



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

T.R.
THE MINISTRY OF HEALTH
PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

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

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 69 ■ Sayı/Number 1 ■ Yıl/Year 2012

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

Mustafa AKSOY, Başkan
Mustafa AKSOY, President

EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Demet CANSARAN-DUMAN
Yavuz UYAR

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

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

TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Murat BAYRAM
Murat DUMAN
Zeynep KÖSEOĞLU
Selahattin TAŞOĞLU

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

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

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :
THSK / PHIT

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

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

Basım Tarihi / Date of Publication :
Mayıs 2012 / May 2012

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

Ahmet ÇARHAN, Türk Akreditasyon Kurumu, Ankara

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

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

Ali ALBAY, GATA, Ankara

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

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

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

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

Ayhan FİLİZİ, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

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

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

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

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

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

Berrin ESEN, RSHMB, Ankara

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

Celal GÖKÇAY, ODTÜ, Çevre Müh., Ankara

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

Daniel MOTLHANKA, Botswana College of Agriculture, Botswana

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gülnur TARHAN, Ahievran Üniv., Sağlık MYO, Kırşehir

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

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

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

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

Iva CHRISTOVA, NCIPD, Sofia, Bulgaria

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

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

İsmail CEYHAN, RSHMB, Ankara

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

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

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

Mahinur AKKAYA, ODTÜ, Kimya Müh., Ankara

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nilay ÇÖPLÜ, RSHMB, Ankara

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

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

Orhan BAYLAN, GATA, Ankara

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

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

Paul HEYMAN, Queen Astrid Military Hospital, Belgium

Pauline MWINZI, Medical Research Inst., Kenya

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

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

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

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

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

Roberto Canete VILLAFRANCA, Centre for Hygiene, Cuba

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

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

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

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

Sıraç DİLBER, Karolinska Univ., Medical School, Sweden

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

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

Takashi AKAMATSU, Prof. Emeritus, Japan

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

Yesim ÖZBAŞ, Hacettepe Üniv. Gıda Müh., Ankara

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

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

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

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

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

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallar aranır:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11- Makale yazımında dikkat edilecek hususlar şunlardır:

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

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

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

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

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

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

Bulgular: Sadece elde edilen bulgular açık bir şekilde belirtilmelidir.

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

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

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

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

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

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

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

Kitap: Yazar(lar)ın soyadı adının baş harf(ler)i. Kitabın adı. Kaçınca 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. İt: Editör(ler)in soyadı adının başharf(ler)i ed/eds. Kitabın adı. Kaçınca baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı: Bölümün ilk ve son sayfa numaraları.

• Örnek: Weinstein L. Swarts MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic Physiol ogy: Mechanism of Disease. 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, Mascaro C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October,10-14, Izmir-Turkey, 1994.

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

GenBank/DNA 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 dipnotta yer verilmeli, uygun simgeler (*,+,++, v.b.) kullanılmalıdır. Fotoğraflar "jpeg" formatında ve en az 300 dpi olmalıdır. Baskı kalitesinin artırılması için gerekli olduğu durumlarda fotoğrafların orijinal halleri talep edilebilir.

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

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

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

12- Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

13- Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

Tel : (0312) 458 23 64

Faks : (0312) 458 24 08

e-posta : turkhijyen@rshm.gov.tr

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

Manuscripts are sought according to the following rules:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Key words should be given under Turkish and English.

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

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

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

Results: The findings should be stated clearly.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Public Health Institution of Turkey

Tel : +90 312 458 23 64

Fax : +90 312 458 24 08

e-mail : turkhijyen@rshm.gov.tr

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

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

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

- Bütün yazarlarca isim sırasına göre imzalanmış telif hakkı devir formu eksiksiz olarak dolduruldu.
 - Yazar isimleri açık olarak yazıldı.
 - Her yazarın bağlı bulunduğu kurum adı, yazar adının yanına numara verilerek başlık sayfasında belirtildi.
 - Yazışmalardan sorumlu yazarın adı, adresi, telefon-faks numaraları ve e-posta adresi verildi.
 - Türkçe ve İngilizce başlıklar ile kısa başlık yazıldı.
 - Türkçe ve İngilizce özetlerin kelime sayısı (300-500 arası) kontrol edildi.
 - Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (MeSH'e uygun) verildi.
 - Tüm kısaltmalar gözden geçirildi ve standart olmayan kısaltmalar 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 Journal of Hygiene and Experimental Biology, is a publication of the Refik Saydam National Public Health Agency. The Journal is published every other three months and one volume consist of four numbers.
- The journal publishes microbiology, immunology, pharmacology, toxicology, parasitology, entomology, biochemistry, food safety, environmental health, public health, epidemiology, pathology, pathophysiology, molecular biology and genetics in the field of original research, case reports, reviews, and letters to the editor. Articles are published in Turkish and English.
- Articles which are not previously published in another journal or are not currently under evaluation elsewhere can be published in the journal.
- Articles approved by the Scientific Committee and Editorial Board are eligible to be released when received at least two positive opinions from the Scientific Committee members. Those committees have the authority to make all corrections and abbreviations but not to change the content of the article.
- The authors have the all the scientific and legal responsibilities of the articles.
- The authors should obey the ethics of research and publication.
- The copyright of the article published in the Bulletin of Experimental Hygiene belongs to the Journal. Copyright fee is not paid to the authors.

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

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

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi;

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

tarafından dizinlenmektedir.

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

İLETİŞİM

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

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

www.turkhijyen.org

CORRESPONDENCE

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

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

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi

- 1. Türkiye’de 2007 - 2008 influenza sezonunda oseltamivir dirençli influenza A (H1N1) virüslerinin H274Y mutasyonu ile saptanması** 1 - 6
Ahmet ÇARHAN, Nurhan ALBAYRAK, Ayşe Başak ALTAŞ, Yavuz UYAR, Etem ÖZKAYA
- 2. Diyaliz sularının mikrobiyal kontaminasyon ve bakteriyel endotoksin testleri ile kontrolü** 7 - 14
Fesem BAŞARI, Öznur UYANIK
- 3. İstanbul’da hayat kadınları ile hastanemizin kadın hastalıkları ve doğum kliniği hastalarındaki vajinal kandidiyazın görülme sıklığının 10 yıl önceki oranla kıyaslanması** 15 - 20
Erdal POLAT, Serhat SİREKBASAN, Burcu AYDIN, Zehra YILDIRIM, Yaşar BAĞDATLI, İsmail ÇEPNİ, Tayfur ÇİFT, Nezihe D. BALTALI
- 4. Kauçuk yapıda Foley idrar sondalarının sitotoksitesinde çinko bileşiklerinin olası rolü** 21 - 30
Mehmet Kürşat DERİCİ, Hakan BÜZKAYA, Ferat ŞAHİN
- 5. Konya ilinde köpeklerde listeriozis seroprevalansı** 31 - 36
Zeki ARAS, Uçkun Sait UÇAN

■ Olgu Sunumu

- 6. S19 hayvan aşısının kazayla inokülasyonu sonucu gelişmiş bir bruselloz olgusu** 37 - 40
Ahmet KARAKAŞ, Gürkan MERT, Ömer ÇOŞKUN, Ömer Hilmi ALGA, Bülent Ahmet BEŞİRBELLİOĞLU, Can Polat EYİĞÜN

■ Derleme

- 7. Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi** 41 - 52
Gülderen YENTÜR, Buket ER

CONTENTS

■ Original Article

- 1. Detection of oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) viruses with H274Y mutation during the 2007 - 2008 influenza season in Turkey** 1 - 6
Ahmet ÇARHAN, Nurhan ALBAYRAK, Ayşe Başak ALTAŞ, Yavuz UYAR, Etem ÖZKAYA
- 2. Control of dialysis water by microbial contamination and bacterial endotoxin tests** 7 - 14
Fesem BAŞARI, Öznur UYANIK
- 3. Comparison of the incidence of vaginal candidiasis among prostitutes in Istanbul and patients of the Obstetrics and Gynecology Clinic of Cerrahpaşa Medical Faculty** 15 - 20
Erdal POLAT, Serhat SİREKBASAN, Burcu AYDIN, Zehra YILDIRIM, Yaşar BAĞDATLI, İsmail ÇEPNİ, Tayfur ÇİFT, Nezihe D. BALTALI
- 4. The possible role of zinc compounds on the cytotoxicity of latex Foley urinary catheters** 21 - 30
Mehmet Kürşat DERİCİ, Hakan BÜZKAYA, Ferat ŞAHİN
- 5. The seroprevalence of canine listeriosis in dogs in Konya province** 31 - 36
Zeki ARAS, Uçkun Sait UÇAN

■ Case Report

- 6. A case of human brucellosis associated with unintentional inoculation of the animal vaccine S19** 37 - 40
Ahmet KARAKAŞ, Gürkan MERT, Ömer ÇOŞKUN, Ömer Hilmi ALGA, Bülent Ahmet BEŞİRBELLİOĞLU, Can Polat EYİGÜN

■ Review

- 7. The evaluation of the aflatoxin presence in foods** 41 - 52
Gülderen YENTÜR, Buket ER

Türkiye’de 2007 - 2008 influenza sezonunda oseltamivir dirençli influenza A (H1N1) virüslerinin H274Y mutasyonu ile saptanması

Detection of oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) viruses with H274Y mutation during the 2007 - 2008 influenza season in Turkey

Ahmet ÇARHAN¹, Nurhan ALBAYRAK¹, Ayşe Başak ALTAŞ¹, Yavuz UYAR¹, Etem ÖZKAYA¹

ÖZET

Amaç: Kuzey yarım kürede 2007-2008 influenza sezonunun başlangıcından itibaren daha önce tanımlanmış olan influenza A (H1N1) virüsünün oseltamivir direncinin arttığı saptanmıştır. Bu direncin göstergesi, nöraminidaz (NA) geninin 274. aminoasidinin (H274Y) histidinden tirozine dönüşümü ile ortaya konmaktadır. Avrupa’da influenza A (H1N1) suşları arasında oseltamivire direnç oranı %25 olarak saptanmıştır. Bu oran ülkeler arasında farklılık göstermekle birlikte Norveç’te en yüksek (%67), İspanya’da en düşük (%2) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada 2007-2008 influenza sezonunda Türkiye’deki influenza A H1N1 izolatlarında oseltamivir direncini tespit etmek amaçlanmıştır.

Yöntem: Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) Ulusal İnfluenza Merkezi’nde 2007 Kasım - 2008 Mayıs ayları arasında real-time RT-PCR ile test edilerek influenza A (H1N1) pozitif olarak bulunan toplam 73 örnek arasından rastlantısal olarak 20 örnek seçilmiştir. Oseltamivir direncini tespit etmek için influenza A H1N1 suşlarının NA gen bölgesi 274. aminoasidini hedefleyen RT-PCR işlemi, histidinden tirozine dönüşümü göstermek

ABSTRACT

Objective: In the beginning of the 2007-2008 influenza season in Northern Hemisphere, the frequency of influenza A (H1N1) viruses bearing a previously defined oseltamivir resistance increased dramatically. This is conferring to the amino acid exchange from histidine to tyrosine at position 274 (H274Y) in neuraminidase (NA) gene. The overall frequency of oseltamivir resistance in influenza A (H1N1) strains in Europe was reported as being 25%. Although it varied between countries, it was shown that the highest percentage was in Norway (67%), and the lowest was in Spain (2%). In this study, it was aimed to evaluate the oseltamivir resistance in influenza A H1N1 isolates from Turkey during the 2007-2008 influenza season.

Method: During November 2007 - May 2008, 20 samples were randomly selected between 73 influenza A (H1N1) positive samples detected with real-time RT-PCR in National Influenza Center (NIC) of Refik Saydam National Public Health Agency (RSNPHA). To detect such resistant viruses in Turkey, an RT-PCR assay was performed targeting amino acid position at 274 in NA gene of H1N1 influenza strain to investigate the presence or absence of histidine to tyrosine mutation.

¹ RSHMB, Salgın Hast. Arş., Müd. Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ulusal İnfluenza Merkezi, Sıhhiye, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Nurhan ALBAYRAK

RSHMB, Salgın Hast. Arş., Müd. Vir. Ref. ve Arş. Lab., Ulusal Inf. Merk., Sıhhiye, ANKARA

Tel : +90 312 458 22 11

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

Geliş Tarihi / Received : 25.04.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 15.02.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.23600

Çarhan A, Albayrak N, Altaş AB, Uyar Y, Özkaya E. Türkiye’de 2007 - 2008 influenza sezonunda oseltamivir dirençli influenza A (H1N1) virüslerinin H274Y mutasyonu ile saptanması. Türk Hij Den Biyol Derg. 2012; 69(1): 1-6.

için uygulanmıştır. İnfluenza virüslerinin NA geni sekanslanmış ve daha önceden tanımlanmış gen dizileri ile karşılaştırılarak direnç belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda değerlendirilen toplam 20 influenza A (H1N1) izolatının iki (%10)'sinde oseltamivir direncinin göstergesi olan 274. (N1 numaralandırmasında 275) aminoasitte histidinden (H) tirozine (Y) değişim saptanmıştır. NA segmentinin kısmi dizi analizi sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBankasında GQ369800, GQ369799, GQ369798 giriş numaraları ile sunulmuştur.

Sonuç: NA dizi analizi ile ülkemiz orta ve doğu kısımlarından gelen influenza A (H1N1) suşlarının H274Y oseltamivir direncinin değerlendirilmesiyle Türkiye'de 2008 yılında nöraminidaz inhibitörlerine direncin görülmeye başladığını belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: İnfluenza A (H1N1), oseltamivir direnci, H274Y mutasyonu, Türkiye

The NA genes of influenza, viruses were sequenced. The presence of resistance was inferred by comparison with published sequences and known resistant mutations.

Results: In our study, the histidine (H) to tyrosine (Y) substitution at position 274 (275 in N1 numbering) of the NA gene was evaluated. The change indicating resistance to oseltamivir was observed in two isolates of the total 20 influenza A (H1N1) strains (10%). The partial sequence analysis results of NA segments were submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank with accession numbers GQ369800, GQ369799, GQ369798.

Conclusion: Resistance to neuraminidase inhibitors was determined by NA gene sequencing in the isolates of A/H1N1 strains taken from central and eastern parts of Turkey by monitoring the presence of H274Y oseltamivir-resistant in 2008.

Key Words: Influenza A (H1N1), oseltamivir resistance, H274Y mutation, Turkey

INTRODUCTION

The prevalence of oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1) dramatically increased worldwide at the beginning of 2007-2008 influenza season in the northern hemisphere. Recent reports indicated that by early 2009 most influenza A (H1N1) strains were resistant to oseltamivir (a neuraminidase inhibitor). These were associated with a specific "histidine-to-tyrosine mutation" at position 274 (H274Y; H275Y in N1 numbering system) in the neurominidase (NA) protein that confers high-level resistance to oseltamivir (1-5). An increased number of influenza A viruses (H1N1) with resistance to oseltamivir was first reported by World Health Organization (WHO, Norway) in January 2008 and high levels of oseltamivir resistance were determined among influenza A (H1N1) viruses in European countries and USA (4,6-8). WHO Global Influenza Surveillance Network (GISN) showed that 16% of community isolates (0%-67% by country) of

influenza A viruses (H1N1) were oseltamivir resistant in the 2007 - 2008 season. The overall frequency of oseltamivir resistance in influenza A (H1N1) strains from Europe was approximately 25%. The frequency of seasonal influenza A (H1N1) viruses resistance to oseltamivir varied between countries. The highest percentage was observed in Norway (67%), followed by France (47%), while increased levels of resistance to oseltamivir were detected worldwide (2-6,8).

The aim of this study was to determine the resistance to oseltamivir (neuraminidase inhibitor) in some influenza A H1 isolates obtained during the 2007-2008 influenza season in central and eastern parts of Turkey. In order to detect such histidine to tyrosine mutation in amino acid position 274 in NA gene, RT-PCR assay was performed.

MATERIAL and METHODS

To detect the dominant circulating influenza virus types and the efficiency of seasonal vaccine, Turkish Ministry of Health established in 2005 the National Influenza Surveillance Program (NISP). Influenza surveillance is conducted as sentinel surveillance system by two centers within 14 provinces, Refik Saydam National Public Health Agency (RSNPHA) National Influenza Center (NIC) and Istanbul University Faculty of Medicine Virology Laboratory which are the members of international information networks. The RSNPHA NIC is responsible for nine provinces in the central and eastern parts of Turkey for Sentinel Influenza Surveillance Programme (Figure 1). The clinical specimens were collected from nine sentinel collaborators as part of routine national virologic influenza surveillance during November 2007 - May 2008 influenza season. From all parts of the country, influenza activity was measured monthly to determine the predominant strain circulating in Turkey.

In this study, total of 20 influenza viruses, confirmed as influenza A (H1) by real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR), were selected from 73 influenza A (H1) positive specimens of 2007-2008 influenza season. The specimens that contain high titer of the viruses were selected in order to work sequencing.

The NA genes of influenza viruses were sequenced and resistance was evaluated by comparison sequence of obtained GenBank and known resistant mutations.

Total RNA was extracted using QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The samples were analyzed for influenza A and B as described in U.S. Centers of Disease Control (CDC)'s protocol, and positive result for influenza A virus were subtyped for H1 with subtype-specific primers provided from CDC (9). The neuraminidase inhibitor oseltamivir's resistance was tested by detecting the H274Y mutation using sequence analysis, through partial-length cycle sequencing of the coding region for the viral NA. A set of primers was designed to determine a residue of the neuraminidase protein at the amino acid position 274 and PCR was performed as previously described (10). The sequence results were subjected to BLAST analysis by using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank.

RESULTS

In 2007-2008 influenza season, Refik Saydam National Public Health Agency National Influenza Center collected specimens from nine provinces.



Figure 1. Sentinel Centers for Influenza Surveillance Programme *

* Purple coded provinces send samples to the laboratories in Istanbul, while green coded provinces send samples to the laboratory in Ankara.

All of the influenza A positive samples were tested for influenza A (H1N1) viruses by real-time RT-PCR. In this study, we were able to amplify sequences for 20 seasonal influenza A (H1N1) viruses. Total of 20 influenza A (H1N1) isolates were selected from 73 influenza A (H1N1) positive specimens of 2007-2008 influenza season. The NA genes of influenza viruses were sequenced and resistance was inferred by comparison with published sequences and known resistance mutations. The neuraminidase genes of all 20 seasonal influenza A (H1N1) viruses were successfully sequenced, and two of them (10%) had histidine (H) to tyrosine (Y) substitution at position 274 (275 in N1 numbering) of the NA gene which indicates resistance to oseltamivir. The partial

sequence analysis results of NA segments were submitted to National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank with accession numbers GQ369800, GQ369799, GQ369798. According to the topological phylogenetic analysis, phylogenetic relationship of isolates from different parts of Turkey is shown in Table 1.

DISCUSSION

In the beginning of 2007-2008 influenza season, the emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses was reported especially in Europe and the prevalence of oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) viruses dramatically increased worldwide. By the early 2009 influenza season,

Table 1. Phylogenetic relationship of influenza A (H1N1) isolates from different provinces in central and eastern parts of Turkey in 2007-2008 influenza season

Sequence product no	Isolate date / Isolate no	Isolate location	274 amino acid changes
4	2007/1370	Konya	Histidine to tyrosine substitution at amino acid position 274
5	2007/1558	Van	
6	2008/1	Ankara	
7	2008/47	Trabzon	
8	2008/117	Van	
9	2008/136	Trabzon	
10	2008/141	Trabzon	
11	2008/149	Diyarbakir	
12	2007/1530	Diyarbakir	
13	2008/11	Adana	No change
14	2008/30	Erzurum	
16	2008/38	Ankara	
17	2008/43	Trabzon	
18	2008/68	Malatya	
19	2008/77	Van	
20	2008/112	Malatya	
29	2008/155	Hakkari	
30	2008/156	Hakkari	
31	2008/223	Trabzon	
33	2008/261	Adana	Serine to alanine substitution at amino acid position 265 Histidine to tyrosine substitution at amino acid position 274

recent reports showed that most influenza A (H1N1) virus strains were resistant to oseltamivir (1-8, 11).

According to our previous study, total of 1157 clinical specimens were collected from nine provinces in 2007-2008 influenza season, and all of these samples were tested for influenza viruses by real-time RT-PCR. In this influenza season, 276 clinical specimens were found positive for influenza viruses. The predominant virus strain was evaluated as influenza A (55.7 %), and the dominant subtype was detected as H3 (61.2%). The 2007-2008 influenza season in Turkey was characterized by moderate clinical activity, and a dominance of influenza A (H3) (12).

The specimens were selected according to the CT level of the real-time PCR results. According to our knowledge, the resistance results were not affected by the specimen selection criteria, that we were used in this study.

In this study, we determined the resistance to neuraminidase inhibitors in influenza A H1 isolates obtained during 2007-2008 influenza season in central and eastern parts of Turkey. Results of our analysis of 2007-2008 influenza season isolates revealed that 10% of the tested isolates were resistant to

oseltamivir. During November 2007-April 2008, oseltamivir resistance was reported in 6 out of 30 (20%) H1N1 isolates from western part of Turkey by Istanbul University Virology Laboratory (13). Up to June 2008, 52 countries worldwide reported similar results. The influenza A H1N1 viruses carried a specific neuraminidase mutation (H274Y) that confers high-level resistance to oseltamivir, despite of low antiviral drug usage (4, 5, 11).

In this report, we determined the presence of H274Y oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) strains in central and eastern parts of Turkey. The results indicate that resistance to neuraminidase inhibitors (NAIs) has begun to be detected in A/H1N1 isolates in Turkey in 2007-2008 influenza season.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank to Turkish Ministry of Health, Primary Health Care Directorate and Health Directorates of Provinces and physicians and also thank to the technical staff of RSNPHA Virology Reference and Research Laboratory for their kind support.

REFERENCES

1. Avellon A, Cabrerizo M, Miguel T, Perez-Brena P, Tenorio A, Perez JL, et al. Widespread oseltamivir resistance in influenza A viruses (H1N1), South Africa *Emerg Infect Dis*, 2008; 14:1809-10.
2. Ciancio BC, Meerhoff TJ, Kramarz P, Bonmarin I, Borgen K, Boucher CA, et al. Oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) viruses detected in Europe during season 2007-8 had epidemiologic and clinical characteristics similar to co-circulating susceptible A(H1N1) viruses. *Euro Surveill*, 2009; 14(46): pii 19412.
3. Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis*, 2009; 15: 155-62.
4. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van der Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis*, 2009; 15: 552-60.
5. Mossong J, Opp M, Gerloff N, Hau P, Kremer J, Lackenby A. Emergence of oseltamivir-resistant influenza A H1N1 virus during the 2007-2008 winter season in Luxembourg: Clinical characteristics and epidemiology. *Antiviral Res*, 2009; 84: 91-4.
6. Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA, et al. Infections with oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus in the United States. *JAMA*, 2009; 301: 1034-41.

7. Gerloff NA, Kremer JR, Mossong J, Opp M, Muller CP. Genomic Diversity of Oseltamivir-Resistant Influenza virus A (H1N1), Luxembourg, 2007-2008. *Emerg Infect Dis*, 2009; 15: 1523-4.
8. Burrel S, Roncin L, Lafon ME, Fleury H. Oseltamivir susceptibility in South-Western France during the 2007-8 and 2008-9 influenza epidemics and the ongoing influenza pandemic 2009. *Euro Surveill*, 2009; 14(38): pii 19334.
9. CDC. <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptcr/en/index.html>
10. Wright KE, Wilson GAR, Novosad D, Dimock C, Tan D, Weber JM. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 1180-84.
11. Vicente D, Cila G, Montes M, Mendiola J, Perez-Trallero E. Rapid spread of drug-resistant influenza A viruses in the Basque Country, Northern Spain, 2000-1 to 2008-9. *Euro Surveill*, 2009; 14(20): pii 19215.
12. Carhan A, Altas AB, Albayrak N, Uyar Y. Influenza surveillance results in 2007-2008 winter season in nine provinces of Turkey. *Mikrobiol Bul*, 2009; 43(2): 235-41.
13. Ciblak MA, Hasoksuz M, Escuret V, Valette M, Gul F, Bozkaya E, Badur S. Surveillance and oseltamivir resistance of human influenza A virus in Turkey during the 2007-2008 season. *J Med Virol*, 2009; 81(9): 1645-51.

Diyaliz sularının mikrobiyal kontaminasyon ve bakteriyel endotoksin testleri ile kontrolü

Control of dialysis water by microbial contamination and bacterial endotoxin tests

Fesem BAŞARI¹, Öznur UYANIK¹

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Adana Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü Su ve Gıda Mikrobiyoloji Laboratuvarına kontrol amacıyla gelen diyaliz sularının mikrobiyal kontaminasyon ve bakteriyel endotoksin test sonuçları ile bu testlerin birbiriyle olan ilişkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada Ocak 2009- Aralık 2010 tarihleri arasında laboratuvarımıza gelen 245 adet diyaliz suyu incelenmiştir. Mikrobiyal kontaminasyon örneklerin tamamında, bakteriyel endotoksin ise sadece 198 örnekte çalışılmıştır. Mikrobiyal kontaminasyon çalışmaları, Plate Count Agar (PCA) ile yapılmıştır. Bakteriyel endotoksinin tespiti için ise Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) yöntemi çalışılmıştır. Mikrobiyal kontaminasyon ve bakteriyel endotoksin testlerinden elde edilen sonuçlar "Su Arıtma Sistemi Yönergesi" ve "Avrupa Farmakopesi"nde belirtilen kriterlere göre değerlendirilmiştir. Sonuçların yıllara göre değişimini karşılaştırmak için istatistiksel değerlendirmelerde ki-kare testi kullanılmış ve

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the microbial contamination and bacterial endotoxin levels in dialysis water samples sent to the Water and Food Microbiology Laboratory of the Adana Hygiene Institute Refik Saydam Hygiene Center, and to assess factors that might influence the results of these tests.

Method: Two hundred forty five dialysis water samples sent to the laboratory between January 2009 and December 2010 were tested; all of them for microbial contamination and 198 of them for bacterial endotoxin levels. Microbial contamination was evaluated by using the Plate Count Agar (PCA) method while the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) assay was used for the detection of bacterial endotoxins. The results were evaluated according to the criteria of the "Directives on the Water Purification Systems" and "the European Pharmacopoeia". To compare the annual differences, the chi-square test was used for statistical evaluation and results

¹ Adana Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, ADANA

İletişim / Corresponding Author : Fesem BAŞARI

Adana Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, ADANA

Tel : +90 322 453 33 41

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

Geliş Tarihi / Received : 06.06.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 15.02.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.47135

Başarı F, Uyanık Ö. Diyaliz sularının mikrobiyal kontaminasyon ve bakteriyel endotoksin testleri ile kontrolü. Türk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(1): 7-14.

$p < 0,05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Mikrobiyal kontaminasyon testi ile toplam aerobik mikroorganizma sayısı (TAMS) 100 CFU/ml'den fazla olanların oranı %11,7 iken, 2010 yılında bu oran %4,8'e gerilemiştir ($p > 0,05$). Bakteriyel endotoksin testinde ise 2009 yılında 0,25 IU ml'den fazla olanların oranı %26,7'den, 2010'da %16,5'e azalmıştır ($p > 0,05$). 2009-2010 yılları arasında mikrobiyal kontaminasyon testi ile çalışılan toplam 245 örneğin 20 tanesinde (%8,2) TAMS 100 CFU/ml'den fazla bulunmuştur. Aynı yıllarda bakteriyel endotoksin testi çalışılan 198 örneğin 43 (%21,7)'ünde bakteriyel endotoksin değeri 0,25 IU/ml'den fazla bulunmuştur. Bakteriyel endotoksin testi sonucu 0,25 IU/ml'den fazla olan 43 örneğin 20 (%46,5)'inde mikrobiyal kontaminasyon testi sonucu oluşan TAMS 100 CFU/ml'den fazla saptanırken, 23 (%53,5)'ünde ise TAMS 100 CFU/ml'den az olarak tespit edilmiştir. Yıllara göre saptanan pozitifliklerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Sonuç: Çalışmamızda diyaliz sularında endotoksin seviyelerinin ölçülmesi, mikrobiyal kontaminasyon testi sonucunda elde edilen TAMS'ı tamamlayıcı özelliindedir. Bu nedenle endotoksin seviyelerinin, bakteri sayımı ile beraber yapılması gerektiği kanaatindeyiz. Diyaliz sularının periyodik kontrollerinin düzenli yapılması, laboratuvar testlerinin zamanında, doğru, güvenilir ve tam olması büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Sözcükler: Diyaliz suyu, mikrobiyal kontaminasyon, endotoksin

with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results: Total aerobic microorganism count (TAMC) found by microbial contamination test higher than 100 CFU/ml were 11.7% in 2009, while only 4.8% ($p > 0.05$) in 2010. On the other hand, in 26.7% of the dialysis water samples the levels of bacterial endotoxins was higher than 0.25 IU/ml in 2009, this percentage dropped to 16.5% in 2010 ($p > 0.05$). During 2009-2010, 245 microbial contamination tests were performed and in 20 (8.2%) of the samples the TAMC values were higher than 100 CFU/ml, while in 43 (21.7%) out of 198 of the samples the bacterial endotoxin levels were higher than 0.25 IU/ml. Out of 20 in 43 samples, a bacterial endotoxin levels were > 0.25 IU/ml were also found as microbiologically contaminated (> 100 CFU/ml), while in remaining 23 samples the level was < 100 CFU/ml. There were no statistically significant differences in the percentages of positives found in 2009 and 2010.

Conclusion: The results of our study indicate that the detection of endotoxins is a complementary factor to microbial contamination in the bacteriological monitoring of dialysis waters. We recommend that level of endotoxin should be taken into account when the bacterial contamination test is used. It is important that periodic control of dialysis waters should be done by different reliable laboratory tests.

Key Words: Dialysis water, microbial contamination, endotoxin

GİRİŞ

Böbrek yetmezliği şikâyeti olan hastalar normal popülasyonla karşılaştırıldığında yaşamları süresince daha fazla miktarlarda suya maruz kalmaktadırlar. Böbrek yetmezliği olan hastalara diyaliz sırasında her

hafta yaklaşık 360-400 litre su uygulanırken, sağlıklı bir insan her hafta yalnızca 14-15 litre su almaktadır. Bu hesaplamalara göre diyaliz hastaları yıllık olarak 18.000 -36.000 litre arasında suya maruz kalmaktadır.

Suda bulunan düşük moleküler ağırlıklı maddeler (endotoksin, ekzotoksin ve bakteri kaynaklı DNA parçaları) diyaliz yoluyla direkt olarak hastaların kan dolaşımına geçebilmektedir (1-3). Kontamine sulardan korunmada mide asidi ve bağırsak bariyeri, diyaliz membranından çok daha etkilidir. Hemodiyaliz işlemi süresince hasta kanı yarı geçirgen bir membranla bağlantı halinde olup, diyaliz sıvısının bileşenleri diyalize bağlı komplikasyonların oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Mikroorganizmalar membran porlarından geçemeyebilir, fakat bakteriyel endotoksinler (lipopolisakkaritler), ekzotoksinler ve bakteri kaynaklı kısa DNA parçaları diyaliz membranından geçebilir ve böylece hasta kanına karışabilirler (1-4).

Filtrasyon, reverozmozis ve dezenfeksiyon için etkili yöntemlerin yeterince sağlanamaması gibi sebeplerden dolayı suların yeterince arıtılmaması, hemodiyaliz hastalarında önemli oranda bakteriyemi pirojenitesine neden olmaktadır. Nonfermantatif gram-negatif bakteriler distile sularda bile hızlıca çoğalabilmektedirler. Hemodiyaliz solüsyonlarında glükoz ve bikarbonat bulunmasından dolayı bu bakteriyel üreme daha hızla olabilmekte ve endotoksinin yüksek seviyelerine ulaşmasına yol açmaktadır. Üstelik işlem görmüş su ve diyalizat örnekleri klinikte kullanılan çeşitli antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı dirençli bakteriler tarafından enfeksiyon kaynağı olabilmektedir (3,4). Bakteriyel biyofilm ve buna bağlı kontaminantlar hemodiyaliz hastalarında monosit ve makrofajların aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin (interlökin-1, interlökin-6, tümör nekrozis faktör) serbest kalması, enflamasyonu tetikleyerek kısa ve uzun dönemde yaşamı kısaltan çeşitli komplikasyonlara neden olmaktadır (1,5-7).

Bu çalışmamızda Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Adana Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü Su ve Gıda Mikrobiyoloji Laboratuvarına kontrol amaçlı gelen diyaliz sularında mikrobiyal kontaminasyon, bakteriyel endotoksin seviyeleri ve bu testlerin birbiriyle olan ilişkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2009- Aralık 2010 tarihleri arasında Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bulunan bazı üniversite, eğitim ve araştırma, devlet ve özel hastanelerin diyaliz merkezleri ile özel diyaliz merkezlerinden laboratuvarımıza gelen 245 adet diyaliz suyu retrospektif olarak incelenmiştir. Mikrobiyolojik olarak çalışılması talep edilen parametreler doğrultusunda mikrobiyal kontaminasyon ve bakteriyel endotoksin testleri yapılmıştır. Mikrobiyolojik ekim metodu olarak plak dökme yöntemi kullanılmıştır. Her örnekten paralel olmak üzere, bir dilüsyon yapmadan bir de 1/10 oranında dilüsyon yaparak toplam dört adet ekim yapılmıştır. Ekim için steril boş petri plaklarına, dilüsyonlu ve dilüsyonsuz örneklerden birer ml diyaliz suyu örneği konulmuştur. Önceden hazırlanarak steril tüplere aktarılan ve 4 °C'de saklanan besiyeri, çalışma esnasında kaynatılarak eritilip, daha sonra su banyosu kullanılarak yaklaşık 45 °C'ye getirilmiştir. Tüplerdeki Plate Count Agar (PCA) besiyeri, örneğin bulunduğu petri plakları üzerine yavaşça dökülmüştür. Besiyeri ve örneğin homojen dağılımı sağlanmıştır. Besiyeri donduktan sonra petri plakları ters çevrilerek 35±1 °C'de beş gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her plakta üreyen koloniler sayılmış, ortalaması alınmış ve bir ml'deki koloni sayısı hesaplanmıştır. Koloni sayısı 100 CFU/ml'den fazla olanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Her çalışmada dilüsyonda kullanılan steril distile saf sudan bir ml steril petri plağına aktarılmış ve aynı yöntemle besiyeri eklenerek herhangi bir üreme olup olmadığı kontrol edilmiştir (8,9).

Bakteriyel endotoksini saptamak için laboratuvarına gelen 198 örneğe Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Jel-Clot testi kullanılmıştır. Üretici firmadan elde edilen kitin (Pyrosate Kit, Rapid Endotoxin Detection, Catalog: PSD10, Cape Cod- MA02536 USA) çalışma yöntemlerine göre; steril bir pipetle 0,5 ml örnekten alınarak numune tüplerine konmuştur. Daha sonra bu tüplerden 0,25 ml alınarak kontrol

tüpüne aktarılmıştır. 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Değerlendirme daha önceki çalışmalar göz önüne alınarak şu şekilde yapılmıştır: Numune tüplerinde katılaşma yoksa numune 0,25 IU/ml'den az endotoksin, katılaşma varsa 0,25 IU/ml'den fazla endotoksin içermektedir (10,11).

Mikrobiyal kontaminasyon ve bakteriyel endotoksin testleri Su Arıtma Sistemi Yönergesi (2009) ve Avrupa Farmokopesi (2005)'nde belirtilen kriterlere göre değerlendirilmiştir (9,11,12).

Sonuçların yıllara göre değişimini karşılaştırmak için istatistiksel değerlendirmelerde ki-kare testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Laboratuvara gelen 245 örnekten mikrobiyal kontaminasyon testi sonucunda TAMS 100 CFU/ml'den fazla olanlarının oranı 2009 yılında %11,7 iken, 2010 yılında %4,8'e düşmesine karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (ki-kare=2,97, $p > 0,05$). İki yıllık periyotta mikrobiyal kontaminasyon testi çalışılan toplam 245 diyaliz suyu örneğinin

20 (%8,2)'sinde bakteri koloni sayısı 100 CFU/ml'den fazla bulunmuştur. Çalışmamızda 2009 yılında LAL testi 0,25 IU/ml'den fazla olanların oranı %26,7'den, 2010 yılında %16,5'e gerilemesine karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (ki-kare=2,51, $p > 0,05$). Toplamda 198 örnekte ise bakteriyel endotoksin çalışılmış ve çalışılan örneklerin 43 (%21,7)'ünde bakteriyel endotoksin değeri 0,25 IU/ml'den fazla bulunmuştur. Bakteriyel endotoksini 0,25 IU/ml'den fazla bulunan 43 örneğin 20 (%46,5)'si TAMS 100 CFU/ml'den fazla olan örneklerde, 23 (%53,5)'ü ise mikrobiyal kontaminasyon testi sonucu 100 CFU/ml'den az olan örneklerde saptanmıştır. Bakteriyel endotoksini 0,25 IU/ml'den fazla bulunan 43 örneğin mikrobiyal kontaminasyonla ilişkisi yönünden yıllara göre değişimi karşılaştırılmıştır. Hem mikrobiyal kontaminasyonu 100 CFU/ml'den hem de bakteriyel endotoksini 0,25 IU/ml'den fazla olan örneklerin sayısı ile mikrobiyal kontaminasyonu 100 CFU/ml'den az ve bakteriyel endotoksini 0,25 IU/ml'den fazla olanların sayısı 2010 yılında gerilemesine karşın (Tablo 1) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (ki-kare=0,32, $p > 0,05$).

Tablo 1. Diyaliz sularının mikrobiyal kontaminasyon ve bakteriyel endotoksin dağılımları

Yıl	Mikrobiyal Kontaminasyon			Bakteriyel Endotoksin			Toplam çalışılan örneklerde Mikrobiyal Kontaminasyon ve Bakteriyel Endotoksin ilişkisi	
	Örnek Sayısı n	<100 CFU/ml Olanlar n (%)	>100 CFU/ml Olanlar n (%)	Örnek Sayısı n	<0,25 IU/ml Olanlar n (%)	>0,25 IU/ml Olanlar n (%)	>100CFU/ml, >0,25 IU/ml Olanlar n (%)	<100CFU/ml, >0,25 IU/ml Olanlar n (%)
2009	120	106 (88,3)	14 (11,7)	101	74 (73,3)	27 (26,7)	14 (51,9)	13 (48,1)
2010	125	119 (95,2)	6 (4,8)	97	81 (83,5)	16 (16,5)	6 (37,5)	10 (62,5)
Toplam	245	225 (91,8)	20 (8,2)	198	155 (78,3)	43 (21,7)	20 (46,5)	23 (53,5)

TARTIŞMA

Endotoksinler Gram-negatif bakterilerin ve bazı siyanobakterilerin hücre duvarlarının dış çeperinin bir parçasını oluşturan ve lipopolisakkaritlerden oluşan bileşenlerdir. Endotoksinlerin tespitine yönelik bir yöntem olan LAL testi ilk kez 1960'larda Levin ve Bang tarafından gerçekleştirilmiştir (13). Diyaliz sularının kabul edilebilir mikrobiyolojik ve kimyasal limitlerine yönelik standartlar da yine 1960'lı yıllarda kabul görmeye başlamıştır. Sonraki yıllarda ülke, bölge ve uluslararası alanlarda diyaliz sularının limitlerini belirlemeye yönelik çeşitli standartlar yayınlanmıştır (14).

Ülkemizde ise Türk Nefrolojisi Derneği'nin 2009 yılı verilerine göre renal replasman tedavisi gören hasta sayısı her geçen gün hızla artmaktadır. 2009 yılı sonu itibarıyla 59.443 hastanın renal replasman tedavisi gördüğü tespit edilmiştir. Son yıllarda böbrek yetmezliği prevalansı milyon nüfus başına 819, insidansı ise 197 olarak bildirilmiştir. Hemodiyaliz (%78,5) en sık kullanılan tedavi yöntemi olduğu, bunu transplantasyon (%12,4) ve periton diyalizinin (%9,1) takip ettiği bildirilmiştir (15).

Brezilya'da 1996 yılında 60'tan fazla diyaliz hastası su sisteminde, mavi/yeşil alglerden biri olan *Microcystis aeruginosa*'nın aşırı üremesi sonucu karaciğer yetmezliğinden ölmüştür. Çünkü bu algler karaciğer için oldukça toksik olan siyanotoksin üretmektedirler. Bu nedenle diyaliz hastalarının kullanacağı hemodiyaliz ünitesi diyaliz suları temiz olmalı ve hiçbir organik komponent içermemelidir (2). Diyaliz sularının mikrobiyal kontaminasyonunun kabul edilebilir sınırlar altında tutulabilmesi, diyaliz merkezlerinde ciddi bir sorundur. Mikrobiyolojik kalitenin iyileştirilmesi başta hastalar olmak üzere bu birimlerde çalışanlar için de son derece önem arz etmektedir (16).

Japonya'da Ikuto ve ark. (17) diyaliz sularının mikrobiyal kontaminasyonunu saptamak amacıyla yaptıkları çalışmalarında koloni sayısını 100 CFU/ml'den fazla olarak 2006 yılında %96,69 ve 2007

yılında %97,4 oranında bulmuşlardır. Giuseppe ve ark. (18) ise çeşitli Avrupa ülkeleri, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada gibi ülkelerde yapılmış çok merkezli çalışmalarda %7-35 oranında mikrobiyal kontaminasyonu 200 CFU/ml'den fazla olarak bildirdiklerini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda mikrobiyal kontaminasyonu 100 CFU/ml'den fazla olanların oranı 2009'da %11,7 iken, 2010'da %4,8'e gerilemesine karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (ki-kare=2,97, p>0,05). Toplamda 245 örnekte mikrobiyal kontaminasyon testi çalışılmış ve 20 (%8,2) örnekte TAMS 100 CFU/ml'den fazla bulunmuştur (Tablo 1). Bu sonuç Japonya'dan bildirilen çalışmadan biraz yüksek olmakla birlikte literatürlerde diğer çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiştir (18). Bu farklılıkların nedeni kullanılan yöntem ve besiyerlerine de bağlı olabilir (19). Nitekim, Klas van der ve ark. (20) ile Adriano ve ark. (21) iki farklı besiyeri (Triptik soya agar ve Reasoner's 2A) ve farklı yöntemler (limiti 100 CFU/ml'den fazla veya 200 CFU/ml'den fazla) kullanarak yaptıkları çalışmalarında farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Bu sonuçlara göre eğer koloni sayısı için limit 200 CFU/ml'den fazla olarak kabul edilseydi sadece bir numune 200 CFU/ml'den fazla olarak değerlendirilmiş olacaktı. Diğer sekiz numune 100 CFU/ml- 200 CFU/ml arasında, 11 numune ise 100 CFU/ml'den fazla olarak kaydedilmiştir.

Ülkelerin diyaliz sularında kullandıkları standartlar da bakteriyel endotoksin testi açısından değişiklik göstermektedir (19). Japonya'da Ikuto ve ark. (17) çalışmalarında diyaliz sularının bakteriyel endotoksinini 2006'da %89,0 IU/ml ve 2007'de %93,6 oranında 0,050 IU/ml'in altında bildirmişlerdir. Litvanya'dan Skarupskiene ve ark. (1) çalışmalarında %86 oranında 0,25 IU/ml'in altında bildirmişlerdir. Mısır'dan El-Koraie ve ark (16) çalışmalarında çeşitli ünitelerden aldıkları örneklerde bakteriyel endotoksin oranının %57-100 oranında 0,25 IU/ml'den fazla olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda bir önceki yıla göre LAL testi 0,25 IU/ml'den fazla olanların oranının %26,7'den %16,5'e gerilemesine karşın

istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (ki-kare=2,51, P>0,05). Hem mikrobiyal kontaminasyon hem de bakteriyel endotoksin sonuçlarında, limit değerlerin üzerinde çıkanların bir önceki yıla göre azalması istatistiki olarak anlamlı olmasa da diyaliz merkezlerindeki iyileşmelerin bir göstergesi olarak düşünülebilir. Toplamda 198 örnekte LAL testi çalışılmış ve 43 (%21,7)'ünde 0,25 IU/ml'den fazla bulunmuştur (Tablo 1). Bu sonuç Japonya ve Litvanya'dan bildirilen sonuçlara göre yüksek iken, Mısır'dan bildirilen sonuçlara göre oldukça düşüktür. Bu durum diyaliz merkezlerinin özelliklerine ve kullanılan yöntemlerin farklılığına bağlı olabilir.

Almanya'dan Bambauer ve ark (22) 30 diyaliz merkezinde artırlmış su örneklerinde ve diyalizatlarda bakteriyel kontaminasyon ve endotoksin araştırmışlar, su örneklerinde bakteriyel konsantrasyonu %17,8 ve diyalizat örneklerinde %11,7 oranında, endotoksin oranlarını ise sırası ile %12,2 ve %27,5 pozitif bulmuşlardır. Amerika'dan Klein ve ark (23) 51 akut ve kronik diyaliz merkezinde artırlmış su örneği ve rastgele seçtikleri diyalizat örneklerinde mikrobiyal kontaminasyonu sırası ile %35,3 ve %19,0 olarak bildirirken, her iki ülkenin araştırmacıları da bakteriyel endotoksin ile mikrobiyal kontaminasyon arasında tutarsızlık gözlendiğini bildirmişlerdir (22,23). Düşük seviyede bakteri üremesi ve yüksek seviyede endotoksin konsantrasyonuna, diyaliz borucuklarındaki bakteriyel tutunma, yapışma veya biyofilm gibi nedenlerle endotoksin ve bakteri parçalarının diyalizata karışmasının yol açtığı düşünülmektedir (14,24). Bazı araştırmacılar da su ve diyaliz örneklerinde bakteriyel üreme ile endotoksin konsantrasyonları arasında bir bağlantı kurulamamasının nedenini farklı bakteri türlerinin farklı endotoksin aktivitelere sahip olabileceği şeklinde açıklamışlardır. Ayrıca lipopolisakkaritlerin mikroorganizma yıkıntıları sonucu serbest kalmasına bağlı olarak düşük CFU/ml ve yüksek endotoksin değerleri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (16,25).

Bizim çalışmamızda da bakteriyel endotoksin oranlarının bir önceki yıla göre düşmüş olması pozitif bir gelişmedir (Tablo 1). Ancak, 0,25 IU/ml'den fazla bulunan 43 örneğin 20 (%46,5)'inde mikrobiyal kontaminasyonun 100 CFU/ml'den fazla olması beklenen bir sonuç iken, ilginç olarak 23 (%53,5) örnekte bakteriyel endotoksin, mikrobiyal kontaminasyon 100 CFU/ml'den az olan örneklerde 0,25 IU/ml'den fazla olarak saptanmıştır. Her iki grubun sayılarında da 2009 yılına göre 2010 yılında gerileme görülmesine karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (ki-kare=0,32, p>0,05). Diğer araştırmacılara uygun olarak bizim çalışmamızda da mikrobiyal kontaminasyonu limit değerinin üstünde çıkanlardan (%46,5) mikrobiyal kontaminasyonu limit değerinin altında çıkanlarda (%53,5) bakteriyel endotoksin oranı daha fazla bulunmuştur. Diğer araştırmacılara uygun olarak çalışmamızda mikrobiyal kontaminasyon ile bakteriyel endotoksin arasında yeterli bir ilişki bulunamamıştır.

Diyaliz sularının kalitesi bu suları oluşturan bileşenlere ve bunların kimyasal özelliklerine, hazırlanış şekline, kullanmadan önce kalite kontrollerinin yapılmasına, iyi ve modern cihazların kullanılmasına, kullanılan filtrelerin kalitesine ve özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca diyaliz suyu sistemlerinin bakımına en uygun dezenfeksiyon yönteminin seçilmesi, çıkabilecek olası problemlerin önceden tahmin edilebilmesi ve çözüm yollarının önceden belirlenmesi, uluslararası kalite standartlarının uygulanması sonuçlara etkili olabilmektedir (2,3,14,18,24).

Bakteriyel endotoksin ve diğer mikrobiyal kontaminantlar hemodiyaliz hastalarında bağışıklık sisteminde görev yapan hücreleri uyarıp, proinflatuvar sitokinlerin serbest kalmasını sağlamakta, enflamasyonu tetiklemekte, buda kısa ve uzun dönemde yaşamı kısaltan çeşitli komplikasyonlara neden olmaktadır (1,5-7). Bu durum göz önünde bulundurularak çalışmamızda pozitif çıkan örneklerin telefon, faks gibi iletişim

araçlarıyla hızlı bir şekilde geri bildirimleri yapılmış ve hastalarda oluşabilecek olası komplikasyonlar önlenmeye çalışılmıştır.

Sonuç olarak; çalışmamızda endotoksin seviyelerinin ölçülmesi diyaliz sularının bakteriyolojik olarak gözlemlenmesinde mikrobiyal kontaminasyonu tamamlayıcı bir özellik taşımaktadır. Bu nedenle

endotoksin seviyelerinin, bakteri sayımına ilaveten yapılması gerekmektedir. Ayrıca, ülkemizde son yıllarda diyaliz hastalarının artışı göz önünde bulundurulduğunda, yetkili kurumlarca periyodik kontrollerin yapılması, laboratuvar testlerinin zamanında, doğru, güvenilir ve tam olması büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Skarupskienė I, Bumblytė IA, Tamošaitis D, Venterienė J, Kuzminskis V. The level of endotoxins in hemodialysis water and dialysate in Lithuanian hemodialysis centers. *Medicina (Kaunas)*, 2010; 46(8): 556-60.
2. AHMAD S. Essentials of water treatment in Hemodialysis. *Hemodialysis International*, 2005; 9: 127-34.
3. Borges CRM, Lascowski KMS, Filho NR, Pelayo JS. Microbiological quality of water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. *J Appl Microbiol*, 2007; 103: 1791-97.
4. Hoenich NA, Ronco C, Levin R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purif*, 2006; 24: 11-8.
5. Cappelli G, Perrone S, Inguaggiato P, Ferramoska E, Albertazzi A. Design of water treatment plants in the year 2000 and beyond. *Saudi J Kidney Dis Transplant*, 2001; 12(3): 398-405.
6. Eyileten T, Yenicesu M, Altun B, Çakar M, Karaman M, Ay SA, et al. Hemodiyaliz hastalarında diyalizatın mikrobiyolojik niteliğinin enflamasyon belirteçleri üzerine etkisi. *Türk Neph Dia ve Transpl Derg*, 2010; 19(3): 162-9.
7. Cappelli G, Sereni L, Scialoja MG, Morselli M, Perrone S, Ciuffreda A, et al. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. *Nephrol Dial Transplant*, 2003; 18: 2105-11.
8. Anonymous. Su Kalitesi-Kültürü yapılabilen Mikroorganizmaların Sayımı-Agar Besiyerinde Aşılama ile Koloni Sayımı. Türk Standartları Enstitüsü, TS EN ISO 6222. Şubat 2002.
9. Total Viable Aerobic Count, European Pharmacopoeia 5.0, (2005) Vol.1, Strasbourg, France, pp. 154. ISBN/ISSN :978-92-871-5281-7.
10. Pyrosate Kit, Rapid Endotoxin Detection, Catalog: PSD10, Cape Cod- MA02536 USA.
11. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia 5.0, (2005) Vol.1, Strasbourg, France, pp. 161. ISBN/ISSN :978-92-871-5281-7.
12. Anonymous. Su Arıtma Sistemi Yönergesi. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. 17.04.2009 tarih ve 15873 sayılı.
13. Reyes MI, Perez CM, Negron EL. Microbiological assessment of house and imported bottled water by comparison of bacterial endotoxin concentration, heterotrophic plate count and fecal coliform count. *PRHSJ*, 2008; 27(1):21-6.
14. Ward RA. Worldwide guidelines for the preparation and quality management of dialysis fluid and their implementation. *Blood Purif*, 2009; 27(1): 2-4.
15. Süleymanlar G, Seyahi N, Altıparmak MR, Serdengeçti K. Türkiye’de renal replasman tedavilerinin güncel durumu: Türk Nefroloji Derneği Kayıt Sistemi 2009 Yılı Rapor Özeti. *Türk Neph Dia ve Transpl Derg*, 2011; 20 (1): 1-6.

16. El-Koraie AF, Hazzah WA, Abbas AA, El-Shazly SA. Bacteriological monitoring of dialysis fluid in 2 hemodialysis units in Alexandria, Egypt. *Saudi Med J*, 2007; 28(8): 1234-8.
17. Masakane I, Takemoto Y, Nakai S, Tsubakihara Y, Akiba T, Watanabe Y, et al. Bacteriological water quality in the central dialysis fluid delivery system from the survey of the Japanese Society for Dialysis Therapy. *Blood Purif*, 2009; 27(1): 11-6.
18. Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant*, 2003; 18(7): 21-5.
19. Nystrand R. Microbiology of Water and Fluids for Hemodialysis. *J Chin Med Assoc*, 2008;71(5): 223-9.
20. Linde KVD, Lim BT, Rondeel JMM, Antonissen LPMT, Jong GMTD. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: A comparison between tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. *Nephrol Dial Transplant*, 1999; 14: 2433-7.
21. Bugno A, Almodóvar AAB, Pereira TC. Enumeration of Heterotrophic Bacteria in water for dialysis: Comparison of the Efficiency of Reasoner'2 Agar and Plate Count Agar. *Braz J Microbiol*, 2010; 41: 15-8.
22. Bambauer R, Schauer M, Jung WK, Daum V, Vienken J. Contamination of dialysis water and dialysate: A survey of 30 centers. *ASAIO J*, 1994;40(4):1012-6.
23. Klein E, Pass T, Harding GB, Wright R, Million C. Microbial and endotoxin contamination in water and dialysate in the central United States. *Artif Organs*, 1990;14(2):85-94.
24. Perez-Garcia R, Rodriguez-Benitez POC. Why and how monitor bacterial contamination of dialysate? *Nephrol Dial Transplant*, 2000; 15: 760-4.
25. Lonnemann G. Assessment of the quality of dialysate. *Nephrol Dial Transplant*, 1998; 13 (5): 17-20.

İstanbul'da hayat kadınları ile hastanemizin kadın hastalıkları ve doğum kliniği hastalarındaki vajinal kandidiyazın görülme sıklığının 10 yıl önceki oranla kıyaslanması

Comparison of the incidence of vaginal candidiasis among prostitutes in Istanbul and patients of the Obstetrics and Gynecology Clinic of the Cerrahpaşa Medical Faculty

Erdal POLAT¹, Serhat SİREKBASAN¹, Burcu AYDIN², Zehra YILDIRIM¹,
Yaşar BAĞDATLI¹, İsmail ÇEPNİ², Tayfur ÇİFT², Nezihe D. BALTALI³

ÖZET

Amaç: Kandida türleri ile oluşan kandidiyaza dünyanın her tarafında rastlanmaktadır. 1998 yılında İstanbul'da hayat kadınları ve poliklinik hastalarından alınan vagina akıntı örnekleri ile yaptığımız çalışmada kandidiyaz oranı poliklinik hastalarında %30,3, hayat kadınlarında ise %11,4 olarak bulunmuştur. Aradan geçen 10 yıllık süre zarfında hayat kadınları ve poliklinik hastalarında kandidiyaz oranındaki değişimin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada Deri ve Tenasül Hastalıkları Hastanesi'ne getirilen 93 hayat kadını ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniğine başvuran ve trikomoniyazis vaginiti şüphesi olan 114 hasta olmak üzere toplam 207 hastadan alınan vaginal akıntı örneği araştırılmıştır. Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar Gram boyanarak mikroskopta incelenmiştir. Ayrıca bir adet sıvı ve bir adet katı Sabouraud besiyerine ekilerek kandida kültürü yapılmıştır.

Bulgular: Toplam 207 vaginal akıntı örneğinin 31 (%14,9)'inde kandida üremiş, bunların 25 (%80,7)'inde Gram boyama ile maya hücreleri görülmüştür.

ABSTRACT

Objective: Candidiasis caused by *Candida* species has been reported worldwide in humans. In a study conducted in 1998 with samples of vaginal discharges of outpatients and prostitutes in İstanbul, a prevalence of candidiasis of 30.3% and 11.4%, respectively was found. The aim of this study was to determine the changes in the rate of candidiasis in prostitutes and outpatients during the past ten years.

Method: Vaginal discharge samples of 207 patients with suspected trichomoniasis vaginitis were examined. The samples were obtained from 93 prostitutes admitted to the Hospital of Skin and Venereal Diseases and from 114 outpatients admitted to İstanbul Medical Faculty, Department of Obstetrics and Gynecology Outpatient Clinic. Smears prepared from the samples were examined under a microscope by Gram staining. Additionally, *Candida* culture tests were performed by inoculating a fluid and a solid Sabouraud medium.

Results: *Candida* was identified in 31 (14.9%) of the 207 samples of vaginal discharges examined, while yeast cells were detected in 25 of them (80.7%) by

¹ İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

² İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İSTANBUL

³ Deri ve Tenasül Hastalıkları Hastanesi, İSTANBUL

İletişim / Corresponding Author : Erdal POLAT

İstanbul Üni., Cerrahpaşa Tıp Fak., Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Tel : +90 212 414 30 00

E-posta / E-mail : erdalp@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 20.05.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 24.11.2011

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.71676

Polat E, Sirekbasan S, Aydın B, Yıldırım Z, Bağdatlı Y, Çepni İ, Çift T, Baltalı ND. İstanbul'da hayat kadınları ile hastanemizin kadın hastalıkları ve doğum kliniği hastalarındaki vajinal kandidiyazın görülme sıklığının 10 yıl önceki oranla kıyaslanması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(1): 15-20.

Kandidaların 21 (%67,7)'ini *Candida albicans* türü oluşturmaktadır. 93 hayat kadınının 10 (%10,8)'unda, 114 poliklinik hastasının 21 (%18,4)'inde kandida ürediği tespit edilmiştir. Bunların 21 (%67,7)'ini *C. albicans*, beşini (%16,1) *Candida krusei* ikisini (%6,5) *Candida tropicalis* ve üçünü (%9,7) *Candida* spp. oluşturmaktadır.

Sonuç: Bakteriyal vajinozdan sonra en çok karşılaşılan vaginal kandidiyazis sıklıkla her yaşta kadında görülen bir hastalıktır. On yıl öncesine göre poliklinik hastalarındaki kandidiyaz oranında azalma görüldüğü halde hayat kadınlarındaki kandidiyaz oranında bir azalma görülmemiştir. Yaptığımız bu epidemiyolojik çalışma enfeksiyon açısından sosyal gelişmişlik düzeyinin belirlenmesinin önemini vurgulamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Vajinal kandidiyaz, poliklinik hastaları, hayat kadınları

Gram staining. Twenty-one (67.7%) of the *Candida* identified, belonged to the species *Candida albicans*, five (16.1%) were *Candida krusei*, two (6.5%) *Candida tropicalis* and three (9.7%) *Candida* spp.. *Candida* was reported in 10 (10.8%) of the 93 prostitutes, and in 21 (18.4%) of outpatients.

Conclusion: Second to bacterial infections of vagina, vaginal candidiasis is the most common disease in women of all ages. Even though a reduction in the prevalence of candidiasis was observed in outpatients as compared to ten years ago, this was not the case in prostitutes. We think that this kind of epidemiological studies are important in determining the level of hygienic conditions in different social groups.

Key Words: Vajinal candidiasis, out patients, prostitutes

GİRİŞ

Kandidalar tek hücreli, ökaryotik, tomurcuklanarak (blastospor) veya ikiye bölünerek çoğalan, 3-4 µm boyutlarında yuvarlak veya oval mayalardır. *Candida* türlerinin insandaki parazitliği sonucunda oluşan kandidiyaza dünyanın her tarafında rastlanmaktadır (1). Deri, ağız, üst solunum yolları, gastrointestinal sistem ve anal bölgenin mukozasında normal flora elemanı olarak bulunan kandidaların 200'den fazla türü bulunmaktadır. İmmun sistemi bozulmuş kişilerde, kanser dolayısı ile kemoterapi ve radyoterapi tedavisi, steroidlerin ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı; katater uygulamaları gibi tedavi yöntemleri normal mikrobiyal florayı değiştirerek mayaların fırsatçı patojen olarak enfeksiyonlara neden olmalarına yol açabilirler (2-4).

Candida cinsi mayalar kadınların %50'sinin vajina florasında normal olarak bulunabildiği gibi vulvovajinit etkeni olarak da karşımıza çıkabilmektedirler. Erişkin kadınların yaklaşık %75'inin hayatları boyunca en az bir kez kandida vulvovajiniti geçirdiği ve bunların da %45'inin tekrarladığı bildirilmektedir (5-9).

Kandidiyazda kesin tanı, etkenin izolasyonu ve tanınması ile mümkündür. İzolasyon yöntemi için Sabouraud'nun dekstrozu agarı kullanılmaktadır. Ayrıca potasyum hidroksit KOH ile lam-lamel arası hazırlanan ve Gram boyanan preparatlarda kandidalar görülebilir (1).

Çalışmamızda, Deri ve Tenasül Hastalıkları Hastanesi'ne getirilen hayat kadınları ile hastanemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne gelen trikomonas vajiniti şüphesi olan hastalardan alınan örnekler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar 1998 yılında kürsümüzde yapılan benzer çalışmadaki sonuçlar ile karşılaştırılarak aradan geçen süre zarfındaki değişikliğin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma İstanbul'da hayat kadınları ile hastanemizin kadın hastalıkları ve doğum kliniği hastalarındaki *Trichomonas vaginalis* görülme sıklığının 10 yıl önceki oranla kıyaslanması şeklinde planlanmıştır.

Deri ve Tenasül Hastalıkları Hastanesi'ne getirilen 93 hayat kadını ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniği'ne gelen özellikle sarı kötü kokulu köpüklü bol akıntısı ve vulvada kaşıntı klinik belirtileriyle trikomoniyaz şüphesi uyandıran 114 hasta olmak üzere toplam 207 hasta çalışmaya alınmıştır.

Bu hastalardan steril iki eküvyon ile alınan vajina akıntı örnekleri yarım saat içinde incelemeye alınmıştır. Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar Gram boyanarak mikroskopta incelenmiş ve bir adet sıvı, bir adet katı Sabouraud besiyerine ekilerek kandida kültürü yapılmıştır. 37 °C'lik etüvde 72 saat tutulan kültürlerde kandidanın üremediği kültürler negatif, ürediği kültürler ise pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Kültürde üreyen kandidaların tür düzeyinde identifikasyonu için; insan serumuna ekilerek 37 °C'de 2-2,5 saat tutulduktan sonra çimlenme borusu ve mısır unlu agara ekilerek 72 saat sonra klamidospor oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır. İnsan serumunda çimlenme borusu mısır unlu

agarda klamidospor oluşturanlar *Candida albicans*, oluşturmayanlar ise *Candida* spp. olarak kabul edilmiştir. Kandidaların tümü kromojenik agara ekilerek 37 °C'de ürettikleri enzim ile besiyerindeki kromojenik substrat reaksiyonu sonucu oluşan renk değişimine bakılarak yeşil olanlar *C. albicans*, metalik mavi renkte olanlar *Candida tropicalis* ve gri-pembe renkte olanlar *Candida krusei*, bu renklerin dışında olanlar ise *Candida* spp. olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1).

BULGULAR

Toplam 207 vajina akıntı örneğinin 25 (%12)'inde Gram boyama ile maya hücreleri görülmüş olup, kültürde ise 31 (%15)'inde *Candida* spp. üremiştir. Doksanüç hayat kadınının 10 (%10,8)'unda, 114 poliklinik hastasının ise 21 (%18,4)'inde *Candida* sp. ürediği görülmüştür. Bunların 21 (%67,7)'ini *C. albicans*, 5 (%16,1)'ini *C. krusei* 2 (%6,5)'sini ise *C. tropicalis* ve 3 (%9,7)'ünü *Candida* spp. oluşturmaktadır.



Şekil 1. Kandida krom agarda değişik kandida türlerinin görünümü

Hastaların sosyo-demografik özelliklerine bakıldığında poliklinik hastalarının 18-44 yaş aralığında (ortalama yaş: 33,3) olduğu saptanmıştır. Hayat kadınları 17-48 yaş (ortalama yaş: 32,6) aralığındadır. Hayat kadınlarının 25 (%26,8)'i ilkokul, 25 (%26,8)'i ortaokul, 31 (%33,3)'i lise ve 12 (%12,9)'si üniversite mezunudur. Poliklinik hastalarının 12 (%10,5)'si okuryazar değildir ve kalanların 33 (%28,9)'ü ilkokul, 31 (%27,9)'i ortaokul, 27 (%23,6)'si lise ve 10 (%8,7)'u üniversite mezunudur. 93 hayat kadınının 60 (%64,3)'ü hayatında sadece bir defa, 25 (%26,8)'i iki defa ve kalan sekiz (%8,6) hasta üç ve üzeri vajinit tanısı almış ve tedavi olmuştur. 114 poliklinik hastasının 11 (%9,6)'inin hayatında hiç kaşıntı, akıntı gibi klinik yakınması olmamış ve vajinit tanısı almamıştır. Kalan 82 (%71,9) hasta bir defa, 12 (%10,5) hasta iki defa ve 8 (%7,1) hasta üç ve üzeri vajinit tanısı almış ve tedavi olmuştur.

TARTIŞMA

Kandidaların; ağız, üst solunum yolları, vajen ve derinin normal mikroorganizma florasında yer aldığını ve özellikle immün sistemi baskılayan bazı faktörlere bağlı olarak, fırsatçı enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir (6). *C. albicans* en sık izole edilen tür olsa da *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stelloidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitanae* gibi diğer türlerle olan enfeksiyonlar da rapor edilmektedir (10-12). Bakteriyal vajinozdan sonra en çok karşılaşılan vajinal kandidiyaz sıklıkla her yaşta kadında görülen bir hastalıktır (13, 14).

Ülkemizde ve İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalımızda direkt mikroskopi, Gram boyama ve/veya kültür yöntemi ile yapılan değişik çalışmalarda vajinal kandidiyazın %11,7 ile %39,92 arasında olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarımızdan elde edilen sonuçların diğer çalışmaların sonuçları ile benzer oranda görülmektedir (15-23). Ancak çalışmalarımızdaki sonuçlara bakıldığında vajinal kandidiyazın poliklinik

hastalarında, hayat kadınlarına göre 2-3 kat daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun hayat kadınlarının poliklinik hastalarından daha sık ve düzenli olarak kontrole gitmesine, hayat kadınlarının birçoğunun cinsel yolla bulaşan hastalıklardan korunmak için bariyer kontrasepsiyon yöntemi kullanmasına, bunun aksine poliklinik hastalarının çoğunun kontrasepsiyon yöntemi olmayan coitus interruptus yöntemi kullanmasına ve aslında cinsel yolla bulaşabilecek tüm enfeksiyonlara daha açık olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

1998 yılında yaptığımız çalışmada vajinal kandidiyaz oranı poliklinik hastalarında %30,3, hayat kadınlarında %11,4 olarak bulunmuştur (24). Yaptığımız bu çalışma da ise hayat kadınının %10,8, poliklinik hastasının ise %18,4 oranında vajinal kandidiyaz tespit edilmiştir. Saptadığımız oranları karşılaştırdığımızda aradan geçen 10 yıl süre zarfında poliklinik hastalarındaki kandidiyaz oranında belirgin bir azalma görülürken, hayat kadınlarındaki kandidiyaz oranında pek de bir azalmanın olmadığı gözlenmektedir.

Çalıştığımız 207 vajinal akıntı örneğinden üretilen 31 kandida cinsinin 21 (%67,7)'ini *C. albicans* oluşturmaktadır. *C. albicans*'ın oranındaki bu yüksekliğin Anabilim Dalımızda daha önceden yapılan çalışmalarda bulunan oranla ve değişik çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir (22-25).

Değerli ve ark., vajinal akıntı şikayeti olan kadınlardan aldıkları toplam 286 örneğin 28 (%9,7) tanesinde *T. vaginalis*, 93 (%32,5) tanesinden kandida cinsi mantar üretmişlerdir (26).

Çalışma İstanbul'da hayat kadınları ile hastanemizin kadın hastalıkları ve doğum kliniği hastalarındaki *T. vaginalis* görülme sıklığının 10 yıl önceki oranla kıyaslanması şeklinde planlanmıştır. Bundan dolayı İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine gelen hastalardan trikomonyaz vajiniti şüphesi olanlardan materyal alınmıştır. Ancak trikomonyaz

vajiniti şüphesi ile alınan materyallerin birinde (%0,9) *T. vaginalis* üremesine rağmen 21(%18,4)'inde kandida cinsi mantarlar üremiştir. On yıl önce yaptığımız benzer çalışmada da *T. vaginalis*; poliklinik hastalarında %3,4 hayat kadınlarında ise %4,6 oranında, vajinal kandidiyaz ise poliklinik hastalarında %30,3, hayat kadınlarında %11,4 oranında bulunmuştur (24). Ancak detaylı bir anamnez ve muayene aslında bu iki klinik tablonun ayrımını sağlamaktadır. Bu durum vajinal kaşıntı gibi bazı klinik semptomların özellikle trikomonyazis ve kandidiyazis tanısında karışıklığa yol açtığını düşündürmektedir. Özellikle sarı köpüklü kötü kokulu akıntı ve vulvada kaşıntı bizi trikomonyazis

lehine yönlendirirken; beyaz renkli peynir kesigi şeklinde kokusuz akıntı ve vajende yoğun kaşıntı kandidiyazis lehine yönlendirmektedir.

On yıl sonra tekrarlanan bu çalışmada gerek vajinal kandidiyazın gerekse vajinal trikomonyazın görülme sıklığında anlamlı bir azalmanın olduğu görülmektedir. Akıntı ile gelen vajinitli veya vulvovajinitli kadınlarda *T. vaginalis* vajiniti tanısı düşünülürken aynı zamanda kandidiyazdan da şüphelenilmesinin yararlı olacağı kanısındayız. Yaptığımız bu epidemiyolojik çalışma ile sosyal gelişmişlik düzeyinin enfeksiyon açısından belirlenmesinde önemli bir veri olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. Baskı. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları. Doçuran Matbaası, 1995: 744-57.
2. Alan MS, Caron A. A practical guide to medically important fungi and the diseases they cause. 1st ed. Lippincott-Raven. Philadelphia, New York, 1996: 34-58.
3. Coskun Ö. Kandidemi saptanan hastalarda bilinen risk faktörlerinin değerlendirilmesi ve hemokültürlerinden izole edilen kandida türlerinin amfoterisin-B ve flukonazole in vitro antifungal duyarlılıklarının incelenmesi. Uzmanlık tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2000.
4. Koçoğlu E, Bayram A, Balcı İ. Klinik örneklerden izole edilen kandida türleri ve antifungal duyarlılıkları. Van Tıp Derg, 2005; 12 (3): 195-200.
5. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. Baskı. İzmir: Barış Yayınları, 2009: 390-400.
6. Birinci A, Cihan ÇÇ, Bilgin K, Acuner Ç, Durupınar B, 2005. *Candida* türlerinde slime üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2005; (35): 163-6.
7. Monif RG. Classification and pathogenesis vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol, 1985; 152 (2): 935-39.
8. Rein MF. Vulvovaginitis and Cervicitis. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol. 1, 4th ed. Churchill Livingstone, New York. 1995: 1074-90.
9. Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol, 1985; 152 (2): 924-35.
10. Göller S. Klinik örneklerden izole edilen *Candida*'ların tiplendirilmesi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları. Uzmanlık tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 1999.

11. Nguyen MH, Peacock JE Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med*, 1996; 100 (2): 617-23.
12. Voss A, le Noble JL, Verduyn Lunel FM, Foudraine NA, Meis JF. Candidemia in intensive care unit patients: risk factors for mortality. *Infection*, 1997; 25 (1): 8-11.
13. Battaglia F, Mariani L, Anglana F, Milite V, Quattrini M, Plotti F, et al. Vulvovaginal candidiasis: a therapeutic approach. *Minerva Ginecol*, 2005; 57 (2): 131-9.
14. Sheary, B, Dayan L. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Aust Fam Physician*, 2005; 34 (1): 147-50.
15. Aktan G. Gebe olan ve olmayan kadınlarda vulvovajinit etkeni olan mayalar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 1988; 18 (3-4): 116-21.
16. Altanlar N. Vulvovajinal candidiasis olgularından izole edilen *Candida*'ların türlere göre dağılımı. *Ankara Ecz Fak Derg*, 1999; 28(1): 61-70.
17. Aydın F, Tosun İ, Ekmek Ü, Bilekli C, Köroğlu H, Soylu H, et al. Vulvovajinal candidiasis olgularından izole edilen mayaların türlere göre dağılımı. *Mikrobiyol Bül*, 1996; 30: 51-5.
18. Berktaş M, Gül A, Yılmaz H, Bozkurt H, Yavuz MT, Dalkılıç AE. Sağlıklı gebe kadınlarda *Candida*'ların vaginal kolonizasyonu ve tür dağılımı. *Van Tıp Derg*, 1995; 2 (2): 10-3.
19. Cengizhan L, Kıyan M, Cengiz AT, Uğurel MŞ. Vajinal akıntı kültürlerinde üretilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. XXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 8-11 Eylül, Bursa. 1992.
20. Çolak D, Özgür K, Mutlu G. Vajinal akıntı örneklerinden izole edilen *Candida* türleri. XXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 11-15 Nisan, Antalya. 1994.
21. Gönülüm A, Gün H, Haznedaroğlu T, Baysallar M, Başustaoğlu A, Özyurt M, 1994. Vajinal akıntı örneklerinden izole edilen mayaların türlere göre dağılımı. XXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 11-15 Nisan, Antalya. 1994.
22. Kahraman M. *Candida*'ların tanımlanmasındaki bazı yöntemlerin karşılaştırılması ve bunların bir kısım antifungallere duyarlılık durumu. Uzmanlık Tezi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 1995.
23. Yücel A, Öztürk R, Kahraman M, Çaçkurlu H. Değişik kimya maddeleri emdirdiğimiz pullar (diskler) ile mayaların ayrımı. *T Parazit Derg*, 1993; 17 (3-4): 154-5.
24. Yücel A, Polat E, Kahraman M, Çepni İ, Öztaş Ö, Tırak Ç, Kayım H, Baltalı ND. Poliklinik hastalarıyla hayat kadınlarından alınan vajina akıntısı örneklerinde *Candida* türü mantarların mikroskop ve kültür sonuçları. *T Parazit Derg*, 1998; 22 (2): 204-7.
25. Yücel A, Çepni İ, Polat E, İpek H, Aydın Y, Gezer A, Aksu MF. Üreme yollarındaki şikayetleriyle başvuran 480 kadının vajina akıntısında bulduğumuz *Candida* türleri. *T Parazit Derg*, 1997; 21 (4): 395-8.
26. Değerli K, Laçın S, Özbakkaloğlu B, Sivrel A, Özkütük N, Özbilgin A. Vajina akıntı şikayeti olan kadınlarda *Trichomonas vaginalis* ve *Candida spp.* yaygınlığının araştırılması. *T Parazit Derg*, 1997; 21 (4): 366-8.

Kauçuk yapıda Foley idrar sondalarının sitotoksitesinde çinko bileşiklerinin olası rolü

The possible role of zinc compounds on the cytotoxicity of latex Foley urinary catheters

Mehmet Kürşat DERİCİ¹, Hakan BÜZKAYA¹, Ferat ŞAHİN¹

ÖZET

Amaç: Doğal kauçuk yapıda olan sonda ve cerrahi eldivenlerin farklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu etkilerin azaltılması amacıyla gümüş ya da polimerik (hidrojel, silikon, politetrafloroetilen) kaplamalar gibi değişik kaplama teknikleri geliştirilmiştir. Kaplama sondaların üretim aşamasında, kauçuk sondalara benzer şekilde hızlandırıcı olarak çinko bileşikleri kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, kauçuk sondaların in vitro sitotoksik etkilerini, silikon kaplanan kauçuk sondalar ile karşılaştırmak ve toksisite nedenini araştırmaktır.

Yöntem: Doğal kauçuk, silikon kaplı kauçuk ve %100 silikon olmak üzere üç grupta sekiz farklı markadan 48 sondanın sitotoksik etkileri, fare bağı dokusu fibroblast hücre kültüründe (L-929) nitel (görüntüleme ve skorlama) ve nicel (MTT) yöntemler ile araştırılmıştır. Sonda özütlerinde bulunan element düzeyleri Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (AAS) ile incelenmiştir.

Bulgular: Negatif kontrol olarak kullanılan standart polietilen ile karşılaştırıldığında, %100 silikon sondalardan elde edilen özütlerin uygulandığı hücrelerde % canlılık

ABSTRACT

Objective: The cytotoxic effects of natural rubber gloves and urinary catheters on different cells have been earlier reported. In order to reduce these effects, various coating techniques such as silver or polymer (hydrogel, silicone, polytetrafluoroethylene (PTFE)) coatings have been developed. However, during manufacturing process of silicone-coated rubber catheters, similar to latex catheters, zinc compounds, which have cytotoxic effects are added to the natural rubber base. The aim of this study was to compare the in vitro cytotoxic effects of rubber catheters with the silicone-coated rubber and to investigate the causes of the toxic effect.

Method: The cytotoxic effects of total 48 urinary catheters in three different structure (natural rubber, silicone, silicone-coated rubber) and 8 different brands were analysed in mouse connective tissue fibroblast cell culture (L-929) by qualitative (imaging and scoring) and quantitative (MTT) methods. The levels of the elements in catheter extracts were examined in an Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS).

Results: Compared with standard polyethylene used as a negative control, the extracts from 100% silicone did not change vitality of the fibroblast cells

¹ Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, İlaç, Biyolojik ve Tıbbi Ürünler Laboratuvar Dairesi, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Mehmet Kürşat DERİCİ

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, İlaç, Biyolojik ve Tıbbi Ürünler Laboratuvar Dairesi, ANKARA

Tel : +90 312 498 21 50

E-posta / E-mail : derici@tr.net

Geliş Tarihi / Received : 08.08.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 05.02.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.78790

Derici Mk, Buzkaya H, Şahin F. Kauçuk yapıda Foley idrar sondalarının sitotoksitesinde çinko bileşiklerinin olası rolü. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(1): 21-30.

oranı ($95,43 \pm 5,39$) değişmezken, doğal kauçuk ($8,57 \pm 0,54$) ve silikon kaplı kauçuk sondalarda ($21,0 \pm 2,52$) canlılığın anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p < 0,01$). AAS ile ölçülen sonda özütleri çinko düzeyleri silikon sondalarda $0,11 \pm 0,01$, kauçuk sondalarda $4,78 \pm 0,66$ mg/L, silikon kaplı grupta ise $2,78 \pm 0,33$ mg/L olarak bulunmuş ve toksik etkiler arasında korelasyon tespit edilmiştir. Düzeyleri araştırılan diğer elementler (Cr, Ag, Cu, Bi, Pb, Fe, Co, Cd) arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Metal iyon şelatörü olan etilendiaminetetraasetik asit (EDTA)'in hücreler için toksik olmayan düzeyi ($5 \mu\text{M}$) uygulama öncesinde özüt içerisine eklendiğinde kauçuk yapıda sondaların sitotoksitesisi anlamlı olarak geriye dönmüştür (sırasıyla $101,05 \pm 5,86$ ve $100,24 \pm 4,9$).

Sonuç: Çalışmamız, doğal kauçuk ve silikon kaplı kauçuk sondaların sitotoksik etkilerinin silikon sondalardan anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu toksisiteden, üretim aşamasında çeşitli amaçlar ile kauçuğa eklenen çinko bileşiklerinin sorumlu olduğu kanıtlanmıştır. Silikon kaplı sondaların sitotoksik etkileri arasında görülen anlamlı fark, üretim teknolojisinin, kalite için önemli bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır. Farklı kaplama yöntemlerinin araştırılması veya kauçuk sondaların yerine toksik olmadığı kanıtlanan ürünler kullanılması, kliniklerde üriner kateterizasyondan kaynaklanan komplikasyonların azaltılması için çözüm olabilir.

Anahtar Sözcükler: Sitotoksosite, idrar sondaları, kaplama, çinko bileşikleri

($95.43\% \pm 5.39$), while the natural rubber ($8.57\% \pm 0.54$) and the silicone-coated rubber ($21.0\% \pm 2.52$) decreased this significantly ($p < 0.01$). The analysis of the catheter extracts by the AAS method showed that the zinc levels of rubber and silicon-coated catheter extracts were 4.78 ± 0.66 mg/L and 2.78 ± 0.33 mg/L, respectively and correlated with the observed toxic effects. No significant differences were found in the levels of elements such as Cr, Ag, Cu, Bi, Pb, Fe, Co and Cd. The addition of the metal chelating agent ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) in a non-toxic level ($5 \mu\text{M}$) for the cells, reversed the latex cytotoxicity ($101.05\% \pm 5.86$ and 100.24 ± 4.9 , respectively).

Conclusion: Our study demonstrated that both the rubber and the silicone-coated rubber catheters have cytotoxic effects. Zinc compounds, which are added to rubber in the production stage for a variety of purposes, have proven to be responsible for this toxicity. The significant difference between the cytotoxic effects of the silicone-coated rubber and latex catheters suggests that the production technology is an important factor for the quality. Different coating methods have to be investigated or the products proved to be non-toxic should be used instead of the rubber catheters, in order to reduce complications in urinary catheterization in clinical practice.

Key Words: Cytotoxicity, urinary catheters, coating, zinc compounds

GİRİŞ

Üriner kateterlerin tarihsel gelişimine bakıldığında farklı dizayn ve hammaddelerin kullanıldığı görülmektedir. Milattan sonra üçüncü yüzyılda Yunan hekimlerin kullanıldığı bilinen bakır, altın, bronz gibi metallerin yanı sıra Mısır'da papirusdan yapılan kateterlerin kullanıldığı da gösterilmiştir (1). İlk elastik kateter, 1779 yılında Fransa'da Bernard tarafından geliştirilmiş daha sonra 1853'de bu tasarıma retansiyon baloncuğu da eklenmiştir. Bu gün kullanılan, doğal kauçuk yapıda üretilen ve Foley kateter olarak bilinen tip ise 1930'ların ortalarında Dr. Frederick B. Foley tarafından geliştirilmiştir

(2). Günümüzde sağlık alanında, üriner tıkanma ve inkontinens sorunlarının tedavisinde en sık kullanılan medikal ürünlerin idrar sondaları olduğu görülmektedir.

Ülkemizdeki kullanımıyla ilgili kesin kayıtları bulunmamakla birlikte, yakın tarihte İngiltere'de yapılan bir araştırma, uzun süreli üriner kateterizasyon prevalansının yetişkin hasta grubunda $0,03-0,07$, 75 yaş üzerinde $0,5$ 'e, 85 yaş ve üzerinde ise 2 ye ulaştığını göstermektedir (3). İleri yaş hastalarda idrar yolu sorunları, sondaların kullanım sıklığı yanında sondaların uygulama sürelerini de uzatmaktadır.

Araştırmalar idrar sondalarının bu hastalarda 1-3 ay arası sürelerde ve değiştirilerek kullanıldığını göstermektedir (3,4).

Günümüzde kullanılan idrar sondalarının büyük çoğunluğu, orijinal Foley katetere benzer şekilde doğal kauçuk veya poliisopren adlı maddeden imal edilmektedir. Doğal kauçuk (lateks) bol bulunduğu için nispeten düşük maliyetli olmasının yanında kolay ve kısa sürede şekillendirilebilmesi, işlenebilmesi nedeniyle aynı zamanda üretim maliyetlerini de azalttığından kateter üretiminde halen sıklıkla kullanılmaktadır. Aynı zamanda doğal kauçuğun, yoğunluk, sertlik, uzama katsayısı, gerilme kuvveti gibi fiziksel özelliklerinden kaynaklanan avantajları bu hammaddenin yerine koyulabilecek alternatiflerini sınırlamaktadır. Ancak özellikle 1980'li yıllarda, kauçuk yapıda malzemelerin neden olduğu zayıf biyoyumluluk, yüksek idrar yolu enfeksiyonu yatkınlığı ve lümen tıkanması sıklığında artış gibi sorunlar, sağlık çalışanları tarafından fark edilmiş ve bildirilmiştir (5). Bunun dışında insan immün sisteminin, kauçuk içeriğinde bulunan proteinler ile aktivasyonu sonucu gelişen ve lateks alerjisi olarak tanımlanan bir tablo da ortaya konmuştur (6). Tüm bu sorunlar, sonda üreticilerinin yeni çözümler aramasına neden olmuş ve günümüzde gümüş, hidrojel, politetrafloroetilen (PTFE) veya silikon kaplanmış kauçuk sondaların ya da tamamen silikon hammaddesinin kullanıldığı sondaların üretimi ile sonuçlanmıştır. Kauçuğun polimerik kaplama ile muamele edilmesi sonucunda biyo-uyumluluğunun iyileştiği, nispeten yüzey kayganlığının artması nedeniyle uygulanmasının kolaylaştığı, uygun esneklik ve sertlik değerlerine ulaşabildiği iddia edilmektedir (5). %100 silikon sondalar ise fiziksel, kimyasal ve biyoyumluluk özellikleri yönünden, üriner kateterizasyon ile ilgili olduğu bildirilen bir çok sorun için kesin çözüm olarak görülmekle birlikte üretim maliyetleri diğer sonda tiplerine oranla yüksektir. Bunlara ek olarak sondaların çeşitli antibiyotikler ile muamele edilmesi ile hem mikroorganizmaların yapışmasının engellendiği hem de sitotoksik etkilerinin azaltıldığı gösterilmiştir (7).

Bu çalışmanın amacı ülkemizde kullanılmakta olan çeşitli marka ve serilerinden oluşan üç tip idrar sondasının (doğal kauçuk, silikon kaplanmış doğal kauçuk ve %100 silikon) hücre kültürü yöntemi kullanılarak in vitro sitotoksitelerinin ortaya konması ve bunun olası nedenlerinin araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, İlaç ve Kozmetikler Araştırma Müdürlüğü, Farmakoloji Laboratuvarına, Sağlık Bakanlığı tarafından piyasa gözetim ve denetimi kapsamında, testlerinin yapılması istemi ile gönderilen, üç farklı hammaddeden (doğal kauçuk, silikon, silikon kaplı doğal kauçuk) üretilen sekiz farklı marka, toplam 48 adet idrar (Foley) sondası alınmıştır. Çalışılacak sondalar, seriler içerisinde rastgele sayılar tablosu kullanılarak seçilmiştir.

Sitotoksite Testleri: Sondalarda özütleme çalışmaları, TS EN ISO 10993-12 "Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi: Bölüm 12; Numune Hazırlama ve Referans Malzemeler. Mart 2010" standardına uygun şekilde yapılmıştır (8). Sonda özütleri, %5 fetal sıgır serumu (FBS) içeren MEM (Minimal Essential Medium) vasatı içerisinde 24 saat 37 °C koşullarda ve sondaların bütünlüğü korunarak elde edilmiştir. Sitotoksite çalışmaları ise TS EN ISO 10993-5 "Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi": Bölüm 5- Vücut dışı sitotoksite deneyleri. Temmuz 2010" standardında belirtildiği şekilde nitel ve nicel deneyler kullanılarak yapılmıştır (9). Deneyler, NCTC klon 929 (L-929) fare subkutanöz bağ doku hücreleri (fibroblast) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücreler, Tarım Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hücre Bankası'ndan sağlanmıştır. Standartta tarif edilene uygun şekilde çözdürülen hücrelerin daha sonra üç pasajı yapılarak çalışmaya hazır hale gelmesi beklenmiştir. Hücrelerin çoğaltılması aşamalarında %10 FBS+ 2 mM Lglutamin,+ 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren MEM (PAA Laboratories, Austria) vasatı kullanılmıştır. Hücreler %90 nem

37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde (19AIC-UV, Sanyo) inkübe edilmiştir.

Nitel Değerlendirme: Hücreler altılı plakalara ekilerek inkübatöre konulmuş ve %80 konfluense ulaşması beklenmiştir. Daha sonra üzerlerine 1/1, 1/10, 1/100 ve 1/1000 dilüsyonlarda hazırlanan sonda özütlerini derişimleri uygulanmıştır. 24 saat %90 nemli, 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletildikten sonra hücreler mikroskopla incelenerek genel morfoloji, vokuolizasyon (boşluk oluşması), hücre kalkması, hücre yıkımı ve membran bütünlüğündeki değişiklikler TS EN ISO 10993-5 standardında bulunan Tablo-1'e göre değerlendirilmiştir.

Nicel Değerlendirme (MTT Testi): MTT testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir testtir (10). Deney için gerekli olan özüt dilüsyonları ve pozitif ve negatif kontrol, MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) boyası, aynı gün hazırlanarak taze olarak kullanılmıştır. MTT (Sigma, Almanya), fenol kırmızısı içermeyen MEM içinde 1 mg/ml olacak şekilde çözülerek 0,22 µm filtreden süzölmüştür.

MTT testi için, 96 kuyulu plaklara 100 µl besiyeri içinde 104 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat inkübe edilen hücreler üzerine özütler 1/1-1/128 dilüsyonlar arasında hazırlanarak eklenmiş ve 24 saat daha 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler her ilaç konsantrasyonu için altı kuyu olarak çalışılmıştır. Negatif kontrol olarak, aynı şartlarda özüt uygulanmamış hücreler ve USP standart polietilen özütü (0,2 g/mL), pozitif kontrol olarak ise 10 mM Amonyum Molibdat (Amonium heptomolybdate-tetrahydrate, Merck) çözeltisi kullanılmıştır. 24 saat sonra özütler boşaltılarak hücrelerin üzerine 50 µl MTT eklenmiş ve iki saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyulardaki çözeltiler dökölüp her kuyucuğa 100 µl isopropanol eklenmiş ve plakların spektrofotometrik olarak 570 nm (referans 650 nm)'de absorbans değerleri okunmuştur.

Sitotoksisiteyi değerlendirmeden önce, hüresiz kuyulardaki OD değerleri (sadece vasat + MTT), özütlerin bulunduğu kuyucukların OD değerlerinden çıkarılmıştır. Numunelerin toksisitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Tablo 1. Sonda özütlerin sitotoksitesinin nitel morfolojik derecelendirilmesi

Deney Grubu	Skor	Kültürlerin durumları
USP Standart Polietilen (Negatif Kontrol)	0 (Yok)	Ayrık sitoplazma içi granüller, hücre yıkımı yok, hücre çoğalmasında azalma yok
%100 Silikon	1 (Çok az)	Hücrelerin %20'sinden daha fazlası yuvarlak olmayan, zayıf tutunmuş ve sitoplazma içi granül içermeyen veya morfolojide değişiklikler gösteren, nadiren yıkıma uğramış hücreler var, sadece hafif büyüme inhibisyonu gözlemlenebilir
Silikon Kaplanan Kauçuk	4 (Şiddetli)	Hücre katmanların tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış
Doğal Kauçuk	4 (Şiddetli)	Hücre katmanların tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış
Doğal Kauçuk + EDTA ve Silikon Kaplanan Kauçuk + EDTA	1 (Çok az)	Hücrelerin %20'sinden daha fazlası yuvarlak olmayan, zayıf tutunmuş ve sitoplazma içi granül içermeyen veya morfolojide değişiklikler gösteren, nadiren yıkıma uğramış hücreler var, sadece hafif büyüme inhibisyonu gözlemlenebilir
Amonyum Molibdat (10mM) (Pozitif Kontrol)	4 (Şiddetli)	Hücre katmanların tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış

(TS EN ISO 10993-5 Temmuz 2010 standardında bulunan Tablo-1'e göre değerlendirilmiştir).

% canlılık = $100 \times$ Her bir numunenin bulunduğu kuyucukların ortalama OD değeri / Negatif kontrol kuyucuklarının Ortalama OD değeri

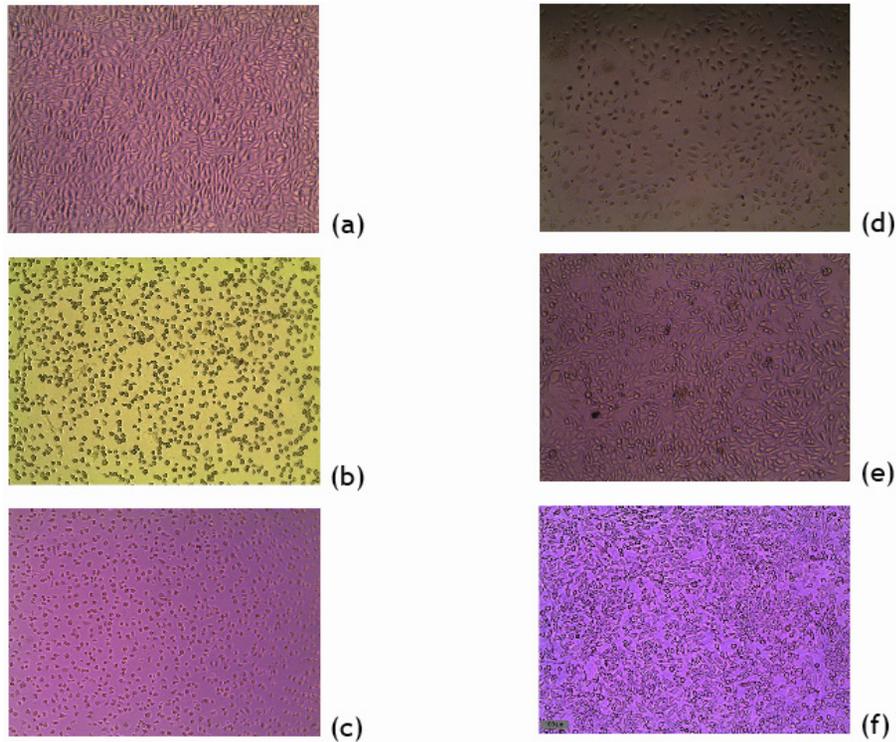
Alevli Atomik Absorbsiyon Yöntemi: Bu araştırmada, özütler içeriğinde bulunan elementlerin miktar tayini için Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS) yöntemi uygulanmıştır. Krom (Cr), Gümüş (Ag), Bakır (Cu), Bizmut (Bi), Kurşun (Pb), Demir (Fe), Kobalt (Co), Kadmiyum (Cd) ve Çinko (Zn) elementlerinin her biri için, istenilen dalga boyunda ışın yayan uygun “Oyuk Katot Lambası” kullanılmıştır. Yanıcı ve yakıcı gazlar, analizi yapılacak elementin atomlaşma sıcaklığına göre seçilmiştir. Her element için uygun konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltiden yararlanarak standart eğrisi

çizilmesini takiben sonda özütlerinin absorpsiyon değeri okutularak elementin numune içerisindeki konsantrasyonu hesaplanmıştır.

İstatistiksel Yöntem: Elde edilen bulgular; ortalama± standart hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farklar, “Kruskal Wallis H” ve “Mann-Whitney U” testleri ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

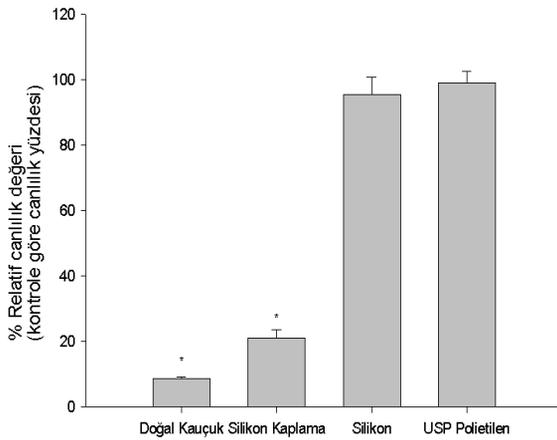
BULGULAR

L-929 hücrelerinin özütler ile 24 saat, 37 °C, %5 CO₂'li ortam şartlarında inkübe edilmesi sonrasında ortaya çıkan mikroskopik değişiklikler nitel değerlendirme ile ortaya konmuştur. Şekil 1, (c) ve (d) fotoğraflarında görüldüğü gibi doğal kauçuk



Şekil 1. Sonda özütlerine 37 °C, %5 CO₂'li ortam şartlarında 24 saat boyunca maruz kalan L-929 hücrelerinde görülen mikroskopik etkiler (LEICA DFC295 FIREWIRE görüntüleme sistemli mikroskop- 10x büyütme). Negatif kontrol olarak kullanılan USP standart polietilen (a) ve silikon yapıda sonda (e) özütlerine maruz kalan fibroblast hücrelerinde mikroskopik olarak herhangi bir değişiklik görülmezken pozitif kontrol örneği (Amonyum Molibdat 10 mM) (b), doğal kauçuk (c) ve silikon kaplanan kauçuk (d) sondaların özütü ile inkübe edilen hücrelerde yuvarlaklaşma, konflüens kaybı, ayrılma gibi toksisite belirtileri gözlenmiştir. Bu toksik etkilerin özütlere 5 µM Na-EDTA eklenmesi ile tümüyle geri dönmüştür (f).

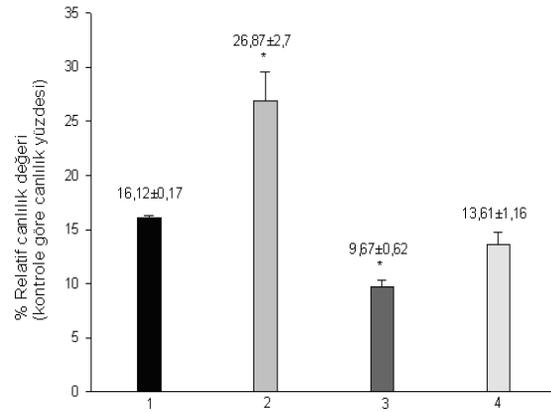
ve silikon kaplanan kauçuk sondalarda, özütlerin uygulanması sonrası hücreler negatif kontrol numunesinde görülen paternlerini değiştirmişler, sitoplazmik kayba uğrayarak tanecikler halinde kümelenmişlerdir. Hücreler arasında geniş boşluklar, hücre membran lizisi ve hücre yıkımı dikkati çekmiştir. Geniş alanlardaki boşluklar, hücrelerin canlılığını kaybederek yüzeyden kalktığını göstermiştir. Silikon sonda örneklerinde ise yuvarlak hücre oranının %20'den daha az olduğu, hücrelerin sitoplazma içi granül içermediği ve morfolojik değişiklikler görülmediği, sadece hücre büyümesinde hafif inhibisyon olduğu dikkati çekmiştir. Özütlere uygulama öncesinde 5 μ M Na-EDTA eklenmesi ile sitotoksik etkilerin ortadan kalktığı ve hücrelerin canlılıklarını koruduğu fark edilmiştir (f). Bu nitel değerlendirmeler TS EN ISO 10993-5 Temmuz 2010 standardına göre skorlandığında ortaya çıkan bulgular Tablo 1'de özetlenmiştir.



Şekil 2. Değişik yapısal özelliklerdeki sondalardan elde edilen özütlerin L-929 fibroblast hücre canlılığı üzerine olan etkileri: Hücrelerin, üç farklı yapısal grup sondadan elde edile özütlerle, 24 saat, 37 °C, %5 CO₂'li ortam şartlarında maruz bırakılması sonrasında, negatif kontrol olarak kullanılan USP standart polietilenin (%98,97 ± 3,49) ve silikon yapıdaki (%95,43 ± 5,39) sondaların hücre canlılığına herhangi bir etkisi olmadığı ancak doğal kauçuk (%8,57 ± 0,54) ve silikon kaplı doğal kauçuk (%21,0 ± 2,52) yapıdaki sondalarda canlılık değerlerinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (* p<0,01, n=6).

Sonda özütlerinin L-929 fare bağ doku fibroblast hücrelerinin canlılıkları üzerine olan etkileri Şekil 2' de gösterilmiştir. Hücrelerin, üç farklı yapısal grup sondadan elde edilen özütlerle, 24 saat, 37 °C, %5 CO₂'li ortam şartlarında maruz bırakılması sonrasında, negatif kontrol olarak kullanılan USP standart polietilenin (%98,97 ± 3,49) ve silikon yapıdaki (%95,43 ± 5,39) sondaların hücre canlılığına herhangi bir etkisi olmadığı ancak doğal kauçuk ve silikon kaplı doğal kauçuk yapıdaki sondalarda (sırasıyla %8,57 ± 0,54 ve %21,0±2,52) canlılık değerlerinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (p<0,01, n=6).

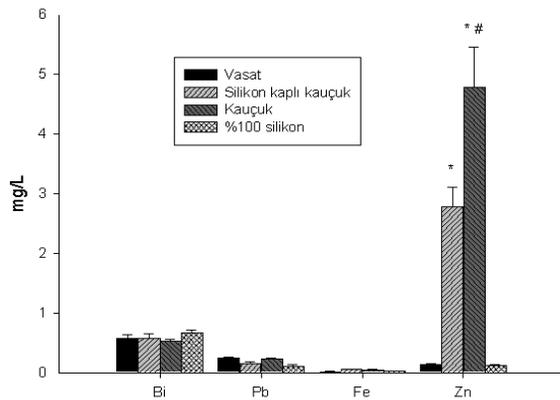
Doğal kauçuk sondaların toksik etkisi, Silikon ile kaplanan kauçuk sondalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p< 0,01). Silikon kaplı ve doğal kauçuk sondalardan elde edilen özütlerin %50 inhibisyon yapan konsantrasyon (IC50) değerleri ise sırasıyla 0,16±0,01 ve 0,05±0,001 olarak hesaplanmıştır. Buna ek olarak farklı markalardaki silikon kaplı sondalar arasında sitotoksosite oranları açısından anlamlı farkların bulunduğu da görülmüştür (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı marka silikon kaplama sonda özütlerinin L-929 hücre canlılığı üzerine olan etkileri: Hücreler, dört farklı marka silikon kaplı kauçuk sondadan elde edile özütlerle, 24 saat, 37 °C, %5 CO₂'li ortam şartlarında maruz bırakılmış ve hücre canlılığı üzerindeki etkiler araştırılmıştır. Aynı yapıda olsa da farklı sonda markalarının sitotoksik etkileri arasında anlamlı farkların bulunduğu dikkati çekmektedir. (* p<0,05, n=6).

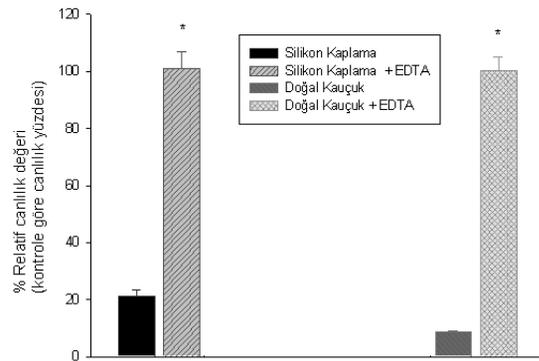
Sonda özütleri içeriğinde bulunan elementlerin analiz sonuçları Şekil 4'de özetlenmiştir. Özütlerdeki Cr, Co, Cd, Ag ve Cu değerleri AAS yönteminin deteksiyon limitlerinin altında bulunmuştur. Konsantrasyonları değerlendirilebilen Bi, Pb ve Fe elementlerinin düzeyleri bakımından sonda özütleri ile kontrol olarak kullanılan vasat arasında fark bulunmamıştır. Ancak kauçuk yapıdaki sondalardan elde edilen özütlerdeki Zn düzeylerinin, vasattan ($0,13 \pm 0,03$ mg/L) ve silikon sondalardan ($0,12 \pm 0,01$ mg/L) anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (* $p < 0,01$, $n=6$).

AAS yöntemi ile elde edilen sonuçlar, kauçuk yapıdaki sonda özütlerinde yüksek düzeyde bulunan Zn oranlarının, ortaya çıkan sitotoksiteden sorumlu olabileceğini göstermiştir. Bu bulguyu desteklemek amacıyla birçok metodolojide metal



Şekil 4. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi(AAS) yöntemi ile sonda özütlerinin elementer analizi: Araştırılan elementler içerisinde bulunan Cr, Ag, Cu, Co ve Cd'nin özütlerdeki düzeyleri yöntemin deteksiyon limitlerinin altında olduğundan gösterilmemiştir. Konsantrasyonları değerlendirilebilen Bi, Pb, Fe elementlerinin kontrol olarak kullanılan vasat ile sonda özütleri arasında fark bulunmamıştır. Kauçuk yapıdaki sondalardan elde edilen özütlerin Zn düzeyleri, vasattan ($0,13 \pm 0,03$ mg/L) ve silikon sondalardan ($0,12 \pm 0,01$ mg/L) anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (* $p < 0,01$, $n=6$). Ek olarak, Doğal kauçuk sondalarda ($4,8 \pm 0,66$ mg/L) bulunan Zn değerleri Silikon kaplı doğal kauçuk sondalardaki değerlerden ($2,8 \pm 0,34$ mg/L) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (# $p < 0,05$, $n=6$).

iyonlarının eliminasyonunda kullanılan bir şelatör olan etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'in hücre canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. 0,1 - 500 μ M arasındaki EDTA konsantrasyonları L-929 hücreleri üzerine uygulanan MEM vasatına katılarak MTT testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, 5 μ M düzeyinde eklenen Na-EDTA, hücre yaşayabilirliğini değiştirmemiştir ($100,24 \pm 4,91$). Bulgulular literatürde, sıçan böbrek hücre kültüründe Na-EDTA maruziyetini inceleyen bir araştırma sonuçları ile uyumludur (11). Sondaların özüt alma işleminde kullanılan MEM hücre vasatına, özütleme sonrasında 5 μ M Na-EDTA eklenerek hücrelere uygulanmış ve 24 saat sonra MTT testi ile canlılık oranları değerlendirilmiştir. Kauçuk sondalar ile ortaya çıkan sitotoksitenin EDTA varlığındaki değişimi Şekil 5'de görülmektedir. Sonuçlar; kauçuk ile ilişkili olduğu düşünülen toksik etkilerin, Na-EDTA (5 μ M) varlığında anlamlı olarak geri döndüğünü göstermiştir (* $p < 0,01$, $n=6$).



Şekil 5. Doğal Kauçuk ve Silikon kaplı sondalardan elde edilen özütlerin sitotoksik etkilerinin EDTA (5 μ M) varlığında değişimi: Hücre özütlerinin alındığı MEM hücre vasatına, özütleme işlemi sonrasında 5 μ M Na-EDTA eklendiğinde canlılık düzeyinde ortaya çıkan değişim MTT testi ile ortaya konmuştur. Hücrelerin doğal kauçuk ($8,57 \pm 0,54$) ve silikon kaplı doğal kauçuk ($21,0 \pm 2,52$) yapıdaki sondalarda ortaya çıkan canlılık değerlerinin, ortama 5 μ M Na-EDTA eklenmesi ile anlamlı olarak artarak negatif kontrol düzeylerine çıktığı (sırasıyla $101,05 \pm 5,86$ ve $100,24 \pm 4,9$) gözlenmiştir (* $p < 0,01$, $n=6$).

TARTIŞMA

Foley kateterlerin ilk kullanıldığı yıllardan bu yana enfeksiyon yada tıkanma gibi problemlere neden olduğu bilinmektedir. Bu sorunların çözümü için yapısal değişikliklerin, farklı koruyucuların, anti bakteriyel ajanların veya hidrojel, gümüş, teflon, silikon gibi kaplamaların uygulanması denenmiştir. Toplumlar da yaşlı hasta sayısının giderek artması, uzun süreli idrar sondası uygulanması gereken kalp damar cerrahisi veya serebrovasküler olayların insidansının artışı da birlikte getirmiştir. Buna bağlı olarak da, üriner kateterizasyon ile ilişkilendirilen komplikasyonların olası nedenleri ve çözüm yolları daha büyük bir önem kazanmıştır. Bu çözüm yollarının birbirlerine olan üstünlüğü halen tartışılmakta ve tedavi maliyet analizlerine olan etkisi karşılaştırılarak kişi ve duruma özgü öneriler oluşturulmaya çalışılmaktadır.

Kateter üretiminde kullanılan materyallerin klinikte görülen komplikasyonlardan sorumlu olabileceğine yönelik şüphelerin ortaya konduğu ilk günden itibaren yapılan çalışmalarda, kauçuk sondaların etkileri in vivo ve in vitro olarak araştırılmaktadır. Bu çalışmaların birçoğunda doğal kauçuk yapıda sondaların diğer sondalara oranla uygulandığı hastalarda daha çok komplikasyona yol açtığı ve toksik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (12-14). Bizim bulgularımız da bu yönüyle literatür ile uyumludur. Buna karşın Engelbart ve ark. tarafından köpeklerde yapılan bir çalışmada, silikon ve kauçuk yapıda altı farklı grup kateterin, dokudaki inflamasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Sondalar altı hafta süre ile uygulandıktan sonra, doku cevapları incelenmiş, silikon ve kauçuk gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı iddia edilmiştir (15). Ancak bu çalışmada ilk 24 saat içerisinde inceleme yapılmadığından bizim çalışmamızda ilk 24 saat sonrası kauçuk sondalarda gözlemlendiğimiz toksik etkilerin gözden kaçırıldığı açıktır. Graham ve arkadaşları tarafından uygulanan, hücre kültürü, tavşan kas implantasyonu ve fare sistemik toksisite deneylerinde ise, kauçuk sondalardan salıverilen bazı zararlı maddelerin

üretit veya darlık gibi klinik sonuçlara yol açabilecek toksisite gösterdiği rapor edilmiştir (16). Aynı çalışmada, hücre kültürü metotlarının, hayvan denekler kullanılan in vivo testlere göre çok daha hassas olduğunu belirtilmiş ve diğer araştırmacılar tarafından da desteklenmiştir (14,17). Örneğin tavşan primer üreter epiteli (18) ya da insan üreter epiteli (19) gibi hücre kültürü teknikleri ile yapılan araştırmalarda, kauçuk sondaların toksik etkileri gösterilmiştir. Benzer sonuçlar doğal kauçuktan yapılan cerrahi eldivenlerin özütleri ile yapılan hücre kültürü çalışmaları ile desteklenmiştir (20).

Doğal kauçuk hammaddesinden idrar sondası üretimi aşamaları sırasında sertlik, esneklik, gerim direnci, yoğunluk v.b. özelliklerinin geliştirilmesi için birçok kimyasal madde ile muamele edilmekte, daha sonra yüzey geriliminin, bakteri adezyonunun veya toksisitesinin azaltılması amacıyla kaplanmaktadır. Bu maddeler (stabilizatörler, boyalar, tepkime hızlandırıcılar vs.) içinde hangilerinin, ne oranda bulunduğu endüstriyel bir sırdır.

Çalışmamızda, %100 silikon yapıda sondaların toksik olmadığı, silikon kaplanan kauçuk sondalarda görülen toksisitenin doğal kauçuk sondalara göre anlamlı olarak ($p<0,01$) azaldığı ancak buna rağmen uygun kabul edilen sınırdan (%70) oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak silikonize kauçuk sonda grupları arasında da toksisite açısından fark olması dikkat çekicidir. AAS çalışmalarımızın sonuçları, kauçuk ve silikonize kauçuk sondalardan özütlenme sırasında süzülerek hücreler üzerinde toksik etkiye sebep olabilecek etkenin, çinko olabileceğini göstermiştir. Kauçuk yapıdaki sondalardaki Zn miktarı, toksisite ile uyumlu olarak daha yüksektir. Metal iyonlarının EDTA ile bağlanması ile sitotoksitesinin tamamen geri dönmesi, toksik etkinin yüksek Zn düzeylerinden kaynaklandığı hipotezimizi desteklemiştir. Çinko, doğal kauçuğun kükürt ile işlenmesi aşamasında kullanılan önemli bir elementtir. Büyük bölümü çinko oksit (ZnO) şeklinde kullanılmaktadır. Bunun yanında üretimde

tepkime hızlandırıcı olarak kullanılan birçok kimyasal içerisinde de çinko bulunmaktadır. Çinko oksit ve diğer birçok çinko türevinin sitotoksik ve karsinojenik etkiler gösterdiği daha önce de rapor edilmiştir (21, 22).

Kauçuk sondalar ile ortaya çıkan toksisitenin azaltılması amacıyla silikon ile kaplanması, toksik etkiyi azaltmasına rağmen önleyemediği görülmüştür. Bunun nedeninin kaplama süreci sırasında kullanılan Zn değeri yüksek kimyasallar olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle üretim aşamasında kullanılan kimyasallardaki çinko oranlarının azaltılması toksisite için faydalı olabilir. Silikonize kauçuk yapıdaki sonda grupları arasında gözlemlenen farklı toksisite oranlarının, üretim kalitelerindeki değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu görüş, silikon, hidrojel, teflon gibi kaplama metodolojileri kullanılarak kaplanan kauçuk sondaların iç ve dış yüzeylerinin SEM (Scannig Electron Microscopy) ile incelendiği bir çalışma ile desteklenmektedir (23). Bu çalışmada incelenen sondalar arasında, farklı üreticilerin uyguladığı kaplamalar arasında anlamlı farklar bulunduğu gösterilmiştir.

İdrar sondalarındaki toksik etkilerin nedenleri üzerine yapılan başka çalışmalar da bulunmaktadır.

Bizim çalışmamızda olduğu gibi L-929 fibroblastik seri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, kauçuk sondalarda görülen toksisiteden, yapılarından salınan N-nitrosaminler sorumlu tutulmuştur (24). N-nitrozodi-N-butilamin ve N-nitrozodietilamin düzeylerindeki yükseklik hücrelerdeki toksisite oranları ile ilişkili bulunmuştur. Bu maddelerin doğal kauçuktan sonda üretim aşamasında hızlandırıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir.

Günümüzde idrar sondaları ayaktan ve yatan hastalarda sıklıkla kullanılan tıbbi cihazlardır. Şu anda ülkemizde kullanılan sondaların (özellikle kauçuk sondalar) neden olduğu komplikasyonların ortaya çıkardığı ek tedavi maliyetlerini ortaya koyan ayrıntılı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu önemli sorunun aşılabilmesi için üriner kateterizasyon amacıyla kullanılan kauçuk yapıdaki idrar sondalarının üretim aşamalarının gözden geçirilmesi, iyileştirilmesi, piyasa gözetim ve denetimleri ile kalitelerinin izlenmesi önemli adımlardır. Bu şekilde toksik olmayan ve güvenle kullanılacak sondaların tedavide yer bulmaları mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Elves AW, Feneley RC. Long-term urethral catheterization and the urine-biomaterial interface. *Br J Urol.* 1997; 80(1): 1-5.
2. Winson L. Catheterization: A need for improved patient management. *Br J Nurs.* 1997; 10; 6(21): 1229-32.
3. Evans A, Pheby D, Painter D, Feneley R. The costs of long-term catheterization in the community. *Br J Community Nurs.* 2000; 5(10): 477-8.
4. Morris NS, Stickler DJ, McLean RJ. The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. *World J Urol.* 1999;17(6): 345-50.
5. Lawrence EL, Turner IG. Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK. *Med Eng Phys.* 2005; 27(6): 443-53.
6. Hunt LW, Kelkar P, Reed CE, Yunginger JW. Management of occupational allergy to natural rubber latex in a medical center: the importance of quantitative latex allergen measurement and objective follow-up. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110(2 Suppl): S96-106.
7. Kowalczyk D, Ginalska G, Przekora A. The cytotoxicity assessment of the novel latex urinary catheter with prolonged antimicrobial activity. *J Biomed Mater Res A.* 2011; 98(2): 222-8.

8. TS EN ISO 10993- 12 “Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi: Bölüm 12; Numune Hazırlama ve Referans Malzemeler. Mart 2010”.
9. TS EN ISO 10993-5 “Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi: Bölüm 5- Vücut dışı sitotoksosite deneyleri. Temmuz 2010”.
10. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Method*, 1983; 65: 55-63.
11. Hugenschmidt S, Planas-Bohne F, Taylor DM. On the toxicity of low doses of tetrasodium-ethylenediamine-tetraacetate (Na-EDTA) in normal rat kidney (NRK) cells in culture. *Arch Toxicol*, 1993; 67(1): 76-8.
12. Graham DT, Mark GE, Pomeroy AR. Cellular toxicity of urinary catheters. *Med J Aust*, 1983; 14; 1(10): 456-9.
13. Bruce AW, Plumpton KJ, Willett WS, Chadwick P. Urethral response to latex and Silastic catheters. *Can Med Assoc J*, 1976; 115(11): 1099-100.
14. Ruutu M, Alfthan O, Talja M, Andersson LC. Cytotoxicity of latex urinary catheters. *Br J Urol*, 1985; 57(1): 82-7.
15. Engelbart RH, Bartone FF, Gardner P, Hutson J. Urethral reaction to catheter materials in dogs. *Invest Urol*, 1978;16(1): 55-6.
16. Graham DT, Mark GE, Pomeroy AR, Macarthur EB. In vivo validation of a cell culture test for biocompatibility testing of urinary catheters. *J Biomed Mater Res*, 1984; 18(9): 1125-35.
17. Talja M, Andersson LC, Ruutu M, Alfthan O. Toxicity testing of urinary catheters. *Br J Urol*. 1985; 57(5): 579-84.
18. Drewa T, Wolski Z, Gałazka P, Wozniak A, Olszewska-Stonina D, Sir J. [Silicone and latex urinary catheters cytotoxicity on primary cultured rabbit urothelial cells]. *Pol Merkur Lekarski*. 2004; 16(93): 228-31.
19. Pariente JL, Bordenave L, Jacob F, Bareille R, Baquey C, Le Guillou M. Cytotoxicity assessment of latex urinary catheters on cultured human urothelial cells. *Eur Urol*. 2000; 38(5): 640-3.
20. Baek HS, Yoo JY, Rah DK, Han DW, Lee DH, Kwon OH, et al. Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of latex gloves. *Yonsei Med J*, 2005; 31; 46(4): 579-83.
21. Talja M, Saarela K, Ruutu M, Andersson LC, Alfthan O. Zinc compounds in urethral catheters. A possible source of toxicity? *Ann Chir Gynaecol Suppl*, 1993; 206: 74-9.
22. Borovanský J, Riley PA. Cytotoxicity of zinc in vitro. *Chem Biol Interact*, 1989; 69(2-3): 279-91.
23. Lawrence EL, Turner IG. Characterisation of the internal and external surfaces of four types of Foley catheter using SEM and profilometry. *J Mater Sci Mater Med*, 2006; 17(12): 1421-31.
24. Heenan MP, Nacey JN, Delahunt B, Ferguson AF, Dickson SJ. Volatile N-nitrosamines in urinary catheters. *Br J Urol*, 1989; 63(1): 72-5.

Konya ilinde köpeklerde listeriozis seroprevalansı

The seroprevalence of canine listeriosis in dogs in Konya province

Zeki ARAS¹, Uçkun Sait UÇAN²

ÖZET

Amaç: Listeriozis, insan ve hayvanlarda abortus, sepsisemi ve meningoensefalitise sebep olmaktadır. Enfekte köpekler *Listeria monocytogenes* suşlarını dışkı ve idrarları ile etrafa saçtıkları için halk sağlığı yönünden büyük bir öneme sahiptirler. Bu çalışmada, Konya bölgesindeki köpeklerde listeriozis enfeksiyonunun serolojik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmanın köpek materyalini Konya il merkezinde bulunan belediye köpek barınağı (n= 106) ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (SÜVF) Köpekçilik Araştırma ve Uygulama Ünitesinde bulunan köpekler (n= 20) ile SÜVF Kliniklerine getirilen köpeklerden (n= 9) alınan toplam 135 kan serumu oluşturmuştur. Serumlar Mikro Standart Tüp Aglütinasyon (mSAT) ve ELISA testleri ile incelenmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar Mc Nemar Testi ve Fisherin Kesin χ^2 testi ile belirlenmiştir.

Bulgular: Toplam 135 kan serum örneğinin 31 (%23)'i mSAT ile ve 21 (%15,5)'i ELISA ile pozitif bulunmuştur. On dört serum örneği sadece mSAT testi ile pozitif bulunurken ELISA testi ile negatif olarak bulunmuştur. Kan serum örneklerinin 114 tanesi (%84,5) ELISA testi ile negatif olarak bulunmuştur. Listeriozisin serolojik sıklığı Konya Belediye Köpek Barınağı, SÜVF Köpekçilik Araştırma ve Uygulama Ünitesi ve SÜVF kliniklerine getirilen köpekler

ABSTRACT

Objective: Listeriosis causes abortion, septicemia and meningoencephalitis in humans and animals. Infected dogs are important in public health as they can spread *Listeria monocytogenes* strains via their faeces or urine. The aim of this study was to investigate the presence of listeriosis in dogs in Konya Province.

Method: A total of 135 blood serum samples were collected from dogs from the municipality kennels (n= 106) and also from veterinary clinics (n= 9) and the Dog Research Unit (n= 20) of the Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University. Samples were examined by Micro Standard Tube Agglutination Test (mSAT) and ELISA. The statistical differences between the groups were determined by the Mc Nemar Test and Fisher Exact χ^2 Test.

Results: Out of 135 serum samples tested, 31 (23%) and 21 (15.5%) were found to be positive for listeriosis by mSAT and ELISA, respectively. Fourteen serum samples which were positive by mSAT were negative with ELISA, while 114 samples (84.5%) were negative by ELISA. The frequencies of listeriosis in municipality kennels, the veterinary clinics and dog research unit of the Veterinary Faculty were 24.5%,

¹ Konya İl Sağlık Müdürlüğü, Selçuklu, KONYA

² Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KONYA

İletişim / Corresponding Author : Zeki ARAS

Konya İl Sağlık Müdürlüğü, 42 040, Selçuklu, KONYA

Tel : +90 332 351 1832

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

Geliş Tarihi / Received : 25.11.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 15.02.2012

için sırasıyla, mSAT testi ile %24,5, %11,1 ve %20, ELISA testi ile %19,8, %0 ve %0 olarak belirlenmiştir. ELISA testi sonuçlarına göre, belediye köpek barınağında bulunan köpeklerde enfeksiyonun seroprevalansı Veteriner Fakültesinin birimlerine getirilen veya oraya ait köpeklere göre daha yüksek olarak saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışma ile Konya bölgesi sokak köpeklerinde yüksek sayılabilecek bir oranda ve ilk kez *L. monocytogenes* seropozitifliği tespit edilmiştir. Bu yüksek oranın veteriner ve halk sağlığı açısından tehdit oluşturduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Köpek, *Listeria monocytogenes*, ELISA, mSAT, halk sağlığı

11.1% and 20%, respectively by mSAT and 19.8%, 0% and 0% by ELISA, respectively. According to ELISA results, the listeriosis frequency was found higher in dogs from the municipality kennels than in animals from the veterinary clinics or in dogs of the research unit of veterinary Faculty.

Conclusions: The present study shows that the seropositivity to *L. monocytogenes* in stray dogs from Konya is high and it is of concern for the veterinary and human public health.

Key Words: ELISA, dog, *Listeria monocytogenes*, mSAT, Public Health.

GİRİŞ

Listeria monocytogenes tarafından oluşturulan listeriozis, genellikle sporadik, zaman zaman enzootik olarak ortaya çıkan, meningoensefalitis, abortus, septisemi ya da konjunktivitis ile karakterize, bazen de latent olarak seyredabilen zoonoz bir enfeksiyondur (1). Enfeksiyon, dünyanın her bölgesinde görülebilmektedir. Etken doğada çok yaygın olarak bulunur ve birçok hayvan türünden izole edilmiştir. *L. monocytogenes*, klinik veya subklinik seyirli enfeksiyona sebep olabilen, enfekte hayvanların dışkıları ile çevreyi kontamine eden ve direkt temas yolu ile diğer hayvan ve insanlara bulaşabilen enfeksiyöz bir etkindir (1, 2).

Enfeksiyonun tanısında, etken izolasyon ve identifikasyonuna dayanan kültür yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemin uzun zaman almasından dolayı moleküler ve serolojik testler de sıklıkla kullanılır (3). Serolojik testlerden kompleman fiksasyon, indirekt hemaglutinasyon, agar jel difüzyon, serum aglutinasyon ve ELISA testleri hastaları ve portörleri ortaya koymak amacıyla kullanılmaktadır (3,4). Bu yöntemlerin dışında, *L. monocytogenes*'in hızlı tespiti için, immünokromatografi, immünofloresans ve

immüno manyetik ayırım yöntemlerinden de yararlanılmaktadır (5).

Mikroorganizmaların, enfekte veya portör hayvanların dışkıları ile etrafa saçılması ve enfeksiyonun zoonoz bir karakter sergilemesi nedeniyle sokak köpekleri halk sağlığı açısından ayrı bir öneme sahiptir. Yapılan çalışmalarda, Van, Şanlıurfa, Erzurum ve Kars yörelerinde yaşayan sokak köpeklerinde *L.monocytogenes* varlığı gösterilmiştir (4,6-8). Ülkemizdeki köpeklerin *L. monocytogenes* taşıyıcılığı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmasından dolayı; bu çalışmada, ELISA ve Mikro Standart Tüp Aglutinasyon (mSAT) testleri kullanılarak, Konya bölgesindeki köpeklerde listeriozis varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, Konya il merkezinde ki belediye köpek barınağında bulunan 106 (76 dişi, 30 erkek) köpek ile Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (SÜVF) Köpekçilik Araştırma ve Uygulama Ünitesinde bulunan 20 dişi ve SÜVF Kliniklerine aşılama için getirilen 9 (1 dişi, 8 erkek) köpekten 2007 yılı içerisinde alınan toplam 135 adet kan serumu kullanılmıştır. Kan

örnekleri klinik olarak sağlıklı görünen hayvanlardan rastgele olarak toplanmış ve 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Toplanan kan serumları 56 °C’de 30 dakika tutularak inaktive edilip, kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Araştırma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Toplanan serumların mSAT testi ile titre tayini yapılmış ve en yüksek titre veren serum (1/2560) pozitif kontrol olarak ELISA testinde kullanılmıştır. Negatif kontrol serumları ise sağlıklı beş adet köpekten elde edilmiştir.

Mikro Standart Tüp Aglutinasyon Testi (mSAT), Regnault (9)’un bildirdiği yöntemin mikropleytlere uyarlanması ile gerçekleştirilmiştir. *L. monocytogenes* tüp aglutinasyon antijeni, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı’ndan temin edilmiştir. Serum örneklerinin, 1/4 ile 1/2560 arasında çift katlı seri dilüsyonları fizyolojik tuzlu su ile yapılmıştır. Daha sonra tüm çukurlara 50 µl tüp aglutinasyon antijeni dağıtılarak 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda 1/160 ve üstü dilüsyonlarda tam aglutinasyonun görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testinde kullanılan somatik O antijeni, Peel ve ark. (10)’nın bildirdiği yöntemle göre hazırlanmıştır. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı’ndan temin edilen *L. monocytogenes* antijeni, 4.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile üç kez yıkanmıştır. Pelet az miktarda PBS ile sulandırılmış ve beş dakika sonikatörde tutularak bakteriler parçalanmıştır. Antijenin protein konsantrasyonu, Lowry ve ark. (11)’nin önerdiği yöntemle dayanan DC protein assay (Cat No. 500-0116, Bio-Rad Lab. USA) ile belirlenmiştir.

ELISA testi, Low ve Donachie (12)’nin bildirdiği yöntemle göre standardize edilerek uygulanmıştır. Optimum antijen ve Anti-Dog IgG HRP konjugat (Sigma, A-9042) konsantrasyonları ile serum dilüsyonunu belirlemek için dama tahtası yöntemi

kullanılmıştır. Optimum antijen, konjugat ve serum dilüsyonları sırasıyla 100 µg/ml, 1/2000 ve 1/100 olarak belirlenmiştir. Immulon II mikropleytlere (Nunc C bottom Immunplate 96 well, 446612) 0.05 M karbonat-bikarbonat tampon’da (pH 9.6) homojenize edilen 100 µl antijen aktararak 37 °C’de bir gece tutulmuştur. Bu süre sonunda mikropleytlere yıkama solüsyonu (%0.05 Tween 80 içeren PBS, pH 8) ile beş kez yıkanmıştır. Daha sonra antijen yapışmayan polystyren yüzeylerin nötralizasyonu (Blocking step) amacıyla 200 µl, %1’lik siğir serum albümini (BSA, Sigma A8531) postcoat solüsyonu şeklinde hazırlanarak her bir göze eklenmiş, 37 °C’de 1,5 saat bekletildikten sonra beş kez yıkanmıştır. Sulandırma solüsyonu (%1 BSA ve %0,05 Tween 20 içeren PBS) ile 1/100 oranında sulandırılmış kontrol ve test serumlarından 100 µl alınarak mikropleytin ilgili gözlerine ilave edilerek 37 °C’de bir saat inkübe edilmiştir. Pleytlere beş kez yıkandıktan sonra sulandırma solüsyonu ile 1/2.000 oranında sulandırılmış konjugattan tüm gözlerle 100 µl ilave edilip 37 °C’de bir saat tutulmuştur. Yıkama işleminden sonra tüm gözlerle 100 µl TMB substrate (Sigma, SIT-0440) ilave edilerek oda ısısında 5-10 dakika inkübe edilmiştir. Stop solüsyonundan (2M H₂SO₄) 100 µl eklenerek ELISA reader’da (MWGt Lambda Scan 200 Bio-Tek Inst. Inc. USA.) 450 nm dalga boyunda mikropleytlerin absorpsiyon değerleri okutulmuştur. Cut-off değerine (1.216) eşit veya yüksek absorpsiyon değerine sahip örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir.

İstatistik analizler Minitap-SPSS paket programı kullanılarak Mc Nemar Testi ve Fisherin Kesin x2 Testi ile yapılmıştır. İstatistiki olarak önemlilik p<0,05 değeri ile ifade edilmiştir.

BULGULAR

Toplam 135 kan serum örneğinden 31 (%23)’i mSAT ile aglutinasyon vermiş ve listeriosis yönünden pozitif olarak kabul edilmiştir. Yüz dört adet (%77) örnek listeriosis negatif olarak saptanmıştır. Pozitif kan serumlarına ait aglutinasyon titreleri Tablo 1’de

Tablo 1. Serumların mSAT ve ELISA ile analiz sonuçları

Kaynak	mSAT titreleri						ELISA	
	≤1/80*	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	Pozitif	Negatif
Belediye Barınağı	80	14	6	5	-	1	21	85
S.Ü.Veteriner Fakültesi Uygulama Çiftliği	16	2	2	-	-	-	-	20
S.Ü. Veteriner Fakültesi Klinikleri	8	-	1	-	-	-	-	9
Toplam	104	16	9	5	-	1	21	114

* mSAT ile negatif kabul edildi.

verilmiştir. Örneklerin 21 (%15,5)'i ELISA testi ile pozitif, 114 (%84,5)'ü ise negatif olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan iki ayrı serolojik test ile elde edilen sonuçlar arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2).

Örneklerin elde edildiği kaynak bazında yapılan incelemede ise kan örneklerinin toplandığı belediye köpek barınağı, üniversite çiftliği köpek ünitesi ve SÜVF kliniklerine getirilen köpeklere ait pozitiflik, mSAT ile sırasıyla %24,5, %20 ve %11,1 ve ELISA ile sırasıyla %19,8 %0 ve %0 olarak saptanmıştır. ELISA test sonuçlarına göre, belediye köpek barınağı ile diğer iki kaynağa ait köpeklerdeki sero-pozitiflik farklılığı istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur.

Tablo 2. ELISA ve mSAT test sonuçlarının karşılaştırılması

Testler	mSAT		Toplam	
	Pozitif	Negatif		
ELISA	Pozitif	17	4	21
	Negatif	14	100	114
Toplam	31	104	135	

TARTIŞMA

Zoonoz enfeksiyonlardan olan listeriozis, insanlarda ve hayvanlarda abortus, septisemi ve meningoensefalitise neden olmaktadır (1). İnsanlarda görülen listeriozis vakalarının son yıllarda artması enfeksiyonun halk sağlığı yönünden önemini göstermektedir (13). Doğada bulunan *L. monocytogenes* suşlarının önemli kaynaklarından birisinin dışkıları ile çevreyi kontamine eden portör hayvanlar olduğu bildirilmiştir (2). Köpeklerin *L. monocytogenes* fekal taşıyıcılığı çeşitli ülkelerde araştırılmış ve %0,9-1,3 oranlarda taşıyıcılık tespit edilmiştir (14,15). Ülkemizde yapılan bir çalışmada da, Bursa ilinde sokak köpeklerinin *L. monocytogenes* fekal taşıyıcılığı %1,22 olarak tespit edilmiştir (16).

Bu çalışmada, Konya il merkezinde bulunan belediye köpek barınağı ve SÜVF Köpekçilik Araştırma ve Uygulama Ünitesinde bulunan köpekler ile SÜVF Kliniklerine aşılama için getirilen köpeklerde *L. monocytogenes* varlığının serolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda incelenen toplam 135 adet serumun 31'i mSAT ile pozitif bulunurken, aynı serumların sadece 21'i ELISA ile pozitif bulunmuştur. Bu iki test ile elde edilen sonuçlar arasındaki fark çapraz reaksiyondan meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir.

Tüm hücre antijeninin kullanıldığı aglütinasyon testlerinde, *L. monocytogenes* ile bazı Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* K8) arasında çapraz reaksiyonun olabileceği bildirilmiştir (17). Bourry ve ark. (18) *L.monocytogenes* antikorlarının varlığını ELISA yöntemi ile değerlendirdiklerinde testin özgüllük ve duyarlılığını %88 ve %100 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada da, listeriozisin serolojik tanısında, ELISA testinin aglütinasyon testi olan mSAT'a göre antikorları belirlemede daha spesifik olduğu sonucuna varılmıştır.

Ülkemizde listeriozisin köpeklerdeki varlığını serolojik olarak belirleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ceylan ve ark. (4), Van yöresindeki 90 sokak köpeğini serum aglütinasyon testi ile incelemişler ve %40 oranında seropozitiflik belirlemişlerdir. Babür ve ark. (6) Şanlıurfa İli sokak köpeklerinde yaptıkları çalışmada listeriozis seroprevalansını %18,75, Aktaş ve ark. (7) ise Erzurum yöresi sokak köpeklerinde bu oranı %26,3 olarak rapor etmişlerdir. Gıcık ve ark. (8) Kars ilinin değişik odaklarında ki sahipli köpeklerde listeriozisin serolojik varlığını %22,3 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, ELISA testi ile elde ettiğimiz %21'lik seropozitiflik oranı, Babür ve ark. (6), Aktaş ve ark. (7) ve Gıcık ve ark.

(8)'nın sonuçları ile uyumlu fakat Ceylan ve ark. (4) belirlediği %40'lık orandan düşük bulunmuştur. Bu farklılık, kullanılan testlerin özgüllüğünün farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği gibi bölgesel farklılıktan da ileri gelmiş olabilir.

Kan serum örneklerinin elde edildiği köpeklerin ait olduğu kaynaklar incelendiğinde, ELISA test sonuçlarına göre sadece belediye köpek barınağında yaşayan sokak köpeklerinin %19,8'i listeriozis yönünden pozitif olarak saptanmıştır. Buna karşın, SÜVF Köpekçilik Araştırma ve Uygulama Ünitesinde bulunan köpekler ile SÜVF kliniklerine getirilen köpeklerde enfeksiyonun seroprevalansı sıfır olarak bulunmuştur. *L. monocytogenes* suşlarının çevreye yayılmasında ve insanlara bulaşmasında önemli kaynaklarından birisinin, dışkıları ile çevreyi kontamine eden portör hayvanlar olduğu bildirilmiştir (2). Bu durum göstermektedir ki, sokak köpekleri yüksek seropozitiflik oranları ile halk sağlığı açısından riskli bir popülasyondur.

Konya bölgesi sokak köpeklerinde yüksek sayılabilecek bir oranda *L. monocytogenes* seropozitifliği tespit edilmiştir. Konya Bölgesinde risk grubu insanlarda enfeksiyonun prevalansının tespit edilmesi, köpek kaynaklı bulaşma olasılığının araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet J, 1997; 153: 9-29.
2. Skovgaard N, Norrung B. The incidence of *Listeria* spp. in faeces of danish pigs and in minced pork meat. Inter J Food Microbiol, 1989; 8: 59-63.
3. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. FEMS Microbiol Rev, 2005; 29: 851-75.
4. Ceylan E, Karaca K, Akkan HA, Keles I, Kutlu I. Van yöresi sokak köpeklerinde listeriozis seroprevalansı. YYU Sağlık Bil Derg, 2005; 8(1-2): 15-17.
5. Fung DYC. Rapid methods and automation in microbiology. Compr Rev Food Sci F, 2002; 1: 3-21.
6. Babür C, Altaş MG, Çelebi B, Sevgili M, Özkan AT, Gökçen A. Şanlıurfa yöresi sokak köpeklerinde toxoplasmosis, leishmaniosis ve listeriosis'in seroprevalansı. Türk Hij Den Biyol Derg, 2007; 64: 11-16.

7. Aktaş MS, Özkanlar YE, Özkan AT, Babür C, Balkaya İ. Erzurum İli barınak köpeklerinde listeriosis ve leishmaniasisin seroprevalansının araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 2010; 34(2): 76-80.
8. Gıcık Y, Sarı B, Babür C, Çelebi B. Kars yöresinde köpeklerde *Toxoplasma gondii* ve *Listeria monocytogenes*'in seropozitifliği. Türkiye Parazitol Derg, 2010; 34 (2): 86-90.
9. Regnault JP. Immunologie Generale. Lausanne: Vigot Pub, 1988.
10. Peel M, Donachie W, Shaw A. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. J Gen Microbiol, 1988; 1: 2171-8.
11. Lowry OH, Rosebrogh NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951; 193: 265-75.
12. Low JC, Donachie W. Clinical and serum antibody responses of lambs to infection by *Listeria monocytogenes*. Res Vet Sci, 1991; 51: 185-92.
13. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, et al. *Listeria*- Review of epidemiology and pathogenesis. J Microbiol Immunol Infect, 2007; 40: 4-13.
14. Weber A, Potel J, Schafer-Schmidt R, Prell A, Datzmann C. Studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in fecal samples of domestic and companion animals. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1995; 198: 117-23.
15. Iida T, Kanzaki M, Nakama A, Kokubo Y, Maruyama T, Kaneuchi C. Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. J Vet Med Sci, 1998; 60: 1341-3.
16. Kocabıyık AL, Cetin C, Özakin C. Faecal carriage of *Listeria monocytogenes* in stray dogs in Bursa province, Turkey. Turk J Vet Anim Sci, 2005; 29: 1357-1359.
17. Bhunia AK. Antibodies to *Listeria monocytogenes*. Crit Rev Microbiol, 1997; 23: 77-107.
18. Bourry A, Cochard T, Poutrel B. Serological diagnosis of bovine, caprine, and ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* by using an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol, 1997; 35(6): 1606.

S19 hayvan aşısının kazayla inokülasyonu sonucu gelişmiş bir bruselloz olgusu

A case of human brucellosis associated with unintentional inoculation of the animal vaccine S19

Ahmet KARAKAŞ¹, Gürkan MERT¹, Ömer COŞKUN¹,
Ömer Hilmi ALGA², Bülent Ahmet BEŞİRBELLİOĞLU¹, Can Polat EYİĞÜN¹

ÖZET

Bruselloz, gram negatif kokobasil olan *Brucella* cinsi bakterilerin neden olduğu, insanlarda ateş, terleme, kas ve eklem ağrısı gibi belirtilerle seyreden bir zoonotik hastalıktır. Bruselloz esas olarak enfekte hayvanlarla temas ve enfekte süt-süt ürünlerinin tüketilmesi ile bulaşmasına rağmen, literatürde aşı kaynaklı olgular da nadiren bildirilmektedir. Burada; genç sığırların aşılama sırasında canlı *Brucella abortus* S19 aşısına maruz kalan bir veteriner hekimde gelişen mesleki bruselloz olgusu sunulmuştur. Yirmi dört yaşındaki erkek veteriner hekim, *B. abortus* S19 aşısı ile sığırları aşılarken aşırı yanlışlıkla sol el başparmağına inoküle etmiştir. Hasta, aşı inokülasyonundan 36 saat sonra Kocaeli Özel Konak Hastanesine başvurmuştur. İlk müracaat ettiğinde aşı inokülasyon yerinde ödem, şişlik ve hassasiyet saptanmış, diğer fizik muayene bulguları normal olarak değerlendirilmiştir. Başlangıçta çalışılan serolojik testler (Rose Bengal ve serum tüp aglütinasyon testi) negatif, rutin biyokimyasal testler ise normal sınırlarda bulunmuştur. Ayrıca inokülasyon yerinden alınan yara kültüründe bakteri izole edilememiştir. Hasta, doksisisiklin ile kemoproflaksi uygulanmasına rağmen olaydan 21 gün sonra ateş, terleme ve testis ağrısı ile tekrar başvurduğu ikinci müracaatında ateşi 38,3 °C olarak saptanmış, inokülasyon bölgesinde fleksiyon sırasında ağrı ve gerginlik yakınması olduğu belirlenmiştir. Laboratuvar incelemesinde aspartat aminotransferaz (AST) 32 U/L, alanin aminotransferaz (ALT) 25 U/L, CRP 8,94 mg/dL, serolojik incelemede

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease caused by *Brucella* species that is a gram negative coccobacilli and can cause symptoms such as fever, diaphoresis, arthralgia and myalgia. Although humans become infected by contact with animals or consuming dairy products that are contaminated with *Brucella*, cases in which humans are infected by vaccination are rarely mentioned in the literature. Here, we present the a case of a 24-year old veterinarian who was diagnosed with brucellosis upon being exposed to *Brucella abortus* S19 while vaccinating a young cattle and accidentally inoculating the pathogen to the thumb of his left hand. He was admitted to the Kocaeli Özel Konak hospital 36 hours after the inoculation with an edema and sensitivity to pressure in the inoculation site, while the other physical examination findings were normal. At this stage theserological tests (Rose Bengal and agglutination) were negative, while the rutin biochemical tests were within normal range. In addition, samples collected from the inoculation site didn't show any bacterial growth. Despite chemoprophylactic treatment with doxycycline, the patient developed fever, diaphoresis, and testicular pain 21 days after the contact. His body temperature was 38.3 °C and the patient complained about pain when the finger was bended during his second visit. Laboratory tests showed the aspartat aminotransferaz (AST) level was 32 U/L, alanin aminotransferaz (ALT) 25 U/L, and CRP 8.94 mg/dL. The

¹ Gülhane Askeri Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA

² Özel Konak Hastanesi, KOCAELİ

İletişim / Corresponding Author : Ahmet KARAKAŞ

Gülhane Askeri Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA

Tel : +90 312 304 43 08

E-posta / E-mail : akarakas@gata.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 24.10.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 05.02.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.64325

Karakas A, Mert G, Coşkun Ö, Alga ÖH, Beşirbellioğlu BA, Eyiğün CP. S19 hayvan aşısının kazayla inokülasyonu sonucu gelişmiş bir bruselloz olgusu. Türk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(1): 37-40.

Rose Bengal pozitif ve standart tüp aglütinasyon testi 1/320 olarak saptanmıştır. Alınan kan kültüründe bakteri izole edilmemiştir. Hastaya klinik belirti ve serolojik bulgular ışığında bruselloz tanısı konarak altı hafta süreyle doksisisiklin (200 mg/gün) ve rifampisin (600 mg/gün) kombinasyon tedavisi verilmiştir. Takip muayenelerinde semptomları kaybolmuş ve relaps görülmemiştir. Veteriner hekimler aşı kaynaklı bruselloz açısından risk altındadırlar. Aşıya maruz kalanlara profilaksi uygulanmalıdır. Ancak aşıya maruziyet sonrasında uygulanacak profilaksinin her zaman hastalık gelişimini engelleyemeyeceği ve temasların yakından takip edilmesi gerektiği unutulmamalıdır.

Anahtar Sözcükler: Bruselloz, Brusella aşıları, Mesleki temas, Veteriner; S19 aşısı

serological tests conducted later showed that the Rose Bengal and the standard serum agglutination test were positive at 1/320, while the blood culture was negative. Based on clinical and serological findings, the patient was diagnosed with brucellosis and treated successfully a combination of doxycycline (200 mg/day) and rifampicin (600 mg/day) for six weeks. The following examinations didn't show any symptoms and no relapse was noted. Veterinarians are at risk to be infected with *Brucella* during vaccination, therefore those infected should receive prophylactic treatment. However, post exposure prophylactic treatment won't always prevent progress of the disease and patients need to be followed up closely.

Key Words: Brucellosis, *Brucella* Vaccines, Occupational Exposure, Veterinarian; S19 Vaccine

GİRİŞ

Bruselloz gram negatif kokobasil olan *Brucella* cinsi bakterilerin neden olduğu, insanlarda ateş, terleme, kas-eklem ağrısı gibi belirtilerle seyreden bir zoonotik hastalıktır. Hastalık esas olarak hayvanlarla direkt temas, enfekte et ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile bulaşır (1). Bununla birlikte; inhalasyon, solid organ ve hematopoetik kök hücre nakli, cinsel ilişki ve veteriner hekimlikte kullanılan brusella aşılarına maruziyet sonucu da hastalık geliştiği bildirilmiştir (2-4).

Bu makalede bir veteriner hekimde canlı *Brucella abortus* S19 aşısına maruziyet sonucu gelişen bir bruselloz olgusu sunulmuş ve literatür ışığında temas sonrası olgu yönetimi gözden geçirilmiştir.

OLGU

B. abortus S19 aşısı ile sığırları aşılariken aşığı yanlılıkla sol el başparmağına inoküle eden 24 yaşındaki erkek veteriner hekim olaydan 36 saat sonra inokülasyon yerinde ağrı, kızarıklık ve şişlik şikâyeti ile Kocaeli Özel Konak Hastanesi polikliniğine başvurmuştur. Özgeçmişinde bir özellik olmayan ve daha önce bruselloz geçirmediğini ifade eden hastanın başvurusu sırasında ateşi 36 °C, arteryel

kan basıncı 110/70 mmHg, nabızı 80 atım/dk olarak saptanmıştır.

Fizik muayenesinde sol el başparmak distal eklem üzerinde ödem, hiperemi ve hassasiyet tespit edilmiştir. Diğer fizik muayene bulguları normal olarak değerlendirilmiştir. Laboratuvar incelemesinde; C-reaktif protein (CRP) 27 mg/dL, Rose Bengal ve serum tüp aglütinasyon (STA) testi negatif bulunmuş, rutin biyokimyasal testler ve tam kan sayımı normal olarak saptanmıştır.

Yara kültürünün *Brucella* agara yapılan ekimlerinde bakteri izole edilememiştir. Hastaya 21 gün süreyle 2x100 mg/gün doksisisiklin profilaksisi planlanmasına karşın, hasta temastan 20 gün sonra ateş, terleme ve testislerinde ağrı şikâyeti ile tekrar başvurmuştur. İkinci ziyaretinde ateş 38,3 °C, arteryel kan basıncı 110/70 mmHg, nabız 90 atım/dk, inokülasyon bölgesinde başparmağın fleksiyonu ile ortaya çıkan ağrı ve gerginlik belirlenmiştir. Laboratuvar incelemesinde aspartat aminotransferaz (AST) 32 U/L, alanin aminotransferaz (ALT) 25 U/L, CRP 8,90 mg/dL, serolojik incelemede Rose Bengal pozitif ve STA 1/320 olarak saptanmıştır. Alınan kan kültüründe bakteri izole edilmemiştir. Hastaya

linik belirti ve serolojik bulgular ışığında bruselloz tanısı ile altı hafta süreyle doksisisiklin 2x100 mg/gün ve rifampisin 1x600 mg/gün kombinasyon tedavisi verilmiş, takip muayenelerinde semptomlarının kaybolduğu ve relaps görülmediği belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Bruselloz esas olarak insanlara enfekte hayvanlarla temas, kontamine et ve süt ile süt ürünlerinin tüketilmesiyle bulaşmakla birlikte nadir de olsa, cinsel ilişki, kemik iliği nakli ve canlı brusella aşılıyla temas sonucu gelişen olgular da rapor edilmektedir (1, 3-6).

İnsanlarda brusellozun kontrol altına alınabilmesi ancak hastalığın evcil hayvanlarda eradikasyonu ile mümkündür. Bu maksatla geliştirilen brusella aşılı (S19, RB51 ve Rev-1 vb.) dünyanın değişik ülkelerinde kullanılmaktadır (7). Ülkemizde 1960 yılında *Brucella abortus* içeren S19 aşısı (büyükbaş hayvanlar için) ve 1969 yılında *B. melitensis* içeren Rev-1 aşısı (küçükbaş hayvanlar için) üretilmeye başlanmıştır (8). Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından hayvan brusellozunun kontrolü amacıyla 1986 yılında "Türkiye Brusellozis Mücadele Projesi" başlatılmış ve 26 yıl sürdürülmesi hedeflenmiştir (9). Proje kapsamında brusella aşısının yoğun olarak kullanıldığı ülkemizde, veteriner hekim ve teknisyenler arasında aşırı maruziyet sonucu gelişen bruselloz olgularının olması beklenir. Ancak etkin bir sürveyans sisteminin bulunmaması nedeniyle, aşırı kaza sonucu maruz kalan ve enfeksiyon gelişen olgu sayısı tam olarak bilinmemektedir.

Literatürde aşının yanlışlıkla inokülasyonuna bağlı olarak gelişmiş sınırlı sayıda bruselloz olgusu bulunmaktadır. Ashford ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; RB51 *B. abortus* aşısına yanlışlıkla maruz kalan 26 kişinin büyük çoğunluğunun veteriner hekim (21 kişi) olduğu bildirilmiştir. Maruziyet şekli incelendiğinde; 21'inde iğne batması, dördünde aşısının konjunktivaya sıçraması, birinde ise aşının ciltteki açık yarayla teması sonucu meydana geldiği belirtilmiştir. Antibiyotik profilaksisi (doksisisiklin veya

doksisisiklin + gentamisin/amoksisilin/siproflaksisin) uygulanan 25 temasının 19 (%76)'unda en az bir sistemik belirti (ateş, üşüme, terleme, halsizlik, ishal, kas-eklem ağrısı gibi) geliştiği, %27'sinde de bu belirtilerin altı aydan uzun sürdüğü saptanmıştır (4). Bunun dışında, aşı sonrası (RB51 aşısı) düşük yapan bir sığır fetüsü ile temas eden sekiz kişiye profilaksi uygulandığı (beş kişiye doksisisiklin, üç kişiye doksisisiklin + rifampisin) ve hiçbirinde bruselloz gelişmediği bildirilmiştir (5). Blasco ve arkadaşları, Rev-1 aşısına kazayla maruz kalan ve profilaksi uygulanmayan iki veteriner hekimde akut bruselloz tablosu geliştiğini bildirmişlerdir (10). Bunlara ilave olarak, Güney Afrika'da Brusella aşısı flakonu ile oynayan bir çocukta akut enfeksiyon tablosu geliştiği ifade edilmiştir (7). Benzer şekilde, Arjantin'de *B. abortus* S19 aşısının üretildiği bir fabrikada çalışan 30 işçinin %70 (21 kişi)'inde bruselloz geliştiği ve bunlardan sadece dokuzunun kaza sonucu teması (perkütan, inhalasyon ve konjunktival yolla) hatırlayabildiği belirtilmiştir (11).

Temas sonrasında bruselloz gelişimini önlemek amacıyla 3-6 haftalık profilaksi süresi yeterli olabilmektedir (12-14). Dünya Sağlık Örgütü'nce profilaksi süresi altı hafta olarak belirlenmiştir. Aşının cilde inokülasyonu durumunda lokal yara bakımı, tetanoz profilaksisi ve doksisisiklin verilmesi, aşının konjunktivaya sıçraması durumunda ise lokal temizlik ve tek veya ikili kombinasyon ile (doksisisiklin + rifampisin veya trimetoprim-sülfametoksazol) profilaksi önerilmektedir. RB51 aşısı için kullanılan süşun rifampisine dirençli olması nedeniyle profilaksi ve tedavide kullanılmaması gerektiği belirtilmektedir (13). Amerika Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC)'nce laboratuvar kaynaklı temaslarda profilaksi süresi üç hafta olarak belirlenmiştir. Yüksek riskli temas (laboratuvarda *Brucella* kültürlerinin koklanması, perkütan temas ve bakterinin konjunktiva, ağız ve buruna inokülasyonu veya sıçraması) durumunda doksisisiklin (2x100 mg/gün) ve rifampisin (1x600 mg/gün) kombinasyonu, doksisisiklin kullanımının kontrendike olduğu durumlarda doksisisiklin yerine trimetoprim-sülfametoksazol (160 mg/800 mg) kullanılabilirliği belirtilmektedir. Ayrıca temaslardan

serum örneklerinin alınarak başlangıç serolojik durumlarının belirlenmesi, altı ay boyunca haftalık periyotlarla akut hastalık gelişimi açısından (ateş ve brusellozun diğer klinik belirtileri) izlenmesi ve 2., 4., 6., 24. haftalarda serum aglütinasyon testlerinin tekrarı önerilmektedir (14).

Burada sunulan ve sığır aşılması sırasında yanlılıkla aşığı kendine inoküle eden olguda inokülasyon yerinde meydana gelen lokal reaksiyonlar (şişlik, kızarıklık, ağrı) üç hafta içerisinde kaybolmuştur. Ancak aşının inokülasyonundan sonra doksisisiklin profilaksisine rağmen akut bruselloz tablosu gelişmiştir. Bu nedenle olgu daha sonra altı hafta süreyle doksisisiklin ve rifampisin kombinasyonu ile tedavi edilmiştir. Her ne kadar kan ve yara kültürlerinde bakteri izole edilememiş olsa da, olgunun daha önce bruselloz geçirmemiş olması, inokülasyondan hemen sonra negatif bulunan ve üçüncü haftada tekrarlanan serolojik testlerde serokonversiyon (Rose Bengal: pozitif, STA:1/320)

saptanması hastalığın aşı suşundan kaynaklandığını doğrulamaktadır.

Sonuç olarak; ülkemizde bruselloz, hayvan aşılama faaliyetlerine rağmen halen yaygın olarak görülmektedir. Kitlesele hayvan aşılama sırasında istenmeyen maruziyetlerin olabileceği unutulmamalıdır. Maruziyet durumunda lokal yara bakımından (yara temizliği ve gerekirse tetanoz profilaksisi) sonra uygun antibiyotik profilaksisi uygulanmalı ancak antibiyotik profilaksisinin her zaman hastalık gelişimini engelleyemeyeceği göz önünde bulundurulmalı ve temaslılar yakından takip edilmelidir. Ülkemizde aşıya bağlı insan bruselloz olgu sayısı tam olarak bilinmemektedir. Bu konuda yapılacak aktif sürveys; istenmeyen maruziyet sayısının doğru olarak saptanması, maruziyet sonrası uygulanan profilaktik yaklaşımın etkinliğinin belirlenmesi ve hastalık geliştiğinde uygun şekilde tedavi edilmesi açısından önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Young EJ. *Brucella* species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2005; 2669-74.
2. Kotton C.N., Zoonoses in solid-organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2007; 44 (6): 857-66.
3. Meltzer E, Sidi Y, Smolen G, Banai M, Bardenstein S, Schwartz E. Sexually transmitted brucellosis in humans. *Clin Infect Dis*, 2010; 51 (2): 12-5.
4. Ashford DA, di Pietra J, Lingappa J, Woods C, Noll H, Neville B. et al., Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, 2004; 22 (25-26): 3435-9.
5. Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht TA, Baum M, Banai M. Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstI site polymorphism of its omp2 gene. *J Clin Microbiol*, 2002; 40 (4): 1475-80.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Human exposure to *Brucella abortus* strain RB51-Kansas, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1998; 47 (9): 172-5.
7. Berkelman RL. Human illness associated with use of veterinary vaccines. *Clin Infect Dis*, 2003; 37 (3): 407-14.
8. <http://penvet.gov.tr/lab.asp?a=b&id=33> (Erişim Tarihi: 16.12.2011).
9. http://www.kkgm.gov.tr/birim/hay_sagl/Hastaliklar/brucella.htm (Erişim Tarihi: 16.12.2011).
10. Blasco JM, Diaz R. *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet*, 1993; 342 (8874): 805.
11. Wallach JC, Ferrero MC, Victoria Delpino M, Fossati CA, Baldi PC. Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina. *Clin Microbiol Infect*, 2008; 14 (8): 805-7.
12. Kılıç S, Babür C. Biyolojik silah olarak bakteriler: Kategori B ajanlar. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2006; 63 (1,2,3): 47-66.
13. <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf> (Erişim Tarihi: 16.12.2011).
14. Laboratory-acquired brucellosis-Indiana and Minnesota, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2008; 57 (2): 39-42.

Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi

The evaluation of the aflatoxin presence in foods

Gülderen YENTÜR¹, Buket ER¹

ÖZET

Aflatoksinler tahıllar, yağlı tohumlar, baharatlar, etler, süt ve süt ürünlerini içeren pek çok gıda ile hayvan yemlerinde yaygın olarak bulunabilen mikotoksinlerdir. Gıdalar ve hayvan yemleri ürün işleme, depolama ve satış sırasında aflatoksinlerle kontamine olabilmektedir. Aflatoksin kontaminasyon düzeyleri iklimsel, bölgesel özellikler veya gıda çeşidine göre farklılıklar gösterebilmektedir. Aflatoksinler genellikle gıdalarda ve yemlerde stabil ve sıcaklığa karşı dirençlidirler. Bu toksinlerin oluşumu için gereken koşullar devam ettiğinde kontaminasyon oranı artabilmektedir. Kontamine olan gıdaların aflatoksinlerden tamamen arındırılması da pek mümkün görünmemektedir. Aflatoksin detoksifikasyonu yeterli olmadığı için kontaminasyonun kontrol altında tutulması gerekmektedir. Aflatoksin oluşumunun önlenmesi için üretimden tüketime kadar çeşitli şekillerde bulaşan küflerin gelişiminin ileri teknolojiler ve iyi uygulamalarla engellenmesi gerekmektedir. Aflatoksinler insanlara kontamine gıdalar ve kontamine yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünler aracılığıyla ulaşarak akut veya kronik toksisiteye neden olabilmektedir. Toksikite derecesini maruziyet düzeyi, yaş, cinsiyet, beslenme ve bazı sağlık faktörleri etkilemektedir. Aflatoksinler en toksik mikotoksinlerdir. Yapılan çalışmalarda aflatoksinlerin toksik, kanserojenik, teratojenik,

ABSTRACT

Aflatoxins are mycotoxins that are widely found in food products such as cereals, oil seeds, spices, meat, milk and milk products and also animal feeds. Food for humans and animals could be contaminated with aflatoxins during the product processing, storage and sale. Levels of aflatoxin contamination also may vary according to the climate, regional characteristics or type of food. Aflatoxins in food and feed are usually stable and resistant to heat. The contamination rate may increase when the conditions for the formation of these toxins continue existing. Apparently, it is not possible to completely purify contaminated food from aflatoxins or detoxify the aflatoxin. To prevent accumulation of aflatoxin, contamination of the food with molds should be prevented with developing technologies and best practices. Humans come in contact with aflatoxin through contaminated food and animal products. As a result, aflatoxin can cause acute or chronic toxicity, while the quantity of aflatoxin ingested, the age, sex, and health factors might affect the degree of toxicity. Aflatoxins are one of the most toxic mycotoxins. In previous studies it was shown that aflatoxins could be dangerous for human

¹ Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Besin Analizleri Bilim Dalı, 06330, Etiler, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Gülderen YENTÜR

Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Besin Analizleri Bilim Dalı, 06330, Etiler, ANKARA

Tel : +90 312 202 32 00

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

Geliş Tarihi / Received : 28.07.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 16.11.2011

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.54154

Yentür G, Er B. Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(1): 41-52.

hepatotoksik ve mutajenik karakteristiği nedeniyle insan hayatı için tehlikeli olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle aflatoksin kontaminasyonu gıda güvenliği açısından önemini korumaktadır. Yüksek miktarlarda aflatoksin içeren gıdaların uzun süre tüketimi halk sağlığı açısından problem yaratabileceği gibi aynı zamanda ihracatı da olumsuz yönde etkileyerek ülkede ekonomik kayıplara neden olabilecektir. Diğer birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de pek çok gıda maddesi için Aflatoksin B₁ (AFB₁), Toplam Aflatoksin-TAF (B₁, B₂, G₁ ve G₂) ve Aflatoksin M₁ (AFM₁) ile ilgili yasal sınırlar belirlenmiştir. Bu derlemede, kanserojenik, teratojenik, hepatotoksik ve mutajenik etkileri ile ön plana çıkan aflatoksinlerin gıdalardaki varlığı ve son yıllardaki kontaminasyon durumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Aflatoksin, gıda, karsinojen, kontaminasyon, detoksifikasyon

due to their toxic, carcinogenic, teratogenic, hepatotoxic and mutagenic characteristic. Therefore, aflatoxins contamination remains of importance in terms of food safety. Long-term consumption of food containing high amounts of aflatoxin may result in health problems and adversely affect the export of several products and cause economic losses. In Turkey, similarly to other countries Aflatoxin B₁ (AFB₁), Total Aflatoxin-TAF (B₁, B₂, G₁ and G₂) and Aflatoxin M₁ (AFM₁) levels in food should be kept within the legal limits. The present review aimed to evaluate the emerging role of aflatoxin as carcinogenic, teratogenic, hepatotoxic and mutagenic products present in food.

Key Words: Aflatoxin, food, carcinogen, contamination, detoxification

GİRİŞ

Mikotoksinler tarım ürünlerinde tarladan tüketime kadar olan aşamalarda, ekolojik koşullara bağlı olarak gelişen ve üreyen bazı alt-mantarların sekonder metabolitleridir. Bu toksinler belirli nem ve sıcaklık koşullarında *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* gibi bazı küfler tarafından oluşturulurlar (1,2). En sık karşılaşılan mikotoksinler aflatoksin (AF), okratoksin, trikotesenler, zeranol, patulin, siklopiazonik asit ve fumonisin olarak sıralanabilir (2). Bilinen 400 mikotoksin arasında aflatoksinler insan sağlığı açısından en tehlikeli olanlardır (3). Mikotoksinler içerisinde önemli yere sahip bu toksinler, İngiltere’de çok sayıda kanatlı hayvanın ölümü ile sonuçlanan “Turkey X” hastalığı sonucunda keşfedilmişlerdir. Yüz binden fazla hindi ve diğer çiftlik hayvanının ölümüyle sonuçlanan hindi hastalığı salgınları sonrasında aflatoksinler heterosiklik bileşikler ile bağlantılı bir grup olarak 1960 yılında bulunmuştur (4,5). Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* küfleri

tarafından üretilen toksik metabolitlerdir (1). *A. parasiticus* AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ aflatoksinlerinin hepsini üretirken *A. flavus* nadiren AFG₁ ve AFG₂ üretmektedir (6).

Aflatoksinle kontamine yemlerin tüketimi hayvan sağlığını ve üretimini olumsuz etkilemektedir. Aynı zamanda bu hayvanların et, yumurta ve sütlerinin tüketimi de insan sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadır (7). Bu toksinler akut ölümlerden kronik hastalıklara kadar geniş aralıklarda etki gösterebilirler (8). Genellikle eser miktarlarda (izin verilen kalıntı düzeylerinin biraz üzerinde) bile etkili, uçuculuğu az, teknolojik işlemlere ve sıcaklığa karşı dirençlidirler (9). Bu nedenle de pek çok ülkede gıdaların ve yemlerin mikotoksin ile kontaminasyonu belirli analiz programları ile izlenmektedir. Bu derlemede, kanserojenik, teratojenik, hepatotoksik ve mutajenik etkileri ile ön plana çıkan aflatoksinlerin gıdalardaki varlığı ve son yıllardaki kontaminasyon durumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GIDALARIN AFLATOKSİNLERLE KONTAMİNASYONU

Çiftlik hayvanlarının beslenmesinde yararlanılan yemler yanında insanların beslenmesinde önemli bir yere sahip olan gıda maddelerinin aflatoksin ile kontaminasyonu dünyanın çeşitli bölgelerinde sık karşılaşılan bir durumdur. Dolayısıyla bu kontaminasyonlar hem gıda güvenliğini etkileyerek halk sağlığı açısından risk oluşturmakta hem de tarım endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (3).

Aflatoksinler hasat, kurutma, depolama, gıda ve yem halinde ürünü işleme aşamasında oluşabildiği gibi ürün tarlada veya bahçede gelişirken de meydana gelebilmektedir. Aflatoksin oluşumunu ürün nemi, kurutma hızı, ortamın nisbi nemi, sıcaklık, ortamda bulunan fungus veya sporlarının yoğunluğu, gelişen türlerin toksin oluşturma güçleri, mikroorganizmalar arası rekabet, ürünün ve yetiştirilen çeşidin direnci, böcek veya diğer zararlıların faaliyeti, bitki stresi, hava sıcaklığı, atmosferik gazların bileşimi gibi birçok etken etkilemektedir (10).

Aflatoksinlerin gelişmesinde nisbi nem ve sıcaklık önemli parametrelerdir. Aflatoksijenik küflerin gelişmesi için optimum şartlar 24-35 °C ve %70'in üzerindeki nisbi nemdir (11,12). Ayrıca gıdalarda aflatoksin üretimi ve misel gelişimi sıcaklık ve su aktivitesi (aw) ile kontrol edilmektedir. Diğer faktörler ise sıcaklık uygulaması, modifiye atmosfer paketleme ve koruyucu madde kullanımınıdır (13). Bu nedenle hava veya güneşte kuruyan tahıl, pamuk, yerfıstığı ve fındık gibi tohumlarda yaygın bir kontaminanttır (14). Mısır da yetiştirme, hasat, depolama, taşıma ve işlem basamaklarında genellikle mikotoksine maruz kalan gıdalardandır. Hasat öncesi ve sonrasında *A. flavus* ile enfekte olan mısırlarda kurutma ve depolama koşullarının iyi olmaması halinde aflatoksin kontaminasyonunda artış görülmektedir (15).

Küf gelişimi için gerekli olan sıcaklık ve su aktivitesi (aw) değerleri toksin oluşumu için gereksinim duyulan değerler ile aynı olmamakta ve türe göre de değişiklik göstermektedir. Örneğin *A. flavus*'un

gelişmesi ve mikotoksin üretiminde aw sırasıyla 0,73 ve 0,85'dir. Bu durumda nem içeriği de %8-12 ve %17-19'dur (15).

Küf ve toksin oluşumu için gerekli minimum sıcaklık değerleri de farklılık göstermektedir. *A. parasiticus*'un gelişmesi için en düşük sıcaklık aralığı 6-8 °C iken 25-35 °C'de optimum gelişme sağlanmaktadır. *A. flavus* için ise en iyi gelişme aralığı 19-35 °C iken 12-42 °C arasında toksin üretmektedir (15,16).

Aflatoksin kontaminasyonu hızlıca oluşabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, *A. flavus* inokule edilen bitkilerde iki gün sonra 0,3-2 ppb, dört gün sonra 950-2.800 ppb ve yedi gün sonra ise 3.600-4.500 ppb miktarlarında aflatoksin varlığına rastlandığı belirtilmiştir (17).

GIDALARIN AFLATOKSİNLERLE DEKONTAMİNASYONU VEYA AFLATOKSİNLERİN DETOKSİFİKASYONU

Aflatoksinler difuranokumarin yapısına sahip bileşiklerdir ve iki kimyasal grubu vardır. Bunlar AFB₁, AFB₂, AFB_{2A}, AFM₁, AFM₂, AFM_{2A} ve aflatoksikol içeren difurokumarosiklopentanon serisi ile AFG₁ ve AFG₂'i içeren difurakumarolakton serisidir (17). Yirmi aflatoksin türü tanımlanmasına rağmen bunlardan AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ belli başlılarıdır. Bunlar kromatogramdaki hareketleri ve floresans özelliklerine göre adlandırılmaktadırlar. Ultraviyole ışık altında mavi floresans verenler AFB₁ ve AFB₂, yeşil floresans verenler ise AFG₁ ve AFG₂ olarak adlandırılmaktadır (18-20). AFB₁ ve AFB₂ içeren yemlerle beslenen ineklerin sütünde rastlanan, ana moleküle benzer fakat daha az biyolojik etki gösteren türevler ise AFM₁ ve AFM₂ olarak adlandırılmaktadır (19,20).

AFB₁ molekülünün fizikokimyasal ve biyokimyasal özellikleri incelendiğinde toksikolojik affinitesinde iki önemli bölge vardır. İlk bölge furofuran halkasının c-8, 9 pozisyonunda ki çift bağıdır ve aflatoksinin DNA ve protein etkileşimlerine neden olmaktadır. İkinci reaktif grup ise kumarin fonksiyonel grubuna bağlı lakton halkasıdır. Bu halka kolay hidrolize olur. Bu yüzden de degradasyon için zayıf bölgedir (21).

Aflatoksinlerin yapısal degradasyonu veya inaktivasyonu kimyasallarla mümkündür. Özellikle de sodyum hipoklorit, klorindioksit, klorin gazı, hidrolitik ajanlardan organik ve inorganik asitler ve sodyum hidroksit, amonyum hidroksit ve potasyum hidroksit gibi alkaliler ile degradasyon sağlanabilmektedir (21,22). Bu kimyasalların bir kısmı gıda endüstrisinde kullanılmasına rağmen çoğu toksik kalıntı bıraktığından, besin içeriğine zarar verdiği için, tat, koku, renk, tekstür ve ürünün fonksiyonel özelliklerini etkilediğinden kullanılmaları uygun değildir (21). İnsan gıdalarının ve hayvan yemlerinin kontaminasyonunun fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlarla kontrolü ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bunlar toksini daha az mutajenik etkili ve daha az zararlı hale dönüştürmek içindir. Bu kimyasallar asitler, oksitleyici ajanlar, bisüfitler ve gazlardır (23). Mikrodalga ile ısıtma, ozon ile muamele (ozonlama) veya amonyak gibi birçok fiziksel ve kimyasal yöntemler aflatoksin ile kontamine olmuş gıdaların detoksifikasyonu için tavsiye edilmektedir. Son zamanlarda gıdalarda aflatoksin detoksifikasyonu için bir oksidasyon yöntemi olan ozonlama geliştirilmiştir. Ozon veya triatomik oksijen (O₃), güçlü bir dezenfektan ve oksitleyici ajandır (24).

Mikotoksinler, radyasyon dozuna bağlı olarak gıda ve mikotoksinin tipine göre gama (γ) ışınları radyasyonu ile inaktive olabilmektedirler. Bununla birlikte γ-radyasyon ile aflatoksinlerin bozunmasında su aktivitesi kritik rol oynamaktadır. Rustom (4) 1 ve 10 kGy dozunda γ-ışını uygulanan yerfıstığı örneklerinde sırasıyla %75 ve %100 azalma görüldüğünü belirtmiştir. Aflatoksinler 222, 265 ve 362 nm'de UV radyasyonuna duyarlıdır. En büyük absorpsiyonu ise 362 nm'de göstermektedir. 1 ppb AFM₁ ile kontamine süt örneklerine 20 dakika 365 nm radyasyon uygulandığında %56,2'sinin yıkımlandığı bildirilmiştir (4,25,26). Mikroorganizmalarla aflatoksin detoksifikasyonuna ilişkin çalışmalarda bulunmaktadır. Thanaboripat ve ark., (27) yaptıkları çalışmada, ticari olarak üretilen yoğurtlarda laktik asit bakterileri ve

Streptococcus lactis ile aflatoksinin detoksifikasyonunu araştırmışlardır. Sonuç olarak da, *S. lactis* ile AFB₁ düzeyinin 50'den 33,70 µg ml⁻¹'ye düştüğünü ve laktik asit bakterilerine göre detoksifikasyon için daha yetenekli olduklarını belirtmişlerdir.

Dekontaminasyon veya detoksifikasyon işlemi mikotoksin ile kontamine olan besin maddeleri açısından yararlıdır. İdeal dekontaminasyon işlemi ucuz ve uygulaması kolay olmalı, toksik metabolit oluşumuna yol açmamalıdır. Yem ve gıda maddelerinde besinsel ve tat özelliklerini değiştirebilecek ve yeni mikotoksin oluşumuna yol açabilecek özellikte olmamalıdır. Bu nedenle mikotoksin kontaminasyonunun önlenmesi daha önemlidir (21,28).

AFLATOKSİNLERİN VÜCUDA ALINMASI VE ETKİLERİ

Mikotoksinler insanlara kontamine besinler ve kontamine yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünler aracılığıyla kalıntı düzeylerinde de olsa ulaşırlar. Az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde besinlerin yaklaşık %25'inin mikotoksinlerle ve metabolitleriyle kontamine olduğu görülmektedir (9). Mikotoksinler genellikle kontamine gıdanın tüketilmesi ile vücuda alınıyor olsa da toksijenik sporların inhalasyonu ve doğrudan deri ile temas diğer maruziyet yollarıdır (29). Dünyanın değişik yerlerinde insanların günlük aflatoksin alım miktarları 0-30.000 ng kg⁻¹ arasında değişmektedir (19).

İnsanlar diyet ile düşük miktarda toksine maruz kalabilmektedir. Uzun vadede düşük dozda aflatoksine maruz kalınması çok tehlikeli sonuçlara neden olabilmektedir (30,31). Aflatoksine maruziyet durumu, kişinin yaşı, beslenme düzeni, hepatit B enfeksiyonu gibi bazı sağlık faktörleri aflatoksinlerin toksisite derecesini etkilemektedir (32).

Aflatoksinlerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu akut ve kronik seyirli mikotoksikoza aflatoksikoz adı verilmektedir (32). Ayrıca aflatoksinlerin siroz,

hepatit, kronik gastrit, Reye sendromu ve böbrek hastalıklarına neden olabildiği belirtilmektedir (33). Bununla birlikte, aflatoksinlerin çocuklarda Kwashiorkor hastalığı ile bağlantılı olduğu da bildirilmektedir (4). Aflatoksin insan kordon kanında bulunmuştur ve bu durumda gelişmekte olan fetüse de geçebilmektedir (19). Ayrıca mikotoksinler hayvanlarda verim kaybı, ağırlık artışında azalma, immunosupresyon ve kanser oluşumuna neden olabilmektedirler. Bulaşmış yemlerle beslenen hayvanlarda zehirlenmeler oluşabilmektedir (31).

Aflatoksinler oluşturdukları toksik etki gücüne göre $AFB_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$ şeklinde sıralanmaktadır (17). Bu toksinler içerisinde AFB_1 'in insan sağlığı açısından en toksik ve en yaygın olduğu belirtilmektedir (33,34). Aflatoksinler akut ve kronik toksisiteye ve büyük bir bölümü ise karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkiye sahiptirler (35). Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (International Agency of Research on Cancer-IARC) tarafından AFB_1 Grup 1 karsinojen, AFM_1 ise Grup 2 karsinojen olarak bildirilmiştir (36). AFB_1 'in toksik ve karsinojenik etkileri için temel hedef organlar karaciğer ve böbrektir. Aflatoksinin hepatotoksik, hepatokarsinojenik ve teratojenik etkileri farklı hayvan türlerinde gösterilmiştir (37). AFB_1 rat, fare, maymun, marmoset, ördek, lepistes, somon, alabalık ve kır faresi gibi bazı hayvanlarda malignan tümör oluşumunu indükleyebilmektedir. Bu bileşikler için hedef organ karaciğer olmakla beraber bazı ratlarda böbrek ve intestinal tümörler görülebilmektedir (38). Bununla birlikte hepatokarsinoma gelişiminde aflatoksinlerin etkili olabileceği belirtilmektedir (39,40). Türkiye'de yapılan bir çalışmada viral hepatit hastalarında sağlıklı bireylere göre aflatoksin maruziyetinin yüksek olduğu ve bu durumun hepatosellüler karsinoma gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (41). Mikotoksin zehirlenmelerinde etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Kontamine olan besinlerin mikotoksinlerden arındırılması da olası görünmemektedir. Bu nedenle, insan sağlığı bakımından kontamine gıdaların tüketiminden kaçınılması ve gıdaların

kontaminasyonuna karşı etkin önlemlerin alınması önemlidir (9).

GIDALARDA AFLATOKSİN VARLIĞI VE YASAL DÜZENLEMELER

Aflatoksinler dünyada çığ olarak tüketilen gıdalardan özellikle yerfıstığı, fındık, kakao, kahve, mısır, pirinç, buğday ve diğer tahıl ürünleri ile kuru meyvelerde yaygın şekilde oluşmaktadır (21,42,43). Aynı zamanda süt ve süt ürünleri, kırmızı biber ve kırmızı biber ürünleri gibi baharatlar da dahil olmak üzere pek çok gıdada yaygın olarak bulunabilmektedir (42,44,45). Yüksek miktarlarda aflatoksin içeren gıdaların uzun süre tüketimi halk sağlığı açısından problem yaratabileceği gibi aynı zamanda ihracatı da olumsuz yönde etkileyebileceğinden ülkede ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Bu yüzden mikotoksinlerin gelişiminin üretimden tüketime kadar izlenebilirliği önem taşımaktadır (21,43). Yapılan araştırmalar sonucunda; Türkiye'de tüketime sunulan bazı gıda maddelerine ait belirlenen aflatoksin düzeyleri Tablo 1'de sunulmuştur (31, 42-62). Bu değerler incelendiğinde; gıda çeşidi, bölgesel ve mevsimsel özellikler gibi faktörlerin etkisiyle farklılıkların bulunduğu görülmüştür.

Türkiye'de diğer birçok ülkede olduğu gibi gıdalarda aflatoksin kontaminasyonu ile ilgili yasal kısıtlamalar vardır. Avrupa Birliği'ne uyum süreci çerçevesinde hazırlanan 2008/26 sayılı gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkındaki Türk Gıda Kodeksi (TGK) Tebliğinde pek çok gıda maddesi için AFB_1 , toplam Aflatoksin-TAF (B_1 , B_2 , G_1 ve G_2) ve AFM_1 ile ilgili sınırlar belirtilmiştir (63).

Asya ülkelerinin birçoğunda pirinç aflatoksin sıklığı ve kontaminasyonunda temel gıdadır. Ayrıca arpa ve mısır bazlı gıdalarda da aflatoksin varlığı bildirilmiştir (64). Özellikle tohumlarda yüksek miktarlarda aflatoksin olduğu bilinmektedir. Yerfıstığının depolanmasında nem %8'in ve ortam sıcaklığı 25 °C'nin üzerinde ise aflatoksin oluşturan küfler meydana gelmektedir (17).

Tablo 1. Türkiye’de tüketime sunulan bazı gıda maddelerine ait aflatoksin düzeyleri

Örnek	Örnek Miktarı (Pozitif Örnek)	Aflatoksin Türü	Aflatoksin Düzeyleri	Kaynak
Yerfıstığı ve ürünleri	85 (1)	AFB ₁	21 ppb	Özay ve Alperden (46)
	22 (5)	AFB ₁	1,2-11,3ppb	Gürses ve Erdoğan (47)
	18 (7)	AFB ₁	8-94 ppb	Gürses (48)
	20	TAF	8,16-75,74 ng g ⁻¹	Yentür ve ark. (43)
	10 (5)	TAF	0,75-26,36 µg kg ⁻¹	Bircan ve ark. (49)
Fındık ve ürünleri	91 (81)	AFB ₁	<1 -13 ppb	Ayçiçek ve ark. (50)
	28 (9)	AFB ₁	1-113 ppb	Gürses (48)
	80 (2)	TAF	5,46-6,55 µg kg ⁻¹	Bircan ve ark. (49)
Badem	9 (2)	AFB ₁	2,9-4,7 ppb	Gürses ve Erdoğan (47)
	13 (3)	AFB ₁	1-13 ppb	Gürses (48)
Ceviz	24 (6)	AFB ₁	3-28 ppb	Gürses (48)
Mısır	26	TAF	0,01-32,30 µg kg ⁻¹	Oruç ve ark. (51)
İncir	103	AFB ₁	0-63,0 µg kg ⁻¹	Özay ve Alperden (52)
Leblebi	11 (1)	AFB ₁	1-2 ppb	Gürses (48)
Baharat	84 (36)	TAF	0,3-46,8 µg kg ⁻¹	Çolak ve ark. (42)
Buğday	41 (24)	TAF	10,4-643,5 ng/kg	Giray ve ark. (53)
Buğday unu	50 (37)	TAF	1,75- <4 ppb	Özturan ve ark. (31)
Fıstık	13 (3)	AFB ₁	1,1-1,5 ppb	Gürses ve Erdoğan (47)
	28 (16)	TAF	2,31-63,11 µg kg ⁻¹	Bircan ve ark. (49)
Kırmızıbiber ve ürünleri	100	AFB ₁	<0,025-40,9 µg kg ⁻¹	Aydın ve ark. (54)
	75 (72)	AFB ₁	0,11-24,7 µg kg ⁻¹	Ardıç ve ark. (44)
	23 (19)	TAF	1,79-6,55 µg kg ⁻¹	Bircan ve ark. (49)
	190	AFB ₁	0,20-6,12 ppb	Yentür (55)
Susam	2	TAF	-	Demirer ve ark. (56)
	20	AFG ₁	0,06-2,04 ng g ⁻¹	Yentür ve ark. (43)
Helva	102 (8)	AFB ₁	1,5-18 µg kg ⁻¹	Var ve ark. (57)
Süt	27 (16)	AFM ₁	10-50,5 ng L ⁻¹	Gürbay ve ark. (58)
	220	AFM ₁	0-0,26 ppb	Er ve ark. (45)
Süt Ürünleri	400 (327)	AFM ₁	51- >800 ng kg ⁻¹	Sarımehmetoğlu ve ark. (59)
	63 (28)	AFM ₁	7-202 ng kg ⁻¹	Gürses ve ark. (60)
	80 (50)	AFM ₁	1- >601 ng kg ⁻¹	Elmalı ve ark. (61)
	193 (159)	AFM ₁	52 - 860 ng kg ⁻¹	Ardıç ve ark. (62)
	70	AFM ₁	0-0,24 ppb	Er ve ark. (45)

Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde, doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulan yerfıstıklarında maksimum AFB₁ ve toplam aflatoksin miktarlarının sırasıyla 8 ve 15 µg kg⁻¹ olabileceği belirtilmiştir. Aynı Tebliğde tahıllar (karabuğday - *Fagopyrum sp.* dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdaların maksimum AFB₁ ve toplam aflatoksin miktarları sırasıyla 2 ve 4 µg kg⁻¹ olarak bildirilmiştir (63). Ayrıca fındık, antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yer fıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar için maksimum toplam aflatoksin miktarı da 10,0 µg kg⁻¹ olarak belirtilmiştir (65).

Başaran ve Özcan (66) yaptıkları çalışmada 217 kuruyemiş örneğinde AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ miktarlarını araştırmışlardır. Örneklerin %14,28'inde düşük miktarlarda ve %1,84'ünde de sınır değerlerinin üstünde aflatoksin saptamışlardır.

Bircan ve ark., (49) yaptıkları çalışmada 2.643 kuru yemiş örneğinin 313 tanesinde, 80 adet fındığın ikisinde, 28 fıstığın 16'sında ve 10 yerfıstığının beşinde ve 23 biberin 19'unda sırasıyla 0,2-162,76; 5,46-6,55; 2,31-63,11; 0,75-26,36 ve 1,79-6,55 µg kg⁻¹ oranlarında toplam aflatoksin saptamışlardır.

Süt ve süt ürünleri insanlar özellikle de çocuklar için hayvansal protein, kalsiyum, vitamin ve esansiyel yağ asidi gibi besin maddeleri için iyi bir kaynaktır. Fakat süt ve süt ürünleri aynı zamanda aflatoksinler açısından da potansiyel kaynaktırlar (67). AFB₁'in alınmasından 12-24 saat sonrasında sütte AFM₁ saptanabilmektedir. Süt bazlı diğer ürünlerde de AFM₁ ürün işleme basamaklarından etkilenmemektedir (58). Bununla birlikte, AFM₁ süte uygulanan pastörizasyon işlemine dayanıklıdır (67). Süt ve süt ürünleri açısından getirilen yasal kısıtlamalarda; çiğ süt, ısıtılmış süt ve süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütlerde maksimum AFM₁ miktarının 0,05 µg kg⁻¹ olması gerektiği belirtilmiştir (63).

Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları için ise maksimum AFB₁ miktarı 0,10 µg kg⁻¹ olarak belirtilmiştir. Ayrıca, bebek mamalarında (bebek sütleri ve devam sütleri dahil) maksimum AFM₁ 0,025 µg kg⁻¹, bebeklerin özel tıbbi amaçlı diyet gıdalarında maksimum AFB₁ ve AFM₁ sırasıyla 0,10 µg kg⁻¹ ve 0,025 µg kg⁻¹ olarak bildirilmektedir. Aflatoksin bulunması muhtemel riskli gıdalar için ise genel olarak maksimum değerler AFB₁, toplam aflatoksin ve AFM₁ için sırasıyla 5,0, 10,0 ve 0,5 µg kg⁻¹ olarak belirtilmiştir (63). Virdis ve ark., (68) İtalya'da keçi sütü ve keçi sütünden yapılan peynirlerde AFM₁ kontaminasyonunu araştırmışlardır. 41 peynir örneğinin 4 (% 9,8)'ünde AFM₁'i 79,5-389 ng kg⁻¹ seviyeleri arasında bulduklarını belirtmişlerdir.

Torkar ve Vengust (69) Slovenya'da yaptıkları çalışmada çiğ süt ve peynir örneklerinde maya, küf ve AFM₁ varlığını araştırmışlardır. Peynir örneklerinin 4 (% 10)'ünde AFM₁ seviyesinin 51-223 ng kg⁻¹ arasında olduğunu belirtmişlerdir.

Bununla birlikte biber, zerdeçal, karabiber, kişniş ve kuru zencefil gibi baharatlarda hasat öncesi, hasat sonrası, depolama ve taşıma sırasında kontamine olabilmektedir (3). Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde baharatlardan kırmızıbiber (*Capsicum spp.*), karabiber (*Piper spp.*), hintceviz/muskat (*Myristica fragrans*), zencefil (*Zingiber officinale*), zerdeçal (*Curcuma longa*) gibi ürünlerde maksimum AFB₁ ve toplam aflatoksin miktarları sırasıyla 5,0 ve 10,0 µg kg⁻¹ olarak belirtilmiştir (63). Tüketimi çok olan gıdalardan biri de kırmızıbiber ve ürünleridir. Kırmızıbiber dünyada tüketimi yaygın olan çok popüler bir baharattır (70). Türkiye de Hindistan, Meksika, Amerika, İspanya gibi yüksek miktarda kırmızıbiber üreten ülkelerden birisidir. Kırmızı toz biberler Türkiye'de yemeklerin rengi, lezzeti ve aroması için çok sık kullanılan baharat çeşitleridir (54). Kırmızıbiber; üretim, hasat, kurutma ve daha sonraki işleme safhalarında karşı karşıya kaldığı şartlar nedeniyle aflatoksin oluşumuna hassas ürünlerden birisidir (44).

Kırmızıbiber en yüksek oranda aflatoksin içeren baharat türüdür (71). Bu biberlerin mikotoksinler ile kontaminasyonunda bölgenin iklimi, ürün genotipi ve toprak tipi gibi birçok faktör etkilidir (72).

Dünyadaki en fazla biber üreticisi olan ülkeler tropik bölgelerde bulunmaktadır. Dolayısıyla kırmızıbiber ve ürünlerinde mikotoksin üreten küflerin gelişimi için uygun iklim koşulları bulunmaktadır (71). Bununla beraber biberler genellikle yetersiz hijyenik koşullar altında açık havada kurutulmaktadır (44). Kırmızıbiberler de diğer pek çok ürün gibi aflatoksinler ile hasat öncesinde, hasat sonrasında, depolama sırasında ve taşıma esnasında kontamine olabilmektedir (71,72). Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkındaki 2008/26 sayılı Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde, tüm ve toz kırmızıbiberler için maksimum AFB₁ ve total aflatoksin miktarının sırasıyla 5 µg kg⁻¹ ve 10 µg kg⁻¹ olduğu belirtilmiştir (63). Türk Gıda Kodeksi Tebliği, 1881/2006/EC sayılı gıda maddelerindeki belirli bulaşanların maksimum miktarlarının belirlenmesi hakkında komisyon tüzüğü dikkate alınarak Avrupa Birliği'ne uyum süreci çerçevesinde hazırlanmıştır. Bu direktif 2010 yılında çıkan 165/2010 direktifi ile yeniden düzenlenmiştir (73,74).

SONUÇ

Gıda maddelerinin ve hayvan yemlerinin aflatoksinler ile kontaminasyonu dünya genelinde ciddi bir problemdir. Aflatoksinlerle kontamine olmuş gıdayı tüketen insanlarda ölüme sonuçlanabilen hastalıklar meydana gelebilmektedir. Farklı ülkelerde, çeşitli gıdalarda aflatoksin varlığının araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmalardaki aflatoksin düzeyleri iklimsel ve bölgesel nedenlerle veya gıda çeşidine göre farklılıklar gösterebilmektedir. Ayrıca mikrobiyolojik ve kimyasal detoksifikasyonla ilgili çalışmalar incelendiğinde ise bazılarında aflatoksin düzeylerinde belli miktarda azalma görülmektedir. Fakat bu durum detoksifikasyonun yeterli olmadığı şeklinde değerlendirilmektedir.

Aflatoksinlerin sağlık üzerine olumsuz etkileri ve ülke ekonomisi açısından kayıplar düşünüldüğünde izlenebilirliğin önemli olduğu görülmektedir. Gıdaların ve hayvan yemlerinin üretimden tüketime kadar her aşamada aflatoksin yönünden analitik yöntemlerle analizleri yapılarak kontrolleri sağlanmalıdır. Yasal düzenlemeler doğrultusunda kabul edilen sınırlardan daha yüksek değerlerde aflatoksin içeren gıda ve yemlerin tüketilmesine izin verilmemelidir. Gıda ve yemlerin küflerle kontaminasyonunun önlenmesi ve dolayısıyla aflatoksin oluşumunun engellenebilmesi yönünde çalışmaların artırılması gerekmektedir. Ayrıca aflatoksinin detoksifikasyonunun yeterli olmamasından dolayı kontaminasyonun kontrol altında tutulması önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Zinedine A, González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, Idrissi L, Mañes J. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *Int J Food Microbiol*, 2007; 114 (1): 25-9.
2. Kumar V, Basu MS, Rajendran TP. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Prot*, 2008; 27 (6): 891-905.
3. O'Riordan MJ, Wilkinson MG. A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chem*, 2008; 107 (4): 1429-35.
4. Rustom IYS. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem*, 1997; 59 (1): 57-67.

5. Farombi EO. Aflatoxin contamination of foods in developing countries: implications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategies. *Afr J Biotechnol*, 2006; 5 (1): 001-14.
6. Wright MS, Greene-McDowelle DM, Zeringue HJ, Bhatnagar D, Cleveland TE. Effects of volatile aldehydes from *Aspergillus*-resistant varieties of corn on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin biosynthesis. *Toxicon*, 2000; 38 (9): 1215-23.
7. Gowda NKS, Malathi V, Suganthi RU. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Anim Feed Sci Tech*, 2004; 116 (3-4): 281-91.
8. Móricz AM, Fatér Z, Otta KH, Tyihák E, Mincsovcics E. Overpressured layer chromatographic determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in red paprika. *Microchem J*, 2007; 85 (1): 140-4.
9. Şener S. Gıda güvenliği açısından mikotoksinler. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci*, 2006; 2 (46): 135-9.
10. Çoksöyler N. Farklı yöntemlerle kurutulmuş kırmızıbiberlerde *Aspergillus flavus* gelişimi ve aflatoxin oluşumunun incelenmesi. *Gıda*, 1999; 24 (5): 297- 306.
11. Arrus K, Blank G, Abramson D, Clear R, Holley RA. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *J Stored Prod Res*, 2005; 41 (5): 513-27.
12. Odoemelam SA, Osu C I. Aflatoxin B₁ contamination of some edible grains marketed in Nigeria. *E-J Chem*, 2009; 6 (2): 308-14.
13. Molina M, Giannuzzi L. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Res Int*, 2002; 35 (6): 585-94.
14. Bonjar GHS. Incidence of aflatoxin producing fungi in early split pistachio nuts of Kerman, Iran. *J Biol Sci*, 2004; 4 (2): 199-202.
15. Giorni P, Battilani P, Pietri A, Magan N. Effect of aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *Int J Food Microbiol*, 2008; 122 (1-2): 109-13.
16. Bhat R, Rai RV, Karim AA. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Compr Revi Food Sci F*, 2010; 9 (1): 57-81.
17. Coppock RW, Christian RG. Aflatoxins. In: Gupta RC, ed. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. New York: Academic Press, 2007: 939-50.
18. Zheng Z, Humphrey CW, King RS, Richard JL. Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, 2005; 159 (2): 255-63.
19. Verma RJ. Aflatoxin cause DNA damage. *Int J Hum Genet*, 2004; 4 (4): 231-6.
20. Reddy BN, Raghavender CR. Outbreaks of aflatoxicoses in India. *Ajfn*, 2007; 7 (5): 1-15.
21. Banu N, Muthumary J. Taxol as chemical detoxificant of aflatoxin produced by *Aspergillus flavus* isolated from sunflower seed. *Health*, 2010; 2 (7): 789-95.
22. Samarajeewa V, Sen AC, Cohen MD, Wei CI. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *J Food Protect*, 1990; 53(6), 489-501.
23. Safara M, Zaini F, Hashemi SJ, Mahmoudi M, Khosravi AR, Shojai-Aliabadi F. Aflatoxin detoxification in rice using citric acid. *Iranian J Publ Health*, 2010; 39 (2): 24-9.
24. Inan F, Pala M, Doymaz I. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B₁ in red pepper. *J Stored Prod Res*, 2007; 43 (4): 425-9.
25. Yousef AE, Marth EH. Use of ultraviolet energy to degrade aflatoxin M₁ in raw or heated milk with and without added peroxide. *J Dairy Sci*, 1986; 69 (9): 2243-7.
26. Kabak B, Dobson ADW, Vara I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2006; 46 (8): 593-619.

27. Thanaboripat D, Kraipeerapun K, Pattanaphongsak C, Srisanan S, Nanasombat S. Detoxification of aflatoxin by *Streptococcus lactis* and lactic acid bacteria in commercial yoghurt. *Kasetsart J-Nat Sci*, 1997; 31: 117-23.
28. Leibetseder J. Decontamination and detoxification of mycotoxins. In: Mosenthin R, Zentek J, Zebrowska T, eds. *Biology of Nutrition in Growing Animals*. Elsevier Limited, 2006: 439-65.
29. Salem NM, Ahmad R. Mycotoxins in food from Jordan: Preliminary survey. *Food Control*, 2010; 21 (8): 1099-103.
30. Papp E, H-Otta K, Záray G, Mincsovcics E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchem J*, 2002; 73 (1-2): 39-46.
31. Özturan K, Ünsal C, Karakaya Y, Atasever M, Ceylan ZG, Atasever MA. Erzurum'da tüketime sunulan buğday unlarının toplam aflatoksin, aflatoksin B₁ ve Okratoksin A Yönünden İncelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 2007; 2 (4): 172-6.
32. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: Toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *Hacettepe Üni Ecz Fak Derg*, 2008; 28 (1): 63-92.
33. Koirala P, Kumar S, Yadav BK, Premarajan KC. Occurrence of aflatoxin in some of the food and feed in Nepal. *Indian J Med Sci*, 2005; 59 (8): 331-6.
34. Hussain HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 2001; 167 (2): 101-34.
35. Oveisi MR, Jannat B, Sadeghi N, Hajimahmoodi M, Nikzad A. Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Control*, 2007; 18: 1216-8.
36. Anonymous. Some naturally-occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC monographs, 1993; 56: 359-62.
37. Ayub MY, Sachan DS. Dietary factors affecting aflatoxin B₁ carcinogenicity. *Mal J Nutr*, 1997; 3: 161-79.
38. Singh VP. Aflatoxin biotransformations: Biodetoxification aspects. *Prog Ind Microbiol*, 1995; 32: 51-61.
39. Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect*, 2010; 118 (6): 818-24.
40. Galy O, Chemin I, Le Roux E, Villar S, Le Calvez-Kelm F, Lereau M. Mutations in TP53 and CTNNB1 in relation to hepatitis B and C infections in hepatocellular carcinomas from Thailand. *Hepat Res Treat*, 2011; 2011: 1-9.
41. Mızrak D, Engin B, Onder FO, Yener B, Bektaş M, Biyikli Z, Idilman R. Aflatoxin exposure in viral hepatitis patients in Turkey. *Türk J Gastroenterol*, 2009; 20 (3): 192-7.
42. Çolak H, Bingöl EB, Hampikyan H, Nazlı B. Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. *J Food Drug Anal*, 2006; 14 (3): 292-6.
43. Yentür G, Er B, Gür Özkan M, Öktem BA. Determination of aflatoxins in peanut butter and sesame samples using high-performance liquid chromatography method. *Eur Food Res Technol*, 2006; 224 (2): 167-70.
44. Ardiç M, Karakaya Y, Atasever M, Durmaz H. Determination of aflatoxin B₁ levels in deep-red ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with ELISA. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 1596-9.
45. Er B, Demirhan B, Onurdağ FK, Yentür G. Determination of aflatoxin M₁ level in milk and white cheese consumed in Ankara Region, Turkey. *J Anim Vet Adv*, 2010; 9 (12): 1780-4.
46. Özay G, Alperden İ. Türkiye'de yetiştirilen yerfıstıklarında (*Arachis hypogaea L.*) mikotoksinler. *Gıda*, 1989; 14 (5): 267-73.
47. Gürses M, Erdoğan A. Erzurum piyasasında satılan yerfıstığı, antepfıstığı ve bademlerin aflatoksin B₁ kontaminasyonu bakımından incelenmesi. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg*, 2004; 35 (1-2): 75-8.
48. Gürses M. Mycoflora and aflatoxin content of hazelnuts, walnuts, peanuts, almonds and roasted chickpeas (leblebi) sold in Turkey. *Int J Food Prop*, 2006; 9: 395-9.

49. Bircan C, Barringer SA, Ulken Ü, Pehlivan R. Aflatoxin levels in dried figs, nuts and paprika for export from Turkey. *Int J Food Sci Tech*, 2008; 43 (8): 1492-8.
50. Aycicek H, Aksoy A, Saygi S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control*, 2005; 16 (3): 263-6.
51. Oruç HH, Cengiz M, Kalkanli O. Comparison of aflatoxin and fumonisin levels in maize grown in Turkey and imported from the USA. *Anim Feed Sci Tech*, 2006; 128: 337-41.
52. Özay G, Alperden I. Aflatoxin and ochratoxin-a contamination of dried figs (*Ficus carina* L.) from the 1988 crop. *Mycotoxin Res*, 1991; 7: 85-91.
53. Giray B, Girgin G, Engin AB, Aydın S, Şahin G. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*, 2007; 18 (1): 23-9.
54. Aydın A, Erkan ME, Başkaya R, Ciftcioğlu G. Determination of aflatoxin B₁ levels in powdered red pepper. *Food Control*, 2007; 18 (9): 1015-8.
55. Yentür G. Bazı gıda maddelerinde aflatoksin B₁ ve M₁ düzeylerinin saptanması. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi. No: 02/2009-16, 2010.
56. Demirer MA, Dinçer B, Kaymaz Ş, Alperden İ, Yalçın S, Özer E. Bazı gıda maddelerinde mikroflora ve mikotoksin araştırmaları. *AÜ Vet. Fak. Derg*, 1989; 36 (1): 85-107.
57. Var I, Kabak B, Gök F. Survey of aflatoxin B₁ in helva, a traditional Turkish food, by TLC. *Food Control*, 2007; 18 (1): 59-62.
58. Gürbay A, Aydın S, Girgin G, Engin AB, Şahin G. Assessment of aflatoxin M₁ levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control*, 2006; 17 (1): 1-4.
59. Sarımehtemetoğlu B, Kuplulu O, Celik TH. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control*, 2004; 15 (1): 45-9.
60. Gürses M, Erdoğan A, Çetin B. Occurrence of aflatoxin M₁ in some cheese types sold in Erzurum, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 2004; 28: 527-30.
61. Elmalı M, Yapar K, Kart A, Yaman H. Aflatoksin M₁ levels in milk powder consumed in Turkey. *J Anim Vet Adv*, 2008; 7 (5): 643-5.
62. Ardıç M, Karakaya Y, Atasever M, Adiguzel G. Aflatoxin M₁ levels of Turkish white brined cheese. *Food Control*, 2009; 20 (3): 196-9.
63. Anonim. Türk Gıda Kodeksi - 2008/26 No'lu Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, 2008.
64. Park JW, Kim EK, Kim YB. Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B₁ through food consumption. *Food Addit Contam*, 2004; 21 (1): 70-5.
65. Anonim. Türk Gıda Kodeksi - 2009/22 No'lu Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ, 2009.
66. Basaran P, Ozcan M. Occurrence of aflatoxins in various nuts commercialized in Turkey. *J Food Safety*, 2009; 29 (1): 95-105.
67. Pei SC, Zhang YY, Eremin SA, Lee WJ. Detection of aflatoxin M₁ in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. *Food Control*, 2009; 20 (12): 1080-5.
68. Virdis S, Corgiolur G, Scarano C, Pilo AL, De Santis EPL. Occurrence of aflatoxin M₁ in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control*, 2008; 19 (1): 44-9.
69. Torkar KG, Vengušt A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M₁ in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*, 2008; 19 (6): 570-7.
70. Saha D, Acharya D, Roy D, Shrestha D, Dhar TK. Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in chili samples. *Anal Chim Acta*, 2007; 584 (2): 343-9.

Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi

The evaluation of the aflatoxin levels present in food

Gülderen YENTÜR¹, Buket ER¹

ÖZET

Aflatoksinler tahıllar, yağlı tohumlar, baharatlar, etler, süt ve süt ürünlerini içeren pek çok gıda ile hayvan yemlerinde yaygın olarak bulunabilen mikotoksinlerdir. Gıdalar ve hayvan yemleri ürün işleme, depolama ve satış sırasında aflatoksinlerle kontamine olabilmektedir. Aflatoksin kontaminasyon düzeyleri iklimsel, bölgesel özellikler veya gıda çeşidine göre farklılıklar gösterebilmektedir. Aflatoksinler genellikle gıdalarda ve yemlerde stabil ve sıcaklığa karşı dirençlidirler. Bu toksinlerin oluşumu için gereken koşullar devam ettiğinde kontaminasyon oranı artabilmektedir. Kontamine olan gıdaların aflatoksinlerden tamamen arındırılması da pek mümkün görünmemektedir. Aflatoksin detoksifikasyonu yeterli olmadığı için kontaminasyonun kontrol altında tutulması gerekmektedir. Aflatoksin oluşumunun önlenmesi için üretimden tüketime kadar çeşitli şekillerde bulaşan küflerin gelişiminin ileri teknolojiler ve iyi uygulamalarla engellenmesi gerekmektedir. Aflatoksinler insanlara kontamine gıdalar ve kontamine yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünler aracılığıyla ulaşarak akut veya kronik toksisiteye neden olabilmektedir. Toksikite derecesini maruziyet düzeyi, yaş, cinsiyet, beslenme ve bazı sağlık faktörleri etkilemektedir. Aflatoksinler en toksik mikotoksinlerdir. Yapılan çalışmalarda aflatoksinlerin toksik, kanserojenik, teratojenik,

ABSTRACT

Aflatoxins are mycotoxins that are widely found in food products such as cereals, oil seeds, spices, meat, milk and milk products and also animal feeds. Food for humans and animals could be contaminated with aflatoxins during the product processing, storage and sale. Levels of aflatoxin contamination also may vary according to the climate, regional characteristics or type of food. Aflatoxins in food and feed are usually stable and resistant to heat. The contamination rate may increase when the conditions for the formation of these toxins continue existing. Apparently, it is not possible to completely purify contaminated food from aflatoxins or detoxify the aflatoxin. To prevent accumulation of aflatoxin, contamination of the food with molds should be prevented with developing technologies and best practices. Humans come in contact with aflatoxin through contaminated food and animal products. As a result, aflatoxin can cause acute or chronic toxicity, while the quantity of aflatoxin ingested, the age, sex, and health factors might affect the degree of toxicity. Aflatoxins are one of the most toxic mycotoxins. In previous studies it was shown that aflatoxins could be dangerous for human

¹ Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Besin Analizleri Bilim Dalı, 06330, Etiler, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Gülderen YENTÜR

Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Besin Analizleri Bilim Dalı, 06330, Etiler, ANKARA

Tel : +90 312 202 32 00

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

Geliş Tarihi / Received : 28.07.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 16.11.2011

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.54154

Yentür G, Er B. Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(1): 41-52.

hepatotoksik ve mutajenik karakteristiği nedeniyle insan hayatı için tehlikeli olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle aflatoksin kontaminasyonu gıda güvenliği açısından önemini korumaktadır. Yüksek miktarlarda aflatoksin içeren gıdaların uzun süre tüketimi halk sağlığı açısından problem yaratabileceği gibi aynı zamanda ihracatı da olumsuz yönde etkileyerek ülkede ekonomik kayıplara neden olabilecektir. Diğer birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de pek çok gıda maddesi için Aflatoksin B₁ (AFB₁), Toplam Aflatoksin-TAF (B₁, B₂, G₁ ve G₂) ve Aflatoksin M₁ (AFM₁) ile ilgili yasal sınırlar belirlenmiştir. Bu derlemede, kanserojenik, teratojenik, hepatotoksik ve mutajenik etkileri ile ön plana çıkan aflatoksinlerin gıdalardaki varlığı ve son yıllardaki kontaminasyon durumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Aflatoksin, gıda, karsinojen, kontaminasyon, detoksifikasyon

due to their toxic, carcinogenic, teratogenic, hepatotoxic and mutagenic characteristic. Therefore, aflatoxins contamination remains of importance in terms of food safety. Long-term consumption of food containing high amounts of aflatoxin may result in health problems and adversely affect the export of several products and cause economic losses. In Turkey, similarly to other countries Aflatoxin B₁ (AFB₁), Total Aflatoxin-TAF (B₁, B₂, G₁ and G₂) and Aflatoxin M₁ (AFM₁) levels in food should be kept within the legal limits. The present review aimed to evaluate the emerging role of aflatoxin as carcinogenic, teratogenic, hepatotoxic and mutagenic products present in food.

Key Words: Aflatoxin, food, carcinogen, contamination, detoxification

GİRİŞ

Mikotoksinler tarım ürünlerinde tarladan tüketime kadar olan aşamalarda, ekolojik koşullara bağlı olarak gelişen ve üreyen bazı alt-mantarların sekonder metabolitleridir. Bu toksinler belirli nem ve sıcaklık koşullarında *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* gibi bazı küfler tarafından oluşturulurlar (1,2). En sık karşılaşılan mikotoksinler aflatoksin (AF), okratoksin, trikotesen, zeranol, patulin, siklopiazonik asit, nivalenol ve fumonisin olarak sıralanabilir (2,3). Bilinen 400 mikotoksin arasında aflatoksinler insan sağlığı açısından en tehlikeli olanlardır (3). Mikotoksinler içerisinde önemli yere sahip bu toksinler, İngiltere’de çok sayıda kanatlı hayvanın ölümü ile sonuçlanan “Turkey X” hastalığı sonucunda keşfedilmişlerdir. Yüz binden fazla hindi ve diğer çiftlik hayvanının ölümüyle sonuçlanan hindi hastalığı salgınları sonrasında aflatoksinler heterosiklik bileşikler ile bağlantılı bir grup olarak 1960 yılında bulunmuştur (4,5). Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* küfleri

tarafından üretilen toksik metabolitlerdir (1). *A. parasiticus* AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ aflatoksinlerinin hepsini üretirken *A. flavus* nadiren AFG₁ ve AFG₂ üretmektedir (6).

Aflatoksinle kontamine yemlerin tüketimi hayvan sağlığını ve üretimini olumsuz etkilemektedir. Aynı zamanda bu hayvanların et, yumurta ve sütlerinin tüketimi de insan sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadır (7). Bu toksinler akut ölümlerden kronik hastalıklara kadar geniş aralıklarda etki gösterebilirler (8). Genellikle eser miktarlarda (izin verilen kalıntı düzeylerinin biraz üzerinde) bile etkili, uçuculuğu az, teknolojik işlemlere ve sıcaklığa karşı dirençlidirler (9). Bu nedenle de pek çok ülkede gıdaların ve yemlerin mikotoksin ile kontaminasyonu belirli analiz programları ile izlenmektedir. Bu derlemede, kanserojenik, teratojenik, hepatotoksik ve mutajenik etkileri ile ön plana çıkan aflatoksinlerin gıdalardaki varlığı ve son yıllardaki kontaminasyon durumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GIDALARIN AFLATOKSİNLERLE KONTAMİNASYONU

Çiftlik hayvanlarının beslenmesinde yararlanılan yemler yanında insanların beslenmesinde önemli bir yere sahip olan gıda maddelerinin aflatoksin ile kontaminasyonu dünyanın çeşitli bölgelerinde sık karşılaşılan bir durumdur. Dolayısıyla bu kontaminasyonlar hem gıda güvenliğini etkileyerek halk sağlığı açısından risk oluşturmakta hem de tarım endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (3).

Aflatoksinler hasat, kurutma, depolama, gıda ve yem halinde ürünü işleme aşamasında oluşabileceği gibi ürün tarlada veya bahçede gelişirken de meydana gelebilmektedir. Aflatoksin oluşumunu ürün nemi, kurutma hızı, ortamın nisbi nemi, sıcaklık, ortamda bulunan fungus veya sporlarının yoğunluğu, gelişen türlerin toksin oluşturma güçleri, mikroorganizmalar arası rekabet, ürünün ve yetiştirilen çeşidin direnci, böcek veya diğer zararlıların faaliyeti, bitki stresi, hava sıcaklığı, atmosferik gazların bileşimi gibi birçok etken etkilemektedir (10).

Aflatoksinlerin gelişmesinde nisbi nem ve sıcaklık önemli parametrelerdir. Aflatoksin gelişmesi için optimum şartlar 24-35 °C ve %70'in üzerindeki nisbi nemdir (11,12). Ayrıca gıdalarda aflatoksin üretimi ve misel gelişimi sıcaklık ve su aktivitesi (aw) ile kontrol edilmektedir. Diğer faktörler ise sıcaklık uygulaması, modifiye atmosfer paketlenme ve koruyucu madde kullanımınıdır (13). Bu nedenle hava veya güneşte kuruyan tahıl, pamuk, yerfıstığı ve fındık gibi tohumlarda yaygın bir kontaminanttır (14). Mısır da yetiştirme, hasat, depolama, taşıma ve işlem basamaklarında genellikle mikotoksine maruz kalan gıdaldandır. Hasat öncesi ve sonrasında *A. flavus* ile enfekte olan mısırlarda kurutma ve depolama koşullarının iyi olmaması halinde aflatoksin kontaminasyonunda artış görülmektedir (15).

Küf gelişimi için gerekli olan sıcaklık ve su aktivitesi (aw) değerleri toksin oluşumu için gereksinim duyulan değerler ile aynı olmamakta ve türe göre de değişiklik göstermektedir. Örneğin *A. parasiticus* 0,82 aw'de

gelişip 0,83 aw'de toksin üretmektedir. *A. flavus*'un gelişmesi ve mikotoksin üretiminde ise aw sırasıyla 0,73 ve 0,85'dir. Bu durumda nem içeriği de %8-12 ve %17-19'dir (15).

Küf ve toksin oluşumu için gerekli minimum sıcaklık değerleri de farklılık göstermektedir. *A. parasiticus*'un gelişmesi için en düşük sıcaklık aralığı 6-8 °C iken 25-35 °C'de optimum gelişme sağlanmaktadır. *A. flavus* için ise en iyi gelişme aralığı 19-35 °C iken 12-42 °C arasında toksin üretmektedir (16).

Aflatoksin kontaminasyonu hızlıca oluşabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, *A. flavus* inokule edilen bitkilerde iki gün sonra 0,3-2 ppb, dört gün sonra 950-2.800 ppb ve yedi gün sonra ise 3.600-4.500 ppb miktarlarında aflatoksin varlığına rastlandığı belirtilmiştir (17).

GIDALARIN AFLATOKSİNLERLE DEKONTAMİNASYONU VEYA AFLATOKSİNLERİN DETOKSİFİKASYONU

Aflatoksinler difuranokumarin yapısına sahip bileşiklerdir ve iki kimyasal grubu vardır. Bunlar AFB₁, AFB₂, AFB₂A, AFM₁, AFM₂, AFM₂A ve aflatoksikol içeren difurokumarosiklopentanon serisi ile AFG₁ ve AFG₂'i içeren difurakumarolakton serisidir (17). Yirmi aflatoksin türü tanımlanmasına rağmen bunlardan AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ belli başlılarıdır. Bunlar kromatogramdaki hareketleri ve floresans özelliklerine göre adlandırılmaktadırlar (18). Ultraviyole ışık altında mavi floresans verenler AFB₁ ve AFB₂, yeşil floresans verenler ise AFG₁ ve AFG₂ olarak adlandırılmaktadır (19). AFB₁ ve AFB₂ içeren yemlerle beslenen ineklerin sütünde rastlanan, ana moleküle benzer fakat daha az biyolojik etki gösteren türevler ise AFM₁ ve AFM₂ olarak adlandırılmaktadır (20).

AFB₁ molekülünün fizikokimyasal ve biyokimyasal özellikleri incelendiğinde toksikolojik affinitesinde iki önemli bölge vardır. İlk bölgede furofuran halkası c-8, 9 pozisyonunda çift bağlanmıştır ve aflatoksin DNA ve protein etkileşimlerinden oluşmaktadır. İkinci reaktif grup ise kumarin fonksiyonel grubuna bağlı lakton halkasıdır. Bu halka kolay hidrolize olur.

Bu yüzden de degradasyon için zayıf bölgedir (21).

Aflatoksinlerin yapısal degradasyonu veya inaktivasyonu kimyasallarla mümkündür. Özellikle de sodyum hipoklorit, klorindioksit, klorin gazı, hidrolitik ajanlardan organik ve inorganik asitler ve sodyum hidroksit, amonyum hidroksit ve potasyum hidroksit gibi alkaliler ile degradasyon sağlanabilmektedir (22). Bu kimyasalların bir kısmı gıda endüstrisinde kullanılmasına rağmen çoğu toksik kalıntı bıraktığından, besin içeriğine zarar verdiği için, tat, koku, renk, tekstür ve ürünün fonksiyonel özelliklerini etkilediğinden kullanılmaları uygun değildir (21). İnsan gıdalarının ve hayvan yemlerinin kontaminasyonunun fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlarla kontrolü ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bunlar toksini daha az mutajenik etkili ve daha az zararlı hale dönüştürmek içindir. Bu kimyasallar asitler, oksitleyici ajanlar, bisüfitler ve gazlardır (23). Mikrodalga ile ısıtma, ozon ile muamele (ozonlama) veya amonyak gibi birçok fiziksel ve kimyasal yöntemler aflatoksin ile kontamine olmuş gıdaların detoksifikasyonu için tavsiye edilmektedir. Son zamanlarda gıdalarda aflatoksin detoksifikasyonu için bir oksidasyon yöntemi olan ozonlama geliştirilmiştir. Ozon veya triatomik oksijen (O_3), güçlü bir dezenfektan ve oksitleyici ajandır (24).

Mikotoksinler, radyasyon dozuna bağlı olarak gıda ve mikotoksinin tipine göre gama (γ) ışınları radyasyonu ile inaktive olabilmektedirler. Bununla birlikte γ -radyasyon ile aflatoksinlerin bozunmasında su aktivitesi kritik rol oynamaktadır. Rustom (4) yaptığı çalışmada, 1 ve 10 kGy dozunda γ -ışını uygulanan yer fıstığı örneklerinde sırasıyla %75 ve %100 azalma görüldüğünü belirtmiştir. Aflatoksinler 222, 265 ve 362 nm'de UV radyasyonuna duyarlıdır. En büyük absorpsiyonu ise 362 nm'de göstermektedir. 1 ppb AFM₁ ile kontamine süt örneklerine 20 dakika 365 nm radyasyon uygulandığında %56,2'sinin yıkımlandığı bildirilmiştir (4,25,26). Mikroorganizmalarla aflatoksin detoksifikasyonuna ilişkin çalışmalarda bulunmaktadır. Thanaboripat

ve ark., (27) yaptıkları çalışmada, ticari olarak üretilen yoğurtlarda laktik asit bakterileri ve *Streptococcus lactis* ile aflatoksinin detoksifikasyonunu araştırmışlardır. Sonuç olarak da, *S. lactis* ile AFB₁ düzeyinin 50'den 33,70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'ye düştüğünü ve laktik asit bakterilerine göre detoksifikasyon için daha yetenekli olduklarını belirtmişlerdir.

Dekontaminasyon veya detoksifikasyon işlemi mikotoksin ile kontamine olan besin maddeleri açısından yararlıdır. İdeal dekontaminasyon işlemi ucuz ve uygulaması kolay olmalı, toksik metabolit oluşumuna yol açmamalıdır. Yemlerin besinsel ve tat özelliklerini değiştirebilecek ve yeni mikotoksin oluşumuna yol açabilecek özellikte olmamalıdır. Bu nedenle mikotoksin kontaminasyonunun önlenmesi daha önemlidir (21,28).

AFLATOKSİNLERİN VÜCUDA ALINMASI VE ETKİLERİ

Mikotoksinler insanlara kontamine besinler ve kontamine yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünler aracılığıyla kalıntı düzeylerinde de olsa ulaşırlar (9). Az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde besinlerin yaklaşık %25'inin mikotoksinlerle ve metabolitleriyle kontamine olduğu görülmektedir. Mikotoksinler genellikle kontamine gıdanın tüketilmesi ile vücuda alınıyor olsa da toksijenik sporların inhalasyonu ve doğrudan deri ile temas diğer maruziyet yollarıdır (29). Dünyanın değişik yerlerinde insanların günlük aflatoksin alım miktarları 0-30.000 ng kg⁻¹ arasında değişmektedir (19).

İnsanlar diyet ile düşük miktarda toksine maruz kalabilmektedir. Uzun vadede düşük dozda aflatoksin maruz kalınması çok tehlikeli sonuçlara neden olabilmektedir (30,31). Aflatoksin maruziyet durumu, kişinin yaşı, beslenme düzeni, hepatit B enfeksiyonu gibi bazı sağlık faktörleri aflatoksinlerin toksite derecesini etkilemektedir (32).

Aflatoksinlerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu akut ve kronik seyirli mikotoksikoza aflatoksikoz

adı verilmektedir (32). Ayrıca aflatoksinlerin siroz, hepatit, kronik gastrit, Reye sendromu ve böbrek hastalıklarına neden olabildiği belirtilmektedir (33). Bununla birlikte, aflatoksinlerin çocuklarda Kwashiorkor hastalığı ile bağlantılı olduğu da bildirilmektedir (4). Aflatoksin insan kordon kanında bulunmuştur ve bu durumda gelişmekte olan fetüse de geçebilmektedir (19). Ayrıca mikotoksinler hayvanlarda verim kaybı, ağırlık artışında azalma, immunosupresyon ve kanser oluşumuna neden olabilmektedirler. Bulaşmış yemlerle beslenen hayvanlarda zehirlenmeler oluşabilmektedir (31).

Aflatoksinler oluşturdukları toksik etki gücüne göre $AFB_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$ şeklinde sıralanmaktadır (17). Bu toksinler içerisinde AFB_1 'in insan sağlığı açısından en toksik ve en yaygın olduğu belirtilmektedir (33,34). Aflatoksinler akut ve kronik toksisiteye ve büyük bir bölümü ise karsinogenik, mutajenik ve teratojenik etkiye sahiptirler (35). Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (International Agency of Research on Cancer-IARC) tarafından AFB_1 Grup 1 karsinogen, AFM_1 ise Grup 2 karsinogen olarak bildirilmiştir (36). AFB_1 'in toksik ve karsinogenik etkileri için temel hedef organlar karaciğer ve böbrektir. Aflatoksinin hepatotoksik, hepatokarsinogenik ve teratojenik etkileri farklı hayvan türlerinde gösterilmiştir (37). AFB_1 rat, fare, maymun, marmoset, ördek, lepistes, somon, alabalık ve kır faresi gibi bazı hayvanlarda malignan tümör oluşumunu indükleyebilmektedir. Bu bileşikler için hedef organ karaciğer olmakla beraber bazı ratlarda böbrek ve intestinal tümörler görülebilmektedir (38). Bununla birlikte hepatokarsinoma gelişiminde aflatoksinlerin etkili olabileceği belirtilmektedir (39,40). Türkiye'de yapılan bir çalışmada viral hepatit hastalarında sağlıklı bireylere göre aflatoksin maruziyetinin yüksek olduğu ve bu durumun hepatosellüler karsinoma gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (41). Mikotoksin zehirlenmelerinde etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Kontamine olan besinlerin mikotoksinlerden arındırılması da olası görünmemektedir. Bu

nedenle, insan sağlığı bakımından kontamine gıdaların tüketiminden kaçınılması ve gıdaların kontaminasyonuna karşı etkin önlemlerin alınması önemlidir (9).

GIDALARDA AFLATOKSİN VARLIĞI VE YASAL DÜZENLEMELER

Aflatoksinler dünyada çığ olarak tüketilen gıdalardan özellikle yerfıstığı, fındık, kakao, kahve, mısır, pirinç, pamuk, buğday ve diğer tahıl ürünleri ile kuru meyvelerde yaygın şekilde oluşmaktadır (20,42,43). Aynı zamanda süt ve süt ürünleri, etler, kırmızı biber ve kırmızı biber ürünleri gibi baharatlar da dahil olmak üzere pek çok gıdada yaygın olarak bulunabilmektedir (42,44,45). Yüksek miktarlarda aflatoksin içeren gıdaların uzun süre tüketimi halk sağlığı açısından problem yaratabileceği gibi aynı zamanda ihracatı da olumsuz yönde etkileyebileceğinden ülkede ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Bu yüzden mikotoksinlerin gelişiminin üretimden tüketime kadar izlenebilirliği önem taşımaktadır (21,43). Yapılan araştırmalar sonucunda; Türkiye'de tüketime sunulan bazı gıda maddelerine ait belirlenen aflatoksin düzeyleri Tablo 1'de sunulmuştur (31, 42-62). Bu değerler incelendiğinde; gıda çeşidi, bölgesel ve mevsimsel özellikler gibi faktörlerin etkisiyle farklılıkların bulunduğu görülmüştür.

Türkiye'de diğer birçok ülkede olduğu gibi gıdalarda aflatoksin kontaminasyonu ile ilgili yasal kısıtlamalar vardır. Avrupa Birliği'ne uyum süreci çerçevesinde hazırlanan 2008/26 sayılı gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkındaki Türk Gıda Kodeksi (TGK) Tebliğinde pek çok gıda maddesi için AFB_1 , toplam Aflatoksin-TAF (B_1 , B_2 , G_1 ve G_2) ve AFM_1 ile ilgili sınırlar belirtilmiştir (63).

Asya ülkelerinin birçoğunda pirinç aflatoksin sıklığı ve kontaminasyonunda temel gıdadır. Ayrıca arpa ve mısır bazlı gıdalarda da aflatoksin varlığı bildirilmiştir (64). Özellikle tohumlarda yüksek miktarlarda aflatoksin olduğu bilinmektedir.

Tablo 1. Türkiye’de tüketime sunulan bazı gıda maddelerine ait aflatoksin düzeyleri

Örnek	Örnek Miktarı	Aflatoksin Türü	Aflatoksin Düzeyleri	Kaynak
Yerfıstığı ve ürünleri	85	AFB ₁	0-21 ppb	Özay ve Alperden (46)
	5	AFB ₁	1,2-11,3ppb	Gürses ve Erdoğan (47)
	7	AFB ₁	8-94 ppb	Gürses (48)
	20	TAF	8,16-75,74 ng kg ⁻¹	Yentür ve ark. (43)
	5	TAF	0,75-26,36 µg kg ⁻¹	Bircan ve ark. (49)
Fındık ve ürünleri	81	AFB ₁	<1 -13 ppb	Ayçiçek ve ark. (50)
	9	AFB ₁	1-113 ppb	Gürses (48)
	2	TAF	5,46-6,55 µg kg ⁻¹	Bircan ve ark. (49)
Badem	9	AFB ₁	2,9-4,7 ppb	Gürses ve Erdoğan (47)
Badem	3	AFB ₁	1-3 ppb	Gürses (48)
Ceviz	6	AFB ₁	3-28ppb	Gürses (48)
Mısır	26	TAF	0,01-32,30 µg kg ⁻¹	Oruç ve ark. (51)
İncir	103	AFB ₁	0,5-63,0 µg kg ⁻¹	Özay ve Alperden (52)
Leblebi	1	AFB ₁	1-2 ppb	Gürses (48)
Baharat	36	TAF	0,3-46,8 µg kg ⁻¹	Çolak ve ark. (42)
Buğday	24	TAF	10,4-643,5 ng/kg	Giray ve ark. (53)
Buğday unu	50	TAF	<1,75- <4 ppb	Özturan ve ark. (31)
Fıstık	3	AFB ₁	1,1-1,5 ppb	Gürses ve Erdoğan (47)
	16	TAF	2,31-63,11 µg kg ⁻¹	Bircan ve ark. (49)
Kırmızıbiber ve ürünleri	100	AFB ₁	<0,025-40,9 µg kg ⁻¹	Aydın ve ark. (54)
	72	TAF	0,11-24,7 µg kg ⁻¹	Ardıç ve ark. (44)
	19	TAF	1,79-6,55 µg kg ⁻¹	Bircan ve ark. (49)
	190	AFB ₁	0,20-6,12 ppb	Yentür (55)
Susam	2	TAF	-	Demirer ve ark. (56)
	20	AFG ₁	0,06-2,04 ng kg ⁻¹	Yentür ve ark. (43)
Helva	102	AFB ₁	<1-18 µg kg ⁻¹	Var ve ark. (57)
Süt	27	AFM ₁	<10-50,5 ng L ⁻¹	Gürbay ve ark. (58)
	220	AFM ₁	0-0,26 ppb	Er ve ark. (45)
Süt Ürünleri	400	AFM ₁	<50- >800 ng kg ⁻¹	Sarımehmetoğlu ve ark. (59)
	28	AFM ₁	7-202 ng kg ⁻¹	Gürses ve ark. (60)
	80	AFM ₁	<1- >601 ng kg ⁻¹	Elmalı ve ark. (61)
	193	AFM ₁	<50 - 860 ng kg ⁻¹	Ardıç ve ark. (62)
	70	AFM ₁	0-0,24 ppb	Er ve ark. (45)

Yerfıstığının depolanmasında nem %8'in ve ortam sıcaklığı 25 °C'nin üzerinde ise aflatoxin oluşturan küfler meydana gelmektedir (17). Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde, doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulan mısır ve yerfıstıklarında maksimum AFB₁ ve toplam aflatoxin miktarlarının sırasıyla 8 ve 15 µg kg⁻¹ olabileceği belirtilmiştir. Aynı Tebliğde tahıllar (karabuğday - *Fagopyrum sp.* dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdaların maksimum AFB₁ ve toplam aflatoxin miktarları sırasıyla 2 ve 4 µg kg⁻¹ olarak bildirilmiştir. Ayrıca fındık, antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yer fıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar için maksimum toplam aflatoxin miktarı da 10,0 µg kg⁻¹ olarak belirtilmiştir (63, 65).

Başaran ve Özcan (66) yaptıkları çalışmada 217 kuruyemiş örneğinde AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ miktarlarını araştırmışlardır. Örneklerin %14,28'inde düşük miktarlarda ve %1,84'ünde de sınır değerlerinin üstünde aflatoxin saptamışlardır.

Bircan ve ark., (49) yaptıkları çalışmada 2.643 kuru yemiş örneğinin 313 tanesinde, 80 adet fındığın ikisinde, 28 fıstığın 16'sında ve 10 yerfıstığının beşinde ve 23 biberin 19'unda sırasıyla 0,2-162,76; 5,46-6,55; 2,31-63,11; 0,75-26,36 ve 1,79-6,55 µg kg⁻¹ oranlarında toplam aflatoxin saptamışlardır.

Süt ve süt ürünleri insanlar özellikle de çocuklar için hayvansal protein, kalsiyum, vitamin ve esansiyel yağ asidi gibi besin maddeleri için iyi bir kaynaktır (34, 67). Fakat süt ve süt ürünleri aynı zamanda aflatoxinler açısından da potansiyel kaynaklardır (67). AFB₁'in alınmasından 12-24 saat sonrasında sütte AFM₁ saptanabilmektedir. Süt bazlı diğer ürünlerde de AFM₁ ürün işleme basamaklarından etkilenmemektedir (58). Bununla birlikte, AFM₁ süte uygulanan pastörizasyon işlemine dayanıklıdır (67). Süt ve süt ürünleri açısından getirilen yasal kısıtlamalarda; çiğ süt, ısıl işlem görmüş süt ve süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütlerde maksimum AFM₁

miktarının 0,05 µg kg⁻¹ olması gerektiği belirtilmiştir (63).

Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları için ise maksimum AFB₁ miktarı 0,10 µg kg⁻¹ olarak belirtilmiştir. Ayrıca, bebek mamalarında (bebek sütleri ve devam sütleri dahil) maksimum AFM₁ 0,025 µg kg⁻¹, bebeklerin özel tıbbi amaçlı diyet gıdalarında maksimum AFB₁ ve AFM₁ sırasıyla 0,10 µg kg⁻¹ ve 0,025 µg kg⁻¹ olarak bildirilmektedir. Aflatoxin bulunması muhtemel riskli gıdalar için ise genel olarak maksimum değerler AFB₁, toplam aflatoxin ve AFM₁ için sırasıyla 5,0, 10,0 ve 0,5 µg kg⁻¹ olarak belirtilmiştir (63). Viridis ve ark., (68) İtalya'da keçi sütü ve keçi sütünden yapılan peynirlerde AFM₁ kontaminasyonunu araştırmışlardır. 41 peynir örneğinin 4 (% 9,8)'ünde AFM₁'i 79,5-389 ng kg⁻¹ seviyeleri arasında bulduklarını belirtmişlerdir.

Torkar ve Vengust (69) Slovenya'da yaptıkları çalışmada çiğ süt ve peynir örneklerinde maya, küf ve AFM₁ varlığını araştırmışlardır. Peynir örneklerinin 4 (% 10)'ünde AFM₁ seviyesinin 51-223 ng kg⁻¹ arasında olduğunu belirtmişlerdir.

Bununla birlikte biber, zerdeçal, karabiber, kişniş ve kuru zencefil gibi baharatlarda hasat öncesi, hasat sonrası, depolama ve taşıma sırasında kontamine olabilmektedir (3). Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde baharatlardan kırmızıbiber (*Capsicum spp.*), karabiber (*Piper spp.*), hintceviz/muskat (*Myristica fragrans*), zencefil (*Zingiber officinale*), zerdeçal (*Curcuma longa*) gibi ürünlerde maksimum AFB₁ ve toplam aflatoxin miktarları sırasıyla 5,0 ve 10,0 µg kg⁻¹ olarak belirtilmiştir (63). Tüketimi çok olan gıdalardan biri de kırmızıbiber (*Capsicum annum*) ve ürünleridir. Kırmızıbiber dünyada tüketimi yaygın olan çok popüler bir baharattır (70). Türkiye de Hindistan, Meksika, Amerika, İspanya gibi yüksek miktarda kırmızıbiber üreten ülkelerden birisidir. Kırmızı toz biberler Türkiye'de yemeklerin rengi, lezzeti ve aroması için çok sık kullanılan baharat çeşitleridir (54). Kırmızıbiber; üretim, hasat, kurutma ve daha sonraki işleme safhalarında

karşı karşıya kaldığı şartlar nedeniyle aflatoksin oluşumuna hassas ürünlerden birisidir (62). Kırmızıbiber en yüksek oranda aflatoksin içeren baharat türüdür (71). Bu biberlerin mikotoksinler ile kontaminasyonunda bölgenin iklimi, ürün genotipi ve toprak tipi gibi birçok faktör etkilidir (72).

Dünyadaki en fazla biber üreticisi olan ülkeler tropik bölgelerde bulunmaktadır. Dolayısıyla kırmızıbiber ve ürünlerinde mikotoksin üreten küflerin gelişimi için uygun iklim koşulları bulunmaktadır (71). Bununla beraber biberler genellikle yetersiz hijyenik koşullar altında açık havada kurutulmaktadır (62). Kırmızıbiberler de diğer pek çok ürün gibi aflatoksinler ile hasat öncesinde, hasat sonrasında, depolama sırasında ve taşıma esnasında kontamine olabilmektedir (71,72). Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkındaki 2008/26 sayılı Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde, tüm ve toz kırmızıbiberler için maksimum AFB₁ ve total aflatoksin miktarının sırasıyla 5 µg kg⁻¹ ve 10 µg kg⁻¹ olduğu belirtilmiştir (63). Türk Gıda Kodeksi Tebliği, 1881/2006/EC sayılı gıda maddelerindeki belirli bulaşanların maksimum miktarlarının belirlenmesi hakkında komisyon tüzüğü dikkate alınarak Avrupa Birliği'ne uyum süreci çerçevesinde hazırlanmıştır. Bu direktif 2010 yılında çıkan 165/2010 direktifi ile yeniden düzenlenmiştir (73,74).

SONUÇ

Gıda maddelerinin ve hayvan yemlerinin aflatoksinler ile kontaminasyonu dünya genelinde ciddi bir problemdir. Aflatoksinlerle kontamine olmuş gıdayı tüketen insanlarda ölümle sonuçlanabilen hastalıklar meydana gelebilmektedir. Farklı ülkelerde, çeşitli gıdalarda aflatoksin varlığının araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmalardaki aflatoksin düzeyleri iklimsel ve bölgesel nedenlerle veya gıda çeşidine göre farklılıklar gösterebilmektedir. Ayrıca mikrobiyolojik ve kimyasal detoksifikasyonla ilgili çalışmalar incelendiğinde ise bazılarında aflatoksin düzeylerinde belli miktarda azalma görülmektedir. Fakat bu durum detoksifikasyonun yeterli olmadığı şeklinde değerlendirilmektedir.

Aflatoksinlerin sağlık üzerine olumsuz etkileri ve ülke ekonomisi açısından kayıplar düşünüldüğünde izlenebilirliğin önemli olduğu görülmektedir. Gıdaların ve hayvan yemlerinin üretimden tüketime kadar her aşamada aflatoksin yönünden analitik yöntemlerle analizleri yapılarak kontrolleri sağlanmalıdır. Yasal düzenlemeler doğrultusunda kabul edilen sınırlardan daha yüksek değerlerde aflatoksin içeren gıda ve yemlerin tüketilmesine izin verilmemelidir. Gıda ve yemlerin küflerle kontaminasyonunun önlenmesi ve dolayısıyla aflatoksin oluşumunun engellenebilmesi yönünde çalışmaların artırılması gerekmektedir. Ayrıca aflatoksinin detoksifikasyonunun yeterli olmamasından dolayı kontaminasyonun kontrol altında tutulması önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Zinedine A, González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, Idrissi L, Mañes J. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *Int J Food Microbiol*, 2007; 114 (1): 25-9.
2. Kumar V, Basu MS, Rajendran TP. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Prot*, 2008; 27 (6): 891-905.
3. O'Riordan MJ, Wilkinson MG. A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chem*, 2008; 107 (4): 1429-35.
4. Rustom IYS. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem*, 1997; 59 (1): 57-67.

5. Farombi EO. Aflatoxin contamination of foods in developing countries: implications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategies. *Afr J Biotechnol*, 2006; 5 (1): 001-14.
6. Wright MS, Greene-McDowelle DM, Zeringue HJ, Bhatnagar D, Cleveland TE. Effects of volatile aldehydes from *Aspergillus*-resistant varieties of corn on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin biosynthesis. *Toxicon*, 2000; 38 (9): 1215-23.
7. Gowda NKS, Malathi V, Suganthi RU. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Anim Feed Sci Tech*, 2004; 116 (3-4): 281-91.
8. Móricz AM, Fatér Z, Otta KH, Tyihák E, Mincsovcics E. Overpressured layer chromatographic determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in red paprika. *Microchem J*, 2007; 85 (1): 140-4.
9. Şener S. Gıda güvenliği açısından mikotoksinler. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci*, 2006; 2 (46): 135-9.
10. Çoksöyler N. Farklı yöntemlerle kurutulmuş kırmızıbiberlerde *Aspergillus flavus* gelişimi ve aflatoxin oluşumunun incelenmesi. *Gıda*, 1999; 24 (5): 297-306.
11. Arrus K, Blank G, Abramson D, Clear R, Holley RA. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *J Stored Prod Res*, 2005; 41 (5): 513-27.
12. Odoemelam SA, Osu C I. Aflatoxin B₁ contamination of some edible grains marketed in Nigeria. *E-J Chem*, 2009; 6 (2): 308-14.
13. Molina M, Giannuzzi L. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Res Int*, 2002; 35 (6): 585-94.
14. Bonjar GHS. Incidence of aflatoxin producing fungi in early split pistachio nuts of Kerman, Iran. *J Biol Sci*, 2004; 4 (2): 199-202.
15. Giorni P, Battilani P, Pietri A, Magan N. Effect of aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *Int J Food Microbiol*, 2008; 122 (1-2): 109-13.
16. Bhat R, Rai RV, Karim AA. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Compr Revi Food Sci F*, 2010; 9 (1): 57-81.
17. Coppock RW, Christian RG. Aflatoxins. In: Gupta RC, ed. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. New York: Academic Press, 2007: 939-50.
18. Zheng Z, Humphrey CW, King RS, Richard JL. Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, 2005; 159 (2): 255-63.
19. Verma RJ. Aflatoxin cause DNA damage. *Int J Hum Genet*, 2004; 4 (4): 231-6.
20. Reddy L, Odhav B, Bhoola K. Aflatoxin B₁-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. *Biol Chem*, 2006; 387 (1): 87-93.
21. Banu N, Muthumary J. Taxol as chemical detoxificant of aflatoxin produced by *Aspergillus flavus* isolated from sunflower seed. *Health*, 2010; 2 (7): 789-95.
22. Samarajeewa U, Arseculeratne SN, Tennekoon GE. Spontaneous and experimental aflatoxicosis in goats. *Res Vet Sci*, 1975; 19 (3): 269-77.
23. Safara M, Zaini F, Hashemi SJ, Mahmoudi M, Khosravi AR, Shojai-Aliabadi F. Aflatoxin detoxification in rice using citric acid. *Iranian J Publ Health*, 2010; 39 (2): 24-9.
24. Inan F, Pala M, Doymaz I. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B₁ in red pepper. *J Stored Prod Res*, 2007; 43 (4): 425-9.
25. Yousef AE, Marth EH. Use of ultraviolet energy to degrade aflatoxin M₁ in raw or heated milk with and without added peroxide. *J Dairy Sci*, 1986; 69 (9): 2243-7.
26. Kabak B, Dobson ADW, Vara I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2006; 46 (8): 593-619.

27. Thanaboripat D, Kraipeerapun K, Pattanaphongsak C, Srisanan S, Nanasombat S. Detoxification of aflatoxin by *Streptococcus lactis* and lactic acid bacteria in commercial yoghurt. *Kasetsart J-Nat Sci*, 1997; 31: 117-23.
28. Leibetseder J. Decontamination and detoxification of mycotoxins. In: Mosenthin R, Zentek J, Zebrowska T, eds. *Biology of Nutrition in Growing Animals*. Elsevier Limited, 2006: 439-65.
29. Salem NM, Ahmad R. Mycotoxins in food from Jordan: Preliminary survey. *Food Control*, 2010; 21 (8): 1099-103.
30. Papp E, H-Otta K, Záray G, Mincsovcics E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchem J*, 2002; 73 (1-2): 39-46.
31. Özturan K, Ünsal C, Karakaya Y, Atasever M, Ceylan ZG, Atasever MA. Erzurum'da tüketime sunulan buğday unlarının toplam aflatoksin, aflatoksin.B1 ve Okratoksin A Yönünden İncelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 2007; 2 (4): 172-6.
32. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: Toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *Hacettepe Üni Ecz Fak Derg*, 2008; 28 (1): 63-92.
33. Koirala P, Kumar S, Yadav BK, Premarajan KC. Occurrence of aflatoxin in some of the food and feed in Nepal. *Indian J Med Sci*, 2005; 59 (8): 331-6.
34. Hussain HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 2001; 167 (2): 101-34.
35. Oveisi MR, Jannat B, Sadeghi N, Hajimahmoodi M, Nikzad A. Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Control*, 2007; 18: 1216-8.
36. Anonymous. Some naturally-occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC monographs, 1993; 56: 359-62.
37. Ayub MY, Sachan DS. Dietary factors affecting aflatoxin B₁ carcinogenicity. *Mal J Nutr*, 1997; 3: 161-79.
38. Singh VP. Aflatoxin biotransformations: Biodetoxification aspects. *Prog Ind Microbiol*, 1995; 32: 51-61.
39. Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect*, 2010; 118 (6): 818-24.
40. Galy O, Chemin I, Le Roux E, Villar S, Le Calvez-Kelm F, Lereau M. Mutations in TP53 and CTNNB1 in relation to hepatitis B and C infections in hepatocellular carcinomas from Thailand. *Hepat Res Treat*, 2011; 2011: 1-9.
41. Mızrak D, Engin B, Onder FO, Yener B, Bektaş M, Biyikli Z, Idilman R. Aflatoxin exposure in viral hepatitis patients in Turkey. *Türk J Gastroenterol*, 2009; 20 (3): 192-7.
42. Çolak H, Bingöl EB, Hampikyan H, Nazlı B. Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. *J Food Drug Anal*, 2006; 14 (3): 292-6.
43. Yentür G, Er B, Gür Özkan M, Öktem BA. Determination of aflatoxins in peanut butter and sesame samples using high-performance liquid chromatography method. *Eur Food Res Technol*, 2006; 224 (2): 167-70.
44. Ardiç M, Karakaya Y, Atasever M, Durmaz H. Determination of aflatoxin B₁ levels in deep-red ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with ELISA. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 1596-9.
45. Er B, Demirhan B, Onurdağ FK, Yentür G. Determination of aflatoxin M₁ level in milk and white cheese consumed in Ankara Region, Turkey. *J Anim Vet Adv*, 2010; 9 (12): 1780-4.
46. Özay G, Alperden İ. Türkiye'de yetiştirilen yerfıstıklarında (*Arachis hypogaea L.*) mikotoksinler. *Gıda*, 1989; 14 (5): 267-73.
47. Gürses M, Erdoğan A. Erzurum piyasasında satılan yerfıstığı, antepfıstığı ve bademlerin aflatoksin B₁ kontaminasyonu bakımından incelenmesi. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg*, 2004; 35 (1-2): 75-8.
48. Gürses M. Mycoflora and aflatoxin content of hazelnuts, walnuts, peanuts, almonds and roasted chickpeas (leblebi) sold in Turkey. *Int J Food Prop*, 2006; 9: 395-9.

49. Bircan C, Barringer SA, Ulken Ü, Pehlivan R. Aflatoxin levels in dried figs, nuts and paprika for export from Turkey. *Int J Food Sci Tech*, 2008; 43 (8): 1492-8.
50. Aycicek H, Aksoy A, Saygi S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control*, 2005; 16 (3): 263-6.
51. Oruç HH, Cengiz M, Kalkanli O. Comparison of aflatoxin and fumonisin levels in maize grown in Turkey and imported from the USA. *Anim Feed Sci Tech*, 2006; 128: 337-41.
52. Özay G, Alperden I. Aflatoxin and ochratoxin-a contamination of dried figs (*Ficus carina* L.) from the 1988 crop. *Mycotoxin Res*, 1991; 7: 85-91.
53. Giray B, Girgin G, Engin AB, Aydın S, Şahin G. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*, 2007; 18 (1): 23-9.
54. Aydın A, Erkan ME, Başkaya R, Ciftcioğlu G. Determination of aflatoxin B₁ levels in powdered red pepper. *Food Control*, 2007; 18 (9): 1015-8.
55. Yentür G. Bazı gıda maddelerinde aflatoksin B₁ ve M₁ düzeylerinin saptanması. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi. No: 02/2009-16, 2010.
56. Demirer MA, Dinçer B, Kaymaz Ş, Alperden İ, Yalçın S, Özer E. Bazı gıda maddelerinde mikroflora ve mikotoksin araştırmaları. *AÜ Vet. Fak. Derg*, 1989; 36 (1): 85-107.
57. Var I, Kabak B, Gök F. Survey of aflatoxin B₁ in helva, a traditional Turkish food, by TLC. *Food Control*, 2007; 18 (1): 59-62.
58. Gürbay A, Aydın S, Girgin G, Engin AB, Şahin G. Assessment of aflatoxin M₁ levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control*, 2006; 17 (1): 1-4.
59. Sarımehtemetoğlu B, Kuplulu O, Celik TH. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control*, 2004; 15 (1): 45-9.
60. Gürses M, Erdoğan A, Çetin B. Occurrence of aflatoxin M₁ in some cheese types sold in Erzurum, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 2004; 28: 527-30.
61. Elmalı M, Yapar K, Kart A, Yaman H. Aflatoksin M₁ levels in milk powder consumed in Turkey. *J Anim Vet Adv*, 2008; 7 (5): 643-5.
62. Ardıç M, Karakaya Y, Atasever M, Adiguzel G. Aflatoxin M₁ levels of Turkish white brined cheese. *Food Control*, 2009; 20 (3): 196-9.
63. Anonymous. Türk Gıda Kodeksi - 2008/26 No'lu Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, 2008.
64. Park JW, Kim EK, Kim YB. Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B₁ through food consumption. *Food Addit Contam*, 2004; 21 (1): 70-5.
65. Anonymous. Türk Gıda Kodeksi - 2009/22 No'lu Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ, 2009.
66. Basaran P, Ozcan M. Occurrence of aflatoxins in various nuts commercialized in Turkey. *J Food Safety*, 2009; 29 (1): 95-105.
67. Pei SC, Zhang YY, Eremin SA, Lee WJ. Detection of aflatoxin M₁ in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. *Food Control*, 2009; 20 (12): 1080-5.
68. Virdis S, Corgiolur G, Scarano C, Pilo AL, De Santis EPL. Occurrence of aflatoxin M₁ in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control*, 2008; 19 (1): 44-9.
69. Torkar KG, Vengušt A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M₁ in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*, 2008; 19 (6): 570-7.
70. Saha D, Acharya D, Roy D, Shrestha D, Dhar TK. Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in chili samples. *Anal Chim Acta*, 2007; 584 (2): 343-9.

71. Marin S, Colom C, Sanchis V, Ramos AJ. Modelling of growth of aflatoxigenic *A. flavus* isolates from red chilli powder as a function of water availability. *Int J Food Microbiol*, 2009; 128 (3): 491-6.
72. Hernández-Hierro JM, García-Villanova RJ, González-Martín I. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Anal Chim Acta*, 2008; 622 (1-2): 189-94.
73. Anonymous. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Commission Regulation (EC) No 1881/2006. *Official Journal of the European Union*, 2006.
74. Anonymous. Amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Commission Regulation (EU) No 165/2010. *Official Journal of the European Union*, 2010.