treatment may be sufficient for mild and moderate cases. Severe cases require hospitalization and intensive care. For protection, it is recommended to avoid to share foods or drinks with infected patients and avoid to kiss them

¹Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya

²Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Tuba DAL

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Tel : +90 506 357 24 38

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

Geliş Tarihi / Received : 24.01.2016

Kabul Tarihi / Accepted : 13.05.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.94546

Altındış M, Dal T. Yeni bir viral tehdit: Enterovirüs D68.

Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(3): 293-302

hijyenine dikkat edilmesi önerilmektedir.

Bu derlemede, literatür eşliğinde, EV-D68 enfeksiyonlarının güncel epidemiyolojik, patojenik, klinik ve tanısal özelliklerinin özetlenmesi amaçlandı. Türkiye’de virüsün neden olduğu enfeksiyonlara yönelik yeterince veri bulunmamaktadır. Sunduğumuz derleme, ülkemizde EV-D68 ile ilgili çalışmalara ışık tutacak, olası bir salgın durumunda EV-D68 enfeksiyonunun erken tanısında ve yönetiminde yarar sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Enterovirüs D68 (EV-D68), solunum yolu enfeksiyonu, salgın

and to pay attention to hand hygiene.

The aim of this review was to summarise the current epidemiological, pathogenic, clinical, diagnostic features of EV-D68 infections. There was no available data for infections caused by this virus in Turkey. This review will lead the studies on EV-D68 and it will provide benefits for early diagnosis and management of infections in a possible outbreak.

Key Words: Enterovirus D68 (EV-D68), respiratory tract infection, outbreak

GİRİŞ

Enterovirüs D68 (EV-D68) ilk kez Kaliforniya’da 1962 yılında Schieble ve ark. tarafından toplum kaynaklı pnömoni ve bronşiyolit tanısıyla hastaneye yatırılan çocuklarda tanımlandı. Enterovirüs D türü, Enterovirus (EV) cinsi, Picornaviridae ailesi içinde sınıflandırılmasına rağmen diğer enterovirüslerin aksine solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur (1,2). Zarfsız, tek iplikli RNA virüsü olan enterovirüsün kapsit proteinleri VP1, VP2, VP3 ve VP4 olarak isimlendirilir. Kapsit proteinlerinden VP1 nükleotidinin sekans analizi sonucunda EV-D68 suşları lineage 1, 2, 3 veya clade A, B, C olmak üzere üç genetik gruba ayrılır (3).

Enterovirüs D68 rhinovirüsler ile benzer biyolojik özelliklere sahiptir. Tıpkı rinovirüsler gibi aside duyarlı olup diğer EV’lere göre daha düşük ısılarda üreyebilir (4) ve ayrıca RV87 için spesifik olan bir monotipik antiserum ile nötralize edilebilir (5). Solunum yollarında diğer enterovirüslerin reseptörü olan α 2-3 siyalik yerine α 2-6 siyalik aside bağlanır (6).

Virüs enfekte kişilerin tükürük, balgam, mukus gibi salgılarıyla bulaşır. Virüsün ilk saptanmasının ardından, en büyük ve geniş alana yayılan solunum yolu enfeksiyonu salgını Ağustos 2014’de Amerika Birleşik Devletleri’nden bildirildi. Bu salgını, birçok ülkeden EV-D68 salgınları takip etti (1-19). Son

yıllarda ise EV-D68’e bağlı olarak gelişen ciddi solunum yolu enfeksiyonları ve nörolojik komplikasyonlar karşımıza çıkmaktadır (20-28). Bu derlemede EV-D68 enfeksiyonlarının epidemiyolojik, patojenik ve klinik özellikleri yönünden irdelenmesi amaçlandı.

EV-D68 enfeksiyonlarının epidemiyolojisi

EV-D68 enfeksiyonlarının mevsimsel dağılımı sonbaharın başlangıcı ve kış aylarıdır (1-3). Hızlı yayılan bir enfeksiyon etkeni olan EV-D68’in neden olduğu sporadik salgınlar ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Hollanda, Filipinler ve Japonya’dan bildirildi (29). Son beş yıl içinde yapılan çalışmalar virüsün dünyada halen dolaştığını ortaya koymaktadır. Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada’da 2014 yılında geniş çaplı bir salgın gerçekleşti ve virüsün ciddi klinik sonuçlara yol açtığı gözlemlendi (1,23,27). Ardından Avrupa, Tayland, Çin, Yeni Zelanda ve bazı Afrika ülkelerinde salgınlar görüldü (3,8,22). Meijer ve arkadaşlarının Hollanda’da yaptığı çalışmalarda 1994 ve 2010 yılları arasında 13310 solunum örneğinin 71’inde (%0,5) EV-D68 saptandı (30). Aynı araştırmacılar tarafından Hollanda’da 2014 yılında da EV-D68 suşlarının varlığı bildirildi (10).

Enterovirüs D68, genellikle solunum yolları ile

İlgili problemlerle kendisini göstermektedir. Bebek, çocuk ve gençler en yüksek risk grubunu oluşturur. Kansas Şehri'nde 2014 yılındaki salgında bir hastanede yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan 6 hafta-16 yaş aralığındaki bebek ve çocuklardan elde edilen 22 örneğin 19'unda EV-D68 saptandı (9,31). Aynı salgın döneminde Şikago'da ise 20 ay - 15 yaş bebek ve çocuklardan elde edilen 14 solunum örneğinin 11'inde Enterovirüs D68 tespit edildi. Bu 11 hastanın sekizinde astım veya hırıltılı nefes alma hikayesi olduğu bildirildi (9,31). Çalışmalar, bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde ve astımlılarda EV-D68'in ciddi komplikasyonlara neden olduğu yönündedir (31,32).

Geçtiğimiz yıl Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (the European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) tarafından yapılan bir çalışma ile Avrupa'da EV-D68 epidemiyolojisi araştırıldı. Solunum örneklerinde VP1 gen bölgesinin sekansı ve filogenetik analizi yapıldı. Toplamda 17 Avrupa ülkesinden, 42 merkez; 51 laboratuvar çalışmaya katıldı ve 17 248 solunum örneği değerlendirildi. Örneklerin 389 (%2,26)'u EV-D68 pozitif. Her bir ülkede pozitif örneklerin oranı %0 ve %25 arasında değişmekteydi. EV-D68'e bağlı solunum yolu geçiren hastaların büyük çoğunluğunu hırıltılı solunumu olan çocuklar ve immun baskılanmış genç erişkinler oluşturuyordu. Avrupadaki virüsler genetik olarak Kuzey Amerika epidemisine neden olan virüslere benzerlik gösteriyordu (%83) ve clade B olarak sınıflandırılıyordu. Vakaların çoğunda ciddi bir hastalık gözlenmedi. Ancak üç akut flask paralizi vakası, bir ölüm gözlemlendi. Sınırlı sayıda vaka ise yoğun bakım ünitesinde yatış gerektirdi. (32). Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (Centre for Disease Prevention and Control, CDC) tarafından Enterovirüs D68'in dünyada yayılmaya başlayan bir virüs olduğu, halkın ve hekimlerin bu virüs hakkında bilgilendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (32). Diğer taraftan EV-D68 çalışmalarının çoğunda pediatrik yaş grubu hedef alındığından, virüsün diğer yaş gruplarındaki dağılımı henüz tam olarak bilinmemektedir.

Virüsün biyolojik özellikleri

Zarfsız bir virüs olan enterovirüsün (EV) genomu yaklaşık olarak 7500 nükleotid uzunluğunda tek iplikli bir RNA'dır. Bir polipeptini kodlayan untranslated regions (UTRs) ile sonlanan bir single open reading frame (ORF) bölgesi içerir. 5' UTR korunmuş dahili ribozom giriş bölgesi (internal ribosome entry site, IRES) içerir (1). Virüsün kapsit proteinleri VP1, VP2, VP3 ve VP4 olarak isimlendirilir. VP1 geni enteroviral serotipler arasındaki farklılıkları belirlemek için kullanılır. Önceleri enterovirüs taksonomisi poliovirüs, coxsackie virüs A and B ve EV şeklinde sınıflandırılıyordu (28,33). Ancak en son taksonomide, moleküler ve biyolojik özelliklerine göre insan EV türleri dört grup olarak sınıflandırıldı (enteroviruses A, B, C, and D) ve her tür, serotiplere ayrıldı (1,5). EV D izolatları arasında, EV-D68, EV-D70, EV-D94 ve EV-D111'in insanları enfekte ettiği bilinmektedir. EV-D68, 33 °C'de üreyebilmesi ve aside toleransının düşük olması nedeniyle RV'lere benzer ve atipik bir EV olarak kabul edilir (1). Dünyada şu anda dolaşımda olan en az üç farklı clade vardır (A, B, C) (8). Yapısal ve yapısal olmayan amino asit dizilimindeki farklılıklara göre subgruplara ayrılır. Dünyada en yaygın alt grup Clade B'dir. Yapılan çalışmalar 2014 Amerika salgınındaki Clade B olan virüsler ile Hollanda, İtalya ve Uzak Doğu'daki kökenler arasında %95 oranında benzerlik olduğunu bildirildi (34). 5'UTR nin 'spacer' bölgesindeki delesyonların virülansı etkilediği ve translasyonel aktiviteyi genişlettiği savunulmakta ve bu delesyonlar virüsün dünya çapındaki salgınlarından sorumlu tutulmaktadır (35).

Patogenez

Fekal oral yolla bulaşan diğer enterovirüslerden farklı olarak, EV-D68 inhalasyon ve aerolize partiküllerle bulaşır. İnfekte materyallerin yüzeyinden hava yolu ile geçiş de mümkündür (1).

Burun ısısı, akciğerlerin ısısından daha düşük olup

α -2-6 sialic acid reseptörlerinin ifadesi üst solunum yollarında yüksektir. Bu nedenle virüs ilk olarak üst solunum yolu mukozasının epitel hücrelerine tutunur (1). Ancak birçok epidemiyolojik veri ile virüsün alt solunum yolu enfeksiyonlarından da sorumlu olduğu gösterildi. Bu da virüsün patogenezinde alternatif mekanizmaların da olabileceğini akla getirmektedir. Bu bağlamda EV-D68'in alt solunum yolu epitelinde yüksek düzeyde ifade edilen bir medyatör olan bozulmayı hızlandırıcı faktör (decay-accelerating factor, DAF) yardımı ile pnömonilere neden olduğu ifade edilmektedir(35).

Enterovirüs D68 enfeksiyonunun klinik belirtileri ve hastalığın seyri

Hastaların %55,9'u kadın, %44,1'i erkek olup EV-D68, genellikle grip benzeri belirtiler ile birlikte görülen ortadan ciddiye üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur (30). Ani başlayan hastalık, ateş, rinore, hapsirme, kırgınlık, öksürük ve boğaz ağrısı gibi solunum semptomları ile karakterizedir (8,15). Ağır vakalarda ise hırıltılı nefes alıp verme ve nefes darlığına yol açabilir (3,7). Ayrıca bazı olgularda meningoensefalite, sinir disfonksiyonlarına, akut flask paralizlere neden olabilmektedir. Uluslararası kodlama sisteminde (ICD, International Classification of Diseases) EV-D68'e özel bir ICD kodu bulunmamaktadır. Enterovirüsler ICD-9'da 008.67 kodu, ICD-10'da B97.19 kodu ile belirtilmiştir (36). EV-D68 enfeksiyonlarının tanısı için, kabul edilmiş spesifik klinik kriterler olmadığından bu enfeksiyonların tanısı güçtür. Bununla birlikte ani başlangıçlı ateş, rinore, hapsirme, kırgınlık, öksürük, boğaz ağrısı, hırıltılı solunum gibi solunum semptomları ve bu semptomları takip eden akut nörolojik semptomların görüldüğü sporadik olgularda ve aynı tabloların görüldüğü salgınlarda ayırıcı tanıda EV-D68 akla gelmelidir.

Pnömoni ve astım alevlenmesi EV-D68 enfeksiyonlarının neden olduğu ana komplikasyonlardandır. Özellikle astımı veya solunum problemi olan olgular hastaneye yatış gerektirir. EV-D68 olgularının hastanede yatış süresi ortalama 17 gün olarak bildirilmektedir. Poelman ve arkadaşlarının

2014'de 1896 örnek ile yaptığı çalışmada örneklerin 18'inde EV-D68 pozitif olarak saptandı. Onbir hasta 18 yaşından küçüktü ve solunum hastalığı gelişen beş çocuk, entübasyon ve mekanik ventilasyon gereksinimi ile yoğun bakıma yatırıldı (32). Kansas Şehri ve Şikago'da geçtiğimiz yıl ortaya çıkan salgında da EV-D68'in özellikle hastanede yatan hastalarda ciddi pnömonilere neden olduğu görüldü (9,31). Danimarka'da 130 solunum örneği ile yapılan epidemiyolojik çalışmada, altta yatan hastalığı olanlarda (>3 hafta), sağlıklı bireylere (4-14 gün) oranla hastalık süresinin uzadığı gözlemlendi (18).

Hastalığın seyrini etkileyen faktörlerden biri insan rinovirüs (human rhinovirüs, HRV) enfeksiyonlarıdır. HRV'nin EV-D68 ile çapraz reaksiyon vererek tanıda zorluklara neden olduğu (16) ayrıca HRV enfeksiyonu varlığının EV-D68 enfeksiyonunun seyrini olumsuz yönde etkilediği bildirildi (37,38). Launes ve arkadaşlarının bir çalışmasında da İspanya'da 96 hastanın solunum örneklerinde %57,3 oranında HRV/EV birlikteliği saptandı. Bu çalışmada örneklerin %9'unda ise sadece EV pozitifliği bulundu (14). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2014 yılı Haziran ve Aralık ayları arasında hastaneye başvuran toplum kaynaklı pnömoni olguları arasından 97 (55.1%)'sinin NFA'sında EV veya RV pozitifliği bildirildi. Bunların dördü (2.3%) EV-D68 pozitif (20). EV-D68 pozitif hastalardan üçünde orta veya ciddi solunum hastalığı mevcutken, 14 yaşında bir kız çocuğunda ensefalopati, laktik asidoz ve inme benzeri epizodlar mevcuttu. Hasta *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonu nedeniyle kaybedildi (20). Çalışmalar ışığında HRV ve EV-D68 birlikteliğinin hastalığın prognozunu etkilediği, ciddi sonuçlara yol açtığı sonucuna varıldı.

EV-D68, primer olarak solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkili görülse de bu virüsün hastalık spektrumu henüz tam olarak açık değildir. Felçlere ve ölümlere neden olmasından dolayı bu virüs her geçen gün önem kazanmaktadır. EV-D68, beş yaşında meningoensefalit ve pnömoniden ölen bir erkek çocuğun BOS'unda saptandı. Kolorado'da EV-D68'e bağlı solunum yolu enfeksiyonu ile birlikte akut flask paralizi ve sinir disfonksiyonu olguları bildirildi. Bu çocukların

hepsinde nörolojik hastalıktan önce ateş ile seyreden solunum semptomları mevcuttu (39). Avrupa'dan da dört yaşında bir erkek çocukta meningeal sendrom ve pnömoni gözlemlendi. Hastanın gaita, nazofarengeal aspirat ve bronkoalveolar lavaj örneklerinde EV-D68 izole edildi (27). Benzer iki vaka da Norveç'ten bildirildi (29). EV-D68 virüsünün nörolojik sistem tutulumlarının nedeni henüz tam olarak açığa çıkarılmadı. Ancak bir genom dizileme çalışmasında, virüs genomunun bazı bölgelerinde değişiklikler olduğundan ve buna bağlı olarak virüsün hastalar üzerindeki etkisinin ve seyrinin değiştiğinden bahsedilmektedir (12). Ülkemizde EV-D68 sıklığı henüz bilinmemektedir. Ozkaya E ve ark.'nın yaptığı bir çalışma ile 2001 ve 2004 yılları arasında aseptik menenjit ön tanısı olan olgulardan alınan 249 örnek incelendi ve 85 vakaya ait 95 örnekte enterovirus izole edildi. En sık izole edilen tip Echovirus type 30 (n: 24) ve Coxsackie virus type B (n: 19) olarak bulundu, ayrıca çeşitli örneklerde Echovirus type 25,18,14,13,11,9,6,5,4 ve Coxsackievirus type A9 varlığı saptandı. Bu çalışma farklı enterovirus tiplerinin ülkemizde bulunabilme olasılığını akla getirmektedir (40).

Laboratuvar tanısı

EV-D68, solunum yolu ve nörolojik enfeksiyon ile başvuran sporadik vakalarda ve aynı tabloların gözlemlendiği salgınlarda, özellikle de sonbaharın başlangıcı ve kış aylarında ayırıcı tanıda düşünülmelidir.

Enteroviruslerin hücre kültürlerinden izolasyonu mümkün olup virüs insan rabdomyosarkom hücrelerinde üretilebilir. Hücre kültür yöntemleri tanıda altın standart olarak kabul edilir. Ancak EV-D68 enfeksiyonlarının tanısında moleküler yöntemler sıklıkla tercih edilen yöntemlerdir (5). Virüsün tanısı için nazofarengeal aspirat, burun sürüntüsü veya bronkoalveolar lavaj örneği, kan ve beyin omurilik sıvısı kullanılır. İdeal olarak örnekler alındıktan sonra en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Örnekler alındıktan sonra +4 °C'de korumak şartıyla 96 saate kadar laboratuvara ulaştırılabilir. Nükleik asit testleri, kültür veya seroloji testleri için

örneklerin teste alınması bu sürelerden daha uzun sürecekse, örnekler -70 °C'ye kaldırılmalı; kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır. Tekrarlayan dondurma-çözme işlemlerinden kaçınılmalıdır (5,41).

Jeong ve ark.'nın 154 hasta ile yaptığı bir çalışmada 107 hasta EV-D68 yönünden pozitif bulundu. Bu hastaların %68'i balgam örnekleri ile pozitif saptanırken %53'ü nazofaringal sürüntü örneği ile pozitiflik bulundu. Çalışmada balgam örneklerinin nazofaringal sürüntü örneklerine göre %16,9 daha fazla pozitif sonuç verdiği ortaya kondu (40). Salgın söz konusu olduğunda tanıda önerilen, moleküler yöntemlerin kullanımı ve EV-D68 ile birlikte HRV'lerin de araştırılmasıdır. Tanıda kullanılan nükleik asit amplifikasyon testlerinin analitik duyarlılıkları ve özellikleri tabloda gösterildi (Tablo 1) (42). Yapılan çalışmalarda laboratuvarında geliştirilmiş testlerin ve ticari nükleik asit amplifikasyon testlerinin analitik duyarlılığı prototipik ticari olarak ulaşılabilen bir EV-D68 suşu kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle moleküler testlerin performansının, dolaşan suşlardaki genetik çeşitliliğe bağlı olarak değişebileceği bildirilmektedir. Ancak prototipik bir suş olan Farmon suşu ve salgınlar sırasında hastalardan izole edilen bir EV-D68 suşunun 5'NTR ve VP1 hedef bölgelerinin sekanslarının büyük ölçüde benzer olduğu gözlemlendi (42). Bu nedenle moleküler yöntemlerin, EV-D68 enfeksiyonlarının tanısında kullanışlı yöntemler olduğu vurgulanmaktadır. Salgın durumlarında örnekler yeterli uzman ve ekipmanın bulunduğu referans laboratuvarlara gönderilmelidir. Ülkemizde Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Programları Başkan Yardımcılığı bünyesindeki Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları bu amaç için hizmet vermektedir (43).

Tedavi

Enterovirus D68 enfeksiyonlarının tedavisi için özel bir ilaç yoktur. Hafif ve orta dereceli vakalar için destekleyici tedavi yeterli olabilmektedir. Semptomatik tedavide ateş düşürücü ve ağrı kesicilerden yararlanılır. Hastalara dinlenme ve bol su içilmesi önerilir (3-5). Ancak altta yatan solunum

Tablo 1. EV-D68 tanısında kullanılan nükleik asit amplifikasyon testleri ve özellikleri (40)

Testin Adı	Yöntem	Reagent	Hedef	Cihaz	Kopya / mL	Log10 Kopya / mL
LDT- ON1	Real-time RT-PCR	QuantiTect RT-PCR kit (Qiagen, Inc.)	VP1	Corbett Rotorgene 6000 (Qiagen, Inc.)	306	2,49
LDT- ON2	Real-time RT-PCR	QuantiTect RT-PCR kit	5' NTR	Corbett Rotorgene 6000	306	2,49
LDT-MB1	Conventional two-step seminested RT-PCR	SuperScript Vilo (cDNA), Platinum Taq Polymerase (Life Technologies)	VP1	GeneAMP PCR system 9700 (Life Technologies)	479	2,68
LDT- MB2	Real-time RT-PCR	AgPath-ID One-Step RT-PCR kit (Ambion)	5' NTR	ABI 7500 Fast (Life Technologies)	562	2,78
LDT-BC2	Real-time RT-PCR	TaqMan Fast Virus 1-Step master mix kit (Life Technologies)	VP1	ABI 7500 Fast (Life Technologies)	562	2,78
LDT- NS	Conventional RT-PCR	One-Step RT-PCR kit (Qiagen, Inc.)	5' NTR	Dual Engine (Bio-Rad Laboratories)	562	2,78
LDT- SK1	Real-time RT-PCR	QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen, Inc.)	5' NTR	ABI 7500 Fast	562	2,78
LDT- ON3	Real-time RT-PCR	Superscript III Platinum One-Step qRT-PCR w/ROX (Life Technologies)	5' NTR	ABI 7900 HT Fast (Life Technologies)	1175	3,07
LDT-AB	Real-time RT-PCR	TaqMan Fast Virus 1-Step master mix kit	5' NTR	ABI 7500 Fast	5495	3,45
LDT- SK2	Real-time RT-PCR	QuantiTect Probe RT-PCR kit	5' NTR	ABI 7500 Fast	3162	3,50
Ticari Testler						
RVP v2 (QC)	Conventional RT-PCR	xTag RVP fast v2 (Luminex Corp.)	-	ABI GeneAmp 9700 PCR System (Life Technologies) and LiquiChip 200 Workstation (Qiagen, Inc.)	1202	3,08
RVP v2 (ON1)	Conventional RT-PCR	xTag RVP fast v2	-	MagPix (Luminex Corp.)	1202	3,08
RVP classic (AB)	Conventional RT-PCR	RVP classic (Luminex Corp.)	-	Applied Biosystems 2720 (Life Technologies)	2692	3,43

LDT: Laboratory Developed Test (Laboratuvarda geliştirilmiş testler)

hastalığı olanlar ve ciddi vakalar için yoğun bakım, mekanik ventilasyon ihtiyacı doğar. ABD Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi tarafından bir çok antiviral ajanın virüs üzerine inhibitör etkisi olduğu bildirildi (1). Ayrıca, çeşitli araştırmalar ile KR-22865, rupintrivir, V-7404 ve DAS181'in etkili ilaçlar olduğu tespit edildi (44,45).

Korunma

Enterovirüs D68 için henüz bir aşı bulunmamaktadır. Enfekte hastalar, yediklerini, içtiklerini paylaşmaktan; öpmek ve sarılmaktan kaçınılmalıdır. El hijyenine önem verilmeli, özellikle çocuklar 20 saniye boyunca ellerini yıkaması ve yüzüne dokunmaması yönünde eğitilmelidir. Kapı kolu ve oyuncak gibi birçok kişinin dokunduğu yüzeyler belirli aralıklarla dezenfekte edilmelidir (1-3).

SONUÇ

Enterovirüs D68, her yaşta insanı enfekte edebilen bir virüs olmakla birlikte özellikle çocuk yaş grubunda solunum yolu enfeksiyonlarına nadiren de nörolojik tutulumu neden olur. Altta yatan solunum hastalığı olanlarda, astımlılarda hastalık ciddi seyreder. Son yıllarda Avrupa ülkelerinde salgınlara neden olan bu virüsün Türkiye'de de etkili olduğu düşünülmektedir. Moleküler yöntemlerin tanıda önemli rolü vardır. Etkin bir tedavisi ve aşısı yoktur. En iyi korunma yöntemi el yıkama olmakla birlikte, enfekte kişilerden temastan kaçınmak bir diğer korunma yöntemidir. Salgınların oluşmasını engellemek ve salgınları kontrol etmek için ise kişisel önlemlerin artırılması ve sağlık çalışanlarının bildirim yapmaları gerekmektedir. Ülkemizde ve dünyada, virüsün neden olduğu hastalıkların patogenezi, seyrini, spektrumunu araştıran geniş çaplı klinik ve deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Oermann CM, Schuster JE, Connors GP, Newland JG, Selvarangan R, Jackson MA. Enterovirus D68: A focused review and clinical highlights from the 2014 United States outbreak. *Ann Am Thorac Soc*, 2015;12(5):775-81.
2. Schieble JH, Fox VL, Lennette EH. A probable new human picornavirus associated with respiratory disease. *Am J Epidemiol*, 1967;85(2):297-310.
3. Imamura T, Oshitani H. Global reemergence of enterovirus D68 as an important pathogen for acute respiratory infections. *Rev Med Virol*, 2015;25(2):102-14.
4. Oberste MS, Maher K, Schnurr D, Flemister MR, Lovchik JC, Peters H, Sessions W, Kirk C, Chatterjee N, Fuller S, Hanauer JM, Pallansch MA. Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J Gen Virol*, 2004;85(9):2577-84.
5. Principi N, Esposito S. Enterovirus D-68: An emerging cause of infection. *Expert Rev. Respir Med*, 2015;9(6):711-9.
6. Imamura T, Okamoto M, Nakakita S, Suzuki A, Saito M, Tamaki R, Lupisan S, Roy CN, Hiramatsu H, Sugawara KE, Mizuta K, Matsuzaki Y, Suzuki Y, Oshitani H. Antigenic and receptor binding properties of enterovirus 68. *J Virol*, 2014;88(5):2374-84.
7. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: Correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999;73(3):1941-8.
8. Piralla A, Girello A, Grignani M, Gozalo-Margüello M, Marchi A, Marseglia G, Baldanti F. Phylogenetic Characterization of Enterovirus 68 Strains in Patients With Respiratory Syndromes in Italy. *Journal of Medical Virology*, 2014;86(9):1590-3.

9. Midgley CM, Jackson MA, Selvarangan R, Turabelidze G, Obringer E, Johnson D, Giles BL, Patel A, Echols F, Oberste MS, Nix WA, Watson JT, Gerber SI. Severe respiratory illness associated with enterovirus D68-Missouri and Illinois, 2014. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2014;63(36):798-9.
10. Meijer A, Benschop KS, Donker GA, van der Avoort HG. Continued seasonal circulation of enterovirus D68 in The Netherlands, 2011-2014. *Eur Surveill*, 2014;19(42):1-6.
11. Lupisan SP, Oshitani H. Molecular epidemiology of enterovirus D68 from 2013 to 2014 in Philippines. *J Clin Microbiol*, 2015;53(3):1015-8.
12. Wylie K, Wylie TN, Overdahl A, Buller RS, Herter BN, Magrini V, Wilson RK, Storch GA. Genome sequence of enterovirus D68 from St Louis, Missouri, USA. *Emerg Infect Dis*, 2015;21(1):184-6.
13. Vongpunaward S, Prachayagprecha S, Chnsaenroj J, Haagmans BL, Smits SL, Poovorawan Y. Genome sequence of enterovirus D68 and clinical disease, Thailand *Emerg Infect Dis*, 2015;21(2):384.
14. Zhang T, Ren L, Luo M, Li A, Gong C, Chen M, Xiali Y, Wu J, Deng Y, Huang F. Enterovirus D68-associated severe pneumonia, China 2014. *Emerg Infect Dis*, 2015;21(5):916-18.
15. Reiche J, Böttcher S, Diedrich S, Buchholz U, Buda S, Haas W, Schweiger B, Wolff T. Low-level circulation of enterovirus D68-associated acute respiratory infections, Germany, 2014. *Emerg Infect Dis*, 2015;21(5):837-41.
16. Torres J, Farfan MJ, Izquierdo G, Piemonte P, Henriquez J, O'Rayan ML. Enterovirus D68 infection, Chile, spring 2014. *Emerg Infect Dis*, 2015;21(4):728-9.
17. Poelmann R., Schölvinck EH, Borger R, Niesters HGM., van Leer-Buter C. The emergence of enterovirus D68 in a Dutch University Medical Centre and the necessity for routinely screening for respiratory viruses. *J Med Virol*, 2015;62(1):1-5.
18. Midgley SE, Christiansen CB, Poulsen MW, Hansen CH, Fischer TK. Emergence of enterovirus D68 in Denmark, June 2014 to February 2015. *Eur Surveill*, 2015;20(17):1-6.
19. Gimferrer L, Campins M, Codina MG, Esperalba J, Martín Mdel C, Fuentes F, Pumarola T, Anton A. First enterovirus D68 (EV-D68) cases detected in hospitalized patients in a tertiary care university hospital in Spain, October 2014. *Enferm Infect Microbiol Clin*, 2015;33(9):585-9.
20. ZEsposito S, Zampiero A, Ruggiero L, Madini B, Niesters H, Principi N. Enterovirus D68-associated community-acquired pneumonia in children living in Milan, Italy. *J Clin Virol*, 2015;68(1):94-6.
21. Drews SJ, Simmonds K, Usman HR, Yee K, Fathima S, Tipples G, Tellier R, Pabbaraju K, Wong S, Talbot J. Characterization of enterovirus activity, including that of enterovirus D68, in pediatric patients in Alberta, Canada in 2014. *J Clin Microbiol*, 2015;53(3):1042-5.
22. Carney S, Brown D, Siqueira MM, Dias JP, da Silva EE. Enterovirus D68 detected in children with severe acute respiratory illness in Brazil. *Emerg. Microbes Infect*, 2015;4(10):e66.
23. Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. 2014 outbreak of enterovirus D68 in North America. *J Med Virol*, 2015;21(10). doi: 10.1002/jmv.24410.
24. Midgley CM., Watson JT, Nix WA, Curns AT, Rogers SL, Brown BA, Conover C, Dominguez SR, Feikin DR., Gray S, et al. Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): a descriptive epidemiological investigation. *Lancet Respir Med*, 2015;3(11):879-87.
25. Greninger A, Naccarcho SN, Messacar K, Clayton A, Yu G, Somasekar S, Federman S, Stryke D, Anderson C, Yagi S, et al. A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with acute flaccid myelitis cases in the USA (2012-14): A retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis*, 2015;15(6):1-12.

26. Pfeiffer HC, Bragstad K, Skram MK, Dahl H, Knudsen PK, Chawla MS, Holberg-Petersen M., Vainio K, Dudman SG, Kran AM, et al. Two cases of acute severe flaccid myelitis associated with enterovirus D68 infection in children, Norway, autumn 2014. *Eur Surveill*, 2015;20(10):1-5.
27. Lang M, Mirand A, Savy N, Henquell C, Maridet S, Perignon R, Labbé A, Peigue-Lafeuille H. Acute flaccid paralysis following enterovirus D68 associated pneumonia, France, 2014. *Eur Surveill*, 2014;6(19):1-5.
28. Calvo C, Cuevas MT, Pozo F, García-García ML, Molinero M, Calderón A, Gonzalez-Esguevillas M, Pérez-Sautu U, Casas I. Respiratory Infections by Enterovirus D68 in Outpatients and Inpatients Spanish Children. *Pediatr Infect Dis J*, 2016;35(1):45-9.
29. Bragstad K, Jakobsen K, Rojahn AE, Skram MK, Vainio K, Holberg-Petersen M., Hungnes O, Dudman SG, Kran AM. High frequency of enterovirus D68 in children hospitalized with respiratory illness in Norway, autumn 2014. *Influenza Other Respir Viruses*, 2015;9(2):59-63.
30. Meijer A, van der Sanden S, Snijders BE, Jaramillo-Gutierrez G, Bont L, van der Ent CK, Overduin P, Jenny SL, Jusic E, van der Avoort HG, et al. Emergence and epidemic occurrence of enterovirus 68 respiratory infections in the Netherlands in 2010. *Virology*, 2012;423(1):1952-8.
31. Shaw J, Welch TR, Milstone AM. The Role of Syndromic Surveillance in Directing the Public Health Response to the Enterovirus D68 Epidemic. *JAMA Pediatr*, 2014;168(11):981-2.
32. Poelman R, Schuffenecker I, Van Leer-Buter C, Josset L, Niesters HG, Lina B; ESCV-ECDC EV-D68 study group. European surveillance for enterovirus D68 during the emerging North-American outbreak in 2014. *J Clin. Virol*, 2015;71:1-9.
33. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html (24.1.2016).
34. Tokarz R, Firth C, Madhi SA, Howie SR, Wu W, Sall AA, Haq S, Briese T, Lipkin WI. Worldwide emergence of multiple clades of enterovirus 68. *J Gen Virol*, 2012; 93(Pt 9):1952-8.
35. Blomqvist S, Savolainen C, Råman L, Roivainen M, Hovi T. Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. *J Clin Microbiol*, 2002; 40(11):4218-23.
36. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/B97.1> (19.04.2016)
37. Mc Allister SC, Schleiss MR, Arbefeville S, Steiner ME, Hanson RS, Pollock C, Ferrieri P. Epidemic 2014 enterovirus D68 cross-reacts with human rhinovirus on a respiratory molecular diagnostic platform. *PLoS one*, 2015;10(3): e0118529.
38. Launes C, Armero G, Anton A, Hernandez L, Gimferrer L, Cisneros C, Jordan I, Muñoz-Almagro C. Molecular epidemiology of severe respiratory disease by human rhinoviruses and enteroviruses at a tertiary paediatric hospital in Barcelona, Spain. *Clin Microbiol Infect*, 2015;21(8):799:5-7.
39. Massacra K, Schreiner TL, Maloney JA, Wallace A, Ludke J, Oberste MS, Nix WA, Robinson CC, Gladé MP, Abzug MJ, et al. A cluster of acute flaccid paralysis and cranial nerve dysfunction temporally associated with an outbreak of enterovirus D68 in children in Colorado, USA. *Lancet*, 2015;385(9978):1662-71.
40. Ozkaya E, Uysal G, Atak T, Alkan M. Serotype distribution of enteroviruses isolated from paediatric cases prediagnosed as aseptic meningitis between 2001-2004 period. *Mikrobiyol Bul*, 2005;39(1):43-51.

41. Jeong, J. H., Kim, K. H., Jeong, S. H., Park, J. W., Lee, S. M., & Seo, Y. H. (2014). Comparison of sputum and nasopharyngeal swabs for detection of respiratory viruses. *J Med Virol*, 2014;86(12):2122-7.
42. Hachette TF, Drews SJ, Grudski E, Booth T, Martineau C, Dust K. Detection of Enterovirus D68 in Canadian Laboratories. *J Clin Microbiol* 2015, 53(5):1748-51.
43. <http://www.thsk.gov.tr/kurumsal/organizasyon-yapisi.html> (10.05.2016)
44. Rhoden E, Zhang M, Nix WA, Oberste MS. In vitro efficacy of antiviral compounds against enterovirus D68. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015;59(12):7779-81.
45. Sun L, Meijer A, Froeyen M, Zhang L, Thibaut HJ, Baggen J, George S, Vernachio J, van Kuppeveld FJ, Leyssen P, et al. Antiviral activity of broad-spectrum and enterovirus-specific inhibitors against clinical isolates of enterovirus D68. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015;59(12):7782-5.

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE



TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU / PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

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

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

Makale Türü/Article Type:

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

Makale Başlığı/Article Entitled :

Sayın Editör,

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

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

Dear Editor,

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

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

(...1) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...2) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...3) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...4) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...5) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

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

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

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU / PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

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

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

Tel/Phone : +90 312 565 55 79

Faks/Fax : +90 312 565 55 91

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

