

ŞARBON ŞÜPHELİ PAKETE NBC LABORATUVARININ YAKLAŞIMI: OLGU SUNUMU**Turan KARAYILANOĞLU¹**
Mesut ORTATATLI¹**Levent KENAR¹**
Ali ÖZTUNA¹**ÖZET**

Ekim 2001'de Amerika Birleşik Devletleri'nde şarbon sporları içeren zarflarla yapılan saldırılar biyoterörizm kavramının gerçek yüzünü göstermiştir. Şarbon, *Bacillus anthracis* tarafından oluşturulan ve esas olarak ot yiyen hayvanların hastalığıdır. Hasta hayvanların doku ve kanından yapılan yaymalarda kapsüllü, Gram pozitif, uzun çomakların görülmesi şarbon tanısını koydursa da, doğadan elde edilen Gram pozitif basillerin tanımlaması oldukça zordur. GATA NBC Bilim Dalı Başkanlığı'na 2003-2006 yılları arasında gelen şüpheli zarflar gerekli güvenlik önlemleri alınarak açılmış ve içerikleri kimyasal ve radyolojik incelemelerin ardından konvansiyonel kültür ve moleküler biyoloji yöntemleri ile araştırılmıştır. RT-PCR yönteminin şarbon araştırılmasında etkili ve hızlı bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: NBC, şüpheli paket, şarbon, analiz, PCR

THE APPROACH OF NBC LABORATORY TO ANTHRAX SUSPECTED PACKAGE: CASE REPORT**SUMMARY**

Attacks made with envelopes containing spores of *Bacillus anthracis* in USA in October 2001 revealed real face of bioterrorism concept. Anthrax is primarily a disease of herbivores caused by *B.anthraxis*. Although observing encapsulated Gram positive rods on the Gram staining of the tissue and blood specimens of the infected animals supports diagnosis of anthrax, the identification of Gram positive bacilli gained from the nature is very difficult. In this paper, methods conducted for the investigation of the suspicious envelopes which were submitted to the Department of Medical NBC Defense of Gulhane Military Medical Academy between the years 2003-2006 are discussed. By taking the appropriate safety precautions, the analysis of the suspicious materials are carried out by either conventional culture methods or molecular biological techniques following chemical and radiological examinations.

Key Words: NBC, suspicious package, anthrax, identification, PCR

GİRİŞ

11 Eylül 2001 tarihinde New York Dünya Ticaret Merkezi'ne çarpan ticari yolcu uçakları Amerika Birleşik Devletleri'ni (ABD) asimetrik savaş kavramı ile tanıştırmıştır. Bu saldırının ardından Ekim 2001'de ABD Posta Teşkilatı kullanılarak gönderilen *Bacillus anthracis* sporu ihtiva eden mektuplar biyoterörist saldırılarının tarihinde yeni bir sayfa açmıştır. Amerikan

Halkı'nı kendi evinde vuran bu saldırı ile biyolojik savaşa ait teorik bilgiler kitaplardan çıkıp gerçek bir afetin bileşenleri haline gelmiştir.

Biyolojik savaş ajanları; tespitindeki güçlükler, erken tanının çoğu zaman mümkün olmaması, karantina önlemlerinin yetersiz kalması ve gerçek etkisinin çok üstünde bir şiddette toplumda yarattığı sosyal panik ile kimyasal silahlarla

¹GATA NBC Bilim Dalı Başkanlığı

Yazışma Adresi: Dr.Mesut ORTATATLI, GATA NBC Bilim Dalı Başkanlığı 06018, Etlik-Ankara

Tel: +90 312 304 35 52

Faks: +90 312 304 6019

e-posta: mortatatl@gata.edu.tr

kıyasla daha büyük bir tehdit oluşturmaktadır (1). Potansiyel bir biyolojik savaş ajanı olan *B.anthraxis* ilk defa Birinci Dünya Savaşı'nda hayvanlara karşı, İkinci Dünya Savaşı'nda ise özellikle İngiltere tarafından geliştirilerek hayvanlara ilaveten insanlara karşı da kullanılabilir bir silah haline getirilmiştir (2). Biyolojik savaş tarihi açısından 1979 yılında eski Sovyetler Birliği'nde bulunan Sverdlovsk'de (şimdiki Ukrayna'nın Yekaterinburg şehrinde) 19 nolu Sovyet Askeri Birliği Biyolojik Araştırma Laboratuvarı'nda meydana gelen ölümcül kaza önemli bir kilometre taşı olmuştur. Şarbon sporlarının bulunduğu laboratuvarından yayılan bakteriler, rüzgarın etkisiyle 79 sivilin akciğer şarbonuna yakalanmasına ve 68'inin ölümüne yol açmıştır (3). Ekim 2001'den Ocak 2002'ye kadar olan bir zaman aralığında şarbonlu mektuplar ile yapılan saldırılar sonucunda A.B.D.'de toplam 22 şarbon vakası tespit edilmiş (11 akciğer, 11 deri) ve bu vakalardan 5 tanesi hayatını kaybetmiştir (4).

B.anthraxis tarafından oluşturulan ve esas olarak ot yiyen hayvanların hastalığı olan şarbon, dünya çapında görülen bir zoonozdur. Normal koşullarda insanlara enfekte hayvanlardan ya da deri, yün gibi kontamine olmuş hayvan ürünlerinden bulaşarak deri şarbonu denilen klinik tabloyu oluşturur. İnhalasyon şarbonu ise çok miktarda hayvan deri ve yünlerinin bulunduğu ve işlendiği kapalı alan ya da fabrikalarda meydana gelmektedir. İnsandan insana bulaş henüz bildirilmemiştir (3, 4).

Olguların Sunumu

2003–2006 yılları arasında GATA NBC Bilim Dalı Başkanlığı'na (BD. Bşk.lığı) 4 adet şüpheli paket gelmiştir. Tüm paketler posta zarfı olup, üçü genel evrak bölümünde açılmıştır. İçlerinde toz tespit edilmesine rağmen şüpheli paket önlemleri alınmamıştır. Üç zarf da oda dışına çıkarılmış, başka bir odaya dahi götürülüp tozun dağılmasına neden olunmuştur. Ardından NBC BD. Bşk.lığı ile irtibata geçilmiş ve gerekli ambalajlama yapılmıştır.

Bir zarf ise, personelin şüpheli paket olarak dikkatini çekmesi nedeniyle herhangi bir işlem yapılmadan önce NBC BD. Bşk.lığı ile irtibata

geçilmiştir. Tüm şüpheli paketler iç içe iki adet naylon poşete konup, ağızları kapatıldıktan sonra ilgili personel tarafından GATA NBC BD. Bşk.lığına getirilmiştir.

NBC BD. Bşk.lığına gelen 4 paket tıbbi analizlere başlanılmadan önce kimyasal ajan monitörü ile kimyasal ve radyakmetre ile radyolojik yönden incelenmiştir. Açılmadan direkt olarak gelen paket ayrıca metal ve/veya kablo içerip içermediğinin tespiti açısından X-Ray cihazıyla kontrol edilmiştir. Kimyasal ajan monitörü, radyakmetre ve X-Ray işlemlerinde negatif olarak tespit edilen paketler koruyucu elbise, eldiven ve tam yüz maskesi giyilip Sınıf 2 tip B biyogüvenlik kabini içinde açılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Şüpheli paketlerin sınıf 2 tip B biyogüvenlik kabini içinde açılması

Olay yerinde açılıp, ardından tekrar ambalajlanan her üç pakette de beyaz pudra şeklinde toza rastlanmıştır. Hiç açılmadan gelen dördüncü pakette ise herhangi bir toz olmamakla birlikte resimli kumaş parçalarının varlığı gözlenmiştir. Bütün zarfların içinden steril serum fizyolojik ile ıslatılan eküvyonla sürüntü örnekleri alınarak, buyyon ve kanlı agara ekimler yapılmıştır (Şekil 2). Zarf içerisinde bulunan tozlardan direkt mikroskopik inceleme yapılmıştır. Toz içeren zarflardan PCR için steril serum fizyolojik içine örnek alınmış ve beklenmedik patolojik mikroorganizmalar yönünden ratların cilt altına enjekte edilerek 48 saat gözlenmiştir.



Şekil 2. Tüm şüpheli paketlerden steril serum fizyolojik ile ıslatılan eküvyonla örnekler alınıp, buyyon ve kanlı agara ekimler yapılmıştır

Ekim yapılan katı besiyerleri 24 saat sonra değerlendirilmiş ve *B.anthraxis* özgül Rough tipik oloni yapısı görülememiştir. Tipik koloniler görülememesine rağmen hem sıvı hem de katı besi yerlerinde üreyen mikroorganizmalar Gram boyamayla tekrar mikroskopik incelemeye alındığında Gram pozitif koklar görülmüştür.

İçinde toz olan paketlerin içeriği daha hızlı ve duyarlı bir yöntem olan Real-Time PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR'da kullanılacak DNA'nın ekstraksiyonu için 2 ml serum fizyolojik içine alınan tozlara -20 °C'de 15 dakika soğutma, 95 °C'de 15 dakika ısıtma yapıp, 5 dakika 9000 rpm'de santrifüj uygulanmıştır. Süpernatantından 1 µl alınıp Cycleave PCR *Bacillus anthracis* Detection Kit Ver.1.1 (Takara Bio. Inc.) ile üretici önerileri doğrultusunda Smartcycler II cihazında Real-Time PCR yapılmıştır. Bakterinin pXO2 plazmidinde yer alan ve kapsülünü sentezleyen gen bölgesi ve pXO1 plazmidinde bulunan protektif antijen toksinini sentezleyen gen bölgesinin hedef alındığı primerler ve (Tablo-1). amplifikasyon bölgesinde FAM ile işaretli probler kullanılmıştır.

Yapılan Real-Time PCR ile 45 dakika içinde negatif kontroller ve şüpheli paket örnekleri negatif, pozitif kontroller ise pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 3). Cilt altı enjeksiyon yapılan

ratlarda 48 saatlik gözlem sonucunda patolojik bir olay gelişmemesi üzerine, şüpheli paketlerin *B.anthraxis* ve diğer patolojik biyolojik savaş ajanları yönünden negatif olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 1. Real-Time PCR'da kullanılan primerler

Marker Bölgesi	Primerler	Primer Sekansları
PA	PA7	ATC ACC AGA GGC AAG ACA CCC
	PA6	ACC AAT ATC AAA GAA CGA CGC
CAP	MO11	GAC GGA TTA TGG TGC TAA G
	MO25	CAA TAG CTC CTG CTA CAA ATG

TARTIŞMA

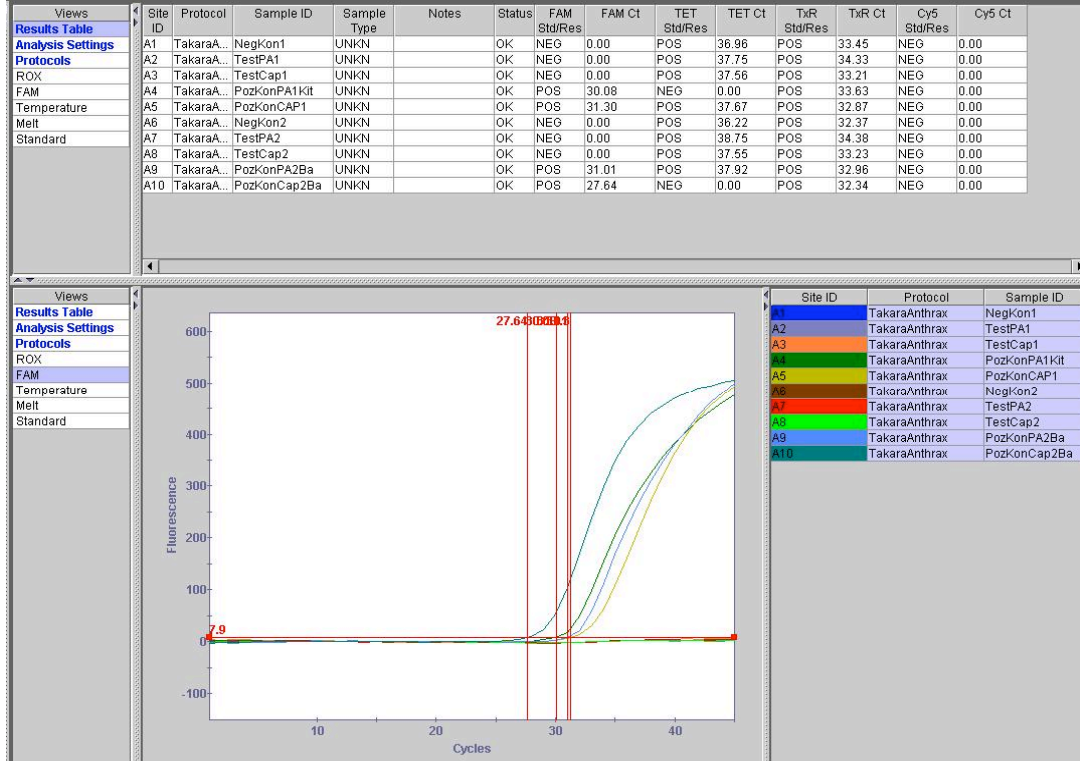
Şarbon tanısının konulması için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; ajanın kültür ile izolasyonu, antikor saptanması, ELISA ve diğer yöntemlerle antijen saptanması, DNA primerleri kullanarak genom saptanması gibi yöntemlerdir (5-9). Kültür gibi standart yöntemler hızlı sonuç veremezler ve sonuç almak için en az 24 saat gibi bir zamana ihtiyaç duyulmaktadır. A.B.D.'de Ekim 2001'de yaşanan şarbonlu mektup olayında olduğu gibi hızlı ve doğru tanı konması gereken durumlarda geleneksel yöntemler yavaş kalmaktadır. Bu gibi durumlarda tarafımızdan da uygulandığı gibi, günümüzde PCR ve Real-Time PCR en uygun tanımlama yöntemleri olarak görülmektedir (10-12).

Biyoterörist bir saldırı sonucu meydana gelebilecek inhalasyon şarbonu salgını, hızlı identifikasyon ve tedavi ile profilaksi uygulanmasıyla engellenebilir. Bununla birlikte, *B.anthraxis* ve diğer ajanlarla oluşabilecek enfeksiyonları önlemek için Tablo 2'de özellikleri verilen şüpheli mektup ya da paketler tespit edilmeli ve uygun koruyucu tedbirler alınmalıdır (13-15).

Şüpheli bir paketle karşılaşılması halinde yapılması gerekenler aşağıda özetlenmiştir:

1- Şüpheli zarf veya paketi sallamayın ya da boşaltmayın,

2- Zarfı veya paketi odadan çıkarmayın, başkalarına göstermeyin ya da başkalarının incelemesine müsaade etmeyin,



Şekil 3. Şüpheli paketlerdeki toz ile yapılan Real-Time PCR sonuçları

3- Zarf veya paketi düzgün bir yüzeye koyun, koklamayın, dokunmayın, tadına bakmayın ve yakından incelemeyin,

4- Zarfı veya paketi plastik bir torbanın ya da akma veya sızıntıyı engelleyecek bir kabın içine koyun,

5- Bulduğunuz yerdeki diğer kişileri uyarın, odayı terk edin, kapıları sıkıca kapatın ve başkalarının girmesini engelleyin, eğer mümkünse havalandırma sistemini kapatın,

6- Ellerinizi su ve sabunla iyice yıkayın,

7- Olayı emniyet yetkililerine, binanızın güvenlik birimine ve ilk amirinize bildirin,

8- Eğer mümkünse; şüpheli mektup veya paketin fark edildiği anda odada veya bölgede bulunanların listesini çıkarın. Listeyi hem bölgesel sağlık yetkililerine, hem de güvenlik güçlerine ilerideki inceleme ve bilgilendirme için verin.

Tablo 2. Şüpheli paket özellikleri

- Dışında tozlu bir madde olan paket
- Tanımadığınız ya da beklenmeyen birinden gelen paket
- Artık sizinle ilgisi kalmamış, daha önceden birlikte çalıştığınız birine gönderilmiş paket
- Gönderici adı ve/veya adresi olmayan ya da mantıklı görünmeyen paket
- Gönderenin adresi ile pul ya da damgasındaki adresin farklı olduğu paket
- Boyutlarına uymayan ya da bir tarafa doğru dengesiz ağırlıkta olan paket
- Garip şekilli, aşırı şişkin veya orantısız paket
- Aşırı miktarda bantlanmış paket
- “Kişiyeye özel” ya da “gizli” gibi sınırlı ifadelerin bulunduğu paket
- Tuhaf koku ya da boya içeren paket

Şarbon ihtiva eden veya şarbon ihtiva ettiği düşünölen postaların açılması sonrasında yapılması gereken işlemler her aşamada dikkat ve sürat gerektirmektedir. Böylesine tehlikeli ve yüksek kullanılma potansiyeli olan bir

biyolojik ajan ile ilk karşılaşmada etkenin identifikasyonuna ve uygulanacak tedaviye kadar olan süreçte sistemli ve titiz bir yaklaşım sergilemek tıbbi savunmanın etkinliğini ve başarısını artıracaktır.

KAYNAKLAR

1. DaSilva EJ. Biological warfare, bioterrorism, biodefence and the biological and toxin weapons convention. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1999; 2: 109-39.
2. Bacon DR. Biological warfare: An historical perspective. *Preoperative Medicine and Pain*, 2003; 22: 224-9.
3. Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, et al. Anthrax as a biological weapon. *JAMA*, 1999; 281: 1735-45.
4. Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, et al. Anthrax as a biological weapon. *JAMA*, 2002; 287: 2236-52.
5. Houpiqian P, Raoult D. Traditional and molecular techniques for the study of emerging bacterial diseases: one laboratory's perspective. *Emerg Infect Dis*, 2002; 8: 122-31.
6. Heller MB, Bunning ML, France MEB, et al. Laboratory response to anthrax bioterrorism, New York City, 2001. *Emerg Infect Dis*, 2002; 8: 1096-102.
7. Sacchi CT, Whitney AM, Mayer LW, et al. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis*, 2002; 8: 1117-23.
8. Quinn CP, Semenova VA, Elie CM, et al. Specific, sensitive, and quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxin protective antigen. *Emerg Infect Dis*, 2002; 8: 1103-9.
9. Quinn CP, Dull PM, Semenova VA, et al. Immune response to *Bacillus anthracis* protective antigen in patients with bioterrorism-related cutaneous or inhalational anthrax. *J Inf Dis*, 2004; 190: 1228-36.
10. Hoffmaster AR, Meyer RF, Bowen MP, et al. Evaluation and validation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis*, 2002; 8: 1178-82.
11. Makino S, Cheun H. Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. *J Microbiol Methods*, 2003; 53: 141-7.
12. Keim P, Price LB, Klevytska AM, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*, 2000; May: 2928-36.
13. Ortatatlı M. Biyolojik Afetler. In: Eryılmaz M, Dizer U, eds. *Afet Tıbbı. Cilt 2. Ankara: Ünsal Yayınları*, 2005: 1207-55.
14. Ceylan S. Epidemiyolojik Yaklaşım ve Stratejiler. In: Karayılanoğlu T, ed. *Kimyasal ve Biyolojik Terörizm. Ankara: GATA Basımevi*, 2002: 91-6.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Update: investigation of bioterrorism-related anthrax and interim guidelines for exposure management and antimicrobial therapy, October 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2001; 50: 909-19.

KARAYILANOĞLU T, KENAR L, ORTATATLI M, ÖZTUNA A.