



T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

REPUBLIC OF TURKEY  
THE MINISTRY OF HEALTH  
GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

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

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 81 ■ Sayı/Number 1 ■ Yıl/Year 2024

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

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü adına

On behalf of General Directorate of Public Health

Prof. Dr. Sedat KAYGUSUZ, Genel Müdür (General Director)

## EDİTÖR

EDITOR IN CHIEF

Doç. Dr. Hasan IRMAK (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

## EDİTÖR YARDIMCILARI

DEPUTY EDITORS

Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN (TOBB ETÜ Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enst.)

Prof. Dr. Hülya ŞİMŞEK (Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Dr. Öğrt. Üye. Pınar MURSALOĞLU KAYNAR (Ankara Medipol Üni. Sağ. Hiz. MYO)

## YAYIN KURULU

EDITORIAL BOARD

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK (Bakırçay Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. Fatih BAKIR (Lokman Hekim Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Doç. Dr. Selin NAR ÖTGÜN (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Doç. Dr. Cemile SÖNMEZ (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Doç. Dr. Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK (Marmara Üniversitesi Pendik EAH)

Dr. Gıda Müh. Şule ŞENSES ERGÜL (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

## İSTATİSTİK EDİTÖRLERİ

STATISTICAL EDITORS

Uzm. Dr. Fehminaz TEMEL (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Doç. Dr. Can Hüseyin HEKİMOĞLU (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

## İNGİLİZCE DİL EDİTÖRÜ

ENGLISH LANGUAGE EDITOR

Dr. Gülsen BUDAK TOPAKTAŞ (S.B. Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü)

## TEKNİK KURUL

TECHNICAL BOARD

Utku ERCÖMERT (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Zeynep KÖSEOĞLU (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Selahattin TAŞOĞLU (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Gülşay GÜLTAY (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

## HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

### Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü / General Directorate of Public Health  
THDBD Teknik Kurulu / TBHEB Technical Board  
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No:55 Sıhhiye /  
ANKARA Tel: +90 312 565 55 80

### Baskı ve Cilt / Press and Binding :

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü / General Directorate of Public Health  
İdari ve Mali İşler Dairesi Başkanlığı - Matbaa / Administrative  
and Financial Affairs Department - Printing House  
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No:55 Sıhhiye/ANKARA  
Tel: +90 312 565 55 88

### Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

### Basım Tarihi / Date of Publication :

Mart - 2024 / March - 2024

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç

Anna PAPA, Yunanistan

Aziz SANCAR, ABD

Cristina DOMINGO, Almanya

Daniel MOTLHANKA, Botsvana

Dwight D. BOWMAN, ABD

Isme HUMOLLI, Kosova

Isuf DEDUSHAJ, Kosova

Iva CHRISTOVA, Bulgaristan

Johan LINDH, İsveç

Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail

Manfred WEIDMANN, İngiltere

Paul HEYMAN, Belçika

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba

Sıraç DİLBER, İsveç

Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya

Takashi AKAMATSU, Japonya

Varalakshmi ELANGO, Hindistan

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Alanya

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Ankara

Banu ÇAKIR, Ankara

Banu SANCAK, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Afyonkarahisar

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Can Hüseyin HEKİMOĞLU, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Cemile SÖNMEZ, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Ebubekir CEYLAN, Ankara

Emrah RUH, Kıbrıs

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fehminaz TEMEL, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnaz ÇULHA, Hatay

Gülnur TARHAN, Adıyaman

Hakan ABACIOĞLU, İzmir

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

- Hanefi ÖZBEK, İzmir  
Hasan IRMAK, Ankara  
Hasan TEZER, Ankara  
Hayrettin AKDENİZ, Bolu  
Hilal ÖZDAĞ, Ankara  
Hülya ŞİMŞEK, Yozgat  
Hürrem BODUR, Ankara  
Işıl MARAL, İstanbul  
İ. Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir  
İpek MUMCUOĞLU, Ankara  
İrfan EROL, Ankara  
İrfan ŞENCAN, Ankara  
İsmail CEYHAN, Ankara  
Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara  
Koray ERGÜNAY, Ankara  
Levent AKIN, Ankara  
Mahinur AKKAYA, Ankara  
Mehmet Ali ONUR, Ankara  
Mehmet Kürşat DERİCİ, Ankara  
Mestan EMEK, Antalya  
Metin KORKMAZ, İzmir  
Mithat ŞAHİN, Kars  
Murat DİZBAY, Ankara  
Murat TOPBAŞ, Trabzon  
Mustafa AKSOY, Ankara  
Mustafa ERTEK, Ankara  
Mustafa Necmi İLHAN, Ankara  
Mustafa Kasım KARAHOCAGİL, Kırşehir  
Mustafa Kemal BAŞARALI, Ankara  
Mustafa KAVUTÇU, Ankara  
Mükerrem KAYA, Erzurum  
Nazime MERCAN, Denizli  
Nazmi ÖZER, Ankara  
Nilay ÇÖPLÜ, Ankara  
Nur AKSAKAL, Ankara  
Nur Münevver PINAR, Ankara  
Nuran ESEN, İzmir  
Oğuz GÜRSOY, Denizli  
Orhan BAYLAN, İstanbul  
Orhan YILMAZ, Ankara  
Özlem KURT AZAP, Ankara  
Pınar MURSALOĞLU KAYNAR, Ankara  
Pınar OKYAY, Aydın  
Rahmet GÜNER, Ankara  
Recep AKDUR, Ankara  
Recep KEŞLİ, Afyonkarahisar  
Recep ÖZTÜRK, İstanbul  
Rıza DURMAZ, Ankara  
S. Aykut AYTAÇ, Ankara  
Saime ŞAHİNÖZ, Gümüşhane  
Sami AYDOĞAN, Kayseri  
Sarp ÜNER, Ankara  
Seçil ÖZKAN, Ankara  
Seda KARASU YALÇIN, Bolu  
Seda TEZCAN, Mersin  
Selçuk KAYA, Çanakkale  
Selim KILIÇ, Ankara  
Selin NAR ÖTGÜN, Ankara  
Sema BURGAZ, Ankara  
Semra Ayşe GÜREŞER, Çorum  
Sercan ULUSOY, İzmir  
Sultan ESER, İzmir  
Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa  
Sümer ARAS, Ankara  
Şule ŞENSES ERGÜL, Ankara  
Tayfur Ata SÖKMEN, Hatay  
Turan BUZGAN, Ankara  
Yeşim ÖZBAŞ, Ankara  
Yunus Emre BEYHAN, Van  
Zafer ECEVİT, Ankara  
Zafer KARAER, Ankara  
Zati VATANSEVER, Kars  
Zeynep GÜLAY, İzmir

# TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAYIN İLKELERİ VE YAZIM KURALLARI

## I) AMAÇ VE KAPSAM

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (THDBD), T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün yayın organı olan bilimsel bir dergidir. Dergi üç (3) ayda bir (Mart, Haziran, Eylül, Aralık) yayımlanır ve dört (4) sayıda bir cilt tamamlanır. Talep olması durumunda Ek Sayı çıkartılır.

Dergimizin amacı tıp alanında aşağıdaki konularda yapılan, bilimsel açıdan nitelikli ve literatüre katkı sağlayacak klinik ve deneysel araştırma yazılarını yayımlamaktır.

Dergide biyoloji, mikrobiyoloji, enfeksiyon hastalıkları, farmakoloji, toksikoloji, immünoloji, parazitoloji, entomoloji, kimya, biyokimya, gıda, beslenme, çevre, halk sağlığı, epidemiyoloji, patoloji, fizyopatoloji, moleküler biyoloji, genetik ve biyoteknoloji ile ilgili alanlardaki özgün araştırma, olgu sunumu, derleme, editöre mektup ve teknik rapor türündeki yazılar yayımlanır.

## II) YAYIN İLKELERİ

Dergiye, daha önce başka yerde yayımlanmamış ve yayımlanmak üzere başka bir dergide inceleme aşamasında olmayan yazılar kabul edilir.

Dergi Yayın Kurulu tarafından uygun görülen yazılar, konu ile ilgili en az iki Bilimsel Danışma Kurulu Üyesi'nden (Hakem'den) olumlu görüş alındığında yayımlanmaya hak kazanır. Hakemlerin ve yazarların isimleri gizli tutulur. Hakemler değerlendirme süreçlerini en geç üç ay içinde tamamlar. Bu kurulların, yazının içeriğini değiştirmeyen her türlü düzeltme ve kısaltmaları yapma yetkileri vardır.

Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.

## III) TELİF VE LİSANS

Makalelerin tıbbi ve etik sorumluluğu yazarlara aittir. Makalelerin ve kaynakların içeriğinden, yayımlanan makalelerdeki veriler, fikirler ve ifadelerden yazarlar sorumludur; editörler, yayın kurulu ve T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü bu konularda herhangi bir sorumluluk kabul etmemektedir. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

Yazarlar, makalenin yayına kabul edilmesi halinde telif haklarını Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne devretmeyi kabul ederler. Ancak yazarlar aşağıdaki haklara sahiptir:

- Telif haklarının dışında kalan patent vb. tescil edilmiş haklar,
- Dergi ve kitap yayını dışında tüm eğitim faaliyetlerinde ücret ödemediği kullanılabileceği hakkı,
- Ticari olmamak koşulu ile makaleyi çoğaltabileceği hakkı.

Yazarlar, Telif Hakkı Devir Sözleşmesini imzalayarak, makalenin Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi tarafından yayımlanmak üzere kabul edilmesi durumunda Creative Commons Atıfı GayriTicari-Türetilemez 4.0 Uluslararası (CC BY-NC-ND 4.0) kapsamında lisanslanacağını kabul ederler.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi tarafından yayımlanan tüm makaleler, Creative Commons Atıfı GayriTicari-Türetilemez 4.0 Uluslararası (CC BY-NC-ND 4.0) lisansına tâbidir. Bu Lisans, makalenin uygun şekilde belirtilmesi, kullanımın ticari olmaması ve herhangi bir değişiklik veya uyarılama yapılmaması koşuluyla, herhangi bir ortamda kullanıma, dağıtılmasına ve çoğaltılmasına izin verir. Lisansın koşulları hakkında daha fazla bilgi için lütfen bakınız: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>. Bu lisans altında yayımlanan materyalin ticari amaçlı kullanım (satış vb.) durumunda telif hakkı sahibi ve yazar haklarının korunması için izin gereklidir. İçerik bilimsel bağlanti verilebilir ve sunumlarda referans olarak kullanılabilir. Bu koşullar dışında, makalelerin yeniden kullanımına ilişkin izinler THDBD Editörlüğü'nden alınmalıdır.

## IV) AÇIK ERİŞİM POLİTİKASI

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi açık erişim politikasını benimsemiştir. Açık erişim politikası Budapeşte Açık Erişim Girişimi (BOAI) kuralları esas alınarak uygulanmaktadır. BOAI'ye göre Açık Erişim, "Hakem değerlendirmesinden geçmiş bilimsel makalelerin, internet aracılığıyla; finansal, yasal ve teknik engeller olmaksızın, serbestçe erişilebilir, okunabilir, indirilebilir, kopyalanabilir, dağıtılabilir, basılabilir, taranabilir, tam metinlere bağlantı verilebilir, dizinlenebilir, yazılıma veri olarak aktarılabilir ve her türlü yasal amaç için kullanılabilir olması"dır. <https://www.budapestopenaccessinitiative.org/boai-10-translations/turkish-translation>

Dergide yayımlanan bilimsel yazılara, Creative Commons Atıfı-GayriTicari-Türetilemez 4.0 Uluslararası Lisansı çerçevesinde ücretsiz erişilebilir. Dergimiz, hakem değerlendirmesinden geçmiş bilimsel literatürün, herkese

serbestçe ulaşılabilir kılınması, daha geniş bir küresel bilgi alışverişini desteklemesi ilkesine dayanarak içeriğine anında açık erişim sağlar. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'nde yayımlanan tüm makaleler Açık Erişim talimatlarına uygundur.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yayımladığı makaleleri tüm dünyada serbestçe çevrimiçi erişilebilir kılmak için makalelere anında açık erişim sağlamaktadır. Makalelere erişim için abone olunmasında gerek yoktur. Dergi kullanıcıları olmadan da sistemdeki tüm makaleler ulaşıp okunabilmektedir. Makale gönderme, değerlendirme ve yayımlama ücreti alınmamaktadır.

## V) ÜCRET POLİTİKASI

Makale gönderilmesi, değerlendirilmesi ve yayımlanması için **ücret alınmaz**.

## VI) ETİK KURALLAR

Araştırma ve yayın etiği kurallarına uymak yazarların sorumluluğundadır. Yazarlar **Helsinki Bildirgesi**'nde ana hatları çizilen ilkeleri izlemelidir. Yazarlar, bu tür bir çalışma söz konusu olduğunda, uluslararası alanda kabul edilen kılavuzlara ve yürürlükte olan tüm mevzuatta belirtilen hükümlere uymalıdır.

Etik kurul izni gerektiren tüm araştırmalar için Etik Kurul Onayı alınmış olmalı, belgelendirilmeli; kurul adı, tarih ve sayısı "Gereç ve Yöntem" bölümünde belirtilmelidir.

Klinik araştırmalarda, çalışmaya katılanlardan bilgilendirilmiş olur alındığının gereç ve yöntem bölümünde belirtilmesi gerekmektedir. Gönüllü ya da hastalara uygulanacak prosedürlerin özelliği tümüyle anlatıldıktan sonra kendilerinin bilgilendirilip onaylarının alındığını gösterir beyan "Gereç ve Yöntem" kısmında bulunmalıdır. Olgu sunumlarında ve araştırma makalelerinde hasta kimliğini içeren herhangi bir doküman kullanılmamalıdır. Hasta kimliği ortaya çıkaracak bilgiler (fotoğraf vs.) kullanıldığında hastanın yazılı onayı gönderilmelidir.

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar için de gereken izinler alınmalı; yazıda deneklere ağrı, acı ve rahatsızlık verilmemesi için neler yapıldığı açık bir şekilde belirtilmelidir. Hayvan deneylerinde, çalışma "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı Kılavuzunda" ([www.nap.edu/catalog/5140.html](http://www.nap.edu/catalog/5140.html)) belirtilen etik düzenlemelere göre yapılmalıdır ve yazarlar etik kurul onayı alındığını ve etik kurul tarih ve sayısını "Gereç ve Yöntem" kısmında beyan etmelidirler. Deneysel ve klinik ilaç çalışmalarında Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı düzenlemelerine uygun olarak yapıldığı ve etik kurul onayı alındığı metin içinde belirtilmelidir.

Makalenin formatı ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) ve COPE (Committee on Publication Ethics) rehberlerine uygun olmalıdır.

## VII) YAZI DİLİ

Dergimizin yazı dilleri Türkçe ve İngilizcedir. Dili Türkçe olan yazılar İngilizce "abstract" ile, dili İngilizce olan yazılar da Türkçe özetleri ile yer alırlar. Özet ve "Abstract" bölümleri bire bir çevirileri şeklinde yer almalıdır. Yazının hazırlanması sırasında, Türkçe kelimeler için Türk Dil Kurumundan ([www.tdk.gov.tr](http://www.tdk.gov.tr)), teknik terimler için Türk Tıp Terminolojisinden ([www.tipterimleri.com](http://www.tipterimleri.com)) yararlanılması önerilir. Dili İngilizce olan yazıların mutlaka yazım ve dilbilgisi açısından yeterliliklerinin kontrol edilmiş olması gereklidir. Dil açısından yetersiz görülen yazılar değerlendirmeye alınmazlar.

## VIII) YAZIM KURALLARI

Dergide yayımlanmak üzere gönderilen yazılar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yazım kurallarına göre hazırlanmalıdır.

Başvurular [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org) adresinden "**Çevrimiçi Makale Gönder, Takip Et, Değerlendir**" programı aracılığıyla on line olarak yapılmaktadır.

Yayımlanmak üzere gönderilecek yazılar;

\* Bilimsel düzeyi yüksek, orijinal ve kaynak gösterilebilecek özellikte olmalıdır.

\* Bilgiler ve kaynaklar son 5 (beş) yıla ait güncel verileri içermelidir.

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

2. Makale başlığı, İngilizce başlık, kısa başlık, yazar ad(ları), yazar(lar)ın çalıştığı kurum(lar) ve birim(ler), yazıma işini üstlenen yazarın açık adresi, telefon numaraları (sabit ve cep), elektronik posta adresi belirtilmelidir.

a. Yazının başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.

b. Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.

c. Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka yazılmalıdır. Herhangi bir ticari ürün ve/veya

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

Tel : (0312) 565 55 80

Faks : (0312) 565 55 91

e-posta : [hsgm.thdbd@saglik.gov.tr](mailto:hsgm.thdbd@saglik.gov.tr)

şirkette bir ilişki yoksa, başvuru yazısında belirtilmelidir.

d. Makale, kongre/sempozyumda sunulmuşsa sunum türü ile birlikte dipnot şeklinde mutlaka belirtilmelidir.

3. Yazılardaki terimler mümkün olduğunca Türkçe ve Latince olmalı, dilimize yerleşmiş kelimelere yer verilmeli ve **Türk Dil Kurumu**'nun güncel sözlüğü kullanılmalıdır. Yazıların dili açık ve anlaşılır olmalı, imlâ ve yazım hataları olmamasına özen gösterilmelidir.

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

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

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

7. Metnin tamamı 12 punto Times New Roman karakteri ile çift aralıkla yazılmalı ve sayfa kenarlarından 2.5 cm boşluk bırakılmalıdır.

## 8. Araştırma yazıları;

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

Dergimizin ve makalenizin olabildiğince fazla atıf alabilmesi için özetler son derece kapsamlı hazırlanmalı; gramer, imlâ ve yazım hataları barındırmamalıdır.

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

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

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

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

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

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

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

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

i) **Kaynaklar:** Yazarlar kaynakların eksiksiz ve doğru yazılmasından sorumludur. Kaynaklar, metnin içinde geçiş sırasına göre numaralandırılmalıdır. Numaralar, parantez içinde cümle sonlarında verilmelidir. Kaynakların 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/>) bakılmalıdır.

Makalenizin Kaynaklar bölümünde Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisinde yayımlanmış makalelere atıf yapılmasına özen gösterilmelidir.

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

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

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

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

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

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

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

- **Örnek:** Weinstein L. Swarts MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic 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 dizi analizi: Gen kalıtım numaraları ve DNA dizileri makale içinde kaynak olarak gösterilmelidir. Konuyla ilgili ayrıntılı bilgi için “National Library of Medicine” adresinde “National Center for Biotechnical Information (NCBI)” bölümüne bakınız.

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

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

10. **Derleme türü yazılarda** tercihen yazar sayısı ikiden fazla olmamalıdır. Yazar(lar) daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olması; 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. Derleme türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 60 olmalıdır.

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

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

13. **Teknik Rapor türü yazılar** ilgili alanda önemli katkısı olabilecek bilgileri içermelidir. Teknik raporlarda Türkçe ve İngilizce başlık, tek paragraf olacak şekilde Türkçe ve İngilizce özet, Türkçe ve İngilizce olmak üzere anahtar kelimeler yer almalıdır. Kaynak sayısı en fazla 10 olmalıdır.

14. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

15. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

## I) AIM and SCOPE

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (TBHEB) is a publication of the "Republic of Turkey, Ministry of Health, General Directorate of Public Health". The Journal is published every three months (March, June, September, December) and one volume consists of four (4) issues.

Goal of the our journal is to publish clinical and experimental research articles which are scientifically qualified and will provide a new contribution to the literature.

The journal publishes biology, microbiology, infectious diseases, pharmacology, toxicology, immunology, parasitology, entomology, chemistry, biochemistry, food safety, environmental, health, public health, epidemiology, pathology, pathophysiology, molecular biology, genetics, biotechnology in the field of original research, case report, reviews, letters to the editor and technical reports.

## II) PUBLISHING POLICY

Articles which are not previously published in another journal or not currently under evaluation elsewhere can be accepted for the journal.

Articles approved by the Scientific Committee and Editorial Board are eligible to be released after receiving at least two positive opinions from the Scientific Committee members. The names of the reviewers and authors are kept confidential. Reviewers complete the evaluation processes within three months at the latest. Those committees have the authority to make all corrections and abbreviations but not to change the content of the article.

The authors have the all the scientific and legal responsibilities of the articles.

The authors must fully obey the ethics of research and publication.

## III) COPYRIGHT and LICENSING

The authors are responsible for the scientific and ethical liability of the manuscripts. Authors are responsible for the contents of the manuscript and the references. The data, opinions and statements of published articles are authors' responsibility, and the Editors, Editorial Board and Republic of Turkey Ministry of Health General Directorate of Public Health deny any responsibility on these subjects. Copyright fee is not paid to the authors.

The authors agree to transfer the copyright to The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology if the article is accepted for publication. However, the authors retain the following rights:

- Registered rights rather than copyrights such as patent etc.
- The right to use it no charge in all educational activities except for publication in journals or books.
- The right to multiply manuscript provided that it is not commercial.

By signing the Copyright Transfer Form, authors agree that the article, if accepted for publication by The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology, will be licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).

All articles published by The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology are subject to the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0). This License permits use, distribution, and reproduction in any platform, provided that the article is properly cited, the usage is noncommercial, and no modifications or adaptations are made. For more information on the conditions of the license please look at: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/> Permission is required for the protection of copyright holder and author rights in the case of commercial use (sales etc.) of material published under this license. The content can be used as a reference in scientific publications and presentations. Except these conditions, permissions for re-use of manuscripts should be obtained from TBHEB editorial office.

## IV) OPEN ACCESS POLICY

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology has adopted open access policy. Open Access Policy is based on rules of Budapest Open Access Initiative (BOAI). According to BOAI, Open Access states, "Scientific articles that have been evaluated by the referee, via the Internet; be freely accessible, readable, downloadable, copied, distributed, printed, scanned, linked to full texts, indexed, transmitted as data and used for any legal purpose, without financial, legal and technical barriers. <https://www.budapestopenaccessinitiative.org/read>

Scientific articles published in the journal are freely available under the Creative Commons 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0). Our Journal, provides immediate open access to its peer-reviewed scientific literature on

the principle of making it freely available to the everyone and supporting a greater global exchange of knowledge. Published articles in The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology are fully comply with Open Access instructions.

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology instant open access to the articles is provided to make the articles published in journals freely available online all over the world. There is no need to subscribe to access articles. All articles in the system can be accessed and read without being a journal user. There is no fee for article submission, evaluation and publishing.

## V) PRICE POLICY

Article submission, evaluation and publication are free.

## VI) ETHICAL RULES

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology expects the authors to comply with the ethics of research and publication. In case the authors do not have a local ethics committee, the principles outlined in the "Declaration of Helsinki" should have been followed. Authors must comply with the internationally accepted guidelines and provisions set out in all applicable legislation when it comes to this type of work.

Ethics Committee Approval must be obtained and documented for all researches requiring ethics committee approval; The name, date and number of the committee should be stated in the method section of the article.

In human research, a statement of the informed consent of those who participated in the study is needed in the section of the "Materials and Methods". In case of procedures that will apply to volunteers or patients, it should be stated that the study objects have been informed and given their approval before the study started. In case reports, information about the signed informed patient consent form should be included in the article. In case patient information (photograph, etc.) is used which shows patient ID, a written informed consent of the patient must be submitted.

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. In animal experiments, the study should be conducted in accordance with the ethical regulations specified in the "Guide to the Care and Use of Laboratory Animals" ([www.nap.edu/catalog/5140.html](http://www.nap.edu/catalog/5140.html)) and the authors should declare that the ethics committee approval was obtained and the date and number of the ethics committee in the "Materials and Methods" section. Experimental and clinical drug studies performed in accordance with the Republic of Turkey Ministry of Health regulations and ethics committee approval must be stated in the article.

The format of the article should be in accordance with ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) and COPE (Committee on Publication Ethics) guidelines.

## VII) LANGUAGE of the JOURNAL

The official languages of the our Journal are Turkish and English. The manuscripts written in Turkish have also abstracts in English, and the articles in English have also abstracts in Turkish. The Turkish and English abstracts should be literal translations of each other. When preparing manuscripts, the Turkish Language Institution ([www.tdk.gov.tr](http://www.tdk.gov.tr)) is advised for consulting Turkish words and Turkish Medical Terminology ([www.tipterimleri.com](http://www.tipterimleri.com)) for technical terms. Manuscripts in English must absolutely be checked for spelling and grammar. Manuscripts considered insufficient in language will not be considered for evaluation.

## VIII) WRITING RULES

Manuscripts submitted for publication in the journal should be prepared according to the writing rules of the Turkish Journal of Hygiene and Experimental Biology.

Applications are made online at [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org) via the "Online Manuscript Submit, Track, Evaluate Program".

Articles to be submitted for publication;

- \* Should have a high scientific level, be original and suitable for reference.
- \* Information and references should contain up-to-date data for the last 5 (five) years.

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

2. The title of article, Turkish title, short title, author name(s), names of institutions and the departments of the author(s), full address of the

## WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

corresponding author, telephone numbers (landline and mobile), e-mail address should be given.

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

3. For Turkish studies; Terms used in articles should be in Turkish and Latin as much as possible, according to the latest dictionary of the "Turkish Language Institution". The language of the articles should be clear, and care should be taken to avoid spelling and writing mistakes.

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

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

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

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

### 8. Research Articles;

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

Abstracts should be prepared in an extremely comprehensive way; it should not contain grammatical, spelling and writing errors.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- **Periodicals:** Author(s) Last Name initial(s) name of author(s) (if there are six

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

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

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

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

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

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

- **Example:** Weinstein L. Swarts MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman HA, 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.

9. **Research articles** should have up to 40 references.

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

11. **Case reports** should have a maximum of seven pages of text. Case report should have a Turkish and English title, abstract, keywords and also introduction, case description and discussion sections should be given. Number of references should be maximum 20.

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

13. **Technical report** should contain information that may contribute significantly to the relevant field. Technical reports should include Turkish and English titles, Turkish and English abstracts in a single paragraph, keywords in Turkish and English. The number of references should be maximum 10.

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

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



## ETİK İLKELER VE YAYIN POLİTİKASI

### ETİK İLKELER

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editör ve Hakemleri, Uluslararası Tıp Dergisi Editörleri Komitesi (ICMJE), Yayın Etiği Komitesi (COPE), Dünya Tıp Editörleri Birliği (WAME), Bilim Editörleri Konseyi (CSE), Avrupa Bilim Editörleri Birliği (EASE), ABD Ulusal Tıp Kütüphanesi (NLM), Dünya Tıp Birliği (WMA) ve Ulusal Bilgi Standartları Örgütü (NISO) rehber kurallarına uymaktadır.

**Yazarlara yönelik;** dergi politikası gereğince, uluslararası anlaşmalara uygun bir etik kurul tarafından araştırma protokollerinin onaylanması gereklidir. [WMA Helsinki Deklarasyonu - İnsan Denekleri İçeren Tıbbi Araştırmalar için Etik İlkeler (son güncelleme: Ekim 2013, Fortaleza, Brezilya)”, “Tüm araştırma çalışmaları için laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanımı kılavuzu (8. baskı, 2011) “ve / veya” Hayvanları içeren Biyomedikal Araştırmalara Yönelik Uluslararası Rehber İlkeler (2012)]. Gönderilen makale, etik kurul onayı içermemesi durumunda değerlendirme için işleme alınmaz.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI POLİTİKASI

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'nin editör incelemesi, uluslararası editör organizasyonları (ICMJE, EASE, WAME, COPE, CSE,...) tarafından belirlenen İyi Editörlük Uygulamalarına uygundur. WAME, yayın sürecinde (makalenin gönderilmesi, hakem incelemesi, editör kararları ve yazarlar, hakemler ve editörler arasındaki iletişim) yazar, hakem veya editörlerin, süreçteki sorumluluklarını (akademik dürüstlük, çalışmanın yürütülmesinde ve raporlanmasında yanıltma olmaması, karar ve hükümlerin uygunluğunu) etkileyebilecek herhangi bir rekabetçi çatışma varsa çıkar çatışmasının mevcut olduğunu belirtmektedir.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, tüm yazarların, hakemlerin ve editörlerin, WAME tarafından yukarıda belirtilen herhangi bir rekabet çıkarının yanı sıra, ailevi, kişisel, finansal, politik veya dini konularla ilgili herhangi bir çıkar çatışmasını editöre bildirmesini istemektedir. Herhangi bir çıkar çatışması ve finansal desteğin olup olmadığı, makalelerin sonunda beyan edilmelidir.

Yazarlar inceleme sürecinde bölüm editörlerinden hiçbiri ile iletişime geçmemelidir. Makalelerin süreci ile ilgili tüm gerekli bilgiler dergi sekreterliğinden edinilebilir. Editör ve hakemlerin isimleri yazarlara verilmez. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'nin çift kör gözden geçirme ilkeleri nedeniyle, yazarların ve hakemlerin isimleri diğer kişilerce bilinmemektedir.

### YAYIN POLİTİKASI ve HAKEM DEĞERLENDİRME SÜRECİ

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (THDBD), **çift kör hakem değerlendirmesi** ile Türkçe ve İngilizce dillerinde T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yayımlanmaktadır. THDBD yayın ilkelerinde belirtilen konularda yazılan makaleleri kapsamaktadır. Sadece çevrimiçi (online) başvurular kabul edilmektedir. Dergiye kabul edilme sürecindeki değerlendirilmelerde aranan temel özellikler öngünlük ve bilim literatürüne katkıdır.

Makaleler gönderildikten sonra öncelikle editörler tarafından değerlendirilmektedir. Editörler hakem değerlendirme sürecinden önce makalelerin THDBD yazım kurallarına uygun yazılıp yazılmadığını değerlendirmektedirler. Bu kurallara göre yazılmayan makaleler değerlendirilmeye alınmamaktadır.

Sonrasında, makalenin değerlendirilmesi için iki hakem atanır. Hakemler aynı alanda yayınları olan uzmanlar arasından seçilir. Makaleler ihtiyaç halinde istatistik editörü tarafından da kontrol edilebilir. Tüm makaleler İngilizce dil editörü tarafından da incelenir. Hakemlere değerlendirme için 20 gün süre verilmektedir ve eğer herhangi bir düzeltme istenirse yazarların gerekli düzeltmeleri yapmak için 30 gün süresi vardır. Editör, editör yardımcıları, istatistik editörü ve İngilizce dil editörü kabul edilen makalenin asıl anlamını değiştirmeyen küçük düzeltmeler yapabilirler.

## ETHICAL PRINCIPLES AND PUBLICATION POLICY

### ETHICAL PRINCIPLES

The Editorial Board and Reviewers of the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology adhere to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), Committee on Publication Ethics (COPE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), European Association of Science Editors (EASE), the US National Library of Medicine (NLM), the World Medical Association (WMA), and National Information Standards Organization (NISO).

**For Authors;** as journal's policy, an approval of research protocols by an ethics committee in accordance with international agreements “WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (last updated: October 2013, Fortaleza, Brazil)” ,“Guide for the care and use of laboratory animals (8th edition, 2011)” and/or “International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (2012)” is required for all research studies. If the submitted manuscript does not include ethics committee approval, it will not be processed for evaluation.

### CONFLICT OF INTEREST POLICY

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology's editorial review process is in accordance with the Good Editorial Practice set by international editorial organizations (ICMJE, EASE, WAME, COPE, CSE, ...). WAME indicates that “conflict of interest exists when an author, reviewer, or editor in the publication process (submission of manuscripts, peer review, editorial decisions, and communication between authors, reviewers and editors) has a competing interest that could unduly influence his or her responsibilities (academic honesty, unbiased conduct and reporting of research, and integrity of decisions or judgments) in the publication process”.

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology requires that each author, reviewer, and editor must disclose to the editor-in-chief any conflict of interest related to family, personal, financial, political or religious issues as well as any competing interest outlined above at the WAME's definition. Whether or not a conflict of interest and financial support exist, they must be declared at the end of the manuscripts.

Authors should not contact any of the section editors during the review process. All necessary information regarding the process of a manuscript can be obtained from the editorial office. However, the names of the handling editor and the reviewers are not given to the author(s). Due to the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology's double-blinded review principles, the names of authors and reviewers are not known to the other.

### PUBLICATION POLICY and PEER REVIEW PROCESS

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (TBHEB) is published in Turkish and English by Republic of Turkey Ministry of Health General Directorate of Public Health which processing through **double-blind peer review**. The journal covers clinical and experimental research articles on subjects from all medical areas, review articles, case reports, letters to the editor, manuscripts on historical evolution of diseases and medicine and content on ethical problems. Articles are accepted only by online submission. The basic features supposed to be in an article during assessment processes for the acceptance to journal are the contribution to the scientific literature and the originality.

All manuscripts are underwent an initial process by the Editors after the submission. Editors firstly evaluates whether the manuscript is prepared according to the journal's manuscript submitting rules before peer review process. Manuscripts which are not appropriate for those rules will not be evaluated.

Then, two reviewers are assigned for manuscript evaluation. Reviewers are selected among specialists who also have publications in literature in the same medical field. Articles might be checked by the statistical editor in addition if needed. All manuscripts are also inspected for English grammatical and manuscript preparation rules. 20 days are given for reviewer and, if any corrections are required, the author(s) has 30 days to make the requested corrections. The Editor-in-Chief, Associate Editors, statistical editor and English language editor may make minor corrections to accepted manuscripts that do not change the main meaning of the manuscript.

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 80

Fax : +90 312 565 55 91

e-mail : hsgm.thdbd@saglik.gov.tr

## YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız.

- Etik kurul onayı alındı.
- Bilimsel kuruluş ve/veya fon desteği belirtildi.
- Kongre/Sempozyumda sunumu ve sunum türü belirtildi.
- Varsa teşekkür bölümü oluşturuldu.

## TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

### 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](http://www.turkhijyen.org) adresinden online olarak makale gönderilebilir

Submissions can be made online at the address [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org)  
to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

INDEX COPERNICUS  
INTERNATIONAL

Scopus

ResearchGate

CAS<sup>®</sup>

A division of the American Chemical Society

Google  
scholar beta

Academic Journals Database  
disseminating  
quality controlled scientific knowledge

EBSCO  
HOST Electronic  
Journals  
Service

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (Türk Hij Den Biyol Derg); Index Copernicus, ResearchGate, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, OpenJ-Gate, GenamicsJournalSeek, AcademicJournals Database, Scirus Scientific Database, EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Medoanet, SCOPUS, Türkiye Atıf Dizini, Türk - Medline ve TUBITAK - ULAKBIM Türk Tıp Dizini'nde yer almaktadır.

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (Türk Hij Den Biyol Derg) is taken part in Index Copernicus, Research Gate, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Medoanet, SCOPUS, Türkiye Atıf Dizini, Türk - Medline and TUBITAK - ULAKBIM Türk Tıp Dizini.

TÜRK  
HİJYEN  
DİZİNİ

TÜRK  
MEDLINE

TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

GENAMICS<sup>™</sup>  
...research from your desktop

medoanet  
Mediterranean Open Access Network

Open  
J-Gate

## İLETİŞİM

## CORRESPONDENCE

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

General Directorate of Public Health  
Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

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

Tel: 0312 565 55 80

Faks: 0312 565 55 91

e-posta: [hsgm.thdbd@saglik.gov.tr](mailto:hsgm.thdbd@saglik.gov.tr)

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

[www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org)



## ■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Tramadol hidroklorürün anjiyogenez üzerindeki etkisi: *ex-ovo* koryoallantoik membran modeli üzerinde *in-vivo* değerlendirme  
Effect of tramadol hydrochloride on angiogenesis: *in-vivo* evaluation on *ex-ovo* chorioallantoic membrane model  
Nadide ÖRS YILDIRIM  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.85226 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 3 - 10
2. Evaluation of frequency, antimicrobial resistance and multidrug resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a university hospital in Northern Cyprus, 2016 to 2020  
Kuzey Kıbrıs'ta bir üniversite hastanesinde metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının görülme sıklığı, antimikrobiyal direnç ve çoklu ilaç direnci paternlerinin değerlendirilmesi, 2016-2020  
Buket BADDAL, Tchamou Malraux Fleury POTINDJI, Emrah GÜLER  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.24892 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 11 - 22
3. COVID-19 şüpheli hastalarda SARS-CoV-2 ve yaygın solunum yolu patojenleri ile koenfeksiyon  
Coinfection with SARS-CoV-2 and common respiratory pathogens in patients with suspected COVID-19  
Sedef Zeliha ÖNER, Hatice ÖZDEMİR, Melek DEMİR, Ergun METE, İlkur KALELİ, Ahmet ÇALIŞKAN, Çağrı ERGİN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.50024 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 23 - 30
4. The effect of HBeAg positivity on susceptibility in noninvasive methods used to detect liver injury in chronic hepatitis B patients  
Kronik hepatit B hastalarında karaciğer hasarını tespit etmek için kullanılan noninvaziv yöntemlerde HBeAg pozitifliğinin duyarlılığa etkisi  
Arif Doğan HABILOĞLU, Yunus GÜRBÜZ, Tülay ÜNVER ULUSOY, Cihad ŞAKAR, İrfan ŞENCAN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.62447 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 31 - 44
5. Prognostik nütrisyon indeksi (PNI) oranlarının batin operasyonu sonrası cerrahi alan enfeksiyonunu gelişimi üzerine etkisi  
The effect of prognostic nutrition index (PNI) rates on the development of surgical site infection after abdominal surgery  
Hakan BALBALOĞLU  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.20744 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 45 - 52
6. Changes in nutritional content in raw milk of the Simmental breed cows fed with different forage combinations  
Farklı yem kombinasyonları ile beslenen Simmental ırkı ineklerin çiğ sütünde besin içeriğindeki değişiklikler  
Baki BEYAZ, Ersin DEMİR, Figen ERDEM ERİŞİR, İbrahim Akın TEMİZER, Ökkeş YILMAZ  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.09068 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 53 - 66
7. Tarçın ekstraktlarının bazı patojenler üzerine antibakteriyel etkilerinin *in vitro* incelenmesi  
Determination of *in vitro* antibacterial effects of cinnamon extracts on some pathogens  
Ayla ÜNVER ALÇAY, Aysun SAĞLAM, Nagihan ÇAĞLAR, Kamil BOSTAN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.69379 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 67 - 78
8. Solunum yolu enfeksiyonlarında kullanım önerisi ile satılan bitkisel çayların antimikrobiyal etkileri  
Antimicrobial effects of herbal teas sold with recommendation for use in respiratory tract infections  
Serdar DEMİR, Canan KARAALP, İsmail ÖZTÜRK  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.87522 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 79 - 90
9. A systematic review and meta-analysis of the prevalence, risk factors, agents and laboratory diagnosis of vulvovaginal candidiasis in Türkiye  
Türkiye'de vulvovajinal kandidiyaz prevalansı, risk faktörleri, etkenleri ve laboratuvar tanısına dair sistematik bir derleme ve meta-analiz  
İmdat KILBAŞ, Elmas Pınar KAHRAMAN KILBAŞ, İhsan Hakkı ÇİFTÇİ  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.22308 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 91 - 102

## ■ Derleme / Review

10. Tüberküloz dışı mikobakteriyel enfeksiyonlar: patogenez ve risk faktörleri, tanı, tedavi, immün yanıt  
Nontuberculous mycobacterial infections: pathogenesis and risk factors, diagnosis, treatment, immune response  
Gönül ASLAN, Leyla ERSOY  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.40336 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 103 - 118



# Tramadol hidroklorürün anjiyogenez üzerindeki etkisi: *ex-ovo* koryoallantoik membran modeli üzerinde *in-vivo* değerlendirme

## Effect of tramadol hydrochloride on angiogenesis: *in-vivo* evaluation on *ex-ovo* chorioallantoic membrane model

Nadide ÖRS YILDIRIM<sup>1</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, tramadol hidroklorürün anjiyogenez üzerindeki etkilerini *ex-ovo* civciv koryoallantoik membran (CAM) modeli kullanarak incelemek ve anjiyogenez sürecindeki etkilerinin kanser tedavisi ve metastazın önlenmesi üzerindeki potansiyel etkisini değerlendirmektir.

**Yöntem:** Anjiyogenezi değerlendirmek için "ATAK-S" soyundan fertilize tavuk yumurtaları kullanılmıştır. Yumurtalar, 37,5°C'de ve nemli ortamını koruyan yumurta inkübatöründe inkübe edilmiştir. İnkübasyondan üç gün sonra yumurtalar hassas bir şekilde steril tartım kapları içerisine kırılarak *ex-ovo* koryoallantoik membran modeli uygunlanmıştır. Çalışmada kontrol grup (n:18), düşük doz (n:18) ve yüksek doz (n:18) olmak üzere gruplandırılmıştır. *Ex-ovo* koryoallantoik membran üzerine farklı dozlarda düşük (1 µM/50 µL) ve yüksek (10 µM/50 µL) tramadol hidroklorür uygulanmış ve uygulama sonrası gruplar 0., 24. ve 48. saatte görüntülenmiştir. Elde edilen görüntülerin kantitatif analizi Image J programı (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm gruplarda 0. saatte elde edilen

### ABSTRACT

**Objective:** The goal of this study is to find out how tramadol hydrochloride affects angiogenesis using the *ex-ovo* chick chorioallantoic membrane (CCM) model and what that might mean for treating cancer and stopping metastasis while angiogenesis is happening.

**Methods:** Fertilized chicken eggs from the "ATAK-S" strain were used to evaluate angiogenesis. Eggs were incubated at 37.5 °C in an egg incubator that maintained a humid environment. After three days of incubation, the eggs were gently broken into sterile weighing containers, and the *ex-ovo* chorioallantoic membrane model was fitted. There are three different groups in the study: the control group (n=18), the low dose (n=18), and the high dose (n=18). Different doses of low (1 µM/50 µL) and high (10 µM/50 µL) tramadol hydrochloride were applied to the *ex-ovo* chorioallantoic membrane. After the application, the groups were monitored for 0, 24, and 48 hours. Quantitative analysis of the obtained images was performed using the Image J program (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The average of the images obtained at hour 0 in all groups

<sup>1</sup>Sincan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Nadide ÖRS YILDIRIM

Sincan EAH. Anest. ve Reanimasyon Klin., Gökçek Mah. 250. Cd. 2/A Sincan - Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 04.10.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 27.12.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.85226

Örs Yıldırım N. Tramadol hidroklorürün anjiyogenez üzerindeki etkisi: *ex-ovo* koryoallantoik membran modeli üzerinde *in-vivo* değerlendirme  
Türk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(1): 3 - 10

görüntülerin ortalaması % olarak hesaplanmış ve diğer 24 ve 48 saat görüntüleri ile standardize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Çalışmanın sonucunda düşük ( $p<0,05$ ) ve yüksek doz ( $p<0,01$ ) uygulanan gruplarda ilk 24. saat sonunda vasküler proliferasyonda istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Ancak embriyonun periferel bölgelerinde yerleşmiş ince vasküler yapılarda bozulmalar gözlenmiştir. 48. saat sonunda ise düşük ve yüksek doz uygulanan gruplarda vasküler proliferasyonun azaldığı, yüksek doz ( $p<0.001$ ) uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Düşük ve yüksek dozda uygulanan tramadol hidroklorür ilk 24 saatte vasküler proliferasyonu arttırmasına rağmen vasküler yapılarda bozulmalara neden olmaktadır. 48. saatte ise tamamen vasküler yapıyı bozduğu ve anti-anjiyogenik etki göstermiştir. Bu sonuçlar, tramadolün kanser tedavisinde ve metastazın önlenmesinde potansiyel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ancak anjiyogenezin büyük rol oynadığı organogenez dönemi göz önünde bulundurulduğunda tramadolün fetus üzerinde ve laktasyon sırasında potansiyel zararları hala belirsizdir. Yapılan bu çalışma, tramadol hidroklorürün kanser tedavisi alanındaki potansiyelini anlamak için bir adım olabilir. Ancak, etkin dozları, pozolojiyi ve potansiyel zararlarını tespit etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Anjiyogenez, tramadol hidroklorür, *ex-ovo* CAM modeli, metastaz

was calculated as a percentage and standardized with the other 24 and 48-hour images. The results obtained were evaluated statistically.

**Results:** As a result of our study, a statistically significant increase in vascular proliferation was detected at the end of the first 24 hours in the low ( $p < 0.05$ ) and high dose ( $p < 0.01$ ) groups. However, deterioration was observed in the thin vascular structures located in the peripheral regions of the embryo. At the end of the 48th hour, vascular proliferation decreased in the low and high dose groups, and a statistically significant decrease was detected in the high dose group ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** Although tramadol hydrochloride applied in low and high doses increases vascular proliferation in the first 24 hours, it causes deterioration in vascular structures. In the 48th hour, it completely disrupts the vascular structure and has an anti-angiogenic effect. These findings suggest that tramadol may play a potential role in cancer treatment and the prevention of metastasis. However, considering the organogenesis period in which angiogenesis plays a major role, the potential harms of tramadol to the fetus and during lactation are still unclear. This study we conducted may be a step towards understanding the potential of tramadol hydrochloride in the field of cancer treatment, but more research is needed to determine effective doses, posologies, and potential harms.

**Key Words:** Angiogenesis, tramadol hydrochloride, *ex-ovo* CCM model, metastasis

## GİRİŞ

Kanser, günümüzde dünya çapında ölümlerin en önde gelen nedenlerinden biridir. Ağrı ise bir hastanın kanser tanısı alması için ilk semptom olabilir ve prognoz kötüleştiğinde ağrının şiddeti artma eğilimindedir. Kanser ağrısının yönetiminde opioid ve

non-opioid analjezikler önemli bir rol oynamaktadır. Tramadol temel etkisini selektif  $\mu$  opioid reseptörleri üzerinden gösteren zayıf bir opioid analjeziktir. Aynı zamanda noradrenalin (NA) ve serotoninin (5-HT7) presinaptik re-uptake inhibitörü etkisi ile serotonerjik bir etki sağlamaktadır (1). Bu dual etkisi sayesinde başta morfin olmak üzere diğer opioid analjeziklere



oranla daha az yan etki potansiyeli olduğu için orta ve şiddetli kanser ağrısının tedavisinde güvenle tercih edilmektedir.

Anjiyogenez olarak adlandırılan süreç, daha önceden mevcut olan damarlardan yeni damarlarının oluştuğu dönem olarak tanımlanmaktadır ve başta embriyonik gelişim, organogenez olmak üzere yara iyileşmesi, inflamasyon gibi birçok fizyolojik aşamada rol oynamaktadır (2). Tümöral dokuların büyümesi ve metastazın da anjiyogenez ile ilişkili olduğu bilinmektedir; bu nedenle anjiyogenezi baskılamayı hedefleyen ajanlar ile tümör büyümesini ve metastaz potansiyelini baskılamak güncel literatürde tartışılmaktadır (3).

Anjiyogenez sürecini, pro-anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörlerin etkilerini gözlemek için literatürde pek çok deneysel model tanımlanmaktadır (4-8). Tanımlanan bu deneysel modeller arasında uygulama kolaylığı, tekrarlanabilir olması ve kantitatif ölçüme imkan vermesi gibi avantajları nedeni ile CAM modeli en sık tercih edilen yöntemlerden biri haline gelmiştir (6). CAM, yoğun bir kılcal ağa sahip olan ekstra-embriyonik bir membrandır. CAM incelemesini hedefleyen deneysel modeller *in-ovo* ve *ex-ovo* modeller olarak iki grupta incelenebilmektedir. *In-ovo* modellerde döllenmiş yumurta kabuğuna bir pencere açılır ve deneyler yumurta kabuğu içerisinde gerçekleştirilir. Literatürdeki mevcut CAM analizlerinin çoğunda *in-ovo* modeller tercih edilmiştir ancak bu metotta embriyonun sağ kalım ihtimali daha yüksek olmakla birlikte CAM'a erişim ve görüntüleme oldukça sınırlıdır (9). *Ex-ovo* metotta ise embriyo tamamen kabuğundan çıkarılıp bir petri kabı veya uygun bir kap içerisinde gelişim sürecinin devamı sağlanmaktadır. *Ex-ovo* yöntemde CAM'a ve embriyoya erişim, görüntüleme ve deneysel uygulamalar daha kolay olmakla birlikte embriyonun sağ kalım oranları *in-ovo* yöntemle oranla daha düşüktür. Çalışmamızın amacı, yaygın kullanılan bir opioid analjezik olan tramadol hidroklorürün anjiyogenez üzerindeki etkilerini *ex-ovo* CAM modeli kullanarak incelemektir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Vasküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Anjiyogenezi araştırmak için *ex-ovo* CAM protokolü kullanılmıştır. Bu çalışma, kanatlı hayvan embriyoları üzerinde gerçekleştirilmiş olup kanatlı hayvan çalışmaları için etik kurul kararı gerekli değildir. Çalışma Helsinki bildirgesi prensiplerine uygun olarak yapılmıştır.

### Ex-Ovo CAM Yöntemi

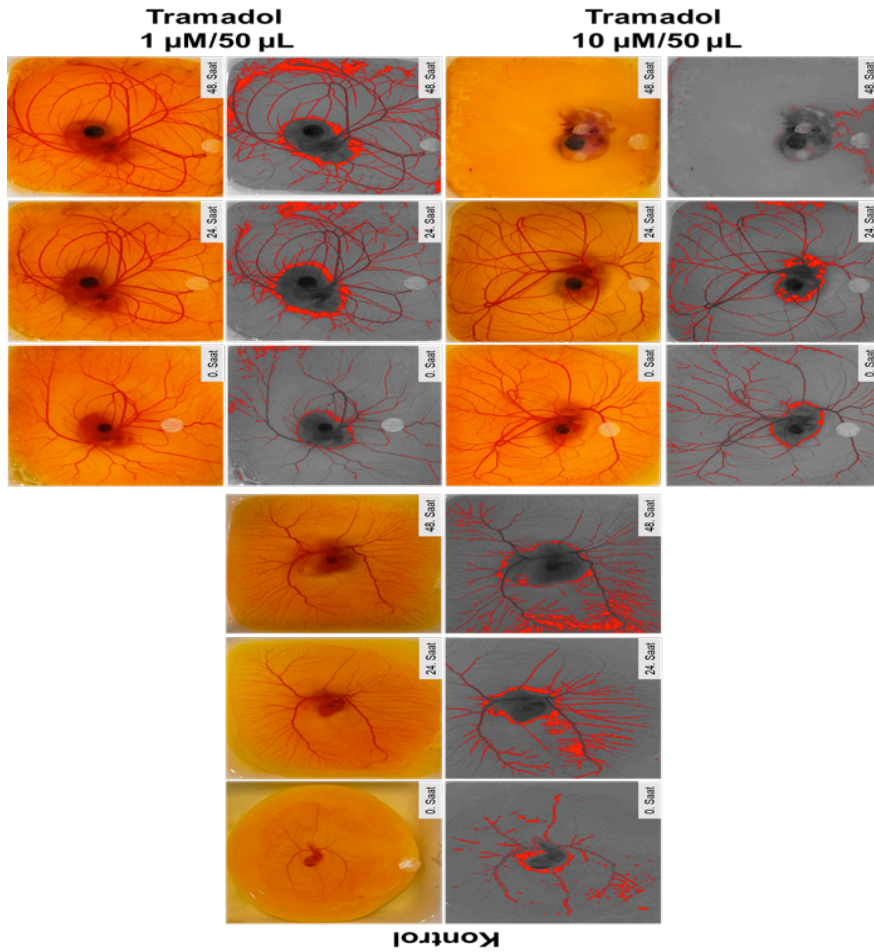
Anjiyogenezi değerlendirmek için *ex-ovo* CAM prosedüründe kullanılması için döllenmiş tavuk yumurtaları Ulusal Tavukçuluk Kurumu'nda (Ankara, Türkiye) üretilen Atak-S tavuklarından elde edilmiştir. Tüm preparatlar deney boyunca sabit sıcaklık (37°C) ve nemde (%85 ila %90 bağıl nem) takip edilmiştir.

Literatürde *ex-ovo* CAM tahlili prosedürlerine uyularak, yumurtalar ilk önce kuru yumuşak bir mendil ile kabuğuna zarar vermeden hassasiyetle dış yüzeyindeki dışkı, çamur ve tüy gibi materyallerden temizlenmiştir. Temizlenen yumurtalar, hareketli bir tepsisi olan kuluçka makinesinde (CİMUKA 40080 seri no.lu kuluçka cihazı) yatay yatırılıp iki saat ara ile döndürülerek 72 saat inkübe edilmiştir (9). Kuluçka makinesinin inkübasyon sıcaklığı ve nem oranı çalışma süresince sabit tutulmuştur.

Inkübasyon süreci tamamlanan yumurtalar kuluçka makinesinden çıkartıldı ve bir ışık kaynağı ile bakılarak embriyonun bulunduğu taraf işaretlenmiştir (9). Yumurtalar işaretlenen nokta üstte kalacak şekilde tutularak tam zıt tarafından kırıldı. Bu esnada yumurtaların aktarılacağı tek kullanımlık, steril tartım kaplarına yumurta oldukça yakın tutularak embriyonun ve yumurta sarısının zedelenmemesine özen gösterildi. Tartım kabına alınan yumurtalar etilen oksit ile sterilize edilmiş cam kapaklar ile kapatılarak hareketli tepsinin kaldırıldığı inkübatör içerisine tekrar yerleştirildi. CAM'ın daha gözle görülebilir hale gelmesi için yumurtalar üç gün süre ile tekrar inkübe edilmiştir.

Çalışmada; toplam 54 adet döllenmiş tavuk yumurtası, kontrol grubu (n:18), düşük doz (n:18) ve yüksek doz (n:18) olmak üzere randomize gruplandırılmıştır. *Ex-ovo* koryoallantoik membran üzerine farklı dozlar da düşük ( $1 \mu\text{M}/50 \mu\text{L}$ ) ve yüksek ( $10 \mu\text{M}/50 \mu\text{L}$ ) tramadol hidroklorür uygulanmıştır. Uygulamanın belirli bir bölgede sınırlı kalması için taşıyıcı destek malzemesi olarak 6 mm çaplı steril edilen filtre kağıtları kullanılmıştır. Uygulama sonrası gruplar 0. 24. ve 48. saatte stereomikroskop (S6D; Leica Microsystems, Heerbrugg, İsviçre) ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntülerin kantitatif

analizi için Image J programı (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) kullanılmıştır. Tüm gruplarda 0. saatte elde edilen görüntülerin ortalaması % olarak hesaplandı ve diğer 24 ve 48 saat görüntüleri ile standardize edildi. İstatistiksel değerlendirme, Prism GraphPad 10 software (San Diego, CA, USA) ile verilerin normal dağılıma uygunluğu test edilerek, normal dağılan özelliklerin iki bağımsız grupların karşılaştırılmasında Student t-testi ile analiz edilmiştir.  $p \leq 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



**Şekil 1.** *Ex-Ovo* CAM Modeli Örnek Görüntüleri

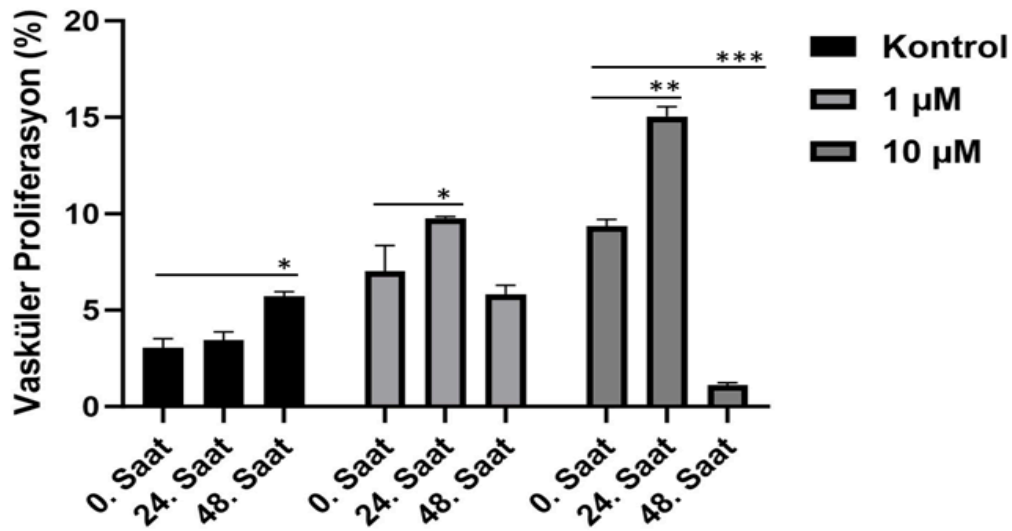
Kontrol grubunda normal anjiyogenez izlenirken, düşük doz tramadol uygulaması yapılan grupta 48. saatte daha belirgin olmak üzere embriyonun periferel bölgelerinde yerleşmiş, ince vasküler yapılarda bozulmalar gözlenmektedir. Yüksek doz tramadol uygulaması yapılan embriyolarda ise 48. saatte embriyonun ölümü ile sonuçlanmıştır.

## BULGULAR

Çalışmamızın sonucunda düşük ( $p < 0,05$ ) ve yüksek doz ( $p < 0,01$ ) tramadol hidroklorür uygulanan gruplarda 24. saat sonunda kontrol grubuna oranla, vasküler proliferasyonda istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmış ancak embriyonun periferel bölgelerinde yerleşmiş ince vasküler yapılarda bozulmalar gözlenmiştir. 48. saatin sonunda ise düşük ve yüksek doz uygulanan gruplarda vasküler proliferasyonun azaldığı, yüksek doz ( $p < 0,001$ ) tramadol hidroklorür uygulanan grupta ise vasküler yapılarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

Tramadolün anjiyogenez üzerindeki etkisini göstermek amacı ile tasarladığımız bu deney protokolü sonucunda yüksek dozda uygulanan tramadolün *ex-ovo* CAM modeli üzerinde anjiyogenez baskılandığını tespit ettik.

Kontrol grubunda inkübasyonun yedinci gününde bir adet ve çalışma süresi boyunca toplam üç (%16,7) adet yumurta kaybedilirken; düşük doz grubunda inkübasyonun yedinci gününde bir adet olmak üzere toplam beş (%27,8) ve yüksek doz grubunda inkübasyonun yedinci gününde beş adet olmak üzere toplam 11 adet (%61,1) yumurta kaybedilmiştir. Artmış bu embriyo ölüm oranının anti-anjiyogenik etki sonucunda bozulan organogenez ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.



Şekil 2. Grupların vasküler proliferasyon yüzdeleri

Gruplar arası istatistiksel olarak \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ve \*\*\* $p < 0.001$  anlamlı bulunmuştur.

## TARTIŞMA

Anjiyogenez mevcut damar yapılarından oluşan yeni damarlar olarak tanımlanmaktadır ve başta tümör büyümesi, metastaz olmak üzere yara iyileşmesi, fetal dönemde organogenez gibi pek

çok hayati fizyolojik olayda rol oynamaktadır (3, 10). Anti-anjiyogenik etki gösteren medikasyonların kanser ilerlemesini ve metastazı durdurarak kanser hastalarında olumlu gelişmelere yol açacağı hipotezinden yola çıkarak umut vadeden ajanlar günümüz literatüründe araştırılmaktadır.

Tramadol günümüzde kanser hastalarında ağrıyı kontrol altına almak için oldukça yaygın kullanılmakta olan bir opioid analjezik olsa da tramadolün anjiyogenik etkileri üzerinde yapılmış sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (11, 12). Bu çalışmalar ile bulunan sonuçlar birbirleri ile çelişmektedir. Karaman ve ark. yaptıkları çalışmada *in-ovo* CAM modelinde opioidlerin etkilerini araştırmışlar ve tramadolün 10 µM dozda anti-anjiyogenik etkileri olduğunu gözlemlemişlerdir (11). Özgürbüz ve ark. ise kolon kanseri hücreleri ile yaptıkları çalışma sonucunda; tramadolün VEGF ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırdığını ve anjiyogenik potansiyelde etkisi olabileceğini belirtmişlerdir (12). Bu *ex-ovo* CAM modeli çalışma sonucu ile Karaman ve ark. çalışmasını destekler şekilde 10µM/50 µL dozda tramadolün anti-anjiyogenik potansiyelde etki gösterdiği belirlenmiştir. Anti anjiyogenik etkinin metastaz potansiyelini azaltacağı yönündeki hipotezimizi destekler şekilde tramadolün tümör metastazı ile ilgisini araştıran çalışmalar incelendiğinde Gaspani ve ark. yaptıkları hayvan çalışmasında; tramadolün sıçanlarda akciğer metastazı riskini azalttığını kanıtlamışlardır (13).

Anjiyogenez kanser ve metastaz sürecinde olduğu gibi yara iyileşmesi sürecinde de büyük bir rol oynamaktadır. Bu aşamada vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) başta olmak üzere endotelial ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (eNOS ve iNOS) aracılığı ile üretilen nitrik oksit (NO) görev almaktadır. Opioid analjeziklerin dokulara NO üretimini artırarak anjiyogenez stimüle ettiği bilinmektedir (14). Bu nedenle tramadol dahil olmak üzere çeşitli opioidlerin akut ve kronik yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Özkan ve ark. yaptıkları bir hayvan çalışmasında, ratlara cerrahi bir kesi oluşturarak bu insizyon hattına tramadol infiltrasyonu uygulamışlar ve tramadolün yara iyileşmesi üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını kanıtlamışlardır (15). Benzer şekilde Hancı ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada; cerrahi insizyon hattına uygulanan tramadolün iyileşme sürecinde olumsuz bir etkiye neden

olmadığını göstermişlerdir (16). Çuvaş-Apan ve ark. ise korneal yaralanmalarda topikal kullanımının doku iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada da aynı sonuçlar elde edilmiş, hasarlanmış doku üzerinde olumsuz etkisinin olmadığını belirtmişlerdir (17). Bakr ve ark. ise farklı tasarlanmış bir çalışma sonucunda; tramadol uygulanan farelerden alınan miyokard dokusu ve aorta kesitlerinde kontrol grubuna oranla eNOS immünoreaktivitesinde, eNOS pozitif hücrelerin sayısında ve VEGF pozitif hücrelerin sayısında belirgin bir azalma gözlemlenmiştir (18). Bakr ve ark.'nın çalışmasında olduğu gibi tramadolün anti-anjiyogenik potansiyelde etkilerinin olabileceği sonucuna ulaşmaktayız (18). Ancak anti-anjiyogenik potansiyelde etki gösteren tramadolün yara iyileşmesini sekteye uğratacağı hipotezi göz önünde bulundurulduğu takdirde, bu çelişkili sonuçlara tramadolün serotonerjik etkisi ile yara iyileşmesi üzerinde multifaktöriyel bir etki gösterebileceğini düşündürmüştür.

Anjiyogenezin rol oynadığı en kritik fizyolojik süreçlerden biri ise tartışmasız organogenez sürecidir. Literatürde gebelik sürecinde tramadol maruziyetinin fetüs üzerinde yapacağı etkiler üzerine çeşitli çalışmalar olmakla birlikte gebeliğin dönemleri ve maruz kalınan dozların doğuracağı sonuçlar arasında halen net bir ortak sonuca varılamamıştır. Kallen ve ark. 1997-2003 yılları arasında gebelik sürecinde tramadol kullandığı bilinen kadınların doğum kayıtları üzerinden yaptıkları büyük çaplı kohort çalışmasında tramadolün fetüste kardiyovasküler bozukluklar özellikle atriyal ve ventiküler septal defektler ve pes ekinovarus açısından zayıf bir teratojenik etkisi olduğunu belirtmişlerdir (19). Sorensen ve ark. yayınladıkları yakın tarihli bir kohort çalışmasında 1997-2016 yılları arasında Danimarka'da gebelik sürecinde tramadol kullanımı olan kadınların kayıtları incelenmiş ve erken gebelik döneminde tramadol maruziyetinin spontan düşük veya majör konjenital malformasyon riskinde artış ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (20). Chomchai ve ark. tasarladıkları hayvan çalışmasında ise gebeliğin 10-21. günlerinde

50 mg/kg/gün dozunda sistemik tramadole maruz kalan hamile ratlarda kontrol grubuna oranla postnatal 7, 14 ve 21. günlerde daha fazla dejenere purkinje hücresi ve beyincikte daha fazla oksidatif hasar olduğunu gözlemişlerdir (21). Ezi ve ark. tarafından yapılan bir diğer hayvan çalışmasında ise tramadol maruziyetinin nörodejeneratif hastalıklarda rol oynayan sinyal basamaklarının düzensizliğine yol açtığını belirtmişlerdir (22). Elghait ve ark. tarafından tasarlanan farklı bir çalışmada ise tramadol maruziyetinin juvenil ve erişkin farelerde testis dokuları üzerindeki etkisi araştırılmış ve juvenil farelerde daha belirgin olmak üzere testis dokularında hasar, apoptoz, sperm üretiminin azalmasına sebep olan oksidatif stres gibi olumsuz etkiler doğurduğunu göstermişlerdir (23). Bu çalışmada; anjiyogenez üzerinde olumsuz etkilerini ve 10 µM/50 µL dozunda uygulama yapılan civciv embriyolarının %61,1 oranında ölümüyle sonuçlanmıştır. Tramadolün, organogenez sürecini bozarak fetüs üzerinde ve laktasyonda kullanımının özellikle preterm infantlar üzerinde olumsuz etkileri olacağını düşündürmüş bu nedenle laktasyon kullanımı gerekliliği görülmüştür. Gebelik, laktasyon ve erken çocukluk çağında tramadol maruziyetinin doğurabileceği sonuçlar halen tartışmalıdır. Bu süreçlerde kullanımıyla ilişkili tramadolün zararlı olup olmadığının belirlenmesinde

geniş gözlemsel, epidemiyolojik veya laboratuvar çalışmaları yararlı olacaktır.

Tramadol karaciğerde hepatik CYP2D6 izoenzimi tarafından aktif metaboliti olan O-Desmetiltramadol'e (M1) metabolize edilmekte ve opioid analjezik etkiden sorumlu metabolitin M1 olduğu kabul edilmektedir (24). Anjiyogenik etkinin daha ayrıntılı incelenbilmesi ve daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için O-Desmetiltramadol ile yapılan ileri *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak; farklı dozlarda uygulanan tramadolün anjiyogenez üzerindeki etkilerin araştırılan bu çalışmada yüksek dozda kullanılan tramadolün düşük dozda oranla daha etkili bir anti-anjiyogenik ajan olduğu gözlemlenmiştir. Anti-anjiyogenez neoplastik hastalıkların tedavisinde ve metastazın önlenmesinde etkili olabilecek bir hedefdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile günümüzde başta kanser hastalarında olmak üzere yaygın olarak kullanılan bir opioid analjezik olan tramadolün yüksek dozlarda anti-anjiyogenik etkisinden kanser tedavisinde ve metastatik sürecin önlenmesinde faydalanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak tramadolün yeni bir anti-anjiyogenik tedavi protokolü olarak kullanılması ve etkin dozun tespit edilebilmesi için daha fazla *in vivo* ve *in vitro* çalışmaya ihtiyaç vardır.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

## KAYNAKLAR

1. Smyj R, Wang XP, Han F. Tramadol hydrochloride. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol, 2013;38:463-94.
2. Naik M, Brahma P, Dixit M. A Cost-Effective and Efficient Chick Ex-Ovo CAM Assay Protocol to Assess Angiogenesis. Methods Protoc, 2018;1(2):19.
3. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. Cancer Res, 1990;50(19):6130-8.
4. Hasan J, Shnyder SD, Bibby M, Double JA, Bicknel R, Jayson GC. Quantitative angiogenesis assays in vivo--a review. Angiogenesis, 2004;7(1):1-16.
5. Norrby K. In vivo models of angiogenesis. J Cell Mol Med, 2006;10(3):588-612.
6. Richardson M, Singh G. Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2003;3(2):155-85.
7. Doganci S, Yildirim V, Erol G, Yesildal F, Karabacak K, Kadan M, et al. Polidocanol (Lauromacrogol 400) has anti-angiogenic effects in vitro and in vivo. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016;20(7):1384-9.
8. Yildirim V, Doganci S, Yesildal F, Kaya E, Ince ME, Ozkan G, et al. Sodium nitrite provides angiogenic and proliferative effects in vivo and in vitro. Med Sci Monit Basic Res, 2015;21:41-6.
9. Dohle DS, Pasa SD, Gustmann S, Laub M, Wissler JH, Jennissen HP, et al. Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: how it really works. J Vis Exp, 2009(33):1620.
10. Karaman H, Tufek A, Karaman E, Tokgoz O. Opioids inhibit angiogenesis in a chorioallantoic membrane model. Pain Physician, 2017;20(2s):Se11-se21.
11. Bürgermeister J, Paper DH, Vogl H, Linhardt RJ, Franz G. LaPSvS1, a (1-->3)-beta-galactan sulfate and its effect on angiogenesis in vivo and in vitro. Carbohydr Res, 2002;337(16):1459-66.
12. Kontos CD, Annex BH. Angiogenesis. Curr Atheroscler Rep, 1999;1(2):165-71.
13. Özgürbüz U, Gencür S, Kurt F, Özkalkanlı M, Vatansver HS. The effects of tramadol on cancer stem cells and metabolic changes in colon carcinoma cells lines. Gene, 2019;718:144030.
14. Gaspani L, Bianchi M, Limiroli E, Panerai AE, Sacerdote P. The analgesic drug tramadol prevents the effect of surgery on natural killer cell activity and metastatic colonization in rats. J Neuroimmunol, 2002;129(1-2):18-24.
15. Cuéllar B, Fernández AP, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Bentura ML, et al. Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal. Psychopharmacology (Berl), 2000;148(1):66-73.
16. Ozkan D, Seker D, Ergil J, Yalcindag A, Han U, Ginis Z, et al. The effects of tramadol infiltration on wound healing in rats. Acta Chir Belg, 2013;113(6):434-8.
17. Hancı V, Hakimoğlu S, Özaçmak H, Bektaş S, Özaçmak HS, Özdamar SO, et al. Comparison of the effects of bupivacaine, lidocaine, and tramadol infiltration on wound healing in rats. Rev Bras Anesthesiol, 2012;62(6):799-810.
18. Cuvaz Apan O, Ozer MA, Takir S, Apan A, Sengul D. Effect of topical administration of tramadol on corneal wound healing in rats. Int Ophthalmol, 2016;36(5):675-80.
19. Bakr MH, Radwan E, Shaltout AS, Farrag AA, Mahmoud AR, Abd-Elhamid TH, et al. Chronic exposure to tramadol induces cardiac inflammation and endothelial dysfunction in mice. Sci Rep, 2021;11(1):18772.
20. Källén B, Reis M. Use of tramadol in early pregnancy and congenital malformation risk. Reprod Toxicol, 2015;58:246-51.
21. Sørensen AMS, Noergaard MM, Gotfredsen DR, Kjærbye-Thygesen A, Jimenez-Solem E, Askaa B, et al. Exposure to tramadol during early pregnancy and risk of spontaneous abortion or major congenital malformations. Obstet Gynecol, 2022;139(4):545-53.
22. Chomchai S, Phuditshinnapatra J, Mekavuthikul P, Chomchai C. Effects of unconventional recreational drug use in pregnancy. Semin Fetal Neonatal Med, 2019;24(2):142-8.
23. Ezi S, Boroujeni ME, Khatmi A, Vakili K, Fathi M, Abdollahifar MA, et al. Chronic exposure to tramadol induces neurodegeneration in the cerebellum of adult male rats. Neurotox Res, 2021;39(4):1134-47.
24. Elghait ATA, Mostafa TM, Gameaa FK, Mohammed GK, Meligy FY, Sayed MM. Comparative histological study on the effect of tramadol abuse on the testis of juvenile and adult male albino mice. Anat Cell Biol, 2022;55(3):341-55.
25. Lai J, Ma SW, Porreca F, Raffa RB. Tramadol, M1 metabolite and enantiomer affinities for cloned human opioid receptors expressed in transfected HN9.10 neuroblastoma cells. Eur J Pharmacol, 1996;316(2-3):369-72.

# Evaluation of frequency, antimicrobial resistance and multidrug resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a university hospital in Northern Cyprus, 2016 to 2020

Kuzey Kıbrıs'ta bir üniversite hastanesinde metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının görülme sıklığı, antimikrobiyal direnç ve çoklu ilaç direnci paternlerinin değerlendirilmesi, 2016-2020

Buket BADDAL<sup>1</sup> (ID), Tchamou Malraux Fleury POTINDJI<sup>2</sup> (ID), Emrah GÜLER<sup>3</sup> (ID)

## ABSTRACT

**Objective:** *Staphylococcus aureus* is a major human pathogen which is responsible for a wide variety of clinical manifestations both in nosocomial and community settings. The presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) limits treatment options. There are major gaps in literature regarding the epidemiological and antimicrobial resistance characteristics of *S. aureus* in Northern Cyprus. This study aims to define the frequency of MRSA in a major hospital in Northern Cyprus and determine MRSA susceptibility to currently available antimicrobials in order to define the most effective regimen for the treatment of *S. aureus* infections.

**Methods:** Four hundred and forty-nine clinical samples collected between January 2016 to December 2020 were retrospectively included in the study. Samples were cultured on Eosin-Methylene Blue (EMB) and 5% sheep blood agar and were incubated at 35°C for 24-48 h. Laboratory identification of isolates and antimicrobial

## ÖZET

**Amaç:** *Staphylococcus aureus*, hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir patojendir. Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarının varlığı tedavi seçeneklerini sınırlamaktadır. Kuzey Kıbrıs'ta *S. aureus*'un epidemiyolojik ve antimikrobiyal direnç özelliklerine ilişkin literatürde kısıtlı veri bulunmaktadır. Bu çalışmada, hastanemizde MRSA görülme sıklığının belirlenmesi ve hastalardan izole edilen MRSA izolatlarında antibiyotik direnç oranlarının tespit edilerek en etkili tedavi seçeneklerinin tanımlanması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Ocak 2016-Aralık 2020 tarihleri arasında izole edilen 449 izolat retrospektif olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerin Eozin Metilen Mavis (EMB) ve %5 koyun kanlı agarlara ekimleri yapılmış ve 24-48 saat süresince 35°C'de inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri için Vitek-2 (bioMérieux, Fransa) otomatize sistem kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılığı,

<sup>1</sup>Near East University, DESAM Institute, Microbial Pathogenesis Research Group, Nicosia, Cyprus

<sup>2</sup>Near East University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology and Clinical Microbiology, Nicosia, Cyprus

<sup>3</sup>European University of Lefke, Faculty of Arts and Sciences, Department of Molecular Biology and Genetics, Lefke, Cyprus



İletişim / Corresponding Author : Buket BADDAL

Near East Boulevard, Nicosia 99138 Nicosia - Cyprus

E-posta / E-mail : buket.baddal@neu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 24.05.2022

Kabul Tarihi / Accepted : 03.01.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.24892

Baddal B, Potindji TMF, Güler E. Evaluation of frequency, antimicrobial resistance and multidrug resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a university hospital in Northern Cyprus, 2016 to 2020. Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(1): 11 - 22

susceptibility testing have been performed by Vitek-2 (bioMérieux, France) automated identification and susceptibility testing system. Antibiotic susceptibility was assessed according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria. Multi-drug resistance (MDR4) was determined by analyses of beta-lactam resistance plus nonsusceptibility to three additional classes of antimicrobial drugs. Data analysis was performed using SPSS Statistics Software version 23. A p value <0.05 was considered as statistically significant.

**Results:** Of the 449 *S. aureus* isolates, 40.5% (n=182) were MRSA. In the inpatients group, MRSA infection rate was statistically higher (p=0.001) compared to outpatients. A significant correlation was observed between older age and MRSA infection. MRSA isolates exhibited higher resistance to erythromycin (85.4%), clindamycin (52.9%), ciprofloxacin (23.8%), levofloxacin (19.8%), tetracycline (68.0%), fosfomycin (13.0%), rifampicin (12.0%) and tobramycin (11.1%) compared to MSSA isolates (p<0.05). MDR was detected in 30.8% of the isolates. All isolates, MRSA and MSSA, showed high susceptibility to daptomycin, linezolid, vancomycin, fusidic acid, teicoplanin and gentamicin. The rate of MDR MRSA was observed to decrease statistically in the post-pandemic period compared to pre-pandemic period (p=0.0001).

**Conclusion:** Over the five-year period, of the study, MRSA isolates have shown an increased resistance to several antibiotics. Therefore, the Infection Control Committee should work actively and inappropriate antibiotic use should be limited in order to prevent the spread of MDR pathogens.

**Key Words:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, infection, hospital, frequency, resistance patterns, Northern Cyprus

Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standartlarına göre değerlendirilmiştir. Çoklu ilaç direnci (ÇİD4), beta-laktam direnci artı üç antimikrobiyal ilaç sınıfına karşı duyarlılık analizleriyle belirlenmiştir.

**Bulgular:** 449 *S. aureus* izolatının %40,5'i (n=182) MRSA olarak tespit edilmiştir. İzole edilen MRSA sayısı yatan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p=0,001). İleri yaş ile MRSA enfeksiyonu görülme sıklığı arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişki gözlenmiştir (p<0,001). MRSA izolatları, MSSA izolatlarına kıyasla, eritromisin (%85,4), klindamisin (%52,9), siprofloksasin (%23,8), levofloksasin (%19,8), tetrasiklin (%68,0), fosfomisin (%13,0), rifampisin (%12,0) ve tobramisin (%11,1) antibiyotiklerine daha yüksek direnç göstermiştir (p<0,05). İzolatların %30,8'inde ÇİD tespit edilmiştir. Tüm MRSA ve MSSA izolatları, daptomisin, linezolid, vankomisin, fusidik asit, teikoplanin ve gentamisine karşı yüksek duyarlılık göstermiştir. Pandemi öncesi döneme göre (2016-2019), pandemi sonrası (2020) ÇİD MRSA suşlarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş belirlenmiştir (p=0,0001).

**Sonuç:** Çalışmanın beş yıllık süresi boyunca, MRSA izolatları çeşitli antibiyotiğe karşı artan bir direnç göstermiştir. Bu sebeple, ÇİD patojenlerin yayılımının önlenmesi adına, Enfeksiyon Kontrol Komitesi'nin aktif olarak çalışması ve uygunsuz antibiyotik kullanımının kısıtlanması gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus*, enfeksiyon, hastane, görülme sıklığı, direnç paternleri, Kuzey Kıbrıs



## INTRODUCTION

The steady rise of antibiotic resistance (AR) is one of the major challenges of healthcare systems worldwide (1) and is currently considered as a global pandemic (2-4). World Health Organization (WHO) reports indicate that the current research and development (R&D) pipeline does not provide the necessary interventions and initiatives for adequate antimicrobial discovery (5). According to the 2017 WHO priority pathogens list, categorized according to the urgency of need for new antibiotics as critical, high and medium priority, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) remains a high priority pathogen (6). MRSA has been reported to become increasingly drug-resistant in both hospital and community settings, and continues to be a major cause of morbidity and mortality worldwide (7). As a versatile bacterium, MRSA causes skin and soft-tissue infections (SSTIs), endocarditis, respiratory, nosocomial and serious bloodstream infections often complicated by metastatic infections (8-10).

Dramatic changes in the antimicrobial susceptibility profiles of *S. aureus* have been globally reported rendering treatment of *S. aureus* infections challenging for clinicians, and limiting options (11,12). However, several current alternatives are actively being introduced, hence expanding the range of drug choices against MRSA (13-15). MRSA expresses resistance to methicillin and most of the currently available  $\beta$ -lactams via carriage of either *mecA*, or one of the several allotypes *mecB*, *mecC* or *mecD* (16,17). These genes may be located on *SCCmec* as well as plasmids, and encode the production of a low affinity penicillin binding protein (PBP): PBP2' (18,19). Apart from production of PBPs with modified affinities for  $\beta$ -lactam drugs, MRSA may exhibit other drug inactivation pathways such as production of penicillinases which hydrolyze the beta-lactam ring of penicillin (20).

The frequency of MRSA varies among different countries or in hospitals and healthcare facilities

within the same country. Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2018 report analysis of 30 European Union (EU) and European Economic Area (EEA) countries suggest that, despite previous diminished rates of MRSA, several EU/EEA countries are still reporting high level burden of MRSA infections (21). In Turkey, the proportion of MRSA were reported to be in 22.7% in 2016, 25.8% in 2017, 29.6% in 2018, 31.3% in 2019 and 33.4% in 2020 (22). Such increasing trends of antibiotic resistance signify an urgent necessity to address management and prevention strategies by implementing continuous surveillance, a key element to determine the burden of MRSA in healthcare facilities and high-risk settings, guide infection prevention and control strategies as well as to assess their efficacy.

In Northern Cyprus, data on the frequency and trends of antimicrobial susceptibility among MRSA isolates circulating in the hospital setting is very limited. This study aims to screen for the frequency and antibiotic resistance patterns of MRSA in a central hospital in Northern Cyprus, in order to provide susceptibility data to guide clinical practice along with decision making, and implementation of management and prevention policies.

## MATERIAL and METHOD

### Study area and study design

This study was performed at Near East University Hospital in Northern Cyprus. This hospital has 500 inpatient beds and serves about 146,000 outpatients and 6,500 inpatients; approximately 3,000 surgeries are performed annually. The hospital has 33-bed intensive care capacity with the distribution of 14 beds for general intensive care, 14 beds for coronary intensive care, three beds for cardiovascular surgery intensive care and two beds for pediatric intensive care.

A total of 449 *S. aureus* isolated from clinical samples of patients admitted to the Microbiology Laboratory at Near East University Hospital from

January 2016 to December 2020 were included in this study. Patient data such as age, gender, hospital department and admission type were electronically stored. The clinical samples included aspiration fluid, blood, abscess/wound, urine, sputum, nasal/throat swab, catheter tip, bronchoalveolar lavage and pleural fluid. The samples were cultured on blood agar and EMB agar, and were incubated aerobically at 35°C for 24-48 hours. Repeating isolates from the patients were omitted from the study.

### Identification and antibiotic susceptibility testing

Identification of isolates and antimicrobial susceptibility testing have been performed by Vitek-2 automated identification and susceptibility testing system (bioMérieux, France). Antibiotic susceptibility was assessed according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) clinical breakpoints (23). Bacterial cultures grown on agar media were suspended in sterile saline at McFarland 0.45-0.55 and were consequently inoculated into Vitek-2 panels as per manufacturer's recommendations. Antimicrobial susceptibility of each isolate to ciprofloxacin, ceftioxin, clindamycin, daptomycin, erythromycin, gentamicin, levofloxacin, linezolid, nitrofurantoin, penicillin G, teicoplanin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole and vancomycin was recorded. Methicillin resistance was assessed using the disc diffusion method with ceftioxin (30µg) (Bioanalyse, Turkey) on Mueller-Hinton agar (Difco, Becton Dickinson, USA) plates. Ceftioxin susceptibility was assessed with EUCAST guidelines and MRSA diagnosis was performed with ceftioxin disc/MIC results.

Multi-drug resistance (MDR4) was defined as beta-lactam resistance plus nonsusceptibility (inducible, intermediate or high-level resistance) to any three additional classes of antimicrobial drug including fluoroquinolones, tetracyclines, macrolides, aminoglycosides, oxazolidinones, glycopeptides, lipopeptides, sulfonamides and ansamycins (24).

### Data analysis

All collected data was imported into SPSS Software version 23.0 (IBM Corp., Armonk N.Y., USA) and statistical analysis was performed using Pearson Chi Square, Fisher's Exact Test and One-Way ANOVA test. A p value <0.05 was considered as statistically significant.

The study was approved by the Near East University Scientific Researches Ethics Committee (Date: 26.11.2020 and Number: 2020/85-1190).

## RESULTS

### Socio-demographic characteristics

In this study, a total of 449 *S. aureus* clinical isolates from patients admitted to the hospital between January 2016 to December 2020 were analyzed. Among the patients, 57.2% (257/449) were male and 42.8% (192/449) were female. The mean patient age was 51.36±25.70. There was no statistically significant association between the mean age of male and female patients and *S. aureus* infection (p = 0.998).

### Frequency of *S. aureus* and MRSA

The number of *S. aureus* isolates was detected to be 78 in 2016, 105 in 2017, 89 in 2018, 76 in 2019 and 101 in 2020. The frequency of MRSA in 2016-2020 are given in Table 1. The number of staphylococcal infections was higher in inpatient care (n=268, 59.7%) compared to outpatients (n=181, 40.3%). The distribution of inpatients and outpatients according to year is given in Table 1. The highest rates of *S. aureus* isolates were recorded in the cardiology (n=75, 16.7%) followed by dermatology (n=59, 13.10%), and infectious disease (n=57, 12.7%) among all departments within the hospital for all the years evaluated (Figure 1a). Infection by *S. aureus* were most frequently found in abscess/wound (n=174, 38.8%), followed by aspiration fluids (n=77, 17.1%) and blood (n=77, 17.1%) specimens (Fig. 1b). A higher frequency of MSSA (n=55, 20.6%) was observed in bloodstream infections compared to MRSA (n=22, 12.1%) (Table 2).

**Table 1.** Distribution of MRSA isolates according to gender, year, admission type and seasons

	MRSA (n, %)	MSSA (n, %)	<i>p</i> -value
Gender			
Male	99 (54.4)	158 (59.3)	0.315
Female	83 (45.6)	109 (40.8)	
Year			
2016	38 (48.7)	40 (51.3)	< 0.001*
2017	44 (41.9)	61 (58.1)	
2018	15 (16.9)	74 (83.1)	
2019	33 (43.4)	43 (56.6)	
2020	52 (51.5)	49 (48.5)	
Admission			
Inpatient	125 (46.6)	143 (53.4)	0.001*
Outpatient	57 (31.5)	124 (68.5)	
Season			
Spring	49 (43.0)	65 (57.0)	0.550
Summer	42 (41.6)	59 (58.4)	
Autumn	54 (42.5)	73 (57.5)	
Winter	37 (34.6)	70 (65.4)	

\* statistically significant

**Table 2.** Distribution of sample type according to methicillin resistance in *S. aureus*

	MRSA (n, %)	MSSA (n, %)
Abscess/wound	56 (30.8)	118 (44.2)
Urethral/vaginal swab	10 (5.5)	16 (6.0)
Pleural Fluid	1 (0.6)	1 (0.4)
Nasal/throat swab	14 (7.7)	7 (2.6)
Aspiration fluid	39 (21.4)	38 (14.2)
Sputum	15 (8.2)	9 (3.4)
Urine	17 (9.3)	18 (6.7)
Blood	22 (12.1)	55 (20.6)
Catheter tip	5 (2.7)	4 (1.5)
Bronchoalveolar lavage	3 (1.6)	1 (0.4)

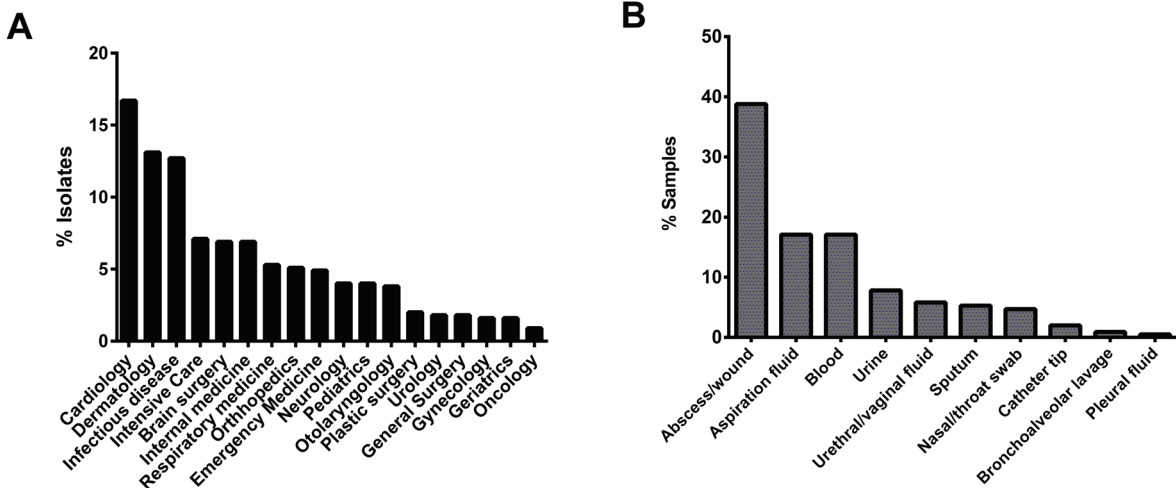


Figure 1. Distribution of *S. aureus* isolates according to a) hospital departments and b) sample source

#### Distribution and risk factors for MRSA colonization

Among the *S. aureus* isolates collected in 2016-2020, the frequency of MRSA was 40.5% (n=182), whereas MSSA was observed in 59.5% (n=267) of the samples ( $p < 0.001$ ). Over the 5-year period evaluated, the frequency of MRSA was highest in 2020 (n=52, 51.1%) which was statistically higher than previous years (n=38, 48.7% in 2016, n=44, 41.9% in 2017, n=15, 16.9% in 2018, n=33, 43.4% in 2019) ( $p < 0.001$ ). Inpatients had statistically higher rates of MRSA infections (n=125, 46.6%) compared to outpatients (n=57, 31.5%) ( $p = 0.001$ ). Of 182 MRSA isolated, 99 (54.4%) were males and 83 (45.6%) were females (Table 1). No statistically significant association between gender and MRSA infection was observed ( $p = 0.315$ ). Patient age was between 0 and 96 with an average of  $57.07 \pm 24.61$ . Importantly, the mean age of patients with MRSA infection was statistically higher than those with MSSA infections ( $p < 0.001$ ; mean age:  $57.07 \pm 24.61$  and  $47.47 \pm 25.74$ , respectively). Rates of MRSA infections were similar in different seasons ( $p = 0.550$ ).

#### Antimicrobial susceptibility patterns of *S. aureus*

Among the tested antibiotics, *S. aureus* isolates were most resistant to erythromycin (39.5%,

n=136/344), followed by tetracycline (35.4%, n=155/438), clindamycin (25.8%, n=114/442), ciprofloxacin (14.6%, n=61/418), levofloxacin (11.8%, n=52/443), trimethoprim/sulfamethoxazole (9.9%, n=42/422), fusidic acid (8.1%, n=14/174), rifampin (6.9%, n=17/248), fosfomycin (6.8%, n=11/163) and tobramycin (5.6%, n=13/232). On the contrary, high susceptibility rates were detected in all *S. aureus* tested for vancomycin (98.9%), daptomycin (98.9%), linezolid (98.8%), teicoplanin (97.3%) and gentamicin (96.8%) (Table 3). Antibiotic susceptibility testing of MRSA isolates revealed statistically higher resistance levels towards ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, tetracycline, levofloxacin, fosfomycin, tobramycin and rifampin compared to MSSA isolates.

Multi-drug resistance of the isolates was also evaluated. MRSA isolates resistant to beta-lactams plus three additional antimicrobial classes were classified as multidrug resistant (MDR4). Overall, fifty-six (30.8%) of the isolates were multi-drug resistant in 2016-2020 period. The distribution of MDR isolates was observed to vary among years with the lowest rate (5.8%, n=3/52) detected in 2020 as shown in Figure 2. Overall, the rate of MDR MRSA was observed to significantly decrease in the post-pandemic period ( $p=0.0001$ ) compared to the

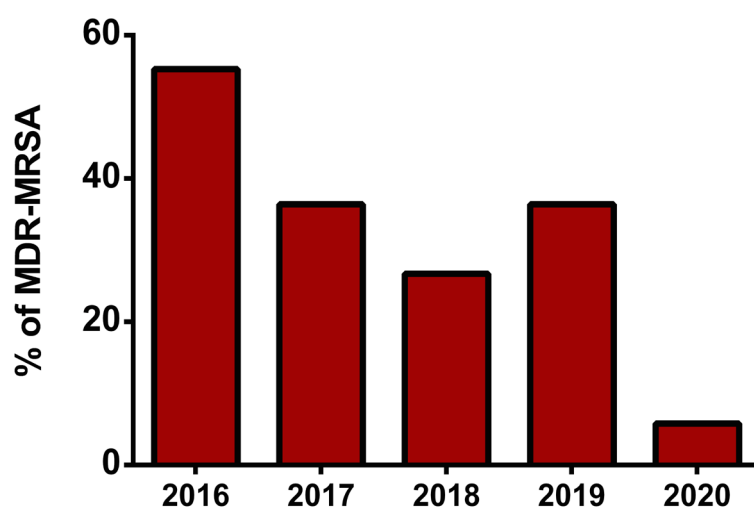
pre-pandemic period (55.3% in 2016, 36.4% in 2017, 26.7% in 2018, 36.4% in 2019). MDR phenotype was found to be at similar rates in men (32.3%, n=32/99) and women (28.9%, n=24/83) with no statistical

difference among gender. There was no statistically significant difference among MDR isolates isolated from inpatients and outpatients ( $p = 0.852$ ).

**Table 3.** Antibiotic resistance profiles (%) of MRSA and MSSA isolates to different antimicrobial agents between 2016-2020

Antibiotic	MRSA (%)	MSSA (%)	p-value
Erythromycin	85.4	11.7	< 0.001*
Tetracycline	68.0	13.7	< 0.001*
Clindamycin	52.9	8.2	< 0.001*
Ciprofloxacin	23.8	8.7	< 0.001*
Levofloxacin	19.8	6.4	< 0.001*
Fosfomycin	13.0	1.2	< 0.005*
Rifampicin	12.0	4.2	< 0.05*
Trimethoprim/sulfamethoxazole	11.6	8.9	0.372
Tobramycin	11.1	3.1	<0.05*
Fusidic acid	7.3	8.7	0.739
Gentamicin	5.2	2.0	0.074
Teicoplanin	3.4	1.5	0.166
Linezolid	2.3	0.4	0.086
Vancomycin	1.6	0.7	0.326
Daptomycin	1.5	0.9	0.484

\* statistically significant



**Figure 2.** Rates of MDR-MRSA in 2016-2020 period

## DISCUSSION

MRSA is an important pathogen in healthcare (25-27). In Northern Cyprus, an analysis of MRSA infections and associated risk factors at a local scale are scarce. This is the first study to document the frequency as well as antimicrobial and multi-drug resistance profiles of MRSA and MSSA in Northern Cyprus.

One of the significant observations over the five-year study period was the higher rates of MSSA observed compared to MRSA isolates (59.5% vs 40.5%) ( $p < 0.001$ ). The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network data between 2015 and 2018 documented a frequency of MRSA as high as 38.4% in Cyprus (27). Our observations indicate a higher MRSA rate in 2016-2020 period. Compared to the EU/EEA population-weighted mean percentage of MRSA as 17.4% in 2014, our findings show higher rates of MRSA in the study period in the hospital setting in Northern Cyprus. In the current study, from 2016 to 2020, although fluctuating, the overall MRSA trend was shown to be significantly higher in 2020 (51.49%) compared with previous years, with a drop (16.85%) in 2018. Evidence from previous studies show that proportion of MRSA among *S. aureus* isolates is variable. Although general trend in frequency has been shown to increase previously (29), some studies have reported declining rates. MRSA has declined in England (30,31) and the USA (32,33).

With respect to patients demographics, evidence from several studies indicated a greater proportion of *S. aureus* infections among male and older age groups (34,35). Our results show a significant age-specific trend associated to MRSA frequency, and although it was not statistically significant, the gender-specific trend observed was consistent with previous reports in the literature (36-38).

In general, clinical samples of wound/abscess suggestive of staphylococcal SSTI are the most common isolates recovered (39). In this study, regardless of the methicillin resistance in *S. aureus*, sources indicative of SSTIs (wound/abscess) and

invasive infections (blood, aspiration fluid) were more commonly observed. This finding is in agreement with previous reports indicating the frequency of MRSA and MSSA isolated from these sources to be predominant compared to other clinical sources (35,40). However, regarding bloodstream infections, a higher frequency of MSSA was observed in our study. Such trend was also described in previously conducted studies focusing on risk factors for *S. aureus* infections (41, 42). Conversely, Wi et al and Hindy et al have reported a significant predominance of MRSA associated bacteremia (43,44). Although we have found overall more MSSA cases in the study population, inpatients were at significantly higher risk to develop MRSA infections. Inpatients care status has been associated with longer hospital stay, thus prolonged exposure to medical procedures and increased likelihood to develop MRSA infections (45). Similarly, Lakhundi et al. (46) reported hospital length of stay, old age and invasive medical procedures as risk factors for MRSA infections.

Several factors such as seasonal fluctuation contribute to spatial and temporal occurrence of infectious diseases (47). Conversely to many studies that have demonstrated a strong and consistent link between seasons and MRSA incidence rate, the examination of MRSA rates over our study period showed no statistically significant correlation. In 2017, Psoter and colleagues reported a predominance of MRSA related respiratory infections during winter season (48). Another study depicted a periodicity pattern in MRSA peak and antibiotic consumption; the latter occurring several month after the first was detected (49). It appears that seasonality incidence of MRSA, more than following a simple meteorological pattern, is a multifactorial mechanism (50).

Susceptibility of MRSA isolates investigated in this study was reported to be over 90% for daptomycin, vancomycin, linezolid, teicoplanin, gentamicin and fusidic acid. One study reported similar rate of susceptibility; yet, conversely to their report, MRSA isolates were found to be slightly less susceptible

to rifampicin and trimethoprim/sulfamethoxazole in the current study (51). A significantly decreased susceptibility for antibiotics such as erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, tetracycline, levofloxacin, fosfomycin in MRSA was observed. Similar trends were reported in 2017, in which MRSA were found to be highly resistant to erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin compared to MSSA, and regardless of the clinical source (38). Total susceptibility to vancomycin and rifampicin (52) and gentamicin (38) were also noted in literature. In the current study, MDR4 MRSA rates were observed to decrease in 2020 compared to previous years, which can be attributable to the decrease in antibiotic consumption mostly in the primary care sector and may be the result of a decrease in the number of primary care consultations, either because of hesitancy to seek healthcare

for mild self-limiting infections, or difficulties in obtaining an appointment for a consultation during the pandemic. It is likely that this has resulted in fewer antibiotic prescriptions for mild and self-limiting infections, and has had a more noticeable effect in countries where overuse and inappropriate use was common before the COVID-19 pandemic.

In conclusion; this five-year study presents the frequency and antibiotic resistance profiles of MRSA and MSSA isolates at a central hospital in Northern Cyprus. An alarmingly high rate of MRSA infections in older patients is reported. MRSA isolates were found to have increased resistance to several antibiotics. Given the fast-paced evolution of MRSA epidemiology, constant monitoring of alterations in incidence and resistance patterns is critical for the timely adjustment of local control and prevention strategies.

### LIMITATIONS OF THE STUDY

This study is single-centered therefore does not represent the overall antimicrobial susceptibility patterns of *S. aureus* in the region. The vancomycin, linezolid and teicoplanin resistance observed in MRSA isolates was not validated due to the lack of a reference laboratory in Northern Cyprus. In addition, identification of antibiotic resistance genes with molecular methods is lacking. Future multi-centered studies with molecular characterization of isolates would give an overview of the antibiotic resistance patterns across the country would be beneficial.

### ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* The study was approved by the Near East University Scientific Researches Ethics Committee (Date: 26.11.2020 and Number: 2020/85-1190).

### CONFLICT OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist*, 2018; 11: 1645-58.
2. Mattar C, Edwards S, Baraldi E, Hood J. An overview of the global antimicrobial resistance research and development hub and the current landscape. *Curr Opin Microbiol*, 2020; 57: 56-61.
3. Singh KS, Anand S, Dholpuria S, Sharma JK, Blankenfeldt W, Shouche Y. Antimicrobial resistance dynamics and the one-health strategy: a review. *Environ Chem Lett*, 2021; 19:2995-3007.
4. Frost I, Van Boeckel TP, Pires J, Craig J, Laxminarayan R. Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. *J Travel Med*, 2019; 26(8):taz036.
5. Beyer P, Paulin S. Priority pathogens and the antibiotic pipeline: an update. *Bull World Health Organ*, 2020; 98(3): 151.
6. World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Geneva: World Health Organization. 2017.
7. Benkő R, Gajdács M, Matuz M, Bodó G, Lázár A, Hajdú E, et al. Prevalence and antibiotic resistance of ESKAPE pathogens isolated in the emergency department of a tertiary care teaching hospital in Hungary: a 5-year retrospective survey. *Antibiotics*, 2020; 9 (9): 1-17.
8. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 2015; 28 (3): 603-61.
9. Horino T, Hori S. Metastatic infection during *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect Chemother*, 2020; 26 (2): 162-9.
10. Tubre DJ, Schroeder AD, Estes J, Eisenga J, Fitzgibbons RJ Jr. Surgical site infection: the "Achilles Heel" of all types of abdominal wall hernia reconstruction. *Hernia*, 2018; 22 (6): 1003-1013.
11. Gajdács M. The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 2019; 8 (2): 52.
12. Foster TJ. Can  $\beta$ -lactam antibiotics be resurrected to combat MRSA? *Trends Microbiol*, 2019; 27 (1): 26-38.
13. Corcione S, Lupia T, De Rosa FG. Novel cephalosporins in septic subjects and severe infections: present findings and future perspective. *Front Med*, 2021; 8: 617378.
14. Bassetti M, Carnelutti A, Castaldo N, Peghin M. Important new therapies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Expert Opin Pharmacother*, 2019; 20 (18): 2317-34.
15. Holubar M, Meng L, Alegria W, Deresinski S. Bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update on new therapeutic approaches. *Infect Dis Clin North Am*, 2020; 34 (4): 849-61.
16. Lozano C, Fernández-Fernández R, Ruiz-Ripa L, Gómez P, Zarazaga M, Torres C. Human mecC-Carrying MRSA: clinical implications and risk factors. *Microorganisms*, 2020; 8 (10): 1615.
17. Schwendener S, Keller JE, Overesch G, Perreten V. Novel SCCmec element containing the methicillin resistance gene mecD in *Macrocooccus bohemicus*. *J Glob Antimicrob Resist*, 2021; 24: 360-2.
18. Becker K, van Alen S, Idelevich EA, Schleimer N, Seggewiß J, Mellmann A, Kaspar U, Peters G. Plasmid-encoded transferable mecB-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, 2018; 24 (2): 242-8.
19. Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, Shirliff ME. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog*, 2016; 101: 56-67.
20. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr*, 2016; 4 (2): 10.
21. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control. 2020.



22. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 - 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. 2022.
23. Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Sweden: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020.
24. Morelli JJ, Hogan PG, Sullivan ML, Muenks CE, Wang JW, Thompson RM, et al. Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from humans, environmental surfaces, and companion animals in households of children with community-onset methicillin-resistant *S. aureus* infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015; 59 (10): 6634-7.
25. Kot B, Wierzchowska K, Piechota M, Gruzewska A. Antimicrobial resistance patterns in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients hospitalized during 2015-2017 in hospitals in Poland. *Med Princ Pract*, 2020; 29 (1): 61-8.
26. Coll F, Harrison EM, Toleman MS, Reuter S, Raven KE, Blane B, et al. Longitudinal genomic surveillance of MRSA in the UK reveals transmission patterns in hospitals and the community. *Sci Transl Med*, 2017; 9 (413): 1-19.
27. Sampedro GR, Bubeck-Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* in the intensive care unit: are these golden grapes ripe for a new approach? *J Infect Dis*, 2017; 215 (1): S64-S70.
28. Surveillance of antimicrobial resistance. Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control. 2018.
29. Soe PE, Han WW, Sagili KD, Satyanarayana S, Shrestha P, Htoon TT, et al. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthcare facilities and its related factors in Myanmar (2018-2019). *Trop Med Infect Dis*, 2021; 6 (2): 70.
30. Lawes T, Lopez-Lozano JM, Nebot CA, Macartney G, Subbarao-Sharma R, Dare CRJ, et al. Effects of national antibiotic stewardship and infection control strategies on hospital-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections across a region of Scotland: a non-linear time-series study. *Lancet Infect Dis*, 2015; 15 (12): 1438-49.
31. Duerden B, Fry C, Johnson AP, Wilcox MH. The Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood stream infections in England. *Open Forum Infect Dis*, 2015; 2 (2): ofv035.
32. Kistler JM, Thoder JJ, Ilyas AM. MRSA incidence and antibiotic trends in urban hand infections: a 10-year longitudinal study. *Hand*, 2019; 14 (4): 449-54.
33. Jones K, Mu Y, Li Q. National reporting trend for HO-MRSA bacteremia labID events, 2010-2018. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2020; 41 (S1): s68-9.
34. Annual epidemiological commentary: gram-negative bacteraemia, MRSA bacteraemia, MSSA bacteraemia and *C. difficile* infections, up to and including financial year April 2019 to March 2020. UK: Health Security Agency. 2020.
35. Schulte RH, Munson E. *Staphylococcus aureus* resistance patterns in Wisconsin: 2018 surveillance of Wisconsin organisms for trends in antimicrobial resistance and epidemiology (swotare) program report. *Clin Med Res*, 2019; 17 (3-4): 72-81.
36. Thorlacius-Ussing L, Sandholdt H, Larsen AR, Petersen A, Benfield T. Age-dependent increase in incidence of *Staphylococcus aureus* bacteremia, Denmark, 2008-2015. *Emerg Infect Dis*, 2019; 25 (5): 875-82.
37. Horváth A, Dobay O, Sahin-Tóth J, Juhász E, Pongrácz J, Iván M, et al. Characterisation of antibiotic resistance, virulence, clonality and mortality in MRSA and MSSA bloodstream infections at a tertiary-level hospital in Hungary: a 6-year retrospective study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2020; 19 (1): 1-11.
38. Acree ME, Morgan E, David MZ. *S. aureus* infections in Chicago, 2006-2014: Increase in CA MSSA and decrease in MRSA incidence. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2017; 38 (10): 1226-34.
39. Del Giudice P. Skin Infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Acta Derm Venereol*, 2020; 100 (9): adv00110.
40. Timsit JF, Ruppé E, Barbier F, Tabah A, Bassetti M. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. *Intensive Care Med*, 2020; 46 (2): 266-84.

41. Jaganath D, Jorakate P, Makprasert S, Sangwichian O, Akarachotpong T, Thamthitawat S, et al. Staphylococcus aureus bacteremia incidence and methicillin resistance in Rural Thailand, 2006-2014. *Am J Trop Med Hyg*, 2018; 99 (1): 155-63.
42. Dilnessa T, Bitew A. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from clinical samples at Yekatit 12 Hospital Medical College, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infect Dis*, 2016; 16 (1): 1-9.
43. Wi YM, Rhee JY, Kang CI, Chung DR, Song JH, Peck KR. Clinical predictors of methicillin-resistance and their impact on mortality associated with Staphylococcus aureus bacteraemia. *Epidemiol Infect*, 2018; 146 (10): 1326-36.
44. Hindy JR, Quintero-Martinez JA, Lahr BD, Palraj R, Go JR, Fida M, et al. Incidence of monomicrobial Staphylococcus aureus bacteremia: a population-based study in Olmsted County, Minnesota - 2006 to 2020. *Open Forum Infect Dis*, 2022; 9 (7): 1-9.
45. Hutzschenreuter L, Flessa S, Dittmann K, Hübner NO. Costs of outpatient and inpatient MRSA screening and treatment strategies for patients at elective hospital admission - a decision tree analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2018; 7 (1): 1-8.
46. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev*, 2018; 31(4): e00020-18.
47. Buonomo B, Chitnis N, d'Onofrio A. Seasonality in epidemic models: a literature review. *Ric di Mat*, 2018; 67 (1): 7-25.
48. Psoter KJ, De Roos AJ, Wakefield J, Mayer JD, Rosenfeld M. Seasonality of acquisition of respiratory bacterial pathogens in young children with cystic fibrosis. *BMC Infect Dis*, 2017; 17 (1): 1-6.
49. Choe YJ, Smit MA, Mermel LA. Seasonality of respiratory viruses and bacterial pathogens. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2019; 8 (1): 4-9.
50. Eibach D, Nagel M, Hogan B, Azuure C, Krumkamp R, Dekker D, et al. Nasal carriage of Staphylococcus aureus among children in the Ashanti Region of Ghana. *PLoS One*, 2017; 12 (1): e0170320.
51. Spencer J, Chukwuma U. Annual surveillance summary: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections in the military health system (MHS), NMCPHC-EDC-TR-177-2017. Navy and Marine Corps Public Health Center. 2017.
52. Nguyen Thai S, Vu Thi Thu H, Vu Thi Kim L, Do Thi Quynh N, Tran Thi Hai A, Tang Thi N, et al. First report on multidrug-resistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in children admitted to tertiary hospitals in Vietnam. *J Microbiol Biotechnol*, 2019; 29 (9): 1460-9.

# COVID-19 şüpheli hastalarda SARS-CoV-2 ve yaygın solunum yolu patojenleri ile koenfeksiyon

## Coinfection with SARS-CoV-2 and common respiratory pathogens in patients with suspected COVID-19

Sedef Zeliha ÖNER<sup>1</sup> (ID), Hatice ÖZDEMİR<sup>1</sup> (ID), Melek DEMİR<sup>1</sup> (ID), Ergun METE<sup>1</sup> (ID), İlknur KALELİ<sup>1</sup> (ID), Ahmet ÇALIŞKAN<sup>1</sup> (ID), Çağrı ERGİN<sup>1</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** SARS-CoV-2 ile enfekte hastaların çoğunun klinik semptomları yaygın solunum yolu viral enfeksiyonunda görülen semptomlara benzemektedir. Çalışmamızda, COVID-19 şüphesi olan hastalarda SARS-CoV-2 ve yaygın solunum yolu virüslerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Mart 2020 - Mart 2022 tarihleri arasında multiplex solunum PCR paneli ve SARS-CoV-2 RT-PCR testi çalışılan 592 hastanın sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi. Yaygın solunum yolu viral patojenler multiplex real-time PCR paneli ile (FTD® Respiratory Pathogens 21 Kit, Fast-Track Diagnostics, Lüksemburg) saptandı. SARS-CoV-2 Real-Time PCR testi, farklı dönemlerde olmak üzere Bio-Seepdy SARS-CoV-2 Double Gene RT-qPCR Kiti, Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Emerging Plus, Diagnovital® HS SARS-CoV-2 real time PCR kiti, DS CORONEX COVID-19 Multiplex Real Time-qPCR Test Kitleri kullanılarak incelenmiştir.

**Bulgular:** Örneklerin %63,2'sinde (374/592) viral antijen pozitifliği bulunmuştur. Tek etken pozitifliği %46,3 (274/592), ikili etken %13,9 (82/592), üçlü etken %2,9 (17/592), dördü etken pozitifliği %0,2 (1/592) saptanmıştır. SARS-CoV-2 pozitif olan hastaların

### ABSTRACT

**Objective:** The clinical symptoms of most patients infected with SARS-CoV-2 are similar to the symptoms of common respiratory viral infection. Our study aims to investigate SARS-CoV-2 and common respiratory viruses in patients with suspected COVID-19.

**Methods:** The test results of 592 patients for multiplex respiratory PCR panel and SARS-CoV-2 RT-PCR between March 2020 and March 2022 were studied and retrospectively evaluated. Common respiratory viral pathogens were detected with the multiplex real-time PCR panel (FTD® Respiratory Pathogens 21 Kit, Fast-Track Diagnostics, Luxembourg). The SARS-CoV-2 Real-Time PCR test was evaluated using the Bio-Speedy SARS-CoV-2 Double Gene RT-qPCR Kit, Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Emerging Plus, Diagnovital® HS SARS-CoV-2 Real-Time PCR kit, DS CORONEX COVID-19 Multiplex Real-Time Test Kits.

**Results:** Viral antigen positivity was detected in 63.2% (374/592) of the samples. The single-agent positivity was 46.3% (274/592), the dual-agent positivity was 13.9% (82/592), the triple-agent positivity was 2.9% (17/592), and the quadruple-agent positivity was 0.2% (1/592). In 51.5% of SARS-CoV-2 positive patients (17/33), SARS-CoV-2

<sup>1</sup>Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Denizli



İletişim / Corresponding Author : Sedef Zeliha ÖNER

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Kınıklı/Pamukkale Denizli - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 10.06.2022

Kabul Tarihi / Accepted : 10.01.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.50024

Öner SZ, Özdemir H, Demir M, Mete E, Kaleli İ, Çalışkan A, Ergin Ç. COVID-19 şüpheli hastalarda SARS-CoV-2 ve yaygın solunum yolu patojenleri ile koenfeksiyon Türk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(1): 23 - 30

%51,5'inde (17/33) sadece SARS-CoV-2 pozitifliği ve %48,5'inde (16/33) birden fazla solunum virüsü etkeni birlikte saptanmıştır. SARS-CoV-2 negatif hastaların %46'sında (257/559) sadece bir virüs pozitifliği ve %36,3'ünde (203/559) ise birden fazla solunum virüsü etkeni birlikte saptanmıştır. SARS-CoV-2 pozitif hastalarda virüs birlitlikleri en sık human rinovirüs (HRV) (7/16, %21,2), human bocavirüs (HBoV) ve solunum adenovirüsleri (HADV) (n=3/16, %9,1), solunum sinsityal virüs (RSV) ve influenza A'da (n=2/16, %6,1) ve SARS-CoV-2 negatif hastalarda virüs birlitlikleri en sık HRV 127 (%37,2), human parainfluenza virüsleri (HPIV) 1-4 81 (%23,8), RSV A 76 (%22,3), HboV 47 (%13,8), HADV 38 (%11,1) tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Çalışmamızda solunum yolu enfeksiyonu etkeni virüs birlitlikleri SARS-CoV-2 pozitif hastalarda daha fazla oranda görülmüştür. Özellikle COVID-19 pandemisinin devam ettiği süreçte solunum yolu viral enfeksiyonu düşünülen hastalarda birden fazla viral etken birlitliklerinin araştırılması, doğru tedavi yaklaşımının uygulanmasına yardımcı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** SARS-CoV-2, solunum virüsleri, koenfeksiyon

positivity was detected alone, while in 48.5% (16/33) multiple respiratory viral agents were detected together. Single virus positivity was found alone in 46% of SARS-CoV-2 negative patients (257/559), and 36.3% (203/559) of the patients presented more than one respiratory viral agent. The most frequent coexistent viruses in SARS-CoV-2 positive patients included human rhinovirus (HRV) (7/16, 21.2%), human bocavirus (HBoV) and respiratory adenoviruses (HADV) (n=3/16, 9.1%), respiratory syncytial virus (RSV) and influenza A (n=2/16%, HPV-6.1%); whereas the most frequent coexistent viruses in the SARS-CoV-2 negative patients were HRV 127 (%37.2), human parainfluenza viruses (HPIV) 1-4 81 (%23.8), RSV A 76 (%22.3), HboV 47 (%13.8) and HADV 38 (%11.1).

**Conclusion:** In our study, coexisting viral respiratory infection agents were detected higher in SARS-CoV-2 positive patients. The investigation of multiple coexisting viral agents in patients who are considered to have respiratory tract viral infection will help to implement the correct treatment approach, particularly throughout the ongoing COVID-19 pandemic.

**Key Words:** SARS-CoV-2, respiratory viruses, coinfection

## GİRİŞ

Solunum yolu enfeksiyonlarının büyük bir kısmı viral etkenlerle oluşmaktadır. Akut solunum yolu enfeksiyonuna neden olan yaygın solunum virüslerinin başlıcaları; influenza A virüsü (INFA), influenza B virüsü (INF B), solunum sinsityal virüs (RSVA/B), enterovirüs (EV), rinovirüs (HRV), solunum adenovirüsleri (HADV), insan metapnömovirüsü (HMPV), human parainfluenza virüsleri (HPIV) 1-4 ve koronavirüsler (HCoV) (NL63, OC43, HKU-1 ve 229E)'dir (1).

Koronavirüs hastalığına (COVID-19) neden olan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü 2 (SARS-CoV-2), ilk kez Çin'in Wuhan kentinde Aralık 2019'da pnömonili hastalardan izole edilen bir

betakoronavirüstür (2). SARS-CoV-2 ile enfekte hastaların çoğunun klinik semptomları solunum yolu viral enfeksiyonlarından farklı değildir (3). Solunum yolu virüslerinin tanısında moleküler yöntemler tercih edilmektedir (1). Özellikle de gerçek zamanlı multipleks PCR'nin kullanılması, çok çeşitli solunum yolu virüslerini ve bunların alt tiplerini saptamada yararlıdır (4). COVID-19 enfeksiyonu tanısında nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) referans test olarak kabul edilmektedir (5).

Yaygın solunum virüsleri ve SARS-CoV-2'nin birlikte değerlendirildiği farklı çalışmalarda virüslerin tek ve birlikte görülme oranları değişiklik göstermektedir (3,6,7). Çalışmamızda, COVID-19 şüphesi olan hastalarda SARS-CoV-2 ve yaygın solunum

yolu virüslerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Mart 2020-Mart 2022 tarihleri arasında multipleks solunum PCR paneli ve SARS-CoV-2 RT-PCR testi çalışılan hastaların sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Hastaların demografik verilerine hastane bilgi sistemi ve Halk Sağlığı Yönetim Sisteminden (HSYS) ulaşılmıştır.

Solunum örneklerinde viral patojenler influenza A (INF A), influenza A subtype H1N1, influenza B (INF B), human parainfluenza virüs 1-4 (HPIV), human rhinovirüs (HRV), human coronavirüs OC43 (HCoV-OC43), 229E (HCoV-229E), HKU1 (HCoV HKU1), NL63 (HCoV NL63), human bocavirüs (HBoV), human metapneumovirüs (HMPV A/B), respiratuvar sinsityal virüs (RSV A/B), human parechovirüs (HPeV), enterovirüs (EV), human adenovirüs (HADV), multiplex real-time PCR paneliyle (FTD Neuro9, Fast Track Diagnostics, Lüksemburg) üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılarak tespit edilmiştir. SARS-CoV-2 Real-Time PCR testi, Diagnovital® HS SARS-CoV-2 real time PCR kiti (RTA laboratuvarları Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. AŞ., Türkiye), DS CORONEX COVID-19 Multiplex Real Time-qPCR Test Kiti (DS Nano and Biotechnology Product Tracing and Tracking Co., Türkiye), Bioseepdy SARS-CoV-2 Double Gene RT-qPCR Kiti ve Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Emerging Plus Kiti (Bioeksen R&D Technologies Ltd., Türkiye) ile Roche Lightcycler480 ve Qiagen Rotor-Gene Q cihazları kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Hastalar SARS-CoV-2 RT-PCR sonucu pozitif ve negatif olmak üzere ve <18 yaş ve ≥18 yaş olarak iki gruba ayrılmıştır.

Verilerin istatistiksel analizi SPSS Ver.25 [(IBM SPSS Ver 25 (Armonk, NY: IBM Corp.)] istatistik paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler medyan, çeyrekler arası aralık (IQR) kategorik değişkenler sayı ve yüzde ile özetlenmiştir. Kategorik değişkenler ise ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır.

İstatistiksel analizlerde  $p < 0,05$  olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 07.06.2022, Karar no: E-60116787-020-217419).

## BULGULAR

Farklı kliniklerden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen 592 hastanın nazofaringeal sürüntü örnekleri multipleks solunum PCR paneli ve SARS-CoV-2 RT-PCR testi ile değerlendirilmiştir.

Örneklerde viral antijen pozitifliği tüm örneklerde %63,2 (374/592) bulunmuştur. Tek etken %46,3 (274/592), iki etken %13,9 (82/592), üç etken %2,9 (17/592), dört etken %0,2 (1/592) birlikte pozitif olarak saptanmıştır.

Değerlendirilen %5,6 (33/592) hastanın SARS-CoV-2 RT-PCR testi olarak bulunmuştur. SARS-CoV-2 RT-PCR testi pozitif hastaların yaş ortancası (IQR) 7.11 (1.19 - 14.51) ve negatif hastaların yaş ortancası (IQR) 3.92 (1.72 - 9.45) saptanmıştır. Kadın hastaların %5,6'sı ve erkek hastaların %5,6'sı SARS-CoV-2 pozitif görülmüştür. 18 yaş altı hastalarda SARS-CoV-2 pozitiflik oranı %5,5 ve 18 yaş ve üstü hastalarda SARS-CoV-2 pozitiflik oranı %6,1 olarak belirlenmiştir. Örnekler gönderildikleri kliniklere göre değerlendirildiğinde poliklinikten gönderilen örneklerin %4,4'ü, yataklı servisten gönderilen örneklerin %5,5'i ve yoğun bakım ünitesinden gönderilen örneklerin %16'sı SARS-CoV-2 pozitif bulunmuştur (Tablo 1).

SARS-CoV-2 (+) / diğer solunum virüsleri (-) örnekler ile SARS-CoV-2 (+) / diğer solunum virüsleri (+) örnekler karşılaştırıldığında cinsiyet, yaş gruplarına dağılımı ve gönderildikleri klinikler açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır (sırasıyla  $p=0,208$ ,  $p=0,582$ ,  $p=0,587$ ) (Tablo 1).

SARS-CoV-2 RT-PCR testi pozitif olan hastaların %51,5'inde (17/33) sadece SARS-CoV-2 pozitifliği ve %48,5'inde (16/33) birden fazla diğer solunum

virüsleri ile pozitiflik tespit edilmiştir (Tablo 2). Virüs birliktelikleri sıklık sırasıyla HRV, %21,2 (7/16), HBoV ve HADV %9,1 (3/16) RSV ve influenza A %6,1 (2/16), HPIV, HCoV OC43, HCoV NL63 ve EV'de %3 (1/16) olarak saptanmıştır. İnfluenza B, H1N1, HMPV, HCoV 229E, HCoV HKU1 ve HpeV ile birlikte pozitiflik görülmemiştir.

SARS-CoV-2 RT-PCR testi (-) / diğer solunum virüsleri (-) örnekler ile SARS-CoV-2 RT-PCR testi (-) / solunum virüsü (+) örnekler karşılaştırıldığında yaş dağılımı ve gönderildikleri klinikler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (sırasıyla  $p=0,361$ ,  $p=0,591$ ). Cinsiyetlere göre SARS-CoV-2 (-) / diğer solunum virüsleri (-) örnekler ile SARS-CoV-2 (-) / diğer solunum virüsü (+) örnekler karşılaştırıldığında erkeklerde diğer solunum virüsleri ile enfeksiyon oranı kadınlara oranla daha fazla olarak bulunmuştur ( $p=0,014$ ) (Tablo 1).

COVID-19 şüpheli hastaların %57,6'sı (341/592) diğer solunum patojenleri için pozitif görülmüştür. SARS-CoV-2 RT-PCR testi negatif olan hastaların %61'inde (341/559) diğer viral solunum patojenleri saptanmıştır. SARS-CoV-2 negatif örneklerin %46'sında (257/559) sadece bir virüs pozitifliği ve %36,3'ünde (203/559) ise birden fazla solunum virüsü birlikte pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). SARS-CoV-2 RT-PCR testi negatif olan hastalarda en sık sırasıyla

HRV 127 (%37,2), HPIV 1-4 81 (%23,8), RSV A76 (%22,3), HBoV 47 (%13,8), HADV 38 (%11,1) saptanmıştır (Şekil 1). HCoV HKU1 pozitifliği belirlenmemiştir.

SARS-CoV-2 negatif ve SARS-CoV-2 pozitif olan hastalarda görülen diğer solunum virüsleri oranları karşılaştırıldığında; HPIV'nin SARS-CoV-2 negatif hastalarda ( $p=0,020$ ) ve HCoV NL63'ün SARS-CoV-2 pozitif hastalarda ( $p=0,001$ ) daha fazla görülmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 1).

SARS-CoV-2 pozitif ve SARS-CoV-2 negatif hastalarda diğer solunum virüsü birliktelik oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,159$ ).

SARS-CoV-2 pozitif hastalarda diğer solunum virüsü birlikteliği görülme oranları mevsimlere göre incelendiğinde; kış mevsiminde HRV'nin ( $n=5$ , %38,5), ilkbaharda HRV, EV, HADV ( $n=1$ , %16,7) ve Yaz mevsiminde HBoV'nin ( $n=2$ , %15,4) en sık etken olduğu görülmüştür. Sonbahar mevsiminde virüs birlikteliği görülmemiştir (Tablo 3).

SARS-CoV-2 negatif hastalarda diğer solunum virüslerinin görülme oranları mevsimlere göre incelendiğinde; kış mevsiminde influenza A'nın ( $n=25$ , %23,6), sonbahar HRV ( $n=22$ , %25), ilkbaharda HRV ( $n=25$ , %20) ve HPIV 1-4 ( $n=24$ , %19,2) ve yaz mevsiminde HRV ( $n=58$ , %24,2) ve RSV A'nın ( $n=57$ , %23,8) en sık etken olduğu görülmüştür (Tablo 3).

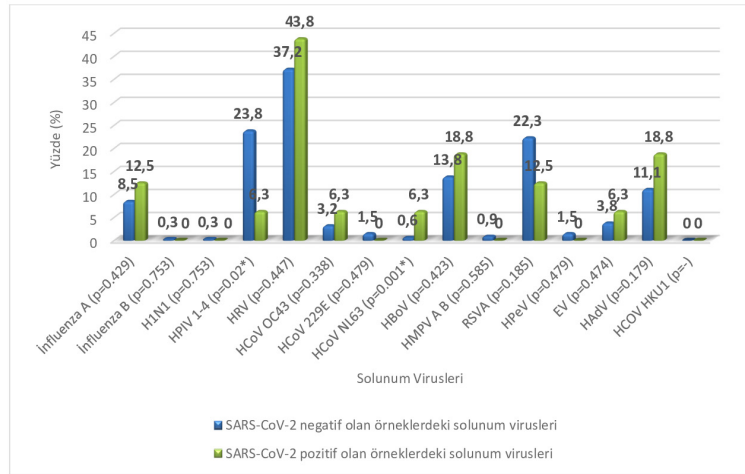
**Tablo 1.** SARS-CoV-2 negatif ve pozitif hastaların demografik özellikleri n (%)

	Tüm hastalar (n=592)	SARS-CoV-2 (-) (n=559)	SARS-CoV-2 (+) (n=33)	Sadece SARS-CoV-2 (+) (n=17)	SARS-CoV-2 koenfeksiyon (n=16)	SARS-CoV-2 (-) / diğer solunum virüsleri (-) (n=218)	SARS-CoV-2 (-) / diğer solunum virüsleri (+) (n=341)
Kadın	252 (42,6)	238 (94,4)	14 (5,6)	9 (52,9)	5 (31,3)	107 (49,1)	131 (38,4)
Erkek	340 (57,4)	321 (94,4)	19 (5,6)	8 (47,1)	11 (68,8)	111 (50,9)	210 (61,6)
<18 yaş	543 (91,7)	513 (94,5)	30 (5,5)	15 (88,2)	15 (93,8)	197 (90,4)	316 (92,7)
≥18 yaş	49 (8,3)	46 (93,9)	3 (6,1)	2 (11,8)	1 (6,3)	21 (9,6)	25 (7,3)
Poliklinik	183 (30,9)	175 (95,6)	8 (4,4)	4 (23,5)	4 (25)	63 (28,9)	112 (32,8)
Servis	384 (64,9)	363 (94,5)	21 (5,5)	10 (58,8)	11 (68,8)	147 (67,4)	216 (63,3)
Yoğun Bakım	25 (4,2)	21 (84)	4 (16)	3 (7,6)	1 (6,3)	8 (3,7)	13 (3,8)

Tablo 2. Solunum virüslerinin görülme özellikleri

Virüsler	Tek virüs	İkili virüs	Üçlü ve daha fazla virüs	Total pozitiflik	Görülme yüzdesi %	Virüs koenfeksiyon yüzdesi %
SARS-CoV-2	17	12	4	33	5,6	48,5
İnfluenza A	17	10	4	31	5,2	45,2
İnfluenza B	1	-	-	1	0,2	0,0
H1N1	-	1	-	1	0,2	100,0
HPIV 1-4	51	22	9	82	13,9	37,8
HRV	83	39	12	134	22,6	38,0
HCoV OC 43	7	4	1	12	2,0	41,7
HCoV 229E	4	1	-	5	0,8	20,0
HCoV NL63	-	2	1	3	0,5	100,0
HCoV HKU1	-	-	-	-	0,0	0,0
HBoV	23	20	7	50	8,4	54,0
HMPV A/B	2	1	-	3	0,5	33,3
RSV A	44	25	9	78	13,2	43,6
HPeV	1	3	1	5	0,8	80,0
EV	5	6	3	14	2,4	64,3
HADV	19	18	4	41	6,9	53,7

SARS-CoV-2= Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; H1N1= influenza A subtype; HPIV 1-4= human parainfluenza virüs 1-4; HRV= human rhinovirüs; HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV HKU1, HCoV NL63= human coronavirüs OC43, 229E, HKU1, NL63; HboV= human bocavirüs; HMPV A/B= human metapneumovirüs; RSV=respiratuvar sinsityal virüs A; HpeV= human parechovirüs; EV= enterovirüs, HADV= human adenovirüs



Şekil 1. SARS-CoV-2 negatif ve pozitif hastalarda görülen solunum virüsleri

SARS-CoV-2= Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; H1N1= influenza A subtype; HPIV 1-4= human parainfluenza virüs 1-4; HRV= human rhinovirüs; HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV HKU1, HCoV NL63= human coronavirüs OC43, 229E, HKU1, NL63; HBoV= human bocavirüs; HMPV A/B= human metapneumovirüs; RSV=respiratuvar sinsityal virüs A; HpeV= human parechovirüs; EV= enterovirüs, HADV= human adenovirüs, \*p<0,05

**Tablo 3.** COVID-19 şüpheli hastalarda solunum virüslerinin mevsimlere göre dağılımı n (%)

	Kış		Sonbahar		İlkbahar		Yaz	
	SARS-CoV-2 negatif hastalarda solunum virüsleri	SARS-CoV-2 pozitif hastalarda solunum virüsleri	SARS-CoV-2 negatif hastalarda solunum virüsleri	SARS-CoV-2 pozitif hastalarda solunum virüsleri	SARS-CoV-2 negatif hastalarda solunum virüsleri	SARS-CoV-2 pozitif hastalarda solunum virüsleri	SARS-CoV-2 negatif hastalarda solunum virüsleri	SARS-CoV-2 pozitif hastalarda solunum virüsleri
İnfluenza A	25 (23,6)	2 (15,4)	-	-	2 (1,6)	-	2 (0,8)	-
İnfluenza B	-	-	1 (1,1)	-	-	-	-	-
H1N1	-	-	-	-	1 (0,8)	-	-	-
HPIV 1-4	13 (12,3)	-	8 (9,1)	-	24 (19,2)	-	36 (15)	1 (7,7)
HRV	22 (20,8)	5 (38,5)	22 (25)	-	25 (20)	1 (16,7)	58 (24,2)	1 (7,7)
HCoV OC43	-	1 (7,7)	2 (2,3)	-	3 (2,4)	-	6 (2,5)	-
HCoV 229E	1 (0,9)	-	1 (1,1)	-	1 (0,8)	-	2 (0,8)	-
HCoV NL63	-	-	1 (1,1)	-	-	-	1 (0,4)	1 (7,7)
HCoVHKU1	-	-	-	-	-	-	-	-
HBoV	6 (5,7)	1 (7,7)	2 (2,3)	-	6 (4,8)	-	33 (13,8)	2 (15,4)
HMPV A/B	-	-	2 (2,3)	-	-	-	1 (0,4)	-
RSV A	13 (12,3)	2 (15,4)	4 (4,5)	-	2 (1,6)	-	57 (23,8)	-
HPeV	2 (1,9)	-	-	-	1 (0,8)	-	2 (0,8)	-
EV	7 (6,6)	-	1 (1,1)	-	1 (0,8)	1 (16,7)	4 (1,7)	-
HADV	13 (12,3)	1 (7,7)	8 (9,1)	-	9 (7,2)	1 (16,7)	8 (3,3)	1 (7,7)

SARS-CoV-2 negatif 559 ve SARS-CoV-2 pozitif n=33 hasta bulunmaktadır.

SARS-CoV-2= Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; H1N1= influenza A subtype; HPIV 1-4= human parainfluenza virüs 1-4; HRV= human rhinovirüs; HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV HKU1, HCoV NL63= human coronavirüs OC43, 229E, HKU1, NL63; HBoV= human bocavirüs; HMPV A/B= human metapneumovirüs; RSV=respiratuar sinsiyal virüs A; HpeV= human parechovirüs; EV= enterovirüs, HADV= human adenovirüs

## TARTIŞMA

Koronavirüs enfeksiyonu şüphesi olan hastalarda SARS-CoV-2 ve yaygın solunum yolu virüslerinin değerlendirildiği çalışmamızda %5,6 oranında COVID-19 enfeksiyonu ve %57,6 oranında diğer solunum virüsleri ile enfeksiyon saptanmıştır. COVID-19'dan şüphelenilen hastalarla yapılan birçok çalışmada olduğu gibi çalışmamızda da, diğer solunum virüsleri ile enfeksiyon oranı COVID-19 ile enfeksiyon oranına göre daha yüksek raporlanmıştır (3,8,9).

Çalışmamızda; 18 yaygın solunum virüsü değerlendirildi. SARS-CoV-2 pozitif hastalarda en yaygın görülen solunum virüsü RV (%21,2), HBoV (%9,1) ve HADV (%9,1), SARS-CoV-2 negatif hastalarda RV (%37,2), HPIV (%23,8) ve RSV (%22,3) bulunmuştur. SARS-CoV-2 negatif hastalarda HPIV ve SARS-CoV-2 pozitif hastalarda HCoV NL63 daha fazla oranda görülmüştür. COVID-19 pandemisinde uygulanan önlemler ile çoğu solunum virüsünün görülme oranını azaltmıştır. İnsan rinovirüs/enterovirüsünde ise görülme oranlarında düşüş meydana gelmemiştir (10). Çalışmamızda da en yaygın görülen solunum virüsü



HRV'dir. Kuzey Kaliforniya'da 3-25 Mart 2020 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada; SARS-CoV-2 pozitif hastalarda rinovirüs/enterovirüs (%6,9), respiratuar sinsiyal virüs (%5,2) ve SARS-CoV-2 dışı koronavirüs (%4,3), SARS-CoV-2 negatif hastalarda ise rinovirüs/enterovirüs (%12,1), metapneumovirüs (%4,3) ve SARS-CoV-2 dışı koronavirüs (%3,5) en yaygın görülen virüsler olarak raporlanmıştır (6). İran'da Aralık 2020-Mart 2021 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada ise SARS-CoV-2 pozitif hastalarda en yaygın görülen virüsler HMPV (%7,7), HCoV NL63 (%3,3), RSV (%2,2) ve SARS-CoV-2 negatif hastalarda HMPV (%6,6), HCoV NL63 (%4,7) ve influenza A/B, HKU1, RSV (%1,9) olarak saptanmıştır (11). Virüslerin görülme oranlarındaki farklılığın coğrafi bölge farklılıklarından ve çalışmanın yapıldığı zaman diliminden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda, SARS-CoV-2 pozitif hastalarda negatif hastalara göre RSV'nin görülme oranı daha düşük, influenza A ve HRV'nin görülme oranı daha yüksek görülmüştür. Benzer epidemiyolojik özelliklere sahip bazı virüslerin aynı anda aynı konakta bulunmaları bu virüslerin büyümelerinin engellenmesi ya da baskılanması ile sonuçlanabilir. SARS-CoV-2 ve diğer solunum yolu virüsleri arasında da böyle bir etkileşim olduğu düşünülmektedir. SARS-CoV-2'nin influenza, RSV ve HRV tarafından baskılanmasının araştırıldığı bir matematiksel modelleme çalışmasında RSV'nin SARS-CoV-2'yi baskıladığı, influenza ve HRV'nin ise baskılamaya neden olmadığı raporlanmıştır (12).

Çalışmamızda, SARS-CoV-2 pozitif olan hastaların %48,5'inde diğer solunum virüs birliktelikleri saptanmıştır. Önceki çalışmalarda SARS-CoV-2 pozitif olan hastalarda koenfeksiyon oranı %1,5-%47,2 arasında değişmektedir (6,8,9,13-17). Çalışmamızda diğer solunum virüsleri ile birlikte saptanma oranının birçok çalışmada bildirilenden fazla olması, hasta

profillerinin farklılığından ve çalışmamızın iki yıllık geniş bir aralığı kapsamasından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda, SARS-CoV-2 pozitif hastalarda negatif hastalara göre yaygın solunum virüsleri ile daha yüksek oranda virüs birlikteliği görülmüştür. Bazı çalışmalarda SARS-CoV-2 pozitif hastalarda bazı çalışmalarda ise SARS-CoV-2 negatif hastalarda daha yüksek koenfeksiyon oranları raporlanmıştır (3,18).

Yaygın solunum virüslerinin bir çoğu mevsimsel özellik göstermekle beraber bazıları yıl boyunca görülmeye devam eder (19). İstanbul ilinde 2010-2018 yılları arasında yapılan solunum virüslerinin görülme oranlarının mevsimlere göre değerlendirildiği bir çalışmada influenza A virüsü kış mevsiminde, influenza B ilkbahar'da, RV ilkbahar ve sonbahar, SARS-CoV-2 dışı HCoV'lerin yaz, RSV/A/B kış, HPIV yaz ve sonbahar, HMPV ve HAdV'nin kış mevsiminde saptanan en yaygın etkenler olduğu raporlanmıştır (20). Solunum yolu viral enfeksiyonlarının mevsimselliğine en fazla çevresel ve insan davranışındaki değişiklikler katkıda bulunmaktadır (19). Çalışmamızda, SARS-CoV-2 pozitif ve negatif hastalardaki diğer solunum virüsleri ile enfeksiyonun mevsimsel görülme oranları farklılık göstermektedir. SARS-CoV-2 pozitif hastalarda kış mevsiminde HRV, ilkbaharda HRV, EV, HADV ve yaz'ın HboV ve SARS-CoV-2 negatif hastalarda kış mevsiminde influenza A, sonbahar HRV, ilkbaharda HRV ve HPIV 1-4 ve yaz mevsiminde HRV ve RSV A'nın en yaygın etken olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak; çalışmamızda solunum yolu enfeksiyon etkeni virüs birliktelikleri SARS-CoV-2 pozitif hastalarda daha fazla oranda görülmüştür. Özellikle COVID-19 pandemisinin devam ettiği süreçte solunum yolu viral enfeksiyonu düşünülen hastalarda birden fazla viral etken birlikteliklerinin araştırılması, doğru tedavi yaklaşımının uygulanmasına yardımcı olması açısından yararlı olacaktır.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 07.06.2022, Karar no: E-60116787-020-217419)

**ÇIKAR ÇATIŞMASI**

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**KAYNAKLAR**

1. Charlton CL, Babady E, Ginocchio CC, Hatchette TF, Jerris RC, Li Y, et al. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: Viruses causing acute respiratory tract infections. *Clin Microbiol Rev*, 2018;32(1):e00042-18.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 2020;382(8):727-33.
3. Si Y, Zhao Z, Chen R, Zhong H, Liu T, Wang M, et al. Epidemiological surveillance of common respiratory viruses in patients with suspected COVID-19 in Southwest China. *BMC Infect Dis*, 2020;20(1):688.
4. Lamrani Hanchi A, Guennouni M, Rachidi M, Benhoumich T, Bennani H, Bourrous M, et al. Epidemiology of respiratory pathogens in children with severe acute respiratory infection and impact of the multiplex PCR film array respiratory panel: A 2-year study. *Int J Microbiol*, 2021;2021:2276261.
5. World Health Organization (2021). Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities: interim guidance <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-lab-testing-2021.1-eng> [Erişim Tarihi: 29 May 2022].
6. Kim D, Quinn J, Pinsky B, Shah NH, Brown I. Rates of co-infection between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *JAMA*, 2020;323(20):2085-6.
7. Nowak MD, Sordillo EM, Gitman MR, Paniz Mondolfi AE. Coinfection in SARS-CoV-2 infected patients: Where are influenza virus and rhinovirus/enterovirus? *J Med Virol*, 2020;92(10):1699-700.
8. Schirmer P, Lucero-Obusan C, Sharma A, Sohoni P, Oda G, Holodniy M. Respiratory co-infections with COVID-19 in the Veterans Health Administration, 2020. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2021;100(1):115312.
9. Sapra M, Kirubanandhan S, Kanta P, Ghosh A, Goyal K, Singh MP, et al. Respiratory viral infections other than SARS CoV-2 among the North Indian patients presenting with acute respiratory illness during the first COVID-19 wave. *Virusdisease*, 2022;33(1):57-64.
10. Champredon D, Bancej C, Lee L, Buckrell S. Implications of the unexpected persistence of human rhinovirus/enterovirus during the COVID-19 pandemic in Canada. *Influenza Other Respir Viruses*, 2022 (2):190-2.
11. Veisi P, Shatizadeh Malekshahi S, Choobin H, Jabbari M R, Mohammadi Torbati P. Simultaneous detection of multiple respiratory viruses among SARS-CoV-2-Positive and negative patients by multiplex Taqman one-step real-time PCR. *Jundishapur J Microbiol*, 2022;15(1):e122090.
12. Pinky L, Dobrovolsky HM. Epidemiological consequences of viral interference: a mathematical modeling study of two interacting viruses. *Front Microbiol*, 2022;657.
13. Li Z, Chen ZM, Chen LD, Zhan YQ, Li SQ, Cheng J, et al. Coinfection with SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens in patients with COVID-19 in Guangzhou, China. *J Med Virol*, 2020;92(11):2381-3.
14. Boschi C, Hoang VT, Giraud-Gatineau A, Ninove L, Lagier JC, La Scola B, et al. Coinfections with SARS-CoV-2 and other respiratory viruses in Southeastern France: A matter of sampling time. *J Med Virol*, 2021;93(4):1878-81.
15. Scott SJ, Pfothauer B, Weiner JJ, Hilleshiem J, Khubbar M, Bhattacharyya S. Respiratory pathogen coinfections in SARS-CoV-2-positive patients in Southeastern Wisconsin: A retrospective analysis. *Microbiol Spectr*, 2021;9(2):e0083121.
16. Arguni E, Supriyati E, Hakim MS, Daniwijaya EW, Makrufardi F, Rahayu A, et al. Co-infection of SARS-CoV-2 with other viral respiratory pathogens in Yogyakarta, Indonesia: A cross-sectional study. *Ann Med Surg (Lond)*, 2022;77:103676.
17. İslamoğlu MS, Borku Uysal B. COVID-19 Pandemisinde influenza ve SARS-CoV-2 Ko-infeksiyonu. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2021;78(3):373-8.
18. Hazra A, Collison M, Pisano J, Kumar M, Oehler C, Ridgway JP. Coinfections with SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2020;41(10):1228-9.
19. Moriyama M, Hugentobler WJ, Iwasaki A. Seasonality of respiratory viral infections. *Annu Rev Virol*, 2020;7(1):83-101.
20. Kuşkuç MA, Mete B, Tabak F, Midilli K. Yetişkinlerde solunum yolu viral etkenlerinin 2010-2018 yılları arasındaki prevalansı ve mevsimsel dağılımı. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*, 2020;50(1):21-6.

## The effect of HBeAg positivity on susceptibility in noninvasive methods used to detect liver injury in chronic hepatitis B patients

Kronik hepatit B hastalarında karaciğer hasarını tespit etmek için kullanılan noninvaziv yöntemlerde HBeAg pozitifliğinin duyarlılığa etkisi

Arif Doğan HABİLOĞLU<sup>1</sup> (ID), Yunus GÜRBÜZ<sup>1</sup> (ID), Tülay ÜNVER ULUSOY<sup>1</sup> (ID), Cihad ŞAKAR<sup>1</sup> (ID), İrfan ŞENCAN<sup>1</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** Hepatitis B is a common health problem and deaths from acute or chronic hepatitis B are more than 600,000 per year. Liver damage that develops throughout the course of the disease forms the basis of mortality and morbidity. The most accurate and most difficult method to detect the extent of liver damage is liver biopsy. There are conflicting data in the literature regarding noninvasive methods. In HBeAg+ and HBeAg- patients, liver cell damage develops by different pathophysiological mechanisms. We aimed to find more sensitive results by evaluating HBeAg + and HBeAg - patients in separate groups, which are biomarkers used as an alternative to liver biopsy.

**Methods:** Patients over the age of 18, who were followed by the Infectious Diseases Clinics of Dışkapı Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital and Yıldırım Beyazıt University Yenimahalle Training and Research Hospital between 2010 and 2020, with HBsAg positivity for more than six months and with HBV DNA >2000 IU were evaluated. The patients were divided into two groups according to the presence of HBeAg.

### ÖZET

**Amaç:** Hepatit B yaygın bir sağlık sorunudur ve akut veya kronik hepatit B'den ölümler yılda 600.000'den fazladır. Hastalığın seyri boyunca gelişen karaciğer hasarı, mortalite ve morbiditenin temelini oluşturur. Karaciğer hasarının boyutunu tespit edebilmenin en doğru ve en zor uygulanan metodu karaciğer biyopsisidir. Biyobelirteçlerle geliştirilen noninvaziv metodlar ile ilgili ise literatürde çelişkili veriler mevcuttur. HBeAg+ ve HBeAg- hastalarda karaciğer hücre hasarı farklı fizyopatolojik mekanizmalarla gelişir. Karaciğer biyopsisine alternatif olarak kullanılan biyobelirteçleri HBeAg+ ve HBeAg- hasta gruplarında ayrı ayrı değerlendirilerek daha duyarlı sonuçlara ulaşmayı amaçladık.

**Yöntem:** 2010-2020 yılları arasında Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Yenimahalle Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nde altı aydan uzun süredir HBsAg pozitifliği ile takip edilen 18 yaş üstü ve HBV DNA >2000 IU olan hastalar değerlendirildi. Hastalar HBeAg varlığına göre iki gruba ayrıldı. Daha

<sup>1</sup>Dışkapı Yıldırım Beyazıt Training and Researching Hospital Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Arif Doğan HABİLOĞLU  
Şehit Ömer Halisdemir Caddesi Ankara - Türkiye  
E-posta / E-mail : arifhabiloglu@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 06.06.2022  
Kabul Tarihi / Accepted : 13.04.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.62447

Habiloğlu AD, Gürbüz Y, Ünver Ulusoy T, Şakar C, Şencan İ. The effect of HBeAg positivity on susceptibility in noninvasive methods used to detect liver injury in chronic hepatitis B patients. Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(1): 31 - 44

Afterwards, each group was divided into mild fibrosis or non-fibrosis group with a fibrosis score of less than 3, and patients with a score of 3 and above in the advanced fibrosis group, according to the histologically determined treatment indication. Indirect fibrosis indicators were evaluated separately in all patients and in all subgroups.

**Results:** 191 CHB patients were included in the study. 89 male and 102 female patients comprised the entire cohort. Among the patients, there were 89 patients with fibrosis 3 or more, and 102 patients with fibrosis below 3. There were 48 HBeAg positive patients in the whole patient group and the patients were equally distributed regardless of fibrosis. No noninvasive marker was found to detect fibrosis in the entire cohort, only the histological activity index was associated with fibrosis. In the HBeAg-positive patient group, the API score, which increased with aging and low platelet counts, was associated with fibrosis, while in the HBeAg-negative patient group, total protein was associated with fibrosis.

**Conclusion:** Determining fibrosis by non-invasive methods in chronic hepatitis B patients is important as it can be an alternative to biopsy for patient follow-up and treatment. When evaluating noninvasive methods that can detect liver damage, we emphasize the importance of evaluating patients by dividing them into appropriate subgroups. More studies are needed to determine the appropriate biomarkers to detect the severity of fibrosis in chronic hepatitis B patients.

**Key Words:** Chronic hepatitis B, biomarker, fibrosis, HBeAg

sonra her grup histolojik olarak Modifiye İshak Skoruna göre fibrozis skoru 3'ün altında olan ve fibrozis skoru 3 ve üzeri olan hastalar olmak üzere ikiye ayrıldı. Fibrozis göstergesi olabilecek biyobelirteçler tüm hastalarda ve tüm alt gruplarda ayrı ayrı değerlendirildi.

**Bulgular:** Çalışmaya 191 KHB hastası dahil edildi. Tüm kohortu 89 erkek ve 102 kadın hasta oluşturdu. Hastalar arasında fibrozis skoru 3 veya daha fazla 89 hasta ve fibrozis skoru 3 den az 102 hasta değerlendirildi. Tüm hasta grubunda 48 HBeAg pozitif hasta vardı ve hastalar fibrozis skorundan bağımsız eşit olarak dağılmıştı. Tüm kohortta gruplara ayrılmadan yapılan incelemede fibrozis şiddetini saptayacak invaziv olmayan bir belirteç bulunmadı, sadece histolojik aktivite indeksi fibrozis ile ilişkilendirildi. Gruplara ayrıldıktan sonra HBeAg pozitif hasta grubunda API skoru fibrozis ile ilişkilendirilirken, HBeAg negatif hasta grubunda total protein fibrozis ile ilişkilendirildi.

**Sonuç:** Kronik Hepatit B hastalarında fibrozis şiddetini invaziv olmayan metodlarla belirlemek hasta takip ve tedavisi için biopsiye alternatif olabileceğinden önemlidir. Bu çalışmada karaciğer hasarını tespit edebilecek noninvaziv metodlar değerlendirilirken hastaları uygun alt gruplara ayırarak değerlendirmenin önemine değinıyoruz. Kronik Hepatit B hastalarında fibrozisin şiddetini etkin şekilde saptayacak biyobelirteçlerin tespiti için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Kronik hepatit B, biyobelirteç, fibrozis, HBeAg

## INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection is a significant health problem worldwide. More than 600 thousand patients die annually due to acute or chronic HBV infections and related complications (1). Currently,

chronic HBV infection, which is moderately endemic in Turkey, is present in more than 350 million people worldwide (2). Although chronic HBV infection can usually cause cirrhosis or hepatocellular carcinoma, it may also present with a clinical picture including persistent viremia with normal aminotransferase

levels and liver histology. (3). While HBV continues to multiply in liver cells during the chronic infection process, liver damage develops mainly secondary to the body's immune response through T cells (4). The Hepatitis B antigen (HBeAg) is an antigenic component of HBV that indicates viral replication and cannot be continuously detected in chronic HBV infection (5). It has been shown that HBeAg suppresses T cells, and the immune mechanism leading to its clearance has not been clarified yet. This antigen suppresses cellular immunity, allowing viral particles to multiply and accumulate in hepatocytes, developing direct cytopathic effects (6, 7). Otherwise cellular immune response in CHB patients mostly develops after HBeAg clearance, with decreased suppressive effects of this antigen on T cells and liver cell cytopathy of cellular immunity.

It was previously suggested that non-invasive markers such as aspartate aminotransferase (AST)/thrombocyte (PLT), red cell distribution width (RDW)/PLT, AST/alanine aminotransferase (ALT) and neutrophil/lymphocyte ratio could predict liver damage (2,8,9). These studies investigated the efficacy of noninvasive biomarkers in predicting liver fibrosis, but did not compare them between HBeAg positive and negative patients. In addition, since different pathophysiological processes can lead to liver damage, the sensitivities of these non-invasive indicators may differ in various settings.

It is widely accepted that the introduction of non-invasive markers with high sensitivity can negate the need for liver biopsy and facilitate the treatment and follow-up of patients with liver damage. Therefore, this study aimed to compare the efficacy of the non-invasive markers in predicting liver fibrosis between HBeAg positive and HBeAg negative patients.

## MATERIAL and METHOD

Data of the adult (age>18) patients who were followed-up at the Infectious Diseases and Clinical Microbiology departments of the Ankara Diskapi

Yildirim Beyazit Training and Research Hospital and Yildirim Beyazit University Yenimahalle Training and Research Hospital were retrospectively reviewed. Patients who were followed-up between January 2010 and December 2020 with the diagnosis of HBsAg positive chronic HBV infection for more than six months constituted the target population of this study. All patients had an HBV DNA level of higher than 2000 IU. All study participants were naive chronic HBV (CHB) patients. Patients who consume alcohol regularly, are on or anti-inflammatory drugs, and had a history of antiviral use, kidney failure, chronic inflammatory disease, diabetes mellitus, malignancy, or other liver disease were excluded.

Demographic, laboratory and radiological data of the study participants were retrieved from computerized patient databases of the hospitals and the Türkiye Ministry of Health.

All study participants had undergone a liver biopsy, and experienced histopathologists assessed the specimens by histological activity index (HAI) and fibrosis scoring via the modified Ishak scoring system (10,11). First, the patients were divided into two groups as per the presence or absence of HBeAg. Subsequently, each group was divided into "mildly fibrous" or "non-fibrous" (i.e., fibrosis score <3) and "advanced fibrosis" (i.e., fibrosis score ≥3) subgroups based on the fibrosis scores.

Laboratory data at the time of biopsy included the measurements of serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin, total protein, platelet, globulin, international normalization ratio (INR), leukocyte, lymphocyte, neutrophil, alpha-fetoprotein (AFP), HBV DNA levels, red cell distribution volume (RDW) and platelet distribution volume (PDW).

Indirect fibrosis indicators were calculated using the following formulas: neutrophil/lymphocyte ratio, AST-platelet ratio index (APRI) [(AST/AST upper limit)/PLT (109/L)×100], and age-platelet index (API) [Age< 30:0, age 30-39:1, 40-49:2, 50-59:3, 60-69:4, age>70:5, PLT count (109/L): ≥225:0, 200-224:1,

175-199:2, 150-174:3, 125-149:4, PLT count $\leq$ 125:5. The index is calculated by summing the scores of regarding age and PLT counts] (12-18).

Anti HBe were analyzed by chemiluminescent microparticle immunoassay kits (ARCHITECT i2000 system; ARCHITECT, Abbott Park, Wiesbaden-Delkenheim, Germany), and HBV-DNA levels were analyzed by LightCycler real-time polymerase chain reaction (PCR) System (Corbett Research Rotor Gene 6000 and HBV QS-RGQ Kit, Qiagen, Germany). HBV DNA PCR results were reported as international units (IU).

All statistical analyzes were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software (IBM SPSS Statistics v24). Frequency tables and descriptive statistics were used for the interpretation of the data. The independent samples t-test (t-table value) was used to compare two independent groups. The Analysis of Variance (ANOVA) test (F-table value) method was used to compare three or more independent groups. The Tukey test was performed for pairwise comparisons of the variables with significant differences between three or more groups. Two independent groups were compared using the Mann-Whitney U test (Z-table value) as per non-parametric methods. A comparison of three or more independent groups was made by performing the Kruskal-Wallis H test ( $\chi^2$ -table value). Bonferroni correction was used for pairwise comparisons of three or more groups with significantly different variables. Pearson- $\chi^2$  cross tables were used to analyze the relationships between qualitative variables. Backward LR model was used for binary logistic regression analysis to determine the factors affecting the treatment requirement and cirrhosis status (i.e., fibrosis scores). Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to determine the variables' diagnostic values.

The study was approved by the Ankara Yildirim Beyazit Training and Research Hospital Clinic Researches Ethics Committee (Date: 05.04.2021 and Number: 108/04).

## RESULTS

After applying the inclusion and exclusion criteria, 191 patients were included in the study. Among these patients, 89 were male, and 102 were female. The mean age of all patients was 45,57. Histopathological examinations revealed that 89 patients had fibrosis scores of three or higher, while 102 patients had scores of less than three. Demographic, histopathological, and laboratory data of these patients are displayed in Table 1. In the multiple regression performed between two groups, no biomarkers that could indicate fibrosis were detected (Table 2).

There were 48 patients in the HBeAg positive and 143 in the HBeAg negative patient groups. The rate of the patients with fibrosis scores of 3 or above was 52.1% (n=25) and 44,8% (n=64) in the HBeAg positive and HBeAg negative patient groups, respectively (p>0,05) (Table 3).

Fibrosis-related parameters were compared between HBeAg positive and negative patient groups. A statistically significant difference was found in the HBeAg negative patient group in terms of AST, ALT, globulin, total protein, AFP, HBV DNA, HAI, and APRI scores (p<0.05) (Table 4).

The logistic regression analysis revealed that HAI and serum total protein levels were significantly associated with fibrosis scores, and the cut-off value was 5.5 as per ROC analysis (p<0.05, OR=2.123, p<0.05, OR=10.516) (Table 5, Figure 1).

Comparison of demographic and laboratory parameters according to fibrosis scores in HBeAg positive patients revealed that the two groups differed significantly in terms of age, AST, ALT, HAI, API and APRI (p<0.05) (Table 6).

The logistic regression analysis elucidated that HAI and APRI scores were significantly associated with fibrosis; the cut-off value was 5.5 as per ROC analysis (p<0.05, OR=2.944, p<0.05, OR=5.512) (Table 7) (Figure 2).

**Table 1.** Comparison of the demographic and laboratory parameters as per fibrosis scores

	Fibrosis<3 (n=102)		Fibrosis≥ 3 (n=89)		Statistical Analysis *
	$\bar{X} \pm S. S.$	Median [IQR]	$\bar{X} \pm S. S.$	Median [IQR]	
Age (year)	44.17±12.17	44.0 [20.0]	47.19±14.81	48.0 [23.0]	t=-1.549 p=0.123
AST	32.60±34.70	24.5 [12.3]	62.80±70.52	36.0 [46.5]	Z=-5.23 p=0.000
ALT	38.34±75.72	23.7 [18.1]	68.94±72.10	43.0 [53.0]	Z=-5.224 p=0.000
PLT	236.59±57.73	235.0 [76.8]	231.18±63.68	218.0 [89.0]	Z=-0.586 p=0.558
Neutrophil	4638.33±1446.77	4505.0 [1945.0]	4911.12±1504.76	4900.0 [2045.0]	t=-1.276 p=0.204
Leukocyte	7147.06±1685.01	7110.0 [2345.0]	7494.72±1991.73	7210.0 [2760.0]	Z=-0.903 p=0.367
Lymphocyte	2248.13±655.79	2120.0 [800.0]	2395.76±861.86	2190.0 [1000.0]	Z=-1.056 p=0.291
INR	1.04±0.09	1.0 [0.1]	1.18±1.19	1.0 [0.1]	Z=-0.200 p=0.842
RDW	13.69±1.66	13.4 [1.7]	14.34±4.66	13.5 [1.6]	Z=-0.706 p=0.480
PDW	22.10±14.55	16.3 [2.1]	20.45±11.10	16.4 [1.5]	Z=-0.952 p=0.341
Albumin	4.34±0.34	4.4 [0.4]	5.09±5.55	4.3 [0.5]	Z=-1.227 p=0.220
Globulin	3.00±0.40	3.1 [0.6]	3.22±0.42	3.2 [0.4]	t=-2.861 p=0.005
Total protein	7.41±0.49	7.4 [0.7]	7.57±0.54	7.6 [0.6]	t=-1.625 p=0.107
AFP	2.77±1.65	2.4 [2.1]	3.34±2.03	3.0 [2.1]	Z=-2.109 p=0.035
HBV DNA	5.56±1.79	4.8 [1.6]	6.42±1.99	6.0 [3.2]	Z=-3.568 p=0.000
HAI	4.70±2.05	4.0 [3.0]	7.73±2.56	7.0 [3.0]	Z=-7.938 p=0.000
API score	2.81±1.81	3.0 [2.3]	3.45±2.12	3.0 [3.0]	Z=-2.061 p=0.039
APRI	0.39±0.48	0.3 [0.2]	0.76±0.94	0.4 [0.7]	Z=-4.652 p=0.000
Neutrophil/ Lymphocyte	2.20±0.89	2.0 [1.1]	2.22±0.95	2.1 [0.9]	Z=-0.164 p=0.870
Platelet/ Lymphocyte	0.113±0.040	0.110 [0.004]	0.107±0.045	0.099 [0.050]	Z=-1.519 p=0.129
AST/ALT	1.06±0.42	1.0 [0.5]	1.02±0.49	0.9 [0.5]	Z=-1.299 p=0.194
RDW/Platelet	0.061±0.015	0.059 [0.020]	0.066±0.028	0.061 [0.020]	Z=-0.991 p=0.322
INR/Platelet	0.004±0.001	0.005 [0.000]	0.006±0.005	0.005 [0.000]	Z=-0.883 p=0.377

\* "Independent Sample-t" test (t-table value) statistics were used to compare two independent groups with normal distribution. "Mann-Whitney U" test (Z-table value) statistics were used to compare two independent groups with non-normal distribution. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, PLT: platelet, RDW: Red Cell Distribution Width, PDW: Platelet Distribution Width, AFP: alpha fetoprotein, HAI: histological activity index, API: age-platelet index, APRI: spartate aminotransferase platelet ratio index.

**Table 2.** Results of the logistic regression model based on fibrosis scores

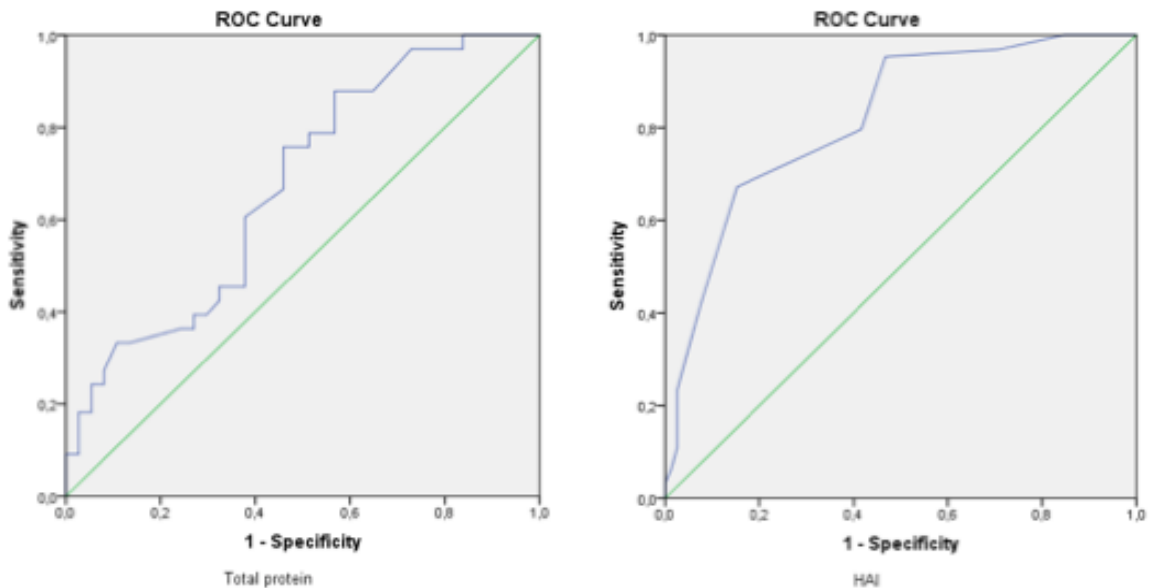
Variable	B	S.H.	Wald	sd	p	OR	95% Confidence Interval (OR)	
							Lower limit	Upper limit
AST	0.028	0.017	2.834	1	0.092	1.029	0.995	1.063
ALT	-0.011	0.007	2.532	1	0.112	0.989	0.975	1.003
Globulin	1.294	0.671	3.723	1	0.054	3.648	0.980	13.582
HAI	0.675	0.151	19.847	1	0.000	1.963	1.459	2.642
	-8.599	2.326	13.663	1	0.000			
$\chi^2_{(8)}=3.525$ ; $p=0.897$								

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, HAI: histological activity index

**Table 3.** Analysis of the relationships between HbeAg status and fibrosis scores

Hbe Ag	Negative (n=143)		Positive (n=48)		Statistical Analysis *
	n	%	n	%	
Fibrosis<3	79	55.2	23	47.9	$\chi^2=0.509$ $p=0.476$
Fibrosis≥3	64	44.8	25	52.1	

\* "Pearson- $\chi^2$ " crosstabs were used to examine the relationships between two qualitative variables.



Variable	Area	Standard error	p	AUC %95 G.A.		Cut-off value
				Down	Up	
Total protein	0.673	0.064	0.013	0.548	0.798	7.5
HAI score	0.819	0.035	0.000	0.751	0.888	5.5

HAI: histological activity index

**Figure 1.** Determination of the serum total protein level and HAI score cut-off values by ROC analysis and comparison of parameters based on fibrosis scores in HbeAg negative patients



**Table 4.** Comparison of the demographic and laboratory parameters as per fibrosis scores in HbeAg negative patients

Variable	Fibrosis<3 (n=79)		Fibrosis≥ 3 (n=64)		Statistical Analysis *
	$\bar{X} \pm S. S.$	Median [IQR]	$\bar{X} \pm S. S.$	Median [IQR]	
Age (year)	44.09±11.88	45.0 [20.0]	44.97±15.66	45.5 [26.0]	t=-0.371 p=0.711
AST	31.54±26.14	25.0 [13.0]	64.70±73.65	38.5 [54.3]	Z=-4.847 p=0.000
ALT	32.28±25.07	24.0 [17.8]	67.35±63.54	46.0 [51.8]	Z=-4.737 p=0.000
PLT	234.34±58.82	235.0 [82.0]	233.97±62.55	216.0 [93.8]	Z=-0.146 p=0.884
Neutrophil	4571.77±1427.62	4500.0 [1910.0]	4920.94±1536.98	4900.0 [2047.5]	t=-1.405 p=0.162
Leukocyte	7161.14±1598.29	7120.0 [2010.0]	7630.78±20.73	7300.0 [2867.5]	t=-1.489 p=0.139
Lymphocyte	2291.27±604.45	2160.0 [850.0]	2448.64±915.34	2240.0 [1020.0]	Z=-0.808 p=0.419
INR	1.04±0.10	1.0 [0.1]	1.23±1.40	1.1 [0.1]	Z=-0.325 p=0.745
RDW	13.63±1.63	13.3 [1.8]	14.34±5.26	13.5 [1.6]	Z=-0.674 p=0.500
PDW	23.56±15.88	16.3 [3.8]	22.15±12.76	16.6 [3.6]	Z=-0.862 p=0.388
Albumin	4.33±0.35	4.4 [0.4]	5.41±6.53	4.3 [0.5]	Z=-1.027 p=0.305
Globulin	2.96±0.40	3.0 [0.6]	3.27±0.39	3.2 [0.5]	t=-3.191 p=0.002
Total protein	7.36±0.51	7.4 [0.9]	7.68±0.43	7.6 [0.7]	t=-2.804 p=0.007
AFP	2.59±1.61	2.2 [1.9]	3.29±2.04	2.9 [2.2]	Z=-2.380 p=0.017
HBV DNA	5.72±1.82	4.8 [1.7]	6.86±1.88	6.9 [3.3]	Z=-3.952 p=0.000
HAI	4.80±2.13	4.0 [3.0]	7.67±2.46	7.0 [3.0]	Z=-6.616 p=0.000
API score	2.91±1.88	3.0 [2.0]	3.16±2.22	3.0 [4.0]	Z=-0.446 p=0.656
APRI	0.39±0.41	0.3 [0.2]	0.76±0.96	0.4 [0.1]	Z=-4.089 p=0.000
Neutrophil/Lymphocyte	2.09±0.76	1.9 [1.0]	2.17±0.95	2.0 [0.8]	Z=-0.386 p=0.700
Platelet/Lymphocyte	0.109±0.036	0.107 [0.050]	0.105±0.038	0.099 [0.040]	Z=-1.009 p=0.313
AST/ALT	1.07±0.44	1.0 [0.6]	1.05±0.55	0.9 [0.6]	Z=-1.039 p=0.299
RDW/Platelet	0.062±0.017	0.060 [0.020]	0.064±0.023	0.060 [0.030]	Z=-0.451 p=0.652
INR/Platelet	0.005±0.001	0.005 [0.000]	0.006±0.005	0.005 [0.000]	Z=-0.583 p=0.560

\* "Independent Sample-t" test (t-table value) statistics were used to compare two independent groups with normal distribution. "Mann-Whitney U" test (Z-table value) statistics were used to compare two independent groups with non-normal distribution. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, PTL: platelet, RDW: Red Cell Distribution Width, PDW: Platelet Distribution Width, AFP: alpha fetoprotein, HAI: histological activity index, API: age-platelet index, APRI: spartate aminotransferase platelet ratio index.

**Table 5.** Results of the logistic regression model in HbeAg negative patients based fibrosis scores

Variable	B	S.H.	Wald	sd	p	OR	95% Confidence Interval (OR)	
							Lower limit	Upper limit
AST	0.050	0.037	1.766	1	0.184	1.051	0.977	1.131
Total protein	2.353	0.943	6.226	1	<b>0.013</b>	10.516	1.656	36.764
HAI	0.753	0.214	12.392	1	<b>0.000</b>	2.123	1.396	3.229
APRI	-3.055	2.961	1.064	1	0.302	0.047	0.000	15.624
	-23.108	7.786	8.808	1	0.003	0.00		

$\chi^2_{(8)}=8.307$ ;  $p=0.404$

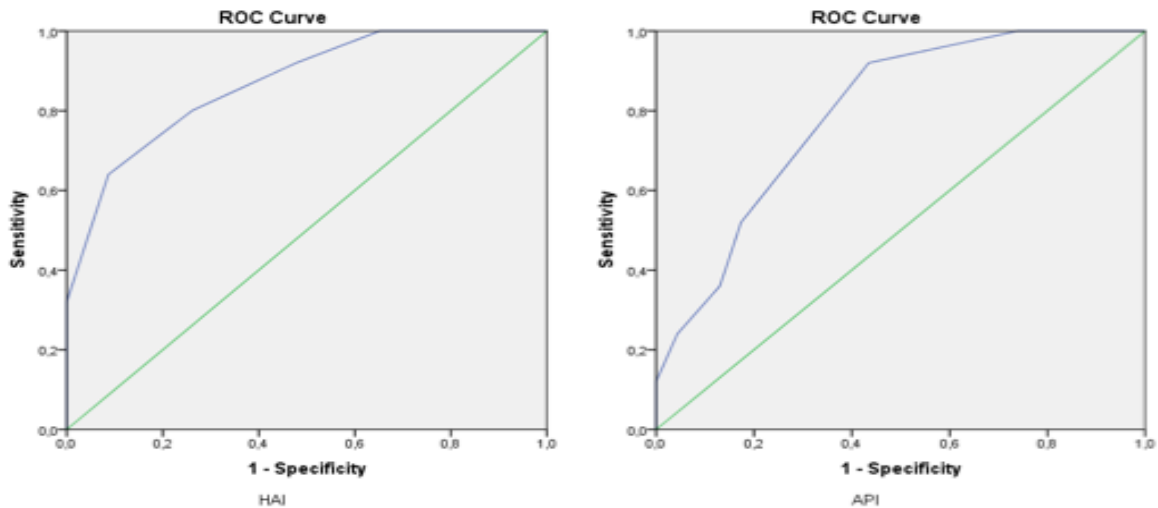
AST: aspartate aminotransferase, HAI: histological activity index, APRI: spartate aminotransferase platelet ratio index.

**Table 7.** Results of the logistic regression model in HbeAg positive patients based on treatment risk status and fibrosis scores

	B	S.H.	Wald	sd	p	OR	95% Confidence Interval (OR)	
							Lower limit	Upper limit
Age(year)	-0.119	0.072	2.733	1	0.098	0.888	0.771	1.022
HAI	1.080	0.373	8.395	1	<b>0.004</b>	2.944	1.418	6.113
API score	1.707	0.772	4.887	1	<b>0.027</b>	5.512	1.214	25.033
	-5.504	2.134	6.654	1	0.010	0.004		

$\chi^2_{(8)}=3.615$ ;  $p=0.890$

HAI: histological activity index, APRI: spartate aminotransferase platelet ratio index.



Varibale	Area	Standard error	p	AUC %95 G.A.		Cut-off value
				Down	Up	
HAI score	0.869	0.050	<b>0.000</b>	0.771	0.966	5.5
API score	0.794	0.065	<b>0.000</b>	0.666	0.922	2.5

HAI: histological activity index, APRI: spartate aminotransferase platelet ratio index.

**Figure 2.** Determination of the HAI and API score cut-off values by ROC analysis based on fibrosis scores in HbeAg positive patients

**Table 6.** Comparison of the demographic and laboratory parameters as per fibrosis scores in HbeAg positive patients

Category-1 Variable	Fibrosis<3 (n=23)		Fibrosis≥ 3 (n=25)		Statistical analysis* Probability
	$\bar{X} \pm S. S.$	Medyan [IQR]	$\bar{X} \pm S. S.$	Medyan [IQR]	
Age (year)	44.43±13.41	43.0 [21.0]	52.88±10.66	52.0 [15.0]	t=-2.426 p=0.019
AST	36.25±55.56	24.0 [10.0]	57.96±62.97	31.0 [39.5]	Z=-2.426 p=0.015
ALT	59.17±153.33	23.0 [19.0]	72.99±91.87	34.0 [62.5]	Z=-2.291 p=0.022
PLT	244.35±54.36	234.0 [64.0]	224.04±67.28	218.0 [83.5]	t=1.144 p=0.259
Neutrophil	4866.96±1520.83	4800.0 [3010.0]	4886.00±1449.31	4700.0 [2080.0]	Z=-0.175 p=0.861
Leukocyte	7098.70±1993.65	7100.0 [3110.0]	7146.40±1755.52	7100.0 [1650.0]	t=-0.088 p=0.930
Lymphocyte	2100.00±805.86	2000.0 [830.0]	2260.40±705.46	2100.0 [1035.0]	Z=-0.951 p=0.342
INR	1.05±0.08	1.0 [0.1]	1.07±0.13	1.0 [0.1]	Z=-0.010 p=0.992
RDW	13.92±1.79	13.5 [1.5]	14.35±2.72	13.5 [1.4]	Z=-0.093 p=0.926
PDW	17.14±6.79	16.5 [1.0]	16.23±1.35	16.4 [0.7]	Z=-0.031 p=0.975
Albumin	4.38±0.30	4.5 [0.4]	4.26±0.43	4.3 [0.5]	Z=-0.671 p=0.502
Globulin	3.06±0.41	3.1 [0.7]	3.16±0.45	3.1 [0.5]	Z=-0.407 p=0.684
Total protein	7.50±0.46	7.5 [0.6]	7.41±0.64	7.5 [0.5]	Z=-0.275 p=0.783
AFP	3.39±1.68	3.0 [2.5]	3.47±2.05	3.1 [1.9]	Z=-0.268 p=0.788
HBV DNA	5.03±1.65	4.8 [1.9]	5.32±1.85	5.3 [3.0]	t=-0.558 p=0.579
HAI	4.35±1.72	4.0 [3.0]	7.88±2.85	7.0 [3.5]	Z=-4.407 p=0.000
API score	2.48±1.47	2.0 [2.0]	4.20±1.66	4.0 [2.5]	Z=-3.573 p=0.000
APRI	0.42±0.68	0.3 [0.2]	0.77±0.90	0.4 [0.6]	Z=-2.035 p=0.042
Neutrophil/ Lymphocyte	2.56±1.19	2.2 [1.4]	2.34±0.95	2.3 [1.1]	Z=-0.599 p=0.550
Platelet/ Lymphocyte	0.130±0.051	0.114 [0.040]	0.112±0.057	0.096 [0.060]	Z=-1.372 p=0.170
AST/ALT	1.02±0.34	1.0 [0.6]	0.95±0.28	0.9 [0.4]	t=0.806 p=0.425
RDW/Platelet	0.059±0.011	0.061 [0.020]	0.072±0.037	0.062 [0.020]	Z=-1.073 p=0.283
INR/Platelet	0.005±0.001	0.004 [0.000]	0.006±0.003	0.004 [0.000]	Z=-0.836 p=0.403

\* “Independent Sample-t” test (t-table value) statistics were used to compare two independent groups with normal distribution. “Mann-Whitney U” test (Z-table value) statistics were used to compare two independent groups with non-normal distribution. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, PLT: platelet, RDW: Red Cell Distribution Width, PDW: Platelet Distribution Width, AFP: alpha fetoprotein, HAI: histological activity index, API: age-platelet index, APRI: spartate aminotransferase platelet ratio index.

## DISCUSSION

This study aimed to evaluate the sensitivity of the biomarkers predicting the severity of liver fibrosis between HBeAg positive and HBeAg negative patients. Analysis of the entire cohort -without grouping as per HBeAg positivity- revealed that none of the biomarkers assessed was found to be related to the severity of fibrosis. However, after dividing the entire group into two according to the presence or absence of the HBeAg antigen, our analysis revealed that the API scores were associated with the fibrosis scores in HBeAg positive patients. On the other hand, serum total protein levels were associated with the fibrosis scores in the HBeAg negative patient group. Our results show that noninvasive fibrosis assessment methods should be performed in separate groups in HBeAg positive and HBeAg negative patients. They also imply that different biomarkers should be used to assess fibrosis severity in these two patient populations.

Detection and accurate assessment of the severity of liver fibrosis in CHB patients is essential for initiation of therapy (19). Although these assessments are conventionally performed by liver biopsies, the use of non-invasive markers predicting the presence and severity of fibrosis can help avoid unnecessary biopsies and related complications (20). It was postulated that HBV was not cytopathic and HBV-related liver damage developed via cytotoxic T cells (21). The resultant inflammation induces liver fibrosis in the chronic period (22). It is known that elevated serum total protein levels can be associated with acute and chronic infections (23). In line with this, we found a significant relationship between elevated serum total protein levels and liver fibrosis in our HBeAg negative patients in our study. The high total protein level is indicated in the literature that can be seen in chronic infections such as viral hepatitis (24). It was stated that serum total protein increased even in hepatotoxicity, which is known to develop severe inflammation in the liver, except for infectious factors (25,26). It was previously reported that in

patients with HBV, the serum profile of both globulins and proteins other than globulins differed according to the degree of liver fibrosis (27-29). However, these studies did not compare the serum total protein values between HBeAg positive and HBeAg negative patients. In line with this, we found a significant correlation between high serum total protein, which can be a sign of the severity of liver inflammation, and liver fibrosis in our HBeAg-negative patients in our study.

It is known that the immune processes are different between HBeAg positive and HBeAg negative patients (30). This antigen has immunomodulatory effects, suppresses T cell-mediated immunity, and helps in developing tolerance in the host immune response against HBV (30). It also attenuates the CD4+ T helper cell response by several mechanisms, including clonal deletion of HBV-specific T cells and immune depletion (6). Since HBeAg suppresses HBV-specific immunity, it facilitates viral replication and is considered an indicator of viral replication (5). As replication continues, the accumulation of the envelope particles in the hepatocytes leads to the formation of ground glass appearance in the hepatocytes histopathologically (31). Since the extent of this damage will increase over time, not surprisingly, age is a significant risk factor for liver fibrosis during CHB (27). The fact that advanced patient age was considered one of the main criteria for determining the optimal treatment option in the international guidelines is consistent with our findings (32). We found a significant correlation between API and fibrosis scores, and the ROC analysis revealed a cut-off value of 2,5 in the diagnosis of advanced fibrosis. In a study conducted using Fibroscan, age was an independent risk factor for fibrosis in HBeAg positive patients (33). Erdoğan et al. (34) reported that the API score was insufficient to detect fibrosis in CHB patients. However, it should be considered that only 15% of their study participants were HBeAg positive. Kim et al. worked on patients 55% of whom were HBeAg positive, and noted that API was significantly associated with

fibrosis (35). In our study, HbeAg positive patients constituted 25% of the entire cohort. However, analysis of the 48 HbeAg positive patients elucidated that API could be used to detect liver fibrosis.

Some studies suggested that low platelet counts were associated with advanced liver fibrosis (36). For example, Kekilli et al. (8) found that the mean platelet count in the advanced fibrosis group was significantly lower than counts in the mild fibrosis and non-fibrosis group. On the contrary, some studies suggested that platelet count was not related to the degree of fibrosis (14, 20). Although the exact relationship between low platelet count and significant liver inflammation has not yet been clarified, it has been reported that platelets could attract the inflammatory cells to the liver parenchyma in the setting of HBV infection (37). In our study, platelet count was not associated with liver fibrosis.

Some studies worked on RDW and reported that RDW and RDW/PLT ratios were independent predictors of fibrosis scores in CHB patients (37, 38). Nevertheless, we did not find an association between these parameters and fibrosis scores in our study.

World Health Organization (WHO) guidelines recommended using APRI to predict liver fibrosis severity in patients with CHB (39). It was also stated that APRI was particularly useful in hepatitis C disease, and hepatitis B and hepatitis C were different diseases regarding prognosis, histopathological findings, and the manifestation of fibrosis (40). However, there are conflicting results in the literature for the APRI score, and it was stated that this biomarker was not cost-effective for predicting advanced fibrosis (41). The APRI was associated with fibrosis severity in univariate analysis in all groups in our study. However, in multivariate analysis, no relationship was found between fibrosis severity and APRI in any patient group.

The N/L ratio is an inexpensive indicator that

provides clues about the immune response to CHB and about disease progression (13). Alkhouri et al. (12) reported a significant association between N/L ratio and fibrosis severity in nonalcoholic steatohepatitis patients. However, the literature reported conflicting results regarding the relationship between N/L ratio and fibrosis severity in CHB patients (42). Yilmaz et al. (42) stated that the N/L ratio could be used as a sensitive marker to predict the severity of fibrosis in CHB. On the other hand, some other studies did not find a significant relationship between the N/L ratio and fibrosis severity (43,44). In line with these findings, we did not find an association between the N/L ratio and fibrosis.

Our study has some limitations which need to be considered while evaluating its findings. First, it is a single-centered study with a retrospective design. Second, it should be considered that, since different HBV strains have different HBV integration patterns, fibrogenic processes may also be different among these strains (3, 45).

Despite these limitations, our findings showed that API score predicted liver fibrosis with high sensitivity and specificity in HbeAg positive patients. While analysis of our entire cohort without grouping revealed that none of the biomarkers could predict liver fibrosis, assessments performed after grouping as per HbeAg positivity revealed that different biomarkers could be used for predicting liver fibrosis in these patient groups. While API could predict liver fibrosis with high sensitivity and specificity in HbeAg positive patients, high serum total protein levels were associated with fibrosis in HbeAg negative patients. Therefore, we suggest that patients with CHB should be grouped based on HbeAg status before performing a liver biopsy, and different biomarkers should be used for predicting the severity of liver fibrosis in these patient groups.

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* The study was approved by the Ankara Yildirim Beyazit Training and Research Hospital Clinic Researches Ethics Committee (Date: 05.04.2021 and Number: 108/04).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev.* 2006;28:112-25.
2. Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci.* 2005;2(1):50-7.
3. Agarwal K, Berg T, Buti M, Janssen H, Lampertico P, Papatheodoridis G, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;67(2): 370-98.
4. Trépo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *The Lancet.* 2014, 384.9959: 2053-63.
5. Kramvis A, Kostaki EG, Hatzakis A, Paraskevis D. Immunomodulatory function of HBeAg related to short-sighted evolution, transmissibility, and clinical manifestation of hepatitis B virus. *Frontiers in microbiology.* 2018; 9: 2521.
6. Lok ASF. Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *J Hepatol.* 2000; 32: 89- 97.
7. Zhang YY, Hu K. Rethinking the pathogenesis of hepatitis B virus (HBV) infection. *J Med Virol.* 2005; 87(12): 1989-99.
8. Kekilli M, Tanoglu A, Sakin YS, Kurt M, Ocal S, Bagci S. Is the neutrophil to lymphocyte ratio associated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B? *World J Gastroenterol.* 2015; 21.18: 5575.
9. Wang J, Yan X, Yang, Y, Chang H, Jia B, Zha, XA, et al. A novel predictive model using routinely clinical parameters to predict liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B *Oncotarget.* 2017; 8.35: 59257.
10. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1995; 22: 696-9.
11. Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Brown RS et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology.* 2018;67(4):1560-99.
12. Alkhouri N, Morris-Stiff G, Campbell C, Lopez R, Tamimi TA, Yerian L, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio: New marker for predicting steatohepatitis and fibrosis in patient with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2012;32(2):297-302.
13. Zhao Z, Liu J, Wang J, Xie T, Zhang Q, Feng S, et al. Platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) and neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) are associated with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *International Immunopharmacology.* 2017;51:1-8.
14. Chen B, Ye B, Zhang J, Ying L, Chen Y. RDW to platelet ratio: a novel noninvasive index for predicting hepatic fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B. *PLoS One.* 2013;8(7):e68780.

15. Ding R, Zheng J, Huang D, Wang Y, Li X, Zhou X, et al. INR-to-platelet ratio (INPR) as a novel noninvasive index for predicting liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Int J Med Sci*, 2021;18(5):1159-1166.
16. Zhijian Y, Hui L, Weiming Y, Zhanzhou L, Zhong C, Jinxin, Z, et al. Role of the aspartate transaminase and platelet ratio index in assessing hepatic fibrosis and liver inflammation in adolescent patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterol Res Pract*, 2015; 2015: 906026.
17. Bonacini M, Hadi G, Govindarajan S, Lindsay KL, Am J. Gastroenterol Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*, 1997;92(8):1302-4.
18. Tseng PL, Wang JH, Hung CH, Tung HD, Chen TM, Huang WS, et al. Comparisons of noninvasive indices based on daily practice parameters for predicting liver cirrhosis in chronic hepatitis B and hepatitis C patients in hospital and community populations. *Kaohsiung J Med Sci*, 2013;29(7):385-95.
19. Branchi F, Conti CB, Baccarin A, Lampertico P, Conte D. Non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*, 2014; 20(40): 14568-80.
20. Park SH, Kim CH, Kim DJ, Suk KT, Cheong JY, Cho SW, et al. Usefulness of multiple biomarkers for the prediction of significant fibrosis in chronic hepatitis B. *J Clin Gastroenterol*, 2011; 45(4): 361-5.
21. Neumann-Haefelin C, Thimme R. Entering the spotlight: hepatitis B surface antigen-specific B cells. *J Clin Invest*, 2018;128(10): 4257-9.
22. Kakimi K, Lane TE, Wieland S, Asensio VC, Campbell IL, Chisari FV, et al. Blocking chemokine responsive to  $\gamma$ -2/Interferon (IFN)- $\gamma$  inducible protein and monokine induced by IFN- $\gamma$  activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of Hepatitis B Virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 2001;194(12): 1755-66.
23. Kurpad AV. The requirements of protein & amino acid during acute & chronic infections. *Indian J Med Res*, 2006;124:129-48.
24. Ibraheem AS, El-Sayed MF, Khalil HA. Establishment of hepatitis model in rat liver induced by injecting extracted DNA: Histopathological study. *The J Bas App Zoo*, 2016;77:102-11.
25. Chen H, Sheng L, Gong Z, Ru S, Bian H. Investigation of the molecular mechanisms of hepatic injury upon naphthalene exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology*, 2018; 27(6), 650-60.
26. Ike C, Arome O, Affiong E, Ogechukwu A, Chimere U. Liver Enzymes and Total Protein Levels as Index of Hepatotoxicity of Naphthalene. *IOSR J Pharm Biol Sci*, 2016;11(2), 28-33.
27. Wu JF, Song SH, Lee CS, Chen HL, Ni YH, Hsu HY, et al. Clinical predictors of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection from children to adults. *J Infect Dis*, 2018;217(9):1408-16.
28. Cao X, Shang QH, Chi XL, Zhang W, Xiao HM, Sun MM, et al. Serum N-glycan markers for diagnosing liver fibrosis induced by hepatitis B virus. *World J Gastroenterol*, 2020;26(10): 1067-8.
29. Sreenivasan P, Nair S. Hepatitis B Associated Monoclonal Gammopathy That Resolved after Successful Liver Transplant. *J Transplant*, Published online 24 Feb 2009.
30. Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, et al. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology*, 2007;45.1: 102- 10.
31. Nakamoto Y, Kaneko S. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury. *Curr Mol Med*, 2003;3(6): 537-44.
32. Chen J, Xu CR, Xi M, Hu WW, Tang ZH, Zang GQ. Predictors of liver histological changes and a sustained virological response to peginterferon among chronic hepatitis B e antigen-positive patients with normal or minimally elevated alanine aminotransferase levels. *J Viral Hepat*, 2017;24(7): 573-9.
33. Wong GLH, Wong VWS, Choi PCL, Chan AWH, Chim AML, Yiu KKL, et al. Clinical factors associated with liver stiffness in Hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B patients. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009;7(2): 227-33.
34. Erdogan S, Dogan HO, Sezer S, Uysal S, Ozhamam E, Kayacetin S, et al. The diagnostic value of noninvasive tests for the evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis B patients. *Scand J Clin Lab Invest*, 2013;73(4): 300-8.

35. Kim BK, Kim SA, Park YN, Cheong JY, Kim HS, Park JY, et al. Noninvasive models to predict liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *Liver Int*, 2007;27(7):969-76.
36. Ekiz F, Yüksel O, Koçak E, Yılmaz B, Altınbaş A, Çoban S, et al. Mean platelet volume as a fibrosis marker in patients with chronic hepatitis B. *J Clin Lab Anal*, 2011; 25(3):162-5.
37. Aiolfi R, Sitia G. Chronic hepatitis B: role of antiplatelet therapy in inflammation control. *Cell Mol Immunol*, 2015; 12: 264-8.
38. Pan JJ, Yang CF, Chu CJ, Chang FY, Lee SD. Prediction of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B by serum markers. *Hepatogastroenterology*, 2007; 54(77):1503-6.
39. World Health Organization. Geneva: World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2015.
40. Celikbilek M, Dogan S, GURSOY S, ZARARSIZ G, YURCI A, OZBAKIR O, et al. Noninvasive assessment of liver damage in chronic hepatitis B. *World J Hepatol*, 2013;5.8: 439.
41. Parikh P, Ryan JD, Tsochatzis EA. Fibrosis assessment in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Annals Trans Med*, 2017;5(3):40.
42. Yılmaz B, Aydın H, Can G, Sentürk Z, Üstüner B, Yılmaz H, et al. The relationship between fibrosis level and blood neutrophil to lymphocyte ratio in inactive hepatitis B carriers. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014;26(12): 1325-8.
43. Chen L, Lou Y, Chen Y, Yang J. Prognostic value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with acute-on-chronic liver failure. *Int J Clin Pract*, 2014;68: 1034-40.
44. Atay K. Relationship between neutrophil-to-lymphocyte ratio, mean platelet volume, and fibrosis level in patients with chronic hepatitis B. *Türk J Acad Gastroenterol*, 2019;18:7-11.
45. Celik D, Tatar B, Kose S, Odemis I. Evaluation of the diagnostic validity of noninvasive tests for predicting liver fibrosis stage in chronic hepatitis B patients. *Acta Gastroenterol Belg*, 2020;83(3): 419-25.



## Prognostik nutrisyon indeksi (PNİ) oranlarının batın operasyonu sonrası cerrahi alan enfeksiyonu gelişimi üzerine etkisi

### The effect of prognostic nutrition index (PNI) rates on the development of surgical site infection after abdominal surgery

Hakan BALBALOĞLU<sup>1</sup> (ID)

#### ÖZET

**Amaç:** Cerrahi alan enfeksiyonu (CAE) yaygın sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarından biridir. CAE risk faktörlerinden biri olan progresif nutrisyonel indeks (PNİ), beslenme değerlendirmesi için basit ama faydalı bir yöntemdir. Bu çalışmanın amacı batın cerrahisi geçirmiş hastalarda PNİ oranlarını ve bu oranların CAE gelişimini tahmin etmedeki yerini araştırmaktır.

**Yöntem:** Çalışmaya 2014-2021 yılları arasındaki hastane kayıtları taranarak batın cerrahisi geçiren toplam 514 hasta dahil edilmiştir. Preoperatif PNİ hesaplamasında  $PNİ = 10 \times \text{serum albümini (g/dl)} + 0,005 \times \text{toplam lenfosit sayısı (mm}^3\text{)}$  formülü kullanılmıştır. CAE tespit edilmiş ve edilmemiş hastalarda PNİ oranları karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmaya alınan 514 hastanın 267'sinde CAE tespit edilmiştir. Geriye kalan 247 hasta ise kontrol grubu olarak seçilmiştir. Hastaların 222 (%43,2)'sinin kadın ve 292 (%56,8)'sinin erkek olduğu belirlenmiştir. Bunların yaş ortanca (medyan) değeri 64 (min:20 maks:93) bulunmuştur. CAE için geçen süre ortalaması (median) 13 gün (min: 6-maks:30) olarak hesaplanmıştır. PNİ, CAE tespit edilen grupta 32 (min:27-maks:37), kontrol

#### ABSTRACT

**Objective:** Surgical site infection (SSI) is one of the common healthcare-associated infections. Progressive nutritional index (PNI), one of the risk factors for SSI, is a simple but useful method for nutritional assessment. The aim of this study is to investigate the rates of PNI in patients who have undergone abdominal surgery and the role of these rates in predicting the development of SSI.

**Methods:** A total of 514 patients who underwent abdominal surgery between 2014 and 2021 were included in the study by retrospective review of hospital records. The formula  $PNI = 10 \times \text{serum albumin (g/dl)} + 0.005 \times \text{total lymphocyte count (mm}^3\text{)}$  was used to calculate preoperative PNI. PNI rates were compared in patients with and without SSI.

**Results:** SSI was detected in 267 of the 514 patients included in the study (case group: 267, control group: 247). The median age of the patients was 64 (min:20 max:93) years, 222 (43.2%) were female and 292 (56.8%) were male. The median time to SSI was 13 days (min:6-max:30). PNI the group in which SSI was detected was 32 (min:27-max:37), 36 (min:32-max:41) in the control group. There was a statistically significant difference

<sup>1</sup>Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD., Zonguldak



İletişim / Corresponding Author : Hakan BALBALOĞLU

Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Polikliniği, Zonguldak - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 22.01.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 09.07.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.20744

Balbaloglu H. Prognostik nutrisyon indeksi (PNİ) oranlarının batın operasyonu sonrası cerrahi alan enfeksiyonu gelişimi üzerine etkisi  
Türk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(1): 45 - 52

grubunda ise 36 (min:32-max:41) saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ( $p<0,000$ ). CAE'li hastaların 87 (%32,7)'sinde *Enterococcus* spp., 71 (%26,3)'inde *E. coli*, 34 (%12,8)'ünde koagülaz (-) metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, 18 (%6,8)'inde *Klebsiella pneumoniae*, 16 (%6)'sında *Candida* spp., 15 (%5,6)'inde *Acinetobacter* spp., 8 (%3)'inde *Pseudomonas* spp., 8 (%3)'inde *Enterobacter aerogenes*, 5 (%1,9)'inde koagülaz (+) metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*, 3 (%1,1)'ünde *Proteus mirabilis* ve 2 (%0,8)'sinde *Bacillus* spp., bulunmuştur.

**Sonuç:** Preoperatif dönemde PNI değerleri düşük olan hastaların, CAE gelişimi açısından daha riskli olduğu belirlenmiştir. PNI düzeyleri CAE gelişecek hastaların yakın izlemi ve erken tespiti açısından kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Cerrahi alan enfeksiyonu, prognostik nutrisyonel indeks, PNI

between the two groups ( $p<0.000$ ). In patients with SSI, *Enterococcus* spp. were detected in 87 (32.7%), *E. coli* in 71 (26.3%), coagulase (-) methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in 34 (12.8%) patients, 18 (6.8%) in *Klebsiella pneumoniae*, *Candida* spp. in 16 (6%), *Acinetobacter* spp. in 15 (5.6%), *Pseudomonas* spp. in 8 (3%), *Enterobacter aerogenes* in 8 (3%) coagulase (+) methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* in 5 (1.9%), *Proteus mirabilis* in 3 (1.1%) and *Bacillus* spp. in 2 (0.8%).

**Conclusion:** It has been found that patients with low PNI values in the preoperative period are at higher risk for the development of SSI. PNI levels can be used for close monitoring and early detection of patients who will develop SSI.

**Key Words:** Surgical site infection, prognostic nutritional index, PNI

## GİRİŞ

Cerrahi alan enfeksiyonu (CAE) en sık sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon nedenlerinden biridir. Hastanede yatış sürenin uzamasına, antibiyotik kullanılmasına, tedavi maliyetlerinin artmasına ve artmış mortaliteye neden olur. Tüm cerrahi girişimler için CAE görülme oranı, yurt dışında %2-11 iken ülkemizde %13-36 arasında olduğu bildirilmiştir (1-3). Operasyon süresi, uygulanan cerrahi tekniğin yanı sıra hastanın kendisine ait risk faktörleri de CAE gelişiminde etkilidir (4). Cerrahi Alan Enfeksiyonunu Önleme Kılavuzu'nda yetersiz beslenmenin de CAE gelişme riskini etkileyebileceği belirtilmiştir (5,6).

Beslenme durumu, bireyin immün sistemi, protein döngüsü ve fiziksel durum dahil olmak üzere genel sağlık durumunun göstergesi olarak kabul edilir (7). Bir kişinin beslenme durumu enfeksiyonlara karşı savunmada önemlidir. Prognostik nutrisyonel indeks (PNI) bir immüno-beslenme tarama aracı

olup serum albümin ve lenfosit konsantrasyonu ile saptanmaktadır (8-11). Hepatositler tarafından sentezlenen albümin, plazmada en sık bulunan proteindir. Ozmotik basıncı etkileme rolüne ek olarak, beslenme durumunun da bir göstergesidir. Hem antioksidan hem de anti enflamatuvar özelliklere sahip akut faz yanıt proteindir. Enflamatuvar süreçte, hepatik sentezde azalma, interstisyel aralığa sıvı kaçışında artış ve artan katabolizma nedeniyle albümin sentezi azalmaktadır (8). PNI, ilk olarak gastrointestinal sistem cerrahisi olan hastalarında, perioperatif immüno-nütrisyonel durum ve cerrahi riski değerlendirmek için tanımlanmıştır (9). PNI'nin; koroner arter hastalığı, kalp yetmezliği ve pulmoner emboli gibi kardiyovasküler hastalıkları olan hastalarda, yetersiz beslenmeyi değerlendirmede ve klinik sonuçları öngörmeye de yararlı olduğu bildirilmiştir. Düşük PNI skorunun kötü sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (10-13).

Günümüzde CAE insidansını azaltmadaki önemli

ilerlemelere rağmen, enfeksiyöz komplikasyonlar modern cerrahinin en önemli sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Bu nedenle CAE'ye neden olan risk faktörlerinin saptanması ve alınması gereken önlemler konusundaki çalışmalar halen güncelliğini korumaktadır. Bu çalışmanın amacı, batın cerrahisi geçirmiş hastalarda PNİ oranları ve bu oranların CAE gelişimini tahmin etmedeki yerini araştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hasta Seçimi

Genel Cerrahi Kliniği'nde 2014 ile 2021 yılları arasında batın operasyonu yapılan hastaların kayıtları retrospektif olarak incelendi. Hasta kayıtlarının değerlendirilmesi sonucunda toplam 514 hasta çalışmaya dahil edildi. Ameliyat öncesi tam kan sayımı ve serum albümin düzeylerini gösteren tüm veriler hasta kayıt sisteminden (MIA Med.) alındı. Hastaların PNİ düzeyleri,  $PNİ = 10 \times \text{serum albümini (g/dl)} + 0,005 \times \text{toplam lenfosit sayısı (mm}^3\text{)}$  formülasyonu ile hesaplandı (9).

### Hariç tutma kriterleri

Başka merkezde opere olmuş, preoperatif dönemde apse/enfeksiyon tanısı almış, başka bir klinik enfeksiyonu olan, kalp hastalığı, kronik karaciğer ve böbrek hastalığı tanısı olan, otoimmün ve enflamatuvar romatizmal hastalık, hematolojik sistem hastalığı tanısı olan, preoperatif kemo-radyoterapi alan, steroid ilaç kullanan hastalar, vücut kitle indeksi  $<18.5 \text{ kg/m}^2$  -  $>25 \text{ kg/m}^2$  olanlar ve tıbbi kayıtlarına ulaşamayan hastalar hariç bırakılmıştır.

### İstatistiksel analiz

Verilerin analizi için IBM SPSS Statistics for Windows, Sürüm 21.0 yazılımı (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanıldı. Veriler kategorik değişkenler için sayı (n) ve yüzde (%) kullanılarak özetlendi. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılması Pearson ki-kare ve Fisher's exact testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenler ortanca (min-maks) olarak ifade edildi. Nicel değişkenlerin karşılaştırılmasında

MannWhitney U testi kullanıldı. CAE hem duyarlılık hem de özgüllük açısından gösterecek optimal PNİ değerini belirlemek için Receiver operating characteristic (ROC) eğri analizi yapıldı. PNİ değerleri,  $\geq 35$  normal ve  $< 35$  düşük olarak belirlendi (Şekil 1).  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bu çalışma, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 12.01.2022, Karar no: 2022/01).

## BULGULAR

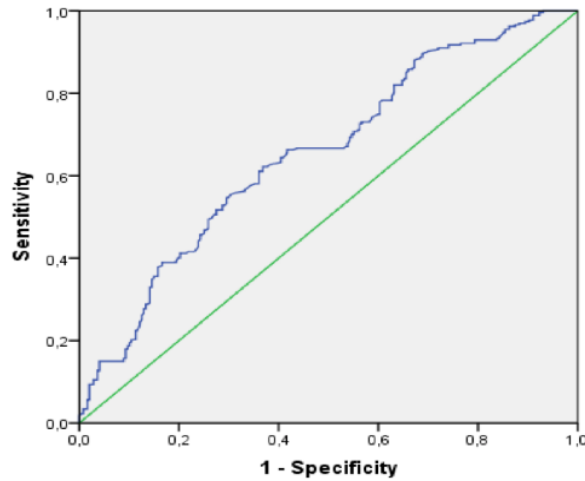
Çalışmaya toplam 514 hasta alındı. Bunlardan, 267'si CAE vaka grubu ve 247'si kontrol grubu olarak belirlendi. Hastaların 222 (%43,2)'sinin kadın ve 292 (%56,8)'sinin erkek olduğu saptandı. Yaş ortanca (medyan) değeri 64 (min:20 maks:93) bulundu. CAE için geçen süre median 13 gün (min: 6-maks:30) olarak tespit edildi. PNİ düzeyleri vaka grubunda 32 (min:27-maks:37) ve kontrol grubunda 36 (min:32-maks:41) olarak saptandı ( $p < 0,000$ ). Hastaların preoperatif laboratuvar sonuçları ve PNİ oranları Tablo 1'de verilmiştir. CAE olan grupta (n:267) hastaların 87 (%32,7)'sinde *Enterococcus* spp., 71 (%26,3)'inde *E. coli*, 34 (%12,8)'ünde koagülaz (-) metisiline dirençli *S. aureus*, 18 (%6,8)'inde *K. pneumoniae*, 16 (%6)'sında *Candida* spp., 15 (%5,6)'inde *Acinetobacter* spp., 8 (%3)'inde *Pseudomonas* spp., 8 (%3)'inde *E. aerogenes*, 5 (%1,9)'inde koagülaz (+) metisiline duyarlı *S. aureus*, 3 (%1,1)'ünde *P. mirabilis* ve 2 (%0,8)'sinde *Bacillus* spp., tespit edildi. PNİ oranı 35'in altında olanlarda en sık *E. coli* (48 kişi; %28,6), *Enterococcus* spp. (46 kişi; %27,4) ve koagülaz (-) metisiline dirençli *S. aureus* (22 kişi; %13,1) saptandı. CAE'yi hem duyarlılık hem de özgüllük açısından optimal gösterecek PNİ değeri 35 olarak belirlendi. Bu eşik değer kullanıldığında PNİ'nin CAE'yi ön görme duyarlılığı %62,2, özgüllüğü ise %37,7 tespit edildi. Eğrinin altında kalan alan (area under the ROC curve =AUC) değerleri %95 0655 (0,608-0702) belirlendi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 1).

Tablo 1. Hastaların preoperatif laboratuvar sonuçları ve PNI oranları

	Grup			p
	CAE (n:267)	Kontrol (n:247)	Total (n:514)	
Yaş (yıl)				
Medyan (min-maks)	63 (20-93)	65 (20-92)	64 (20-93)	0,068
n (%)				
Kadın	127 (%47,6)	95 (%38,5)	222 (%43,2)	0,037
Erkek	140 (%52,4)	152 (%61,5)	292 (%56,8)	
	Medyan (min-maks)	Medyan (min-max)	Medyan (min-maks)	
Lökosit $\times 10^3 / \text{mm}^3$	9,8 (6,6-14,1)	9,2 (6,3-13,8)	9,6 (1-44,1)	0,340
Hemoglobin (g/dL)	11,3 (7,3-16,9)	11,0 (7,5-18)	11,1 (7,3-18)	0,515
Trombosit ( $\times 10^3 / \text{mm}^3$ )	247 (50-725)	225(64-548)	234 (50-725)	0,014
Lenfosit ( $10^9 / \text{L}$ )	1,3(0,1-5,2)	1,2(0,1-5,0)	1,2 (0,1-5,2)	0,206
Nötrofil ( $10^9 / \text{L}$ )	7,2 (1,1-37,2)	6,7 (0,9-21,7)	7,0 (0,9-37,2)	0,327
Monosit ( $10^9 / \text{L}$ )	0,6 (0,1-6)	0,6(0,1-4,3)	0,6 (0,1-6)	0,051
Albumin (g/dL)	3,2 (1,2-4,9)	3,6 (1,6-6,5)	3,5 (1,2-6,5)	0,000
C-reactive protein (mg/L)	40,8 (2,8-339)	27,8 (1,6-333)	29,1 (1,6-339)	0,000
PNI	32 (12-49)	36 (16-65)	35 (12-65)	0,000
PNI eşik değeri				
35 <	168 (%62,9)	96 (% 38,9)	264 (%100)	
35 $\geq$	99 (%37,1)	151 (%61,1)	250 (%100)	

Medyan (min-maks) veya sayı (yüzde) olarak ifade edilen değerler

PNI: Prognostik beslenme indeksi, PNI  $\geq 35$ : (normal) ve PNI <35: (yetersiz beslenme)



Şekil 1. PNI değişkeninin ROC eğrisi

## TARTIŞMA

Batın cerrahisi sonrasında CAE olan ve olmayan hastalarda PNİ oranlarının karşılaştırıldığı bu çalışmada vaka grubu ile kontrol grubu arasında PNİ düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ( $p<0,000$ ). Bilindiği kadarıyla bu çalışma, batın cerrahisi sonrasında CAE olan ve olmayan hastalarda PNİ oranlarının karşılaştırıldığı ve kültür sonucunda üreyen mikroorganizmaların belirtildiği ilk çalışmadır.

Serum albümin düzeyi, çeşitli hasta popülasyonlarında malnütrisyonun, lenfosit oranı ise sistemik enflamatuvar durumun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (9,15,16). Bu nedenle, hem beslenme hem de enflamatuvar durumu yansıtan ameliyat öncesi PNİ'nin, postoperatif CAE gelişimini tahmin etmek için kullanılabilirliği düşünüldü. Albümin, yara iyileşmesinde en fazla üzerinde durulan makro besin ögesidir. Kollajen oluşumu, anjiyogenez, eritrosit, lökosit ve sitokin oluşumunda rol oynaması nedeniyle yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır (17). PNİ, çeşitli alanlarda beslenme değerlendirmesi için de yaygın olarak kullanılmaktadır (18,19). Hastanın klinik sonucunu etkilemede beslenme durumunun önemi yıllar önce belirtilmiştir. 1955'te Rhoads ve Alexander (20); postoperatif enfeksiyonlar ile kötü beslenme durumu arasındaki ilişkiyi göstermiştir. Şiddetli protein-kalori malnütrisyonu olan hastalarda, yara iyileşmesi bozularak CAE insidansı ve mortalite artmaktadır (21-24). Düşük serum albümin düzeyi veya total lenfosit sayısı CAE gelişimi için risk faktörü olarak tanımlanan iki parametredir (25). Yapılan çalışmalarda ameliyat öncesi ve sonrası PNİ'nin komplikasyonları ve sağkalımı öngörmeye yararlı olduğu gösterilmiştir (26). Kolorektal cerrahisi geçiren 1194 hastanın beslenme durumunun değerlendirildiği bir çalışmada yetersiz beslenmenin CAE için önemli bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (27). Cerrahi sonrası erken enfeksiyon, enfeksiyon nedeniyle yeniden yatış ve ameliyattan sonraki 28 gün içinde ölümle ilişkili faktörlerin rapor edildiği

9016 olguluk bir araştırmanın sonucunda ise, azalan albümin ve artan yaş, erken enfeksiyon olasılığının artmasıyla ilişkilendirilmiştir (28). 1115 vakalık başka bir çalışmada, çalışma sonuçları ile uyumlu olarak düşük preoperatif PNİ değerinin, omurga cerrahisi sonrası CAE gelişimi için risk faktörü olduğu kabul edilmiştir. Bu çalışma da düşük preoperatif PNİ değerleri olan hastalar, CAE riski konusunda uyarılmalı ve yeterli bilgilendirilmiş onam alınmalıdır önerisinde bulunulmuştur (29). Gastrointestinal fistül ameliyatlarında enterektomi sonrası CAE'leri öngörmeye preoperatif PNİ ve C-reaktif protein (CRP) düzeylerinin araştırıldığı çalışmada ise PNİ, CRP'den daha iyi performans gösterdiği belirtilmiştir. Postoperatif CAE için önemli bir risk faktörünün, düşük PNİ skoru olduğu saptanmıştır (19). Çalışmada; vaka grubu ile kontrol grubu arasında PNİ düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ( $p<0,000$ ). Yapılan çalışmalarla uyumlu şekilde PNİ oranının CAE gelişiminin iyi bir öngörücüsü olduğunu düşündürmüştür.

CAE oluşumunda, genellikle ciltte veya ameliyat edilen organın içinde bulunan bakteriler dahil olmak üzere endojen patojenler sorumludur. Avrupa hastalık önleme ve kontrol merkezinin bir çalışmasında CAE'de en sık izole edilen mikroorganizmanın *S. aureus* olduğu gösterilmiştir (30). Gastrointestinal sistem ameliyatlarında gelişen CAE'de gram negatif basiller, enterokoklar, anaerob mikroorganizmalar sorumlu olabilmektedirler. Altı yıllık değerlendirmenin yapıldığı bir çalışmada Gram negatif bakterilerin ön planda olduğu belirtilmiştir. En sık *E. coli* (%26,16), ikinci sıklıkta *Acinetobacter* spp. (%22,53), daha sonra sırasıyla *Staphylococcus* spp. (%14,63) ve *Enterococcus* spp. (%11,78) tespit edilmiştir (31). Bu çalışmada da cerrahi türünün çeşidine bağlı olarak farklılık olmakla birlikte vaka grubunda 34 (%12,8) kişide koagülaz (-) metisiline dirençli *S. aureus*, 71 (%26,3) kişide *E. coli*, 87 (%32,7) kişide de *Enterococcus* spp. tespit edilmiştir. PNİ oranı 35'in altında olanlarda ise en sıklıkla 48 kişide (%28,6) *E. coli*, 46 (%27,4) kişide ise *Enterococcus* spp.

saptanmıştır.

Bu çalışmanın birkaç sınırlaması vardır. Retrospektif ve tek merkezli bir çalışmadır. CAE gelişimi multifaktöriyel olup insidansı, etiyoloji, cerrahi prosedür, kişisel faktörler gibi birçok nedene bağlı olarak değişebilir. Bu çalışmada; değişken etiyoloji ve değişken cerrahi prosedüre sahip olgular dahil edilmiştir. Hastaların hastaneye yatış öncesi beslenme durumlarının analizinin yapılmamış olması çalışmamızın kısıtlılıklarıdır.

Sonuç olarak, CAE oluşumu multifaktöriyel olmakla birlikte, beslenme durumunun CAE gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir. PNİ ise beslenme durumunun değerlendirmesi için kullanılan kolay ve ucuz bir yöntemdir. Bu çalışmada, batın cerrahisi geçirmiş hastalarda PNİ oranları incelenmiştir. Preoperatif dönemde düşük PNİ değerleri olan hastaların CAE açısından daha riskli olduğu sonucuna varılmaktadır. PNİ düzeyleri, CAE açısından hastaların yakın izlemi ve erken tespiti açısından kullanılabilir.

## TEŞEKKÜR

Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniği Prof. Dr. Kemal Karakaya'ya makaleye katkılarından dolayı teşekkür ederim.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 12.01.2022, Karar no: 2022/01).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Garner BH, Anderson DJ. Surgical site infections: an update. *Infect Dis Clin North Am*, 2016; 30: 909-29.
2. Demirtürk N, Demirdal T. Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesinde tespit edilen cerrahi alan infeksiyonlarının değerlendirilmesi: İki yıllık veriler. *SDÜ Tıp Fak Derg*, 2011;18 (1):12-75.
3. Kolasiński W. Surgical site infections - review of current knowledge, methods of prevention. *Pol Przegl Chir*, 2018;91(4):1-7.
4. Ates S, Nazik S, Sahin AR, Kardas F, Erdogan A. Cerrahi alan enfeksiyonlarının değerlendirilmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üni Tıp Fak Derg*, 2019;14(1):5-6.
5. WHO Guidelines for Safe Surgery. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44185/1/9789241598552\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44185/1/9789241598552_eng.pdf), Date Accessed: 06.03.2023.
6. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for prevention of surgical site infection. USA: Centers for Disease Control and Prevention Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. 1999.
7. Edington J, Boorman J, Durrant ER, Perkins A, Giffin CV, James R, et al. Prevalence of malnutrition on admission to four hospitals in England. *Clin Nutr*, 2000;19:191-5.
8. Margaron MP, Soni N. Serum albumin: touchstone or totem? *Anaesthesia*, 1998;53:789-803.
9. Onodera T, Goseki N KG. Prognostic nutritional index in gastrointestinal surgery of malnourished cancer patients. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*, 1984;85(9):1001-5.
10. Narumi T, Arimoto T, Funayama A, Kadowaki S, Otaki Y, Nishiyama S, et al. Prognostic importance of objective nutritional indexes in patients with chronic heart failure. *J Cardiol*, 2013;62:307-13.
11. Hayiroğlu Mİ, Keskin M, Keskin T, Uzun AO, Altay S, Kaya A, et al. A novel independent survival predictor in pulmonary embolism: prognostic nutritional index. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2018;24:633-9.
12. Keskin M, Hayiroğlu Mİ, Keskin T, Kaya A, Tatlısu MA, Altay S, et al. A novel and useful predictive indicator of prognosis in ST-segment elevation myocardial infarction, the prognostic nutritional index. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2017;27:438-46.
13. Wada H, Dohi T, Miyauchi K, Jun S, Endo H, Doi S, et al. Relationship between the prognostic nutritional index and longterm clinical outcomes in patients with stable coronary artery disease, *J Cardiol*, 2018;72:155-61.
14. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG. CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1992;13(10):606-8.
15. Maeda K, Nagahara H, Shibutani M, Otani H, Sakurai K, Toyokawa T, et al. A preoperative low nutritional prognostic index correlates with the incidence of incisional surgical site infections after bowel resection in patients with Crohn's disease. *Surgery Today*, 2015; 45, 1366-72.
16. Ballmer PE. Causes and mechanisms of hypoalbuminaemia. *Clin Nutr*, 2001;20:271-3.
17. Pekmezci D, Mutlu AA. Yara iyileşmesinde güncel yaklaşımlar: Makro besin öğelerinin rolü. *Hacettepe Uni Fac Health Sci J*, 2019; 6.(1): 1-16.
18. Oe S, Togawa D, Yamato Y, Hasegawa T, Yoshida G, Kobayashi S, et al. Preoperative age and prognostic nutritional index are useful factors for evaluating postoperative delirium among patients with adult spinal deformity. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2019; 44:472-8.
19. Hu Q, Wang G, Ren J, Ren H, Li G, Wu X, et al. Preoperative prognostic nutritional index predicts postoperative surgical site infections in gastrointestinal fistula patients undergoing bowel resections. *Medicine (Baltimore)*, 2016; 95:e4084.

20. Rhoads JE, Alexander CE. Nutritional problems of surgical patients. *Ann NY Acad Sci*, 1955; 63:268.
21. Brown IW Jr, Moor GF, Hummel BW, Marshall WG Jr, Collins JP. Toward further reducing wound infections in cardiac operations. *Ann Thorac Surg*, 1996; 62:1783-9.
22. Hu SS, Fontaine F, Kelly B, Bradford DS. Nutritional depletion in staged spinal reconstructive surgery. The effect of total parenteral nutrition. *Spine*, 1998; 23:1401-5.
23. Leite JF, Antunes CF, Monteiro JC, Pereira BT. Value of nutritional parameters in the prediction of postoperative complications in elective gastrointestinal surgery. *Br J Surg*, 1987;74:426-9.
24. Buzby GP, Mullen JL, Matthews DC, Hobbs CL, Rosato EF. Prognostic nutritional index in gastrointestinal surgery. *Am J Surg*, 1980; 139:160-7.
25. Klein JD, Hey LA, Yu CS, Klein BB, Coufal FJ, Young EP, et al. Perioperative nutrition and postoperative complications in patients undergoing spinal surgery. *Spine*, 1996;21(22):2676-82.
26. Matsumoto H, Okamoto Y, Kawai A, Ueno D, Kubota H, Murakami H, et al. Prognosis prediction for postoperative esophageal cancer patients using onodera's prognostic nutritional index. *Nutr Cancer*, 2017;69(6):849-54.
27. Skeie E, Koch AM, Harthug S, Fosse U, Sygnetveit K, Nilsen RM, et al. A positive association between nutritional risk and the incidence of surgical site infections: a hospital-based register study. *PLoS One*, 2018;13(5): e0197344.
28. Scott JD, Forrest A, Feuerstein S, Fitzpatrick P, Schentag JJ. Factors associated with postoperative wound infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2001; 22:347-51.
29. Ushirozako H, Hasegawa T, Yamato Y, Yoshida G, Yasuda T, Banno T, et al. Does preoperative prognostic nutrition index predict surgical site infection after spine surgery? *Eur Spine J*, 2021 30:1765-73.
30. Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J, Muller A, Vankerckhoven V, Weist K, et al. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro Surveill*, 2012;17(46), 10-2807.
31. Aslaner H, Akıncı E, But A, Kanyılmaz D, Baştuğ A, Aypak A, et al. Üçüncü basamak bir hastanede tespit edilen cerrahi alan enfeksiyonlarının değerlendirilmesi *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2018; 75(3): 265 - 76.



## Changes in nutritional content in raw milk of the Simmental breed cows fed with different forage combinations

### Farklı yem kombinasyonları ile beslenen Simmental ırkı ineklerin çiğ sütünde besin içeriğindeki değişiklikler

Baki BEYAZ<sup>1</sup> (ID), Ersin DEMİR<sup>2</sup> (ID), Figen ERDEM ERİŞİR<sup>1</sup> (ID), İbrahim Akın TEMİZER<sup>1</sup> (ID),  
Ökkeş YILMAZ<sup>1</sup> (ID)

#### ABSTRACT

**Objective:** In this study, the biochemical compositions of fatty acids, amino acids, fat-soluble vitamins (ADEK), cholesterol and phytosterols were examined in raw milk samples of Simmental breed cows fed with different forage combinations.

**Methods:** Milk samples were provided from their farm in Kovancılar district of Elazığ province in Türkiye. The cows were fed in different forage combinations the spring season. These were Group 1: cows fed with Beet pulp+Factory feed+Hay (n: 10); Group 2: cows fed with Maize silage+Barley+Hay (n: 10), and Group 3: cows free-fed in pasture (n: 10).

Milk samples were taken on the 15th day of feeding and brought to the laboratory. Biochemical analyses were performed on the milk samples brought to the laboratory in accordance with the cold chain rules. After the milk samples went through a number of biochemical processes, fatty acid, ADEK vitamins, cholesterol and amino acid analyses were performed. The analysis of cholesterol and ADEK vitamins was performed with a high performance liquid chromatography (HPLC) device, and

#### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, farklı yem kombinasyonları ile beslenen Simmental ırkı ineklerin çiğ süt örneklerinde yağ asitleri, aminoasitler, yağda çözünen vitaminler (ADEK) ve fitosterollerin biyokimyasal bileşimleri incelenmiştir.

**Yöntem:** Süt örnekleri Elazığ iline bağlı Kovancılar ilçesindeki çiftlikten sağlanmıştır. İnekler bahar mevsiminde farklı yem kombinasyonlarında beslenmiştir. Bunlar; Grup 1: Pancar küspesi+Fabrika yemi+Saman ile beslenen inekler (n: 10); Grup 2: Mısır silajı+Arpa+Saman ile beslenen inekler (n: 10) ve Grup 3: Merada serbest beslenen inekler (n: 10) olarak gruplandırılmıştır.

Beslenmenin 15. gününde süt örnekleri alınarak laboratuvara getirilmiştir. Soğuk zincir şartlarına uygun olarak laboratuvara getirilen süt örneklerinin biyokimyasal analizleri yapılmıştır. Süt örnekleri birtakım biyokimyasal işlemlerden geçtikten sonra, yağ asidi, ADEK vitaminleri, kolesterol, fitosterol ve aminoasit analizleri yapıldı. Kolesterol ve ADEK vitaminlerinin analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı, aminoasit ve yağ asitlerinin analizi ise gaz

<sup>1</sup>Firat University, Faculty of Science, Department of Biology, Elazığ

<sup>2</sup>Düzce University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Düzce



İletişim / Corresponding Author : Baki BEYAZ

Firat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Elazığ - Türkiye

E-posta / E-mail : baki-beyaz-23@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 14.07.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 11.08.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.09068

Beyaz B, Demir E, Erdem Erişir F, Temizer İA, Yılmaz Ö. Changes in nutritional content in raw milk of the Simmental breed cows fed with different forage combinations. Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(1): 53 - 66

analysis of amino acids and fatty acids was performed with gas chromatography (GC) and FID detector.

**Results:** 18 amino acids were detected in the milk samples examined. Compared to Group 1, it was found that the amounts of arginine ( $p<0.001$ ), isoleucine ( $p<0.05$ ), methionine ( $p<0.05$ ), threonine ( $p<0.05$ ), phenylalanine ( $p<0.001$ ), lysine ( $p<0.05$ ) and tryptophan ( $p<0.001$ ) amino acids increased statistically, while the amounts of alanine ( $p<0.001$ ), glycine ( $p<0.05$ ), leucine ( $p<0.05$ ), aspartic acid ( $p<0.01$ ) and glutamic acid ( $p<0.05$ ) decreased statistically in Group 3. Compared to Group 1, it was found that the amounts of arginine ( $p<0.001$ ), threonine ( $p<0.05$ ), phenylalanine ( $p<0.001$ ) and lysine ( $p<0.05$ ) amino acids increased statistically, while the amounts of alanine ( $p<0.001$ ), glycine ( $p<0.001$ ), proline ( $p<0.01$ ), aspartic acid ( $p<0.05$ ), glutamic acid ( $p<0.001$ ), histidine ( $p<0.001$ ) and tryptophan ( $p<0.05$ ) decreased statistically in Group 2. Compared to Group 1, the amounts of lauric acid ( $p<0.05$ ), myristic acid ( $p<0.01$ ), pentadecanoic acid ( $p<0.05$ ), palmitic acid ( $p<0.01$ ), stearic acid ( $p<0.001$ ), oleic acid ( $p<0.001$ ) and cholesterol ( $p<0.05$ ) were statistically decreased, while the amounts of linoleic acid ( $p<0.001$ ), alpha-linolenic acid ( $p<0.001$ ), dihomo-gamma-linolenic acid ( $p<0.05$ ), vitamin K2 ( $p<0.001$ ),  $\gamma$ -tocopherol ( $p<0.001$ ), vitamin D2 ( $p<0.001$ ),  $\alpha$ -tocopherol ( $p<0.001$ ),  $\alpha$ -tocopherol acetate ( $p<0.05$ ), vitamin K1 ( $p<0.001$ ), stigmasterol ( $p<0.01$ ),  $\beta$ -sitosterol ( $p<0.05$ ) were statistically increased in Group 3. Compared to Group 1, the amounts of stearic acid ( $p<0.001$ ), oleic acid ( $p<0.01$ ),  $\alpha$ -tocopherol acetate ( $p<0.001$ ) and  $\beta$ -sitosterol ( $p<0.05$ ) were statistically decreased, while the amounts of vitamin K2 ( $p<0.001$ ),  $\gamma$ -tocopherol ( $p<0.01$ ), vitamin D2 ( $p<0.01$ ),  $\alpha$ -tocopherol ( $p<0.01$ ), vitamin K1 ( $p<0.01$ ) and stigmasterol ( $p<0.01$ ) were statistically increased in Group 2. It was determined that the amounts of palmitic, oleic, myristic, stearic, lauric, linoleic, palmitoleic and pentadecanoic acids were found to be above 1% in the fatty acid composition of milk among the groups, respectively. It was determined that there were significant changes in the amount of some fatty acids among the groups. In addition, it was determined

kromatografi (GC) ve FID dedektörü ile yapılmıştır.

**Bulgular:** İncelenen süt örneklerinde 18 aminoasit tespit edilmiştir. Grup 1 ile karşılaştırıldığında, arginin ( $p<0,001$ ), izolözin ( $p<0,05$ ), metionin ( $p<0,05$ ), threonin ( $p<0,05$ ), fenilalanin ( $p<0,001$ ), lizin ( $p<0,05$ ) ve triptofan ( $p<0,001$ ) aminoasitlerinin miktarlarının istatistiksel olarak arttığı, alanin ( $p<0,001$ ), glisin ( $p<0,05$ ), lösin ( $p<0,05$ ), aspartik asit ( $p<0,01$ ) ve glutamik asit ( $p<0,05$ ) miktarlarının istatistiksel olarak Grup 3'te azaldığı tespit edilmiştir. Grup 1 ile karşılaştırıldığında, arginin ( $p<0,001$ ), threonin ( $p<0,05$ ), fenilalanin ( $p<0,001$ ) ve lizin ( $p<0,05$ ) aminoasitlerinin miktarlarının istatistiksel olarak arttığı, alanin ( $p<0,001$ ), glisin ( $p<0,001$ ), prolin ( $p<0,01$ ), aspartik asit ( $p<0,05$ ), glutamik asit ( $p<0,001$ ), histidin ( $p<0,001$ ) ve triptofan ( $p<0,05$ ) miktarlarının istatistiksel olarak Grup 2'de azaldığı belirlenmiştir. Grup 1 ile karşılaştırıldığında laurik asit ( $p<0,05$ ), miristik asit ( $p<0,01$ ), pentadekanoik asit ( $p<0,05$ ), palmitik asit ( $p<0,01$ ), stearik asit ( $p<0,001$ ), oleik asit ( $p<0,001$ ) ve kolesterol ( $p<0,05$ ) miktarlarının istatistiksel olarak azaldığı, linoleik asit ( $p<0,001$ ), alfa-linolenik asit ( $p<0,001$ ) ve dihomo-gamma-linolenik asit ( $p<0,05$ ), vitamin K2 ( $p<0,001$ ),  $\gamma$ -tokoferol ( $p<0,001$ ), vitamin D2 ( $p<0,001$ ),  $\alpha$ -tokoferol ( $p<0,001$ ),  $\alpha$ -tokoferol asetat ( $p<0,05$ ), vitamin K1 ( $p<0,001$ ), stigmasterol ( $p<0,01$ ),  $\beta$ -sitosterol ( $p<0,05$ ) düzeylerinin Grup 3'te istatistiksel olarak arttığı belirlendi. Grup 1 ile karşılaştırıldığında stearik asit ( $p<0,001$ ), oleik asit ( $p<0,01$ ),  $\alpha$ -tokoferol asetat ( $p<0,001$ ) ve  $\beta$ -sitosterol ( $p<0,05$ ) miktarları istatistiksel olarak azalırken, vitamin K2 ( $p<0,001$ ),  $\gamma$ -tokoferol ( $p<0,01$ ), vitamin D2 ( $p<0,01$ ),  $\alpha$ -tokoferol ( $p<0,01$ ), vitamin K1 ( $p<0,01$ ) ve stigmasterol ( $p<0,01$ ) miktarlarının istatistiksel olarak Grup 2'de arttığı görülmüştür. Gruplar arasında sütün yağ asidi bileşiminde sırasıyla, - palmitik asit, oleik asit, miristik asit, stearik asit, laurik asit, linoleik asit, palmitoleik asit ve pentadekanoik asit miktarlarının %1'in üzerinde bulunduğu saptanmıştır. Gruplar arasında bazı yağ asidi miktarlarında önemli değişimlerin olduğu görülmüştür. Ayrıca

that there were significant changes in the amounts of cholesterol, phytosterol and some ADEK vitamins among the groups.

**Conclusion:** According to these data, it is seen that the use of different feed combinations in animal nutrition by dairy producers is very important for enriching the biochemical content of milk. It has been determined that the nutrient content of milk changes depending on different feed combinations and feeding in the flora. In addition, it has been found that the milk content of cows fed in pasture is more significantly enriched with nutrients necessary for a healthy life.

**Key Words:** Amino acids, chemical composition, dairy biochemistry, lipids, raw milk, vitamins

gruplar arasında kolesterol, fitosterol ve bazı ADEK vitaminlerin miktarlarında önemli değişimlerin olduğu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Bu verilere göre, süt üreticilerinin hayvan beslenmesinde farklı yem kombinasyonlarını kullanmasının sütün biyokimyasal içeriğinin zenginleşmesi için oldukça önemli olduğu görülmektedir. Sütün besin içeriğinin farklı yem kombinasyonları ve florada beslenmeye bağlı olarak sütün biyokimyasal bileşiminin değiştiği saptanmıştır. Ayrıca merada beslenen ineklerin süt içeriğinin sağlıklı yaşam için gerekli besinlerce daha belirgin bir şekilde zenginleştiği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Aminoasitler, çiğ süt, kimyasal bileşim, lipitler, süt biyokimyası, vitaminler

## INTRODUCTION

The liquid obtained from the milk glands of mammals such as cows, sheep, goats, buffaloes, donkeys, horses, and camels is called milk (1). Cow milk and dairy products have been part of the human diet, from birth to old age, for millennia. Milk and dairy products are important foodstuffs in daily life as well as being used extensively in the preparation of many foods. Milk is an excellent food that contains micro and macronutrients essential for healthy living. At the same time, human beings get an important part of their daily fat, carbohydrates, essential amino acids, vitamins and minerals from milk and dairy products (2, 3). Milk compound in dairy cows is acknowledged to be influenced by herbal forage compound, flora composition, and plant development status and rumen activity (4, 5). Milk yield and the enrichment of milk in terms of nutrients are related to the feeding of animals. Animal nutrition is very

important for high meat and milk yield in livestock. As a result, cows need to be fed with different forage and forage combinations to prevent protein, vitamin and mineral deficiencies but also to increase milk yield (6). Due to the nutritional and economic value of cow's milk, fertile dairy cow breeds have been successfully selected, which has resulted in significant success in milk production over the years. With significant improvements in breeding and feeding and animal husbandry practices, milk production has now far exceeded the needs of the offspring. This excess milk is then sold in grocery stores for the purpose of human nutrition as fresh pasteurized milk. It is also used in the production of foods such as yogurt, butter, cheese, cream, ice cream, milk powder which are important in human nutrition (7). Cow's milk consists of approximately 5% lactose, 3.2% protein, 4% lipid, 3.5% vitamin and 0.7% mineral, but these figures may vary depending on animal nutrition and environmental factors and other factors. Milk is

a very important food for bone and dental health. However, it has been recent data shown that milk contains nutrients necessary for healthy nutrition, as well as some active compounds important for healthy living (8).

In order to sustain all biological activity in a healthfully, the metabolism needs protein. One of the most important sources of protein in the human diet is milk, provides about 32 g protein/L. Its protein fraction can be divided into two parts, soluble protein and insoluble protein. Soluble proteins (whey proteins), describe 20% of milk protein fraction, while the insoluble, (caseins), describe 80 %. Both groups are high-quality proteins. It is classified as a source of amino acids with physiological properties suitable for humans (9). Apart from its biological function, some bioactive compounds formed as a result of enzymatic hydrolysis of milk proteins and some bioactive peptides have been shown to play an important role in the protection of human health. These bioactive compounds have been found to show antibacterial, antiviral, antifungal, antioxidant, antimicrobial, antihypertensive, antithrombotic and immunomodulatory properties (8). Research is needed on the effects of different forage combinations and regional flora on milk composition in terms of human health and nutrition. It has been reported that there are changes in the biochemical composition of raw milk in studies conducted with different feed combinations (9, 10). It is seen that the feeds used in this study are primarily used in animal nutrition in our country. According to the literature research, it seems that the effect of these feed combinations on the biochemical composition of raw milk has not been studied. It was aimed to investigate the effect of this feed combination on raw milk biochemistry. This study investigated changes in the compound of amino acids, fatty acids, lipophilic vitamins, cholesterol, and phytosterols in raw milk obtained from cows living in the same environment but feeding on different feed combinations.

## MATERIAL and METHOD

### 1. Feeding of Animals

In this study, the cow's milk was obtained from animal farm in Kovancılar District of Elazığ province. The cows were from the same farm. They were four years old. These cows have usually given birth. The animals on this farm were fed in three different ways the spring season. These;

I. Group: Cows fed with Beet pulp (4 kilograms)+Factory feed (6 kilograms)+Hay (4 kilograms) (n:10),

II. Group: Cows fed with Maize silage (4 kilograms)+Barley (6 kilograms)+Hay (4 kilograms) (n:10),

III. Group: Cows fed freely in pasture (n:10).

In this feed mixture, animals were given 14 kilograms per day (Morning 7 kilograms-Evening 7 kilograms). Hay and maize silage are prepared by the farmers in the area. Raw milk samples were taken on the 15th day of feeding and brought to the laboratory, and implemented biochemical processes. Ethical permission is not required in these studies. The cows were milked by hand. The milk of each cow was taken separately. The cows were milked at five o'clock. Milking was done after dinner. The necessary hygiene conditions were paid attention to during milking. The analyses of milk samples were performed in the laboratories of the Biology Department of Fırat University. Raw milk samples were taken into 50 ml tubes directly after milking. The raw milk samples were brought to the laboratory in accordance with the cold chain rule and used in biochemical processes.

### 2. Extraction of lipids

The extraction of lipids from the raw milk samples was realized according to (11). For this purpose, milk samples were centrifuged (at +4°C at 9050 g for 5 minutes-Hettich Universal 320) after homogenizing 3:2 (v/v) in the isopropanol-hexane mixture (Sigma Aldrich). Consequently, this supernatant liquid was exercised for the determination of fatty acids,

**Table 1.** Factory feed composition

Analytical components	
Crude protein	%19
Raw oil	%3.5
Raw cellulose	%9
Ash	%9
Vitamins and trace elements	
Vitamin A	10000000 IU
Vitamin D	2000000 IU
Vitamin E	40000 mg
Manganese	50000 mg
Iron	50000 mg
Zinc	80000 mg
Copper	12000 mg
Iodine	500 mg
Selenium	300 mg
Biotin	1000 mg

lipophilic vitamins, cholesterol and sterol.

### 3. Measurement of lipophilic vitamins, cholesterol and phytosterols

Methyl alcohol (Sigma Aldrich) KOH (Sigma Aldrich) (5 %) solution was added on milk examples taken for lipophilic vitamins, cholesterol and sterol analysis and was immediately mixed. Milk samples were kept for 15 minutes at 85 °C temperatures. After the samples were cooled to room temperature, 5.0 mL of pure water was added and mixed. Lipophilic phase in the hexane were extracted. Hexane (Sigma Aldrich) mixture was removed by nitrogen gas. It was solved in 1.0 mL (60/40%, v/v) acetonitrile methanol (Sigma Aldrich) solution and was analyzed. The analysis was performed on the Shimadzu brand High-Performance Liquid Chromatography (Shimadzu-HPLC) device. For analysis, a solution of acetonitrile methanol (60/40%, v/v) was used as the carrier phase. Mobile phase flux rate was identified as 1.0 mL minute DAD-UV detector was utilized for analysis of lipophilic vitamins. Nucleodur LC 18 (15 x 4.6 cm, 5µm; MN USA) column

was utilized as HPLC column. Detection wavelength 326 nm was used for lipophilic vitamin retinol, 202 nm was utilized for vitamin E, vitamins D and K cholesterol and phytosterols (12, 13).

### 4. Preparation of fatty acid methyl esters from milk sample

For chromatographic analysis, fatty acids must be converted into methyl ester derivatives. For this purpose, the acid-catalyzed esterification method was utilized. According to the method, the hexane isopropanol phase was transferred to the test tubes. 5.0 mL 2% methanolic sulfuric acid (Riedel-De-Haën) was added and thoroughly mixed (14, 15). This mixture was kept for about 15 hours at 55 °C temperatures for methylation. At the end of the time, the test tubes were cooled to room temperature, and then 5.0 mL of 5% sodium chloride (Sigma Aldrich) was added and thoroughly mixed. The formed fatty acid methyl esters were extracted with 5.0 mL hexane. Then the hexane phase was removed and 5.0 mL of 2% KHCO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich) was added. The test tubes waited five

hours for phase separation. Solvents in the mixture containing methyl esters were removed with the help of nitrogen gas (45°C). Then the methyl esters were dissolved in chloroform (Sigma Aldrich) and analyses were performed on the gas chromatography device (Shimadzu 2010 Plus).

### 5. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters

Conditions of analysis, the column temperatures, detector, and injection valve were 110-215, 245, and 275°C, in turn. The analysis time was set at 28 minutes. Helium gas was utilized as the bearer gas. Before the analysis of the fatty acid methyl ester of milk samples, analyses of the standard fatty acid methyl ester mixture were performed. At this stage, the retention times of each fatty acid were determined (16).

### 6. Amino acid analysis

Derivatization of amino acids with N-tert-butyl(dimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA (Sigma Aldrich)) reasons the synchronous sialylation of the amino and carboxyl groups in a step by step with modifications method explained by Buch et al. (17). Each sample protein was hydrolyzed by the 6 M HCl (Riedel-De-Haën) (0.5% phenol) at the 110°C for 24 hours and then examples were added 1.0 mL of the studying solution (1.5 µg) and then vaporized to exact dryness. Then, 10 µL of dimethylformamide and 60 µL of MTBSTFA were added and the flask was closed with a cap. Eventually, the examples were warmed at 70°C for 20 minute to obtain the chemical derivatization of amino acid and the derivatives were analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometer (Shimadzu-GC-MS).

### 7. Analysis of amino acids in gas chromatography

The analysis of amino acid derivatives, Shimadzu gas chromatograph modified for glass-capillary work and FID detector were utilized. Amino acid derivatives were distinguished on a 20 m Supelco Slb 5 ms capillary column (Supelco, Sigma, 0.25 mm ID 0.25 µm film thickness) working with helium bearer gas (45

cm sec) under the following temperature program: from 120 to 150°C at 120°C minute (five minute hold), to 240°C at 7°C minute and eventually to 285°C at 20°C min (18 minute hold). The temperature of the injector and detector was kept fixed at 240, 300°C, in turn. The identification of amino acid derivatives was based on compare of their FID chromatogram and detention times with those of real acknowledgement (18).

### 8. Statistical analysis

Data was analyzed using SPSS package (version 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The results were shown as mean±standard error. Statistical evaluation was used in analysis of variance (ANOVA) and post-hoc test (LSD). A P<0.05 was accepted significant.

## RESULTS and DISCUSSION

### 1. Amino acids distribution in milk of Simmental cows fed with different nutrients (%)

Milk and dairy products are recognized as food products of high nutritional and dietary value. They are important sources of food that ensure normal human growth and development as well as vital functions of the body (19-21). Milk and its products is a rich source of nutrients and considered by many as a valuable element of diet for all age groups especially for infants, children and elderly. Cow's milk contains many bioactive components that boost the physiological processes in the body. The compound of milk alters significantly across species because milk composition is related to the nutrient needs of newborns from each species (22). The biochemical content of milk can vary depending on different factors such as nutrition, genetic characteristics, cow's health and physiological status (22, 23). Milk and dairy products are considered to be a good source of protein in the nutrition. Cow's milk, which contains high quality protein, has an average of 3-3.5% protein. Cow's milk protein is a heterogeneous mixture of non-protein compounds containing enzymes and small amounts of nitrogen,

based on casein and whey proteins (24). The major amino acids found in whey protein are leucine, isoleucine, valine and lysine, while the major amino acids found in casein are histidine, methionine, and phenylalanine (9). In our study, eighteen amino acids were detected in milk samples. Cow's milk has been found to be an important food in terms of protein (Table 2). According to raw milk amino acids analysis of Simmental breed cows fed with different rations, the amounts of aspartic acid, cysteine, lysine, phenylalanine and leucine amino acids were higher than other amino acids. In general, it was found that these amino acid values were higher than other amino acid values (Table 2). In studies, it has been

determined that these essential amino acids are more present than other essential amino acids (25). It has been reported that the phenylalanine essential amino acid is found more often than other essential amino acids, especially in Group 2 and Group 3. It is important for the quality of milk that the proteins in milk contain high levels of essential amino acids (Table 2).

Compared to Group 1, glycine ( $p<0.001$ ), proline ( $p<0.01$ ), aspartic acid ( $p<0.05$ ), glutamic acid ( $p<0.001$ ), histidine ( $p<0.001$ ) and tryptophan ( $p<0.05$ ) amino acid amounts were statistically decreased, while arginine ( $p<0.001$ ), alanine ( $p<0.001$ ), threonine ( $p<0.05$ ), phenylalanine ( $p<0.001$ ) and lysine ( $p<0.05$ ) amino acid amounts were statistically

**Table 2.** Amino acids distribution in milk of Simmental breed cows fed with different forage combinations (%)

Amino acids	Group 1	Group 2	Group 3
Arginine	0.49±0.02	1.17±0.18 <sup>d</sup>	1.46±0.11 <sup>d</sup>
Alanine	7.89±0.78	2.91±0.26 <sup>d</sup>	1.91±0.15 <sup>d</sup>
Glycine	6.70±0.56	1.87±0.41 <sup>d</sup>	3.71±0.89 <sup>b</sup>
<b>Valine</b> <sup>1</sup>	6.51±0.67	6.93±0.88	7.56±1.33
<b>Leucine</b> <sup>1</sup>	9.02±0.89	9.51±1.12	8.65±1.67 <sup>b</sup>
<b>Isoleucine</b> <sup>1</sup>	4.77±0.34	4.45±0.67	6.45±0.97 <sup>b</sup>
Proline	3.97±0.32	1.66±0.08 <sup>c</sup>	3.40±0.79
<b>Methionine</b> <sup>1</sup>	1.45±0.05	1.54±0.07	2.01±0.75 <sup>b</sup>
Serine	6.40±0.47	7.25±1.11	5.34±1.09
<b>Threonine</b> <sup>1</sup>	3.89±0.36	5.29±0.86 <sup>b</sup>	6.71±1.34 <sup>b</sup>
<b>Phenylalanine</b> <sup>1</sup>	5.86±0.77	12.32±1.78 <sup>d</sup>	13.56±2.06 <sup>d</sup>
Aspartic acid	13.57±1.16	10.65±1.34 <sup>b</sup>	9.34±1.19 <sup>c</sup>
Cysteine	9.61±1.11	8.01±2.21	8.73±0.87
Glutamic acid	4.24±0.78	1.08±0.03 <sup>d</sup>	2.76±0.56 <sup>b</sup>
<b>Lysine</b> <sup>1</sup>	8.57±0.97	10.09±1.25 <sup>b</sup>	10.89±1.36 <sup>b</sup>
<b>Histidine</b> <sup>1</sup>	1.96±0.09	0.52±0.04 <sup>d</sup>	2.09±0.67
Tyrosine	4.22±0.29	5.19±0.69	4.56±1.08
<b>Tryptophan</b> <sup>1</sup>	0.91±0.03	0.54±0.01 <sup>b</sup>	1.11±0.56 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>: Essential amino acids

One-way analysis of variance (ANOVA) LSD post hoc test, ( $p<0.05$ )

<sup>a</sup>: The difference between the groups is not statistically significant ( $p>0.05$ )

<sup>b</sup>: The difference between the groups is statistically significant ( $p<0.05$ )

<sup>c</sup>: The difference between the groups is statistically more significant ( $p<0.01$ )

<sup>d</sup>: The difference between the groups is statistically most significant ( $p<0.001$ )

increased in Group 2. It was determined that the changes in the amino acid values of valine, leucine, isoleucine, methionine, serine, cysteine and tyrosine were statistically insignificant (Table 2). Compared to Group 1, it was determined that the amounts of arginine ( $p<0.001$ ), isoleucine ( $p<0.05$ ), methionine ( $p<0.05$ ), threonine ( $p<0.05$ ), phenylalanine ( $p<0.001$ ), lysine ( $p<0.05$ ) and tryptophan ( $p<0.001$ ) amino acids statistically increased, while the amounts of alanine ( $p<0.001$ ), glycine ( $p<0.05$ ), leucine ( $p<0.05$ ), aspartic acid ( $p<0.01$ ) and glutamic acid ( $p<0.05$ ) amino acids statistically decreased in Group 3. It was determined that the changes in valine, proline, serine, cysteine, histidine and tyrosine amino acid values were statistically insignificant (Table 2).

When amino acid levels were compared between the groups, it was found that arginine and lysine amino acids were high in the second and third groups ( $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ). When amino acid levels were compared between the groups, amino acid levels such as isoleucine, methionine, threonine, phenylalanine and tryptophan were determined to be high in the third group ( $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ). When amino acid levels were compared between the groups, it was found that alanine, aspartic acid and glutamic acid levels decreased in the second and third groups (respectively  $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ). It was determined that there was a decrease or increase in amino acid levels other than the above-mentioned amino acids at different rates between the groups. But these changes are not statistically significant (Table 2).

In this study, we observed that there were significant changes in the milk obtained from cows grazing freely in the pasture and that the milk content was enriched in terms of nutrients. This is also true in terms of protein content. This may be linked to the amount of pasture cows receive more nitrogen through nutrition and the conversion of excess nitrogen into milk protein. Studies have announced that changes in amino acid composition in milk are related to the amount of nitrogen taken by nutrition (22).

## 2. Fatty acid composition in milk of Simmental cows fed with different nutrients (%)

Fatty acid composition in milk depends on factors related to animal race, lactation stage, ruminal fermentation and nutrition. In fact, the fatty acid composition of milk depends on nutrition and ruminal microbial activity. Milk is generally made up of saturated fatty acids (70%) and unsaturated fatty acids (30%) (9). In the fatty acid compound of the milk content, palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1), myristic acid (C14:0), stearic acid (C18:0), lauric acid (C12:0), linoleic acid (C18:2), palmitoleic acid (C16:1) and pentadecanoic acids (C15:0) were determined to be more. According to milk analysis, the dominant saturated fatty acids are palmitic (C16:0), stearic and (C18:0) myristic acids (C14:0), while the dominant unsaturated fatty acids are oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and alpha-linolenic acids (18:3 n-3) (Table 3).

In general, according to our findings, it was found that saturated fatty acid level decreased ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ), the unsaturated fatty acid level increased ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ) in Group 3 compared to Group 1 and Group 2 (Table 3). There were significant changes in milk fatty acid composition in Group 3 compared to Group 1 and Group 2 in terms of human health. In Group 3, the reduction in the amount of saturated fat acid is very important for human health. The C18:0 (Stearic acid) fatty acid and C18:1 (Oleic acid) fatty acid levels were reduced in Group 2 and Group 3 compared to Group 1 ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ). The level of saturated fatty acids (C14:0-Myristic acid, C18:0-Stearic acid) in Group 1 was increased compared to Group 3. The level of saturated fatty acids (C18:0-Stearic acid) in Group 1 was increased compared to Group 2 ( $p<0.001$ ). Compared to group 2, the level of oleic (C18:1-Oleic acid unsaturated fatty acid) acid increased significantly in Group 1 ( $p<0.01$ ). In Group 3, it was found that the amount of some saturated fat acid decreased compared to other groups. Also in Group 3, the levels of linoleic and alpha-linolenic fatty acids, which are essential fatty acids, were increased compared to other groups



**Table 3.** Fatty acids distribution in milk of Simmental breed cows fed with different forage combinations (%)

Fatty acids	Group 1	Group 2	Group 3
<sup>1</sup> Caprylic acid (8:0)	0.14±0.01	0.90±0.05 <sup>d</sup>	0.70±0.03 <sup>d</sup>
<sup>1</sup> Capric acid (10:0)	0.36±0.06	3.68±0.78 <sup>d</sup>	2.68±1.04 <sup>c</sup>
<sup>1</sup> Lauric acid (12:0)	<b>5.35±1.08</b>	<b>4.87±0.88</b>	<b>3.87±1.06<sup>b</sup></b>
<sup>1</sup> Myristic acid (14:0)	<b>14.04±1.89</b>	<b>14.30±1.09</b>	<b>12.30±2.07<sup>c</sup></b>
<sup>2</sup> Miristoleik asit (14:1)	0.35±0.05	0.26±0.01	0.36±0.01
<sup>1</sup> Pentadecanoic acid (15:0)	1.49±0.45	1.42±0.33	1.02±0.04 <sup>b</sup>
<sup>2</sup> 15:1	0.29±0.02	0.43±0.02 <sup>b</sup>	0.23±0.06
<sup>1</sup> Palmitic acid (16:0)	<b>38.05±2.67</b>	<b>39.89±2.76</b>	<b>35.20±2.81<sup>c</sup></b>
<sup>2</sup> Palmitoleic acid (16:1)	1.79±0.22	2.16±0.16 <sup>b</sup>	2.75±0.06 <sup>b</sup>
<sup>1</sup> Heptadecanoic acid (17:0)	0.79±0.08	0.64±0.04	0.74±0.07
<sup>2</sup> 17:1	0.63±0.07	0.32±0.01	0.42±0.03 <sup>b</sup>
<sup>1</sup> Stearic acid (18:0)	<b>11.18±1.67</b>	<b>7.74±1.03<sup>d</sup></b>	<b>6.74±1.04<sup>d</sup></b>
<sup>2</sup> Oleic acid (18:1)	<b>22.19±2.23</b>	<b>19.88±2.67<sup>c</sup></b>	<b>17.88±2.71<sup>d</sup></b>
<sup>2</sup> Linoleic acid (18:2)*	<b>2.34±0.26</b>	<b>2.29±0.67</b>	<b>8.29±0.88<sup>d</sup></b>
<sup>2</sup> Gamma-linolenic acid (18:3 n-6)	0.32±0.04	0.15±0.01	1.15±0.04 <sup>d</sup>
<sup>2</sup> Alpha-linolenic acid (18:3 n-3)*	<b>0.28±0.03</b>	<b>0.32±0.02</b>	<b>3.32±1.08<sup>d</sup></b>
<sup>1</sup> Arachidic acid (20:0)	0.10±0.01	0.14±0.01	0.74±0.05 <sup>c</sup>
<sup>2</sup> Gadoleic acid (20:1)	0.11±0.02	0.21±0.02	0.81±0.06 <sup>c</sup>
<sup>2</sup> Eicosadienoic acid (20:2)	0.13±0.01	0.17±0.01	0.37±0.04 <sup>b</sup>
<sup>2</sup> Dihomo-gamma-linolenic acid (20:3)	0.18±0.02	0.23±0.02	0.43±0.05 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>: Saturated fatty acids

<sup>2</sup>: Unsaturated fatty acids

\*: Essential fatty acid

One-way analysis of variance (ANOVA) LSD post hoc test, (p<0.05)

<sup>a</sup>: The difference between the groups is not statistically significant (p>0.05)

<sup>b</sup>: The difference between the groups is statistically significant (p<0.05)

<sup>c</sup>: The difference between the groups is statistically more significant (p<0.01)

<sup>d</sup>: The difference between the groups is statistically most significant (p<0.001)

(Table 3). It is possible that due to free nutrition in pasture, the level of saturated fat acid decreases and the level of unsaturated fat acid increases in milk. It is reported that there is a correlation between saturated fatty acid consumption and diabetes with cardiovascular diseases (22, 26). It has been stated that there may be a decrease in the level of saturated fatty acids in milk due to free nutrition in pastures (27, 28). It has been stated that the milk fat acid composition of cows may vary depending on diet. It

has been reported that oleic acid, polyunsaturated fatty acids and saturated medium-chain fatty acids are particularly affected in milk depending on the diet (26). It has been reported that linoleic (C18:2), alpha-linolenic and (C18:3 n-3) oleic acid (C18:1) levels may increase in raw milk due to free feeding in the pasture (29). This fatty acid-rich diet is very important for human health (8, 29, 30). Many studies have recognized the importance of diet in regulating and improving health-promoting and disease-

inhibiting groups of fatty acid in cow milk. Milk fatty acid profile varies depending on external and internal factor (26, 29). Furthermore, seasonal differences in pasture, flora of the region and characteristics of forage will result in differences in milk fatty acids composition (31). According to nutrition, fatty acids such as C8:0 (Caprylic acid), C10:0 (Capric acid) and C16:1 (Palmitoleic acid) were found to be higher in Group 2 and Group 3 in milk. In Group 3 such as, C18:2 (Linoleic acid), C18:3 (Gamma-linolenic acid) (n-6), C18:3 (Alpha-linolenic acid) (n-3), C20:0 (Arachidic acid), C20:1 (Gadoleic acid), C20:2 (Eicosadienoic acid), C20:3 (Dihomo-gamma-linolenic acid) fatty acids high, C12:0 (Lauric acid), C14:0 (Myristic acid), C16:0 (Palmitic acid), C18:0 (Stearic acid) and C18:1 (Oleic acid) fatty acids were low (Table 3).

### 3. Changes in the composition of cholesterol, lipophilic vitamins and phytosterols in the milk of Simmental cows fed with different nutrients ( $\mu\text{g}/10 \text{ mL}$ )

There was no difference in the amount of retinol in milk between the groups. However, the levels of K2 vitamin,  $\alpha$ -tocopherol, D2 vitamin,  $\gamma$ -tocopherol, K1 vitamin and stigmasterol were observed to rise at different rates in Group 2 and Group 3 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). In Group 3, there was a partial decrease in cholesterol level in milk samples ( $p < 0.05$ ). In Group 1 and Group 3, partial increase in  $\beta$ -sitosterol level was determined in milk samples ( $p < 0.05$ ) (Table 4).

In addition to being involved in the structure of cell membranes, cholesterol is a molecule necessary for the synthesis of bile acids and steroid hormones. High plasma cholesterol levels are considered to be an important risk factor for cardiovascular diseases. Mortality rates from cardiovascular disease are high all over the world. Cardiovascular diseases and other metabolic diseases have been reported to be related to high fat intake (32). The most important sterol found in milk is cholesterol (3 mg/g fat, equivalent to 100 mg/L cow's milk), but phytosterols are also present (33). Cholesterol levels were significantly

reduced in Group 2 and Group 3 ( $P < 0.05$ ) compared to Group 1 (Table 4). It has been stated that there may be changes in the amount of cholesterol in the milk of farm animals according to dietary fat (34, 35). It is emphasized that low cholesterol diet is important against cardiovascular diseases and metabolic diseases (36). Our study shows that the amount of cholesterol in the milk of naturally fed animals has decreased (Table 4). Therefore, low cholesterol content in the milk of naturally fed animals is very important for healthy living. Hypercholesterolemia is evaluated as an important cardiovascular risk factor. In terms of cardiovascular health, healthy diet and healthy lifestyle are very important. The diet rich in phytosterols (Stigmasterol,  $\beta$ -Sitositerol) is recommended for the treatment of hypercholesterolemia. Phytosterols are a widely used approach in lowering plasma cholesterol levels (37). The amount of stigmasterol was significantly increased in Group 2 and Group 3 compared to Group 1 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ). The amount of  $\beta$ -sitosterol was significantly reduced in Group 2 compared to Group 1 ( $p < 0.05$ ). The amount of  $\beta$ -sitosterol was significantly increased in Group 3 compared to Group 1 ( $p < 0.05$ ) (Table 4). In Group 3, phytosterol (Stigmasterol,  $\beta$ -Sitositerol) level significantly increased in milk. In general, group 1 and Group 2 are important sources of phytosterol (Stigmasterol,  $\beta$ -Sitositerol) (Table 4). Sterol rich diet is a useful dietary strategy to reduce the risk of cardiovascular and metabolic disease. Epidemiological studies have shown that cardiovascular diseases can be prevented based on positive changes in diet and lifestyle. The main plant-derived sterol in farm animal's milk is  $\beta$ -sitosterol (33). It was determined that there were changes in sterol content in milk due to the feeding of cows. Researchers have stated that changes in milk composition may occur when animal nutrition is interfered with (33, 34). Milk and dairy products are an important component of a healthy diet due to their capacity to provide vitamins, minerals, macronutrients and micronutrients prominent for,

**Table 4.** Distribution of lipophilic vitamins, cholesterol and phytosterols in milk of Simmental breed cows fed with different forage combinations ( $\mu\text{g}/10 \text{ mL}$ )

	Group 1	Group 2	Group 3
Vitamin A (Retinol)	0.03 $\pm$ 0.001	0.03 $\pm$ 0.001	0.04 $\pm$ 0.001
Vitamin K <sub>2</sub>	0.09 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	0.65 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>
$\gamma$ -tocopherol	<b>1.12<math>\pm</math>0.07</b>	<b>3.12<math>\pm</math>0.97<sup>c</sup></b>	<b>5.34<math>\pm</math>0.78<sup>d</sup></b>
Vitamin D <sub>2</sub>	0.31 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	1.34 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>
Vitamin D <sub>3</sub>	0.15 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.03
$\alpha$ -tocopherol	<b>0.64<math>\pm</math>0.07</b>	<b>1.47<math>\pm</math>0.06<sup>c</sup></b>	<b>2.67<math>\pm</math>0.67<sup>d</sup></b>
$\alpha$ -Tocopherol acetate	<b>73.53<math>\pm</math>2.76</b>	<b>33.87<math>\pm</math>2.78<sup>d</sup></b>	<b>87.67<math>\pm</math>3.09<sup>b</sup></b>
Vitamin K <sub>1</sub>	0.68 $\pm$ 0.08	2.02 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup>	3.04 $\pm$ 0.88 <sup>d</sup>
<b>Cholesterol</b>	<b>74.34<math>\pm</math>2.87</b>	<b>66.64<math>\pm</math>2.09</b>	<b>56.78<math>\pm</math>1.88<sup>b</sup></b>
<b>Stigmasterol</b>	<b>8.16<math>\pm</math>0.98</b>	<b>18.21<math>\pm</math>1.12<sup>c</sup></b>	<b>34.78<math>\pm</math>2.06<sup>c</sup></b>
<b>B-Sitosterol</b>	<b>661.23<math>\pm</math>3.45</b>	<b>531.23<math>\pm</math>5.56<sup>b</sup></b>	<b>711.78<math>\pm</math>7.18<sup>b</sup></b>

One-way analysis of variance (ANOVA) LSD post hoc test, ( $p < 0.05$ )

<sup>a</sup>: The difference between the groups is not statistically significant ( $p > 0.05$ )

<sup>b</sup>: The difference between the groups is statistically significant ( $p < 0.05$ )

<sup>c</sup>: The difference between the groups is statistically more significant ( $p < 0.01$ )

<sup>d</sup>: The difference between the groups is statistically most significant ( $p < 0.001$ )

up growth, flourish and tissue care (38). Vitamin A is particularly substantial in up growth, flourish, immunity, and eye health. Its content in milk depends fundamentally on fat quantity, but also on factors like animal nutrition and season. In general, fatty milks are richer in vitamin A (9). In our study, there were no significant changes in vitamin A level in the milk of cows fed with different foods (Table 4). Retinol comes from the liver to the mammary glands, where it is esterified and then given to milk (33). The amount of vitamin D in cow's milk is very low, but some countries supplement vitamin D in milk and dairy products from different sources. In previous studies, vitamin D levels (5 and 35 IU/L) in cow's milk were stated to be low. Recently, people's interest in vitamin D has increased due to its protective property against some important diseases. Studies have reported that vitamin D protects against cancer, diabetes and heart disease (39). In addition, vitamin D has important effects on muscle and bone health due to calcium absorption (9). The amount of fat-soluble vitamins in

cow's milk varies depending on the breed, nutrition, physiological conditions and health of the animal. It has been reported that the amount of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol-0.2 and 1.0 mg/L) and vitamin A in milk may vary depending on nutrition, forage content and forage quantity (40). The amount of vitamin D and vitamin K in milk varies depending on the time the animal and food stay in the sun and the function of the rumen (33). Vitamin K<sub>2</sub> ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) and vitamin D<sub>2</sub> ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) were significantly increased in Group 2 and Group 3 compared to Group 1 (Table 4). Because the animals live in the same environmental conditions, the difference in milk content may have been due to the forage content. Studies have shown that the biochemical content of milk can vary depending on nutrition (33). The amount of  $\delta$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopherol was significantly increased in Group 2 and Group 3 compared to Group 1 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). The amount of  $\alpha$ -tocopherol acetate was significantly increased in Group 1 and Group 3 compared to Group 2 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ )

(Table 4). Alpha-tocopherol is the fundamental manner of vitamin E available in cow's milk, referring 84-92% of the total, whereas gamma-tocopherol and alpha-tocotrienol conduce approximately 5% each one (33). According to feeding with different forage combinations, the amount of tocopherol is higher in the milk of cows grazing freely in the pasture.

In general, the amount of fat-soluble vitamins depends on the fat content of milk. When the total amount of fat or any amount of fatty acid changed in milk and dairy products, the level of fat-soluble vitamins can also change. In order to increase the vitamin content of these products, it is necessary to increase the content of synthetic or natural vitamins or their precursors in the forage. It has been reported that there may be significant changes

in the micronutrient and macronutrient composition of milk due to forage and forage content (33).

In conclusion; the effect of regional flora and different forage combinations on milk composition (amino acids, fatty acid, sterol, lipophilic vitamins) was evaluated for the first time in this study. It was determined that flora caused significant changes in milk composition. In this study, changes in amino acid, fatty acid, cholesterol, lipophilic vitamin and sterol content were examined in milk samples of cows living in the same conditions but fed different forage combinations. Milk samples were taken in the spring. As a result, milk content changes depending on the feeding of animals, especially milk content of cows fed freely in pasture is found to be enriched in terms of nutrients necessary for healthy living.

#### ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* This study does not require Ethics Committee Approval.

#### CONFLICT OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Yiğit AA. Animal and plant-based milk and their antioxidant properties. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 2019; 4 (2):113-22.
2. Chung IM, Kim JK, Lee KJ, Son NY, An MJ, Lee JH et al. Discrimination of organic milk by stable isotope ratio, vitamin E, and fatty acid profiling combined with multivariate analysis: A case study of monthly and seasonal variation in Korea for 2016-2017. *Food Chem*, 2018; 261: 112-23.
3. Landi N, Ragucci S, Di Maro A. Amino acid composition of milk from cow, sheep and goat raised in Ailano and Valle Agricola, Two Localities of 'Alto Casertano' (Campania Region). *Foods*, 2021;10(10):2431.
4. Adler SA, Dahl AV, Jensen SK, Thuen E, Gustavsson AM, Steinshamn H. Fatty acid composition, fat-soluble vitamin concentrations and oxidative stability in bovine milk produced on two pastures with different botanical composition. *Livest Sci*, 2013; 154: 93-102.
5. Atalay H. Milk fat/protein ratio in ketosis and acidosis. *BAUN Health Sci J*, 2019; 8(3):143-6.
6. Wyss U, Münger A, Collomb M. Variation of fatty acid content in grass and milk during the grazing season. Grassland in a changing world. Proceedings of the 23th General Meeting of the European Grassland Federation. August 29th - September 2nd Kiel-Germany. 2010.
7. Vincent D, Elkins A, Condina MR, Ezernieks V, Rochfort S. Quantitation and identification of intact major milk proteins for high-throughput LC-ESI-Q-TOF MS Analyses. *PLoS One*, 2016; 11(10): e0163471.
8. Mills S, Ross RP, Hill C, Fitzgerald GF, Stanton C. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int Dairy J*, 2011; 21(6): 377-401.
9. Pereira PC. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 2014; 30(6): 619-27.
10. O'Callaghan TF, Hennessy D, McAuliffe S, Kilcawley KN, O'Donovan M, Dillon P et al. Effect of pasture versus indoor feeding systems on raw milk composition and quality over an entire lactation. *J. Dairy Sci*, 2016;99(12):9424-40.
11. Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem*, 1978; 90: 420-6.
12. Sánchez-Machado DI, López-Hernández J, Paseiro-Losada P. High-performance liquid chromatographic determination of alpha-tocopherol in macroalgae. *J Chromatogr A*, 2002; 976(1-2): 277-84.
13. López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Ríos-Vázquez NJ. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *J Chromatogr A*, 2006; 1105(1-2), 135-9.
14. Christie WW. *Gas Chromatography and Lipids*. (1th ed.), Scotland, The Oily Pres, 1990.
15. Christie WW. Preparation of fatty acid methyl esters. *Inform*, 1992; 3: 1031-4.
16. Tvřizcká E, Vecka M, Staňková B, Žák A. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection: Quantitative aspects. *Anal Chim Acta*, 2002; 465: (1-2), 337-50.
17. Buch A, Glavin DP, Sternberg R, Szopa C, Rodier C, Navarro-Gonzalez R et al. A new extraction technique for in situ analyses of amino and carboxylic acids on Mars by gas chromatography mass spectrometry. *Planet Space Sci*, 2006; 54: 1592-9.
18. Badawy AA, Morgan CJ, Turner JA. Application of the Phenomenex EZ: faasttrade mark amino acid analysis kit for rapid gas-chromatographic determination of concentrations of plasma tryptophan and its brain uptake competitors. *Amino Acids*, 2008;34(4):587-96.
19. Paszczyk B, Tońska E. Fatty acid content, lipid quality indices, and mineral composition of cow milk and yogurts produced with different starter cultures enriched with *Bifidobacterium bifidum*. *Appl Sci*, 2022;12(13): 6558.
20. Küçük SC, Yıbar A. The effects of raw milk and pasteurized milk consumption on public health. *Food and Health*, 2019; 5(3):197-204.

21. Antunes IC, Bexiga R, Pinto C, Roseiro LC, Quaresma MAG. Cow's milk in human nutrition and the emergence of plant-based milk alternatives. *Foods*, 2022;12(1):99.
22. Li X, Ma X, Xiao N, Long W, Wu Y, Tong P et al. Change in chemical composition of Simmental crossbred cattle milk improved its physicochemical, nutritional, and processed properties. *J Food Sci*, 2019; 84(6): 1322-30.
23. Islam MA, Alam MK, Islam MN, Khan MA, Ekeberg D, Rukke EO et al. Principal milk components in buffalo, holstein cross, indigenous cattle and red chittagong cattle from Bangladesh. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2014; 27(6): 886-97.
24. Fox PF. Milk Proteins: General and Historical Aspects. In: Fox PF, McSweeney PLH, eds. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A&B*. Third Edition Part A, New York: Springer Verlag Publish, 2003: 1-48.
25. Rafiq S, Huma N, Pasha I, Sameen A, Mukhtar O, Khan MI. Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2016; 29(7): 1022-8.
26. Nantapo CT, Muchenje V, Hugo A. Atherogenicity index and health-related fatty acids in different stages of lactation from Friesian, Jersey and Friesian×Jersey cross cow milk under a pasture-based dairy system. *Food Chem*, 2014; 146: 127-33.
27. Chilliard Y, Glasser F, Ferlay A, Bernard L, Rouel J, Doreau M. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2007; 109: 828-55.
28. Toral PG, Monahan FJ, Hervás G, Frutos P, Moloney AP. Review: Modulating ruminal lipid metabolism to improve the fatty acid composition of meat and milk. Challenges and opportunities. *Animal*, 2018; 12(s2): s272-81.
29. Alothman M, Hogan SA, Hennessy D, Dillon P, Kilcawley KN, O'Donovan M et al. The "Grass-Fed" milk story: understanding the impact of pasture feeding on the composition and quality of bovine milk. *Foods*, 2019; 8(8):350.
30. Tsukamoto I, Sugawara S. Low levels of linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid and high levels of arachidonic acid in plasma phospholipids are associated with hypertension. *Biomed Rep*, 2018; 8(1): 69-76.
31. Elgersma A, Tamminga S, Ellen G. Modifying milk composition through forage. *Anim Feed Sci Technol*, 2006; 131: 207-25.
32. Ohlsson L. Dairy products and plasma cholesterol levels. *Food Nutr Res*, 2010; 54: 5124.
33. Baldi A, Pinotti L. Lipophilic microconstituents of milk. *Adv Exp Med Biol*, 2008; 606: 109-25.
34. Reklewska B, Oprzadek A, Reklewski Z, Panicke L, Kuczyńska B, Oprzadek J. Alternative for modifying the fatty acid composition and decreasing the cholesterol level in the milk of cows. *Livest Prod Sci*, 2002; 76: 235-43.
35. Faye B, Bengoumi M, Al-Masaud A, Konuspayeva G. Comparative milk and serum cholesterol content in dairy cow and camel. *J King Saud Univ Sci*, 2015; 27: 168-75.
36. Ravera A, Carubelli V, Sciatti E, Bonadei I, Gorga E, Cani D et. Nutrition and cardiovascular disease: Finding the perfect recipe for cardiovascular health. *Nutrients*, 2016; 8(6):363.
37. Köhler J, Teupser D, Elsässer A, Weingärtner O. Plant sterol enriched functional food and atherosclerosis. *Br J Pharmacol*, 2017; 174(11): 1281-9.
38. Lordan R, Tsoupras A, Mitra B, Zabetakis I. Dairy fats and cardiovascular disease: Do we really need to be concerned? *Foods*, 2018; 7(3):29.
39. Danik JS, Manson JE. Vitamin D and cardiovascular disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2012;14(4):414-24.
40. Jensen RG. Fat-Soluble Vitamins in Bovine Milk. In: Jensen RG, ed. *Handbook of Milk Composition*, First Edition, San Diego: Academic Press, 1995:718-25.

# Tarçın ekstraktlarının bazı patojenler üzerine antibakteriyel etkilerinin *in vitro* incelenmesi

## Determination of *in vitro* antibacterial effects of cinnamon extracts on some pathogens

Ayla ÜNVER ALÇAY<sup>1</sup> (ID), Aysun SAĞLAM<sup>2</sup> (ID), Nagihan ÇAĞLAR<sup>3</sup> (ID), Kamil BOSTAN<sup>3</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** Gıda kaynaklı enfeksiyonlar dünya çapında halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Antibiyotiklerin keşfi enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde önemli bir mihenk taşı olmuştur. Ancak günümüzde antibiyotiklere dirençli enfeksiyonlar nedeniyle her yıl çok sayıda insan yaşamını yitirmektedir. Antibiyotiklere karşı direnç yeni antibakteriyellerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Günümüzde gıda koruyucu doğal antimikrobiallere talep de artarak devam etmektedir. Ayrıca COVID-19 pandemisiyle birlikte antimikrobiyal etkinliği olan fonksiyonel gıda takviyelerine yoğun ilgi olmaktadır. Bu çalışmada, mutfakta geniş bir kullanım alanına sahip olan ve sayısız sağlık yararı nedeniyle fonksiyonel gıdalara dahil edilen tarçın baharatının çeşitli çözücülerle (etanol, metanol, kloroform ve su) hazırlanan ekstraktlarının bazı gıda ve suyla bulaşan patojen bakteriler üzerine antimikrobiyal etkinliğinin *in vitro* çalışmalarla belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Bu çalışmada; tarçının metanol, etanol, kloroform ve su ekstraktlarının bazı önemli gıda ve suyla bulaşan patojen bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Typhi*) üzerine *in vitro* antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyu difüzyon

### ABSTRACT

**Objective:** Foodborne illnesses are still a major public health concern across the world. Antibiotics have been a critical component in the treatment of infectious illnesses since their discovery. However, antibiotic-resistant diseases claim the lives of countless individuals every year. Antibiotic resistance requires the development of new antibiotics. Nowadays, the demand for natural antimicrobials as a food preservative is on the rise. Furthermore, with the COVID-19 pandemic, functional food supplements with antibacterial action are gaining popularity. The focus of this research was to identify the *in vitro* antimicrobial activity of cinnamon spice, which has many culinary utilizes and is used in functional foods due to its multiple health benefits, extracts prepared with various solvents (ethanol, methanol, chloroform, and water) against some food and water-borne pathogens.

**Methods:** Cinnamon methanol, ethanol, chloroform, and water extracts were tested for *in vitro* antimicrobial activity against a variety of food and water-borne pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Typhi*)

<sup>1</sup>İstanbul Aydın Üniversitesi, ABMYO, Gıda Teknolojisi Programı, İstanbul

<sup>2</sup>İstanbul Aydın Üniversitesi, ABMYO, Gıda Kalite Kontrolü ve Analizi Programı, İstanbul

<sup>3</sup>İstanbul Aydın Üniversitesi, Güzel Sanatlar Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, İstanbul



**İletişim / Corresponding Author :** Ayla ÜNVER ALÇAY  
Beşyol, İnönü Cd. No: 38, Küçükçekmece / İstanbul - Türkiye  
E-posta / E-mail : aylaalçay@aydin.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 16.06.2022  
Kabul Tarihi / Accepted : 10.01.2023

ve mikrodilüsyonla yapılan minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) yöntemleri ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** Tarçından elde edilen etanol ve metanol ekstraktlarının incelenen bakterilere karşı değişen derecelerde antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gözlenmiş, MİK değerlerinin sırasıyla 1,65 ila 6,82 mg/mL, 1,12 ila 9,16 mg/mL arasında değiştiği saptanmıştır. Tarçının etanol ve metanol ile elde edilen ekstraktları için minimum inhibisyon zonları (MİZ) ise sırasıyla 11,13-14,35 mm ve 12,20-15,55 mm aralığında belirlenmiştir. Tarçının kloroform ekstraktları ve sulu ekstraktları ile MİZ ve MİK saptanamadığı için istatistiksel değerlendirmede kapsam dışı bırakılmıştır. Yapılan istatistik değerlendirmede; etanol ve metanol ekstraktlarının MİZ sonuçları karşılaştırıldığında, antimikrobiyal etkinlik açısından farklılığın anlamlı olmadığı (*E. faecalis* hariç) belirlenmiş ve bu ekstraktların benzer derecede antimikrobiyal etkinlik gösterdiği saptanmıştır ( $p<0,05$ ). *E. faecalis*'e karşı tarçının metanol kullanılarak elde edilen ekstraktının etanolla elde edilene kıyasla daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.

**Sonuç:** Bu çalışmada; incelenen tarçının etanol ve metanol ekstraktlarının antibakteriyel aktivite sonuçlarının, tarçın ekstraktlarının daha önceki çalışmalarda belirlenen patojenler üzerindeki antibakteriyel aktivitesine yakın hatta daha yüksek olabileceği belirlenmiştir. Elde edilen verilerin, gıdaların formülasyonlarının hazırlanmasında yardımcı olacağı düşünülmektedir. Bu çalışmanın sonuçları, geçmişte tarçın ekstraktları ile yapılan antibakteriyel aktivite çalışmalarının verileri ile karşılaştırıldığında çok farklı sonuçlar elde edildiği gözlenmiştir. Bitkisel antimikrobiyallerin etkinliğinin belirlenmesinde, antibiyotiklerde olduğu gibi standardize yöntemlere ihtiyaç duyulduğu sonucuna da varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Tarçın ekstraktları, antimikrobiyal etki, gıda kaynaklı patojen bakteri, minimum inhibisyon konsantrasyonu

using agar well diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) methods.

**Results:** MIC values for ethanol and methanol extracts from cinnamon ranged from 1.65 to 6.82 mg/mL and 1.12 to 9.16 mg/mL, respectively. Inhibition zones for ethanol and methanol extracts were determined in the range of 11.13-14.35 mm and 12.20-15.55 mm, respectively. In order to assess these extracts as food preservatives, more research on food model systems is required. Since MIZ and MIC were not determined cinnamon chloroform extracts and aqueous extracts, they were excluded from the statistical evaluation. In the statistical evaluation, when MIZ results were compared for the antimicrobial effects of ethanol and methanol extracts, it was determined that the difference was not significant (except for *E. faecalis*) ( $p<0.05$ ). It was determined that the cinnamon extract obtained using methanol was more sensitive to *E. faecalis* than the cinnamon extract obtained with ethanol.

**Conclusion:** It was determined that the antibacterial activity results of cinnamon ethanol and methanol extracts examined in this study may be close to or even higher than the antibacterial activity of cinnamon extracts on pathogens determined in previous studies. It is thought that the data obtained will help in the preparation of food formulations. When the results of this study were compared with the data of antibacterial activity studies conducted with cinnamon extracts in the past, it was observed that very different results were obtained by different researchers. It has been concluded that standardized methods are needed to determine the efficacy of herbal antimicrobials, as for antibiotics to determine antimicrobial efficacy.

**Key Words:** Cinnamon extracts, antimicrobial effect, foodborne pathogen, minimum inhibition concentration



## GİRİŞ

Tarçın, dünya mutfağında ve geleneksel tıpta geniş bir kullanıma sahip olan *Lauraceae* familyası *Cinnamomum* cinsinden her daim yeşil bir tropikal ağacın iç kabuğundan elde edilen, oldukça aromatik bir baharattır. *Cinnamomum zeylanicum*, *Cinnamomum loureirii*, *Cinnamomum burmanni* ve *Cinnamomum aromaticum* en çok bilinen tarçın türleridir. Antimikrobiyal, anti-inflamatuar, antialerjik, antitümör, antilipemik, antidiyabetik, ateş düşürücü, antiülserojenik, antihipertansif, mide koruyucu ve immünomodülatör gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (1). Türkiye’de tarçın obezite ve kilo kaybı için halk tarafından aktardan alınarak kullanılan ilk beş bitkiden birincisidir (2).

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar tüm dünyada sorun olmaya devam etmekte, bozulmaya yol açarak ve raf ömrünü kısaltarak önemli gıda kayıplarına yol açmaktadırlar. *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* başlıca gıda kaynaklı patojen bakterilerdir. Patojenik mikroorganizmalar veya bozulma yapan mikroorganizmalara karşı önlem almak için gıda endüstrisi genellikle koruyucu maddeler kullanır. Son yıllarda, tüketici bazında, doğal koruyucu maddelerin geliştirilmesine yönelik talep artmıştır. Doğal ve güvenli gıda koruyucu maddeler olarak bitki ekstraktlarının kullanımı önemli seçeneklerdir (3). Bitkisel ekstraktlar; su, alkol, klorofom veya hekzan gibi çözücüler kullanılarak bitkilerin taze veya kurutulmuş yapraklar, çiçekler, meyve çekirdekleri veya odunsu kısımlarının belirli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen sıvı, toz ya da viskoz bitki özlerine verilen isimdir. Farklı gıda ürünlerinde, çeşitli yöntemlerle elde edilen bitki ekstraktlarıyla gıda koruma yöntemleri geliştirmek için araştırmalar yapılmaktadır (4). Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri, pek çok bitki uçucu yağında bulunan terpenoidler (carvacrol, carvone, thymol, terpinen-4-ol) ve phenylpropanoidler (cinnamaldehyde, eugenol, anethol) gibi ikincil bitki bileşenlerinden

kaynaklanmaktadır. Mazimba ve ark. (5), *Cinnamomum verum*’un metanol ekstraktlarının fitokimyasal analizini yapmışlar; alkaloidler, flavanoidler, tanenler, fenoller ve saponinlerin varlığını saptamışlardır. Tarçın kabuk uçucu yağının temel bileşeni sinamaldehit (3-fenil-2-propenal fenol;  $C_9H_8O$ ), tarçın yaprak uçucu yağının başlıca bileşeni ise öjenoldür (6-8). Yapılan çalışmalar, sinamaldehit ve öjenol gibi aromatik maddelerin yüksek antimikrobiyal etkisini ortaya koymuştur (9-11).

Günümüzde sağlıklı beslenme, doğala yönelim ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle, bitkilerin ve ekstraktlarının gıdalara eklenmesi büyük ilgi çekmektedir. Bu çalışmada da çeşitli çözücülerle hazırlanan tarçının ekstraktlarının bazı gıda ve suyla bulaşan patojen bakteriler üzerine *in vitro* antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Laboratuvar çalışmaları ve ekstraktların üretimi, İstanbul Aydın Üniversitesi, ABMYO Gıda Teknolojisi Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

Üç farklı markaya ait (menşei Endonezya), kapalı ambalajda 100 gramlık altışar paket toz tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*) İstanbul’daki yerel marketlerden 2021 Ocak ayında temin edilmiştir.

Çalışmada, altı tanınmış patojen bakteri türü olarak *Salmonella Typhi* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 51780, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) kullanılmıştır. Suşlar BD Diagnostics’ten (Almanya) satın alınmış ve aerobik olarak 24 saat süreyle 37°C’de Nutrient Agar besiyerinde (Merck, 105458) inkübe edilmiştir (12).

Tüm ekstraktlar Gupta ve ark.’nın (12) yöntemi modifiye edilerek hazırlanmıştır. Her bir ekstraktı elde etmek için dört farklı çözücü [etanol (Merck 100986), metanol (Merck, 106009), kloroform (Merck 102445) ve fosfat tamponlu salin (PBS, Merck 109439 pH 7]

kullanılmıştır. Temin edilen tarçın, 15 gram tartılarak 100 mL'lik ağzı kapaklı erlenlere aktarıldıktan sonra her ekstrakt için ayrı ayrı 60 mL etanol, 60 mL metanol, 60 mL kloroform ve 120 mL PBS ilave edilmiştir. Karanlık bir yerde, oda sıcaklığında iki gün, orbital shaker (Scilogex, SK-O330-pro) ile çalkalanmıştır. Bu işlemten sonra, homojenizatör (WiseTis, HG-15A) ile iki dakika karıştırılmıştır. Orbital shaker çalkalama işlemine bir gece (12 saat) daha devam edilmiştir.

Ertesi gün ekstraktlar Whatman No.1 filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve ardından döner buharlaştırıcı (Heidolph Hei-Vap Value HL/G6) kullanılarak vakum altında 40°C'de konsantr edilmiş ve kuru madde miktarı hesaplanmıştır. Hazırlanan farklı ekstraktların verimleri (mg/mL) Tablo 1'de verilmiştir. Dimetil sülfoksit (DMS, Merck 802912) 1/10 oranında ilave edildikten sonra ekstraktlar çözülmüş ve ekstraktlar kahverengi şişelerde -25°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 1. Ekstraktların verimleri (mg/mL)

Solvent Tipi	Tarçın 1	Tarçın 2	Tarçın 3
Etanol	13,63	15	13,35
Metanol	18,325	26,33	17,92
Kloroform	13,38	14,75	14,4
PBS	6,61	8,64	6,62

Tarçın ekstraktlarının antibakteriyel özelliklerini araştırmak için agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır (12). Her bakteri başlangıçta, Brain Heart Infusion (Merck, 110493) sıvı besiyerine ekilmiş ve 24 saat 37°C'de aerobik koşullarda inkübe edilmiştir. *L. monocytogenes* için mikroaerofilik inkubasyon koşulları sağlanmıştır. Her test bakterisinden 100 mikrolitre standartlaştırılmış inokulum (10<sup>6</sup> CFU/mL; 0,5 MacFarland), Muller-Hinton Agar (MHA) besiyerine üzerine yayılmıştır. Petrilerin kuruması için bir süre beklendikten sonra, agarda steril bir delici yardımıyla 6 mm çapında kuyular açılmış ve her ekstraktan 100 µL'lik bir hacimde agar plakalarının kuyularına yerleştirilmiştir. Daha sonra petri kapları difüzyon sağlamak için oda sıcaklığında 1 saat bekletilip 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Her ekstrakt için altı paralel çalışılmıştır. Oluşan inhibisyon zonları dijital kumpas ile milimetre cinsinden ölçülmüştür (Şekil 1). Pozitif kontrol olarak gentamisin (10 µg) kullanılmıştır (Şekil 2).

Ekstraktların MİK değerleri mikrodilüsyon metodu kullanılarak saptanmıştır (13). İncelenen bakteri suşları Tryptic Soy Broth (Merck 105459) besiyerine ekilmiş ve 24 saat 37°C'de aerobik olarak, *L. monocytogenes* mikroaerofilik olarak inkübe edilmiştir. Steril 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarında, her bir ekstraktın iki kat azalan seyreltmeleri steril distile su ile yapılmıştır. Her suş Mueller-Hinton Broth (Merck 110293) ile 0,5 McFarland elde etmek için (10<sup>6</sup> kob/mL) süspansiyon edilmiştir. Daha sonra her kuyucuğa 50 µL bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Her mikrodilüsyon plakasının, bir negatif büyüme kontrolü (tek başına besiyeri) ve bir pozitif büyüme kontrolü (100 µL besiyerinde bakteri süspansiyonu) içermesi sağlanmıştır. Mikroplaka 48 saat 37°C'de aerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Kültürde bulanıklığın gözlenmediği, bakteri üremesinin olmadığını gösteren en düşük ekstrakt konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak belirlenmiştir. Doksan altı kuyucuklu plakın her kuyusundan, steril bir pipet ile

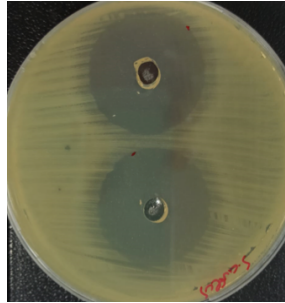
10 mikrolitre sıvı alınarak Triptik Soy Agar plaklarına aktarılmış ve hangi kuyucuğun son üreme olduğu kesin olarak doğrulanmıştır (Şekil 3). Her ekstrakt için üç bağımsız deney yapılmıştır.

Tüm analizlerin sonuçları ortalama olarak ifade edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 25 (IBM) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Zon çapları ve MİK değerlerinin tespiti için sırasıyla altı ve üç paralel

çalışılmıştır. Analiz yapılan veri setlerinin normal dağılım gösterdiği Shapiro-Wilk testiyle kontrol edilmiştir. İkili grupların karşılaştırması, Independent Samples T-test kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İki den fazla sayıda bulunan gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Games-Howel Testi kullanılarak saptanmıştır. *p* değerleri 0,05' den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu kabul edilmiştir.



Şekil 1. Kuyu difüzyon testi ile tarçının etanol, metanol ve kloroform ekstraktlarının minimum inhibisyon bölgeleri



Şekil 2. Gentamisin pozitif kontrol minimum inhibisyon zonları



Şekil 3. MHA besiyerinde MİK mikrodilüsyon testinin doğrulanması

## BULGULAR

Farklı tarçın ekstrakt çeşitlerinin verimleri (mg/mL) Tablo 1'de gösterilmiştir. Tarçın ekstraktlarının inhibisyon zonu ve MİK değerleri Tablo 2 ve Tablo 3'te özetlenmiştir. Tarçın etanol ve metanol özütlelerinin incelenen patojen bakterilere karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiş, ancak tarçın kloroform ve sulu ekstraktlarının incelenen hiçbir bakteriye karşı antibakteriyel etkisi gözlenmemiştir.

Inhibisyon zonu çapları etanol ve metanol ekstraktları sırasıyla 11,13-14,35 mm ve 12,57-15,55 mm aralığında belirlenmiştir (Tablo 2). *E. faecalis* hariç çözücü farklılığının (etanol, metanol)

ekstraktların antibakteriyel etkisinde değişikliğe sebep olmadığı belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). *E. faecalis*'in tarçının metanol kullanılarak elde edilen ekstraktına etanole kıyasla daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Etanol ve metanol ekstraktları tek tek ele alındığında tüm bakteri türlerine karşı istatistiksel olarak aynı oranda antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Tarçından elde edilen etanol ve metanol ekstraktları için MİK değerlerinin sırasıyla 1,65 ila 6,82 mg/mL, 1,12 ila 9,16 mg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 3). Bakteri çeşidinin MİK değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

Tablo 2. Tarçın ekstraktlarının minimum inhibisyon zonu çapları

Bakteri Türü	Zon Çapları (mm)	
	Etanol ekstrakt	Metanol ekstrakt
<i>S. Typhi</i>	13,48±2,26 <sup>a A</sup>	12,64±3,20 <sup>a A</sup>
<i>E. coli</i>	13,60±2,80 <sup>a A</sup>	15,55±2,68 <sup>a A</sup>
<i>B. cereus</i>	14,35±2,84 <sup>a A</sup>	12,57±1,20 <sup>a A</sup>
<i>S. aureus</i>	13,20±1,53 <sup>a A</sup>	15,52±2,18 <sup>a A</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	13,10±1,36 <sup>a A</sup>	12,74±1,28 <sup>a A</sup>
<i>E. faecalis</i>	11,13±0,51 <sup>a B</sup>	15,20±2,85 <sup>a A</sup>

a: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır ( $p<0,05$ )

A-B: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır ( $p<0,05$ )

Tablo 3. Tarçın ekstraktlarının MİK değerleri (mg/mL)

Bakteri Türü	Etanol ekstrakt		Metanol ekstrakt	
	Min-Max	Ortalama	Min-Max	Ortalama
<i>S. typhi</i>	2,75-3,41	3,15 <sup>a</sup>	1,65-4,58	3,57 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	2,75-6,82	4,29 <sup>a</sup>	2,24-9,16	4,89 <sup>a</sup>
<i>B. cereus</i>	1,70-3,30	2,58 <sup>a</sup>	2,24-3,29	2,61 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i>	2,75-3,41	3,15 <sup>a</sup>	1,12-4,58	2,45 <sup>a</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	2,75-3,41	3,15 <sup>a</sup>	2,24-3,29	2,61 <sup>a</sup>
<i>E. faecalis</i>	1,65-3,41	3,52 <sup>a</sup>	1,15-6,58	3,32 <sup>a</sup>

a: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır ( $p<0,05$ )

## TARTIŞMA

Bu çalışmada, tarçın etanol ve metanol çözücülerini ile elde edilen ekstraktlar incelenen tüm bakteri suşlarına karşı *in vitro* antibakteriyel etkinlik göstermiş, ancak tarçın kloroform ve sulu ekstraktlarının hiçbir bakteri üzerine etkinlik göstermediği belirlenmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen verilere göre tarçın ekstraktlarının *S. Typhi*'e karşı *in vitro* antimikrobiyal etkisi incelendiğinde, literatürde benzer olarak tarçının kloroform ve sulu ekstraktlarının antibakteriyel etki göstermediği çalışmalar olduğu saptanmıştır (14, 15). Cowan (16), tarçının ana aktivitesinin esas olarak öjenol ve sinamaldehit içeriğinden kaynaklandığını ve bu bileşiklerin tercihen sudan çok etil alkol içinde çözüldüğünü bildirmiştir. İsmail ve ark. (14) ve Naveed ve ark. (17) tarafından gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları; çalışmamızın sonuçlarına [2,75-3,41 mg/mL (min-max)] benzer olarak tarçın etanol ekstraktlarının *S. Typhi*'e karşı MİK değerlerinin sırasıyla 3 mg/mL ve ortalama 3,57 mg/mL olarak bildirildiği saptanmıştır.

Moon (18) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise tarçın etanol ve metanol ekstraktlarının (w/v: 10 g/100 mL) *E. coli* için belirlenen inhibisyon zonlarının çalışmamıza benzer olarak sırasıyla 10 mm ve 18 mm olarak saptandığı gözlemlenmiştir. Yine bir başka çalışmada; tarçın metanol ekstraktının *E. coli* için inhibisyon zonu 10 mm olarak bildirilmiştir (5). İsmail ve ark. (14)'nın çalışmasında ise *E. coli* ATCC 5087'e karşı MİK değeri 3 mg/mL olarak bildirilmiş olup, sulu ekstrakt için MİK belirlenmemiştir.

Yapılan çeşitli çalışmaların sonucunda farklı sonuçlar elde edildiği de görülmüştür. Rakshit ve Ramalingam (19) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; *Cinnamomum verum* (tarçın) sulu ekstraktının (w/v: 40/200 mL) *E. coli* açısından antibakteriyel aktivitesini değerlendirilmiş, yüksek dozda hazırlanan ekstraktlarda zon oluşumu gözlemlenmiştir. Hoque ve ark. (20) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada

ise tarçının (*Cinnamomum cassia*), etanol, sulu ekstraktının *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi olmadığı bildirilmiştir. Tarçının metanol ve etanol ekstraktlarının *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkisinin olmadığını bildiren başka çalışmalar da bulunmaktadır (21, 22). Genel olarak yapılan çalışmaların sonucunda elde edilen farklı sonuçların ekstraksiyon yöntemi, kullanılan tarçın çeşidi ve analiz yönteminin farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Albaridi ve Yehia (23) tarafından yapılan çalışmada da *B. cereus* ATCC 14579'a karşı tarçın sulu ekstraktının MİK değeri 100 mg/mL, etanol ekstraktının ise 6,25 mg/mL olarak saptanmıştır. Çalışmamızdaki etanol ekstraktı *B. cereus* MİK değeri 1,70-3,30 mg/mL (ortalama 2,58 mg/mL) olarak belirlenmiş olup bu çalışmadan oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. İnhibisyon zon çapları karşılaştırıldığında; sulu ekstraktlarda benzer olarak inhibisyon zonu belirlenemediği görülmüş ve etanol ekstraktının minimum inhibisyon zon çapları bizim çalışmamıza göre oldukça yüksek bulunmuştur. Ayrıca yapılan farklı çalışmaların MİK ve MİZ sonuçlarının çalışmamızda elde edilen değerlerden yüksek olduğu belirlenmiştir (12, 18). *B. cereus*'a karşı tarçının metanol ekstraktının antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği başka bir çalışmanın MİK değeri, bizim çalışmamızdan elde edilen değerden yüksek bulunmuş olmasına rağmen inhibisyon zon çaplarının (MİZ 15,4 ± 0,3 mm) yakın olduğu görülmüştür (11).

Hoque ve ark. (20)'nın çalışmasında tarçının (*Cinnamomum cassia*), etanol ekstraktında 10,0 mg/mL miktarında MİZ gözlenmemiş; MİK değerleri etanol ekstraktı için saptanmamıştır.

İsmail ve ark. (14)'nın çalışmasında da Mısır'da baharat olarak kullanılan tarçının etanol ve sulu ekstraktı 100, 200 and 300 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış ve *S. aureus* ATCC 6538 üzerine antimikrobiyal etkinliği agar jel difüzyon tekniği ile MİK belirlenerek değerlendirilmiştir. Bu bakteri ile tarçın etanol ekstraktının MİK değeri 2 mg/mL olarak saptanmıştır. Belirlenen MİK değeri bizim çalışmamıza

yakın olduğu tespit edilmiştir. Sulu ekstraktta MİK belirlenmemiştir. Hazırlanan tarçın sulu ekstraktının (100 mg/mL) MİK değeri saptanamamıştır. Bu çalışma ile ve bizim çalışmamızda sulu ekstraktta MİK belirlenmemiştir. Mouas ve ark.'nın (15) tarçının (*Cinnamomum zeylanicum*) kloroform ile hazırladıkları ekstraktının (15,625 ila 500 µg/mL) *S. aureus* için antimikrobiyal duyarlılığı agar jel difüzyon ile ölçüldüğü çalışmasında da 10-13 mm inhibisyon zonu belirlenmiştir. Mazimba ve ark. (5) *Cinnamomum verum*, gövde kabuğu metanol ekstraktlarının (100 µg/mL), *S. aureus*'a karşı MİZ değerini 11 mm, MİK değerini ise 2,5 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Mazimba ve ark. (5) ile Mouas ve ark. (15)'nin çalışmasında belirlenen sonuçlar bizim çalışmamızla yakın olduğu görülmüştür. *Cinnamomum burmannii* ile hazırlanan Blume (tarçın çubuğu) metanol ekstraktın (w/v: 1/25) *S. aureus* için MİZ 15.7 ± 0.4 mm olarak belirlenmiş ve çalışma sonucumuz ile yakın olduğu görülmüştür. Hoque ve ark. (20), tarçının (*Cinnamomum cassia*), etanol (w/v: 100 gram/400 mL), sulu ekstrakt ve solvent-solvent ekstraksiyon metoduyla elde ettikleri esansiyel yağları dört farklı *S. aureus* suş üzerine antimikrobiyal etkinliğini agar disk difüzyon yöntemi ile belirlemişlerdir. Tarçın etanol ekstraktı (10,0 mg/mL) üç *S. aureus* suşu üzerine 10,0±0,45- 11,0±0,20 mm arasında inhibisyon zonu göstermiş ve 13.208 mm olan sonuç, bizim sonuçlarımız ile yakın bulunmuştur. Tarçın esansiyel yağı (%10) ise dört *S. aureus* suşuna 2,0±0,81 - 44,0±0,50 mm aralığında inhibisyon zonu göstermiştir. MİK değerleri üç farklı *S. aureus* üzerine 2,0-3,5 mg/mL aralığında belirlenmiş ve bu sonuç 2,75-3,41 mg/mL (ortalama 3,15 mg/mL) olan bizim sonuçlarımız ile yakın görülmüş ve suş farklılıklarının önemi ortaya konulmuştur. Tarçın esansiyel yağı dört farklı *S. aureus* suşu için MİK değeri %2,5 olarak belirlenmiştir.

Gupta ve ark. (12)'nin tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*) ekstraktı (w/v: 1/5) (%50 etanol) ve yağının *S. aureus* karşı inhibisyon çapları sırasıyla 16 mm ve 20 mm olarak hesaplanmıştır. Tarçın etanol

ekstraktı MİZ sonucu bizim sonuçlarımıza yakın olduğu görülmüştür. Tarçın etanol ekstraktı MİK değeri 62,5 mg/mL olarak belirlenmiş; çalışmamızda belirlenen etanol ekstraktı sonucumuzun 2,75-3,41 mg/mL'in bu değerden oldukça düşük olduğu görülmüştür.

Bayoub ve ark. (24)'nin çalışmasında, tarçının (*Cinnamomum zeylanicum*) etanol (%90) ekstraktının (20 g/100 mL) *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkinliğini agar kuyu difüzyon ve mikrodilüsyonla belirlenmiştir. MİZ 22 mm, MİK değeri ise 0,4 mg/mL olarak saptanmıştır. MİZ değerinin çalışmamızdan yüksek; MİK değeri ise daha düşük bulunmuştur.

Gupta ve ark.'nın (12), tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*) ekstraktının (w/v: 1/5) (%50 etanol) *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon çapını 10 mm olarak belirlenmiş ve çalışmamızın sonuçlarına yakın değer olduğu görülmüştür. 500 mg/mL hazırlanan tarçın ekstraktın MİK değerinin ise çalışmamızdaki değerden yüksek olduğu belirlenmiştir. *L. monocytogenes*, *C. cassia*'dan ekstrakte edilen bileşenler tarafından ve kullanılan maksimum konsantrasyonda (MİK:2640 mg/L) inhibe edildiği belirlenmiştir (25). MİK değeri bizimkinden oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

*Cinnamomum verum*'un (tarçın) sulu ekstraktının (w/v: 40g/200 mL), *E. faecalis*'e karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (9, 19). Çalışmamızda; sulu ekstraktlar için MİZ ve MİK değeri belirlenmemiştir. Adarsh ve ark. (9) tarafından, *Cinnamomum zeylanicum*'un metanol, etanol ve su ekstraktlarına (50 gram/200 mL çözücü) yönelik yapılan çalışma sonucunda; *E. faecalis*'e karşı inhibisyon zonları kloroform ekstrakt (ortalama 11 mm), metanol ekstrakt (ortalama 7 mm) ve sulu ekstrakt (ortalama 6 mm) şeklinde tespit edilmiştir. Çalışmamızda su ve kloroform ekstraktlarında inhibisyon zonu gözlenmemiş olup metanol ekstraktında bu çalışmadan daha büyük inhibisyon zonları ölçülmüştür. Yapılan bir çalışmada; *E. faecalis* ATCC 33186 suşunun metanol ekstraktlarına karşı en dayanıklı suş olarak belirlenmiştir. Gram negatif bakterilerin Gram pozitif bakterilere göre daha fazla

etkilendikleri tespit edilmiştir (21).

Bitkilere özgü antimikrobiyal etkili bileşiklerin miktarı tür, yetiştirildiği toprağın özellikleri, iklim, sulama gibi faktörlerden etkilenmesi, aynı zamanda bu bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılan farklı yöntemler, ekstraksiyonda kullanılan çözücünün niteliği gibi unsurlar da antimikrobiyal etkinin derecesi üzerinde belirleyici olmaktadır. Tüm bunlar farklı çalışmaların farklı antimikrobiyal etkinlik belirlemede açıklayıcı olabilir.

Farklı çalışmalar, bitkisel ekstrakt ve esansiyel yağların antimikrobiyal etkinliği açısından Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilerden daha duyarlı olduğunu açıklasa da çalışmamızdaki istatistiksel değerlendirmeye göre Gram negatif ile Gram pozitif bakterilerin MİZ çapları arasındaki fark anlamsız bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Shan ve ark. (11)'nin çalışması ile daha önceki birçok çalışmada (26-28), çoğu baharat ekstraktının Gram pozitif bakterilere karşı Gram negatif bakterilere göre daha aktif olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin dış katmanlarındaki önemli farklılıklardan olduğu şeklinde açıklanmıştır. Ancak bizim yaptığımız çalışmada böyle bir sonuca varılmamıştır. Ojagh ve ark. (29)'nın çalışmasında, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler için farklı duyarlılıkta MİK sonuçları saptanmıştır. Kose (21), bu çalışmaların aksine bazı baharat tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*), kimyon (*Cuminum cyminum L.*), kekik (*Thymus vulgaris L.*) ve nanenin (*Mentha spicata L.*) metanol ekstraktlarının *E. coli*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *S. Typhimurium*'a karşı agar difüzyon yöntemi ile *in vitro* antibakteriyel etkisini incelediği çalışmada; Gram negatif bakterilerin Gram pozitif bakterilerden daha fazla etkilendiğini belirlemiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda, farklı bakteri suşlarından kaynaklanan duyarlılık farkı bildirilmiştir (17, 20, 30, 31).

Bitkiler, *in vitro* olarak antimikrobiyal özelliklere

sahip olduğu bilinen tanenler, terpenoidler, alkaloidler, flavonoidler, flavonlar ve flavonoller gibi metabolitler açısından zengindir. Mikroorganizmalara karşı aktif olan bitkilerden tanımlanan bileşenlerin neredeyse tamamı aromatik veya doymuş organik bileşikler olduğundan, bunlar çoğunlukla ilk etanol veya metanol ekstraksiyonu yoluyla elde edilir. Polisakaritler (örneğin nişasta) ve polipeptitler gibi istisnai suda çözünür bileşikler dışında, aslında, birçok çalışmada sulu fraksiyonlamadan çoğunlukla kaçınılmıştır (16). Tarçın biyoaktif bileşikler alkoller, eter, kloroformda çözüldüğü ve suda az çözüldüğü bildirilmiştir. Aydın (32)'nin tarçın, kimyon ve sumak üzerinde yaptığı çalışmasında, toplam fenolik bileşik miktarlarının metanol ve etanol-su ekstraktlarında en yüksek, kloroform ekstraktlarında en düşük olduğu belirlenmiştir. Ekstraktlar arasındaki toplam fenolik bileşik miktarları sıralandığında ise kloroform < metanol < etanol-su ≤ su ekstraktları şeklinde sıralanmıştır. Tarçının iki ana aktif bileşeni olan sinamaldehit ve sinamik asit ekstraksiyonunda etanol (40,1 ve 3,4 mg/g), ardından metanol (38,6 ve 3,21 mg/g), kloroform (35,7 ve 3,3 mg/g) ve su (15,2 ve 1,7 mg/g) en yüksek verimini göstermiştir (10). Bu çalışmanın sonucu bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumludur. Çalışmamızda da en düşük antimikrobiyal etkinlik sulu ekstrakt ve ardından kloroform ekstraktında belirlenmiştir.

Tarçın ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği yönünden yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar tespit edilmiştir. Bitkisel antimikrobiyallerin etkinliğinin belirlenmesinde, antibiyotiklerde olduğu gibi standardize yöntemlere ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Sonuçlar, doğru ve güvenilir MİK ve MİZ değerlerine ihtiyaç duyulduğunu açıkça vurgulamaktadır. Ayrıca bitkisel antimikrobiyallerin varlığı düşünülerek gıda takviyelerinin dozajlarının ve vücuttaki etkilerinin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya, Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından, 2019/8 numaralı proje kapsamında mali destek veren İstanbul Aydın Üniversitesi'ne teşekkür ederiz

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Hajimonfarednejad M, Ostovar M, Raei MJ, Hashempour MH, Mayer JG, Heydari M. Cinnamon: a systematic review of adverse events. *Clin Nutr*, 2019; 38(2): 594-602.
2. Ekin A, Karaalp C, Kaner G. Kadınlarda zayıflama amacıyla bitkisel ürün kullanım sıklığının ve bitkisel ürün kullanımını etkileyen faktörlerin belirlenmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2019; 77(2), 167-78.
3. Valdivieso-Ugarte M, Gomez-Llorente C, Plaza-Díaz J, Gil A. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, 2019; 11(11): 2786.
4. Teneva D, Denkova Z, Denkova-Kostova R, Goranov B, Kostov G, Slavchev A, et al. Biological preservation of mayonnaise with *Lactobacillus plantarum* LBRZ12, dill, and basil essential oils. *Food Chem*, 2021; 344: 128707.
5. Mazimba O, Wale K, Tebogo E, Kwape Shetonde O. *Cinnamomum verum*: ethylacetate and methanol extracts antioxidant and antimicrobial activity. *J Med Plants Studies*, 2015; 3(3): 28-32.
6. Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Sanjust E, Meli M et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Cinnamomum zeylanicum*: Chemical characterization and antityrosinase activity. *J Agric Food Chem*, 2007; 55(24): 10022-7.



7. Singh G, Maurya S, de Lampasona MP, Catalan CAN. Comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol*, 2007;45: 1650-61.
8. Jayawardena B, Smith RM. Superheated water extraction of essential oils from *Cinnamomum zeylanicum*. *Phytochem Anal*, 2010; 21: 470-2.
9. Adarsh A, Chettiyar B, Kanthesh BM, Raghu N. Phytochemical screening and antimicrobial activity of "Cinnamon zeylanicum". *Int J Pharm Res Innov*, 2020; 13: 22-33.
10. Gilani S, Najafpour G. Evaluation of the extraction process parameters on bioactive compounds of cinnamon bark: A comparative study. *Process Biochem*, 2022; 114: 93-101.
11. Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *J Agric Food Chem*, 2007; 55(14): 5484-90.
12. Gupta C, Garg AP, Uniyal RC, Kumari A. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. *Afr J Microbiol Res*, 2008; 2(9): 247-51.
13. Boligon AA, de Brum TF, Zadra M, Piana M, dos Santos Alves CF, Fausto V, et al. Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol*, 2013;112(2): 105-7.
14. İsmail MM, Essam TM, Mohamed AF, Mourad FE. Screening for the antimicrobial activities of alcoholic and aqueous extracts of some common spices in Egypt. *Int J Microbiol Res*, 2012; 3(3), 200-7.
15. Mouas T, Benalileche Y, Benalileche M. Biological assessment of *Cinnamomum zeylanicum* percolate. 1st International Electronic Conference on Biological Diversity, Ecology and Evolution. March, 15- 31, Basel, Switzerland, 2021.
16. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 1999; 12: 564-82.
17. Naveed R, Hussain I, Tawab A, Tariq M, Rahman M, Hameed S, et al. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complement Altern Med*, 2013; 13(1): 1-10.
18. Moon TM. Determination of antibacterial activity of cinnamon and black cumin extracts, along with MIC/MBC against bacterial isolates and analysis of their phytochemical properties. Doctoral dissertation, BRAC University, 2018.
19. Rakshit M, Ramalingam C. In-vitro antibacterial and antioxidant activity of *Cinnamomum verum* (Cinnamon) aqueous bark extract in reference to its total phenol content as natural preservative to food. *Int J Biol Biotech*, 2011; 8(4): 529-37.
20. Hoque MM, Inatsu M, Juneja V, Kawamoto S. Antimicrobial activity of cloves and cinnamon extracts against food borne pathogens and spoilage bacteria and inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground chicken meat with their essential oils. *Rep Nat Food Res Inst*, 2008; 72: 9-21.
21. Kose S. Determination of antimicrobial and antioxidant activity of some spices widely consumed in Turkey. *FBED*, 2020; 10(4): 2574-82.
22. Bonilla J, Sobral PJDA. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extracts of guarana, boldo, rosemary and cinnamon. *Braz J Food Technol*, 2017; 20: e2016024.
23. Albaridi NA, Yehia HM. The real role of select herb and spice extracts against *Bacillus cereus* ATCC 14579 growth in cooked rice. *Food Sci Technol (Campinas)*, 2022; 42: e08521.
24. Bayoub K, Baibai T, Mountassif D, Retmane A, Soukri A. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *Afr J Biotechnol*, 2010; 9(27): 4251-8.
25. Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol*, 2003; 80(3): 223-30.

26. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol*, 1998; 26(2): 118-22.
27. Lopez P, Sanchez C, Batlle R, Nerin C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J Agric Food Chem*, 2005; 53(17), 6939-46.
28. Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem*, 2005; 53: 7749-59.
29. Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SMH. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chem*, 2010; 122(1): 161-6.
30. Valdivieso-Ugarte M, Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Gómez EL, Sabés-Alsina M, Gil Á. In vitro examination of antibacterial and immunomodulatory activities of cinnamon, white thyme, and clove essential oils. *J Funct Foods*, 2021; 81: 104436.
31. Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *J Agric Food Chem*, 1996; 44(5), 1202-5.
32. Aydın, Ö. Tarçın, kimyon ve sumak adlı baharat türlerinden elde edilen su, etanol-su, metanol ve kloroform ekstraktlarının in vitro antioksidant özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011.

# Solunum yolu enfeksiyonlarında kullanım önerisi ile satılan bitkisel çayların antimikrobiyal etkileri

## Antimicrobial effects of herbal teas sold with recommendation for use in respiratory tract infections

Serdar DEMİR<sup>1</sup> (ID), Canan KARAALP<sup>1</sup> (ID), İsmail ÖZTÜRK<sup>2</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, İzmir'deki aktarlarda solunum yolu enfeksiyonlarında kullanım önerisi ile satılan 19 adet bitkisel çay örneğinden (13 karışım çay, 4 mono çay ve 2 ticari marka) hazırlanan su ve metanol ekstralarının, 7 standart bakteri suşu, 2 standart maya mantarı suşu ve 12 klinik izolat üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Bitkisel çaylardan hazırlanan ekstraların, antimikrobiyal aktiviteleri American Tip Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis* ile 12 klinik izolat (4 *S. aureus*, 4 *C. albicans* ve 4 *S. pneumoniae*) üzerinde Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre mikrodilüsyon metodu ile incelenerek minimum bakterisidal/fungusidal konsantrasyon (MBK/MFK) değerleri belirlenmiştir.

**Bulgular:** İncelenen örnekler arasında güçlü antibakteriyel aktivite gösteren ekstralar şu şekildedir:

### ABSTRACT

**Objective:** In this study, it was aimed to investigate the antimicrobial activities of water and methanol extracts prepared from 19 herbal tea samples (13 blended teas, 4 mono teas and 2 trademarks) sold by herbalists in Izmir with recommendation for use in respiratory tract infections, on 7 standard bacterial strains, 2 standard yeast strains and 12 clinical isolates.

**Methods:** The antimicrobial activities of the extracts prepared from the medicinal teas were investigated on *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans* and *C. parapsilosis* obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and on 12 clinical isolates (including 4 *S. aureus*, 4 *C. albicans* and 4 *S. pneumoniae*). Minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) values were determined by examining with microdilution method according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria.

**Results:** Among the tested samples, the extracts that exhibited potent antibacterial activity are as follows:

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik AD., İzmir

<sup>2</sup>İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD., İzmir



İletişim / Corresponding Author : Serdar DEMİR

Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik AD., Bornova-İzmir - Türkiye

E-posta / E-mail : serdar.demir@ege.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 18.03.2022

Kabul Tarihi / Accepted : 10.01.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.87522

Demir S, Karaalp C, Öztürk İ. Solunum yolu enfeksiyonlarında kullanım önerisi ile satılan bitkisel çayların antimikrobiyal etkileri  
Türk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(1): 79 - 90

adaçayı metanol ekstresi *S. aureus*, *B. subtilis* suşları ile 4 *S. aureus* izolatında, 13 bitkisel drog içeren kış çayı metanol ekstresi *E. faecalis* ile 3 *S. aureus* izolatında, 11 bitkisel drog içeren kış çayı metanol ekstresi ise *E. faecalis* üzerinde inhibisyon sağlamıştır (MİK=31-62 µg/mL).

**Sonuç:** Bu çalışmada standart bakteri ve maya mantarı suşları ile klinik izolatlara karşı etkinlikleri araştırılan bitki çayı ekstralarının farklı düzeylerde antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, antiinflamatuar etkili zencefil ve zerdeçal, müsülaj taşıyan ihlamur ve hatmi gibi droglar içeren bitkisel kış çayları, doğru bitkinin seçilmesi, kabul edilir yöntemlerle toplanıp paketlenmesi ve uygun koşullarda saklanması halinde tedaviyi desteklemek için kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Bitkisel çay, antimikrobiyal aktivite, mikrodilüsyon yöntemi

methanol extract of sage inhibited *S. aureus*, *B. subtilis* strains and 4 *S. aureus* isolates; methanol extract of a winter tea consisting 13 herbal drugs inhibited *E. faecalis* and 3 *S. aureus* isolates and methanol extract of a winter tea consisting 11 herbal drugs inhibited *E. faecalis* (MIC=31-62 µg/mL).

**Conclusion:** In this study, it was determined that herbal winter tea extracts, whose activities were investigated against standard bacterial and yeast strains and clinical isolates, showed antimicrobial activity at different levels. In addition, anti-inflammatory drugs such as ginger and turmeric, mucilage-bearing linden and marshmallow can be used to support the treatment if the right plant is selected, collected and packaged with acceptable methods and stored under appropriate conditions.

**Key Words:** Herbal tea, antimicrobial activity, microdilution assay

## GİRİŞ

İnsanlar çağlar boyunca çeşitli hastalıkların tedavisinde farklı uygulama yolları kullanarak bitkilerden yararlanmışlardır. Bitkilerin şifa amaçlı kullanım şekilleri arasında kolay uygulanabilir ve ulaşılabilir olması nedeniyle çay olarak tüketimleri öne çıkmaktadır. Bitkisel çaylar, bir veya birkaç drogtan maserasyon, dekoksasyon veya infüzyon yoluyla hazırlanan, soğuk algınlığı, hazımsızlık, kabızlık, diyare, menstrüel bozukluklar ve uykusuzluk gibi günlük şikayetlerde tedavi edici veya tedaviye yardımcı değere sahip ürünlerdir (1,2). Bitkisel çaylar polifenolik bileşikler açısından oldukça zengin olup, antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuar, galaktogog, östrojenik, antiproliferatif ve antidiyabetik aktivite gösterdikleri yapılan çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (3-11).

Sinüzit, tonsillit ve farenjit gibi üst solunum yolları ile bronşit, toplum kökenli pnömoni gibi alt solunum

yolu rahatsızlıkları en çok rastlanan enfeksiyon hastalıklarıdır. Son yıllarda, antibiyotiklerin yanlış ya da fazla kullanımı nedeniyle dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması, enfeksiyon hastalıklarının tedavisini zorlaştırmaktadır (12). Tıbbi bitkiler, çeşitli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlara karşı etkili yeni bileşiklerin geliştirilmesinde potansiyel doğal kaynaklardan olup, yapılan çeşitli araştırmalarla çok sayıda bitki ekstresinin veya bitkilerden izole edilen metabolitlerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır (13-15).

Solunum yolu enfeksiyonları, özellikle kış aylarında halkın tedavi ve korunma amacıyla bitkisel ürünlere başvurduğu rahatsızlıkların başında gelmekte olup çoğunlukla aktardan temin edilen ve “kış çayı” olarak adlandırılan bitkiler veya bitki karışımları yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. İzmir’deki aktarlarda solunum yolu enfeksiyonlarında kullanılmak üzere satılan bitkisel çaylardan hazırlanan su ve metanol

ekstrelerinin çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki aktivitelerinin incelenmesi ve sunulan çay karışımlarının halk arasındaki kullanımlarının uygun olup olmadığının değerlendirilmesi, bu çalışmanın amacıdır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Bitkisel Materyal

Bu çalışmada, İzmir’de farklı aktar ve marketlerden, solunum yolu rahatsızlıklarında kullanım önerisi ile satılan 13 karışım çay, 4 mono çay ve poşet çay olarak hazırlanmış 2 ticari marka olmak üzere, toplam 19 adet çay örneği satın alınmıştır. Çayların içeriği, etiket bilgilerine bakılarak, etiketsiz ürünlerde ise drogların makroskopik olarak incelenmesi ile belirlenmiştir (Tablo 1).

### Ekstraksiyon ve İnfüzyon

Ürünlerin paket içeriklerinin tamamı mekanik olarak öğütülmüş ve homojen olarak karıştırılmıştır. 20 g örnek üzerine 200 ml metanol (Analitik derece, Merck) ilave edilmiş ve 24 saat beklemeye bırakılmıştır. Daha sonra 30 dk ultrasonik su banyosunda tutulduktan sonra filtre kağıdından süzölmüştür.

İnfüzyon işlemi için ise 20 g örnek üzerine 200 ml kaynar su ilave edilerek 30 dk beklemeye bırakılmış ve filtre kağıdından süzölmüştür. Daha sonra infüzyon ve metanol ekstreleri ayrı olarak, rotavapor ile vakum altında 40 C°’de yoğunlaştırılmış ve vial içerisine alınarak vakum konsantratör sisteminde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Elde edilen ekstre ve infüzyonların miktarları ve ağırlıkça % verimleri tablo halinde sunulmuştur (Tablo 2).

Tablo 1. Aktarlarda satışı sunulan kış çaylarının paket içerikleri

İçerik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Zencefil rizomu ( <i>Zingiber officinale</i> Roscoe)					+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Tarçın kabuğu ( <i>Cinnamomum</i> sp.)						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+
Kuşburnu meyvesi ( <i>Rosa canina</i> L.)					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Havlıcan rizomu ( <i>Alpinia officinarum</i> Hance)					+	+	+			+	+	+	+	+	+	+			+
Hibiskus çiçeği ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)					+	+	+	+	+	+	+	+		+	+				+
Hatmi çiçeği ( <i>Alcea</i> sp.)					+	+	+		+	+				+	+	+			
Adaçayı ( <i>Salvia</i> spp.)				+	+	+			+	+				+		+			+
İhlamur Yaprağı ( <i>Tilia</i> sp.)	+				+	+				+					+	+			+
İhlamur Çiçeği ( <i>Tilia</i> sp.)		+																	
Zerdeçal rizomu ( <i>Curcuma longa</i> L.)					+	+	+					+	+						+
Papatya çiçeği ( <i>Matricaria chamomilla</i> L.)						+	+		+	+					+				
Sığırkuyruğu çiçeği ( <i>Verbascum</i> sp.)							+		+		+			+					
Karanfil tomurcuğu ( <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry)						+					+							+	+

Tablo 1 (devamı). Aktarlarda satışı sunulan kış çaylarının paket içerikleri

İçerik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Hünnap meyvesi ( <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.)						+			+	+									
Ekinezya çiçeği ( <i>Echinacea</i> sp.)							+							+		+			+
Dağ çayı ( <i>Sideritis</i> sp.)			+			+													
Limon kabuğu [ <i>Citrus limon</i> (L.) Burm.f.]					+			+											+
Elma kurusu ( <i>Malus domestica</i> Borkh.)								+				+	+						
Mersin yaprağı ( <i>Myrtus communis</i> L.)									+	+								+	
Portakal kabuğu [ <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck]					+			+											
Meyan Kökü ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.)														+		+			
Kekik ( <i>Thymus</i> sp. <i>Thymbra</i> sp., <i>Satureja</i> sp. <i>Origanum</i> sp.)					+											+	+		
Rezene meyvesi ( <i>Foeniculum vulgare</i> Mill)					+									+					
Ebegümeci çiçeği ( <i>Malva sylvestris</i> L.)							+												
Karabaş lavanta çiçeği ( <i>Lavandula stoechas</i> L.)									+										
Civanperçemi çiçeği ( <i>Achillea</i> sp.)									+										
Defne yaprağı ( <i>Laurus nobilis</i> L.)										+									
Vişne meyvesi ( <i>Prunus cerasus</i> L.)										+									
Biberiye yaprağı ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)																		+	
Yenibahar meyvesi [ <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.]																			+
Zahter yaprağı ( <i>Thymbra spicata</i> L.)																			+
Böğürtlen yaprağı ( <i>Rubus</i> sp.)																			+
Limonotu ( <i>Lippia chrysantha</i> Greenm.)																			+
Isırganotu yaprağı ( <i>Urtica</i> sp.)																			+
Fesleğen yaprağı ( <i>Ocimum basilicum</i> L.)																			+
Keçiboynuzu meyvesi ( <i>Ceratonia siliqua</i> L.)					+														
Nane yaprağı ( <i>Mentha</i> spp.)					+														
Ayva yaprağı ( <i>Cydonia oblonga</i> Mill.)					+														

Tablo 2. Elde edilen ekstre ve infüzyonların miktarları ve ağırlıkça % verimleri

Çay No	Miktar (g)		Verim (%)	
	Metanol ekstresi	İnfüzyon	Metanol ekstresi	İnfüzyon
1	2.80	2.24	14.01	11.20
2	3.50	2.90	17.52	14.52
3	2.91	3.35	14.57	16.75
4	3.92	3.79	19.62	18.95
5	5.05	4.26	25.23	21.30
6	3.69	3.44	18.46	17.20
7	3.44	2.96	17.22	14.80
8	9.34	7.63	46.68	38.15
9	2.85	2.98	14.26	14.9
10	5.04	3.03	25.22	15.16
11	2.46	2.19	12.32	10.95
12	3.36	2.23	16.78	11.13
13	3.63	1.20	18.17	6.10
14	3.03	1.58	15.17	7.89
15	3.18	0.93	15.91	4.64
16	3.32	1.66	16.58	8.30
17	4.94	3.43	24.57	17.15
18	4.37	3.10	21.84	15.51
19	2.48	4.01	12.4	20.07

### Test Mikroorganizmaları

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 04059, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 02021, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, 4 adet *S. aureus*, 4 adet *C. albicans* ve 4 adet *S. pneumoniae* klinik izolatları çalışmaya dahil edilmiştir. Solunum yollarından elde edilen klinik izolatlar, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

### Antimikrobiyal Aktivite

Hazırlanan infüzyon ve metanol ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre mikrodilüsyon metodu ile incelenmiştir (16). Bakteriyel kökenler Mueller-Hinton agarda (MHA)

(Merck) 37°C'de 24 saat, *Candida* kökenleri Sabouraud dekstroz agarda (SDA) (Oxoid) 37°C'de 48 saat inkübe edilerek canlandırılmıştır. Canlandırılan kültürler serum fizyolojik ile süspansiyonlar dansitometre cihazı (Den-1, Biosan) ile 0.5 McFarland'a ayarlanmıştır.

96 kuyucuklu mikropalakaların kuyucuklarına bakteri kökenleri için 50 µl Mueller-Hinton broth (MHB), *S. pneumoniae* izolatları için 50 µl %5 hemolize at kanı içeren MHB, *Candida* kökenleri için ise 50 µl, 3-morfolinopropan-1-sülfonik asit (MOPS) ile tamponlanmış Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma) besi yeri ilave edilmiştir. Her bir köken için ilk kuyucuklara 50 µl olmak üzere, dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülmüş ekstre veya infüzyon ilave edilerek seri dilüsyonları yapılmıştır (4000 - 2 µg/mL). Son olarak tüm kuyucuklara 1/100 oranında dilüe edilmiş olan mikrobiyal süspansiyonlardan 50 µl ilave edilmiştir.

37°C'de, bakteriyel kökenlerin 24 saat ve *Candida* kökenlerinin 48 saatlik inkübasyonunun ardından, gözle görülebilen üremenin önlediği en düşük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak kabul edilmiştir. Minimum bakterisidal/fungusidal konsantrasyon (MBK/MFK) değerlerinin saptanması amacıyla Yeşil Çelikleş ve ark.'nın yöntemi uygulanmıştır. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyonlu kuyucuklardan 20'şer µl alınarak, bakteriyel kökenler MHA'ya, maya kökenleri ise SDA'ya pasajlanmış, 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon değeri MBK/MFK değeri olarak belirlenmiştir (17).

Kontrol amacıyla, %25 DMSO, antibakteriyel ajan olarak ampicilin ve antifungal ajan olarak flukonazol kullanılmıştır.

## BULGULAR

Standart bakteri ve maya mantarı suşları ile klinik izolatlarla karşı etkinlikleri araştırılan bitki çayı ekstralarının farklı düzeylerde antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmış, mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK ve MBK değerleri tablo halinde sunulmuştur (Tablo 3 ve Tablo 4). Çalışmamızda 250 µg/mL test konsantrasyonu üzerindeki değerler etkisiz olarak kabul edilmiş ve tablolara dahil edilmemiştir.

En yüksek aktivitelerin görüldüğü örnekler incelendiğinde; 4 no'lu örnek olan adaçayı mono preparatından hazırlanan metanol ekstresinin, standart *S. aureus*, *B. subtilis* kökenlerine karşı, klinik *S. aureus* 1-2-4 ve *S. aureus* 3 izolatlarına karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği (sırayla MİK=31, 31, 62 ve 31 µg/mL), ayrıca 62 µg/mL konsantrasyonda standart ve klinik tüm *S. aureus* suşlarına karşı bakterisit etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Karışım halinde bulunan kış çaylarından 6 no'lu örneğin metanol ekstresi *E. faecalis* standart kökeni, *S. aureus* 1 ve *S. aureus* 2 klinik izolatlarına karşı etkili bulunmuştur (MİK=31, 62 ve 62 µg/mL, sırasıyla). Yine bir karışım çay olan 7 no'lu örneğin metanol ekstresi ise standart *E. faecalis* kökenine karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir (MİK=62 µg/mL).

Bunun yanında, 250 µg/mL ve daha düşük konsantrasyon değerlerinde, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 16 ve 18 no'lu örneklerden infüzyon yöntemi ile hazırlanan ekstralarında ve 19 no'lu örneğin her iki ekstresinde de aktivite görülmemiştir. Hazırlanan ekstraların tamamının, 250 µg/mL ve daha düşük konsantrasyon değerlerinde, standart kökenlerden *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*'a karşı ve klinik *S. pneumoniae*-4 izolatına karşı antimikrobiyal etki göstermedikleri saptanmıştır. Bu nedenle belirtilen ekstralar ve mikroorganizmalar tablolarda yer almamaktadır.

**Tablo 3.** Kış çaylarından hazırlanan metanol ekstresi ve infüzyonlarda mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK değerleri (µg/mL)

Çay No	Ekstre	SA	EF	BS	SA1	SA2	SA3	SA4	SP	SP1	SP2	SP3	CP
1	M	-	250	250	-	-	250	-	-	-	-	-	-
	I	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	M	250	-	-	-	-	250	250	-	-	-	-	-
3	I	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-
4	M	31	250	31	62	62	31	62	125	125	125	250	125
	I	250	-	250	250	-	250	-	250	250	250	-	-
5	M	-	250	-	250	-	-	-	250	-	-	250	-
6	M	250	31	125	62	62	250	250	250	-	-	-	-



**Tablo 3 (devamı).** Kış çaylarından hazırlanan metanol ekstresi ve infüzyonlarda mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK değerleri ( $\mu\text{g/mL}$ )

Çay No	Ekstre	SA	EF	BS	SA1	SA2	SA3	SA4	SP	SP1	SP2	SP3	CP
7	M	-	62	250	250	250	250	-	250	-	-	-	-
8	M	-	250	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	250	250	-	-
9	M	-	125	-	-	-	-	-	125	-	-	-	-
10	M	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	250
11	M	-	250	250	-	-	250	-	-	-	-	-	-
12	M	250	125	125	250	-	-	250	250	250	250	-	-
13	M	-	-	-	250	250	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-
14	M	250	-	125	-	-	-	-	-	250	250	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	250	250	-	-
15	I	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-
16	M	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	-	-
17	M	125	-	250	250	250	125	250	-	250	250	-	-
	I	125	-	-	250	250	125	250	-	250	250	-	-
18	M	-	250	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-
%25 DMSO		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampisilin		0.048	0.19	0.025	NT	NT	NT	NT	0.2	NT	NT	NT	-
Flukonazol		NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1

M: Metanol ekstresi; I: İnfüzyon; NT: Test edilmemiştir; SA: *Staphylococcus aureus*; EF: *Enterococcus faecalis*; BS: *Bacillus subtilis*; SP: *Streptococcus pneumoniae*; CP: *C. parapsilosis*, (-) : 250  $\mu\text{g/mL}$  test konsantrasyonu üzerinde etkisiz olarak kabul edilmiştir.

**Tablo 4.** Kış çaylarından hazırlanan metanol ekstresi ve infüzyonlarda elde edilen MBK/MFK sonuçları ( $\mu\text{g/mL}$ )

Çay No	Ekstre	SA	EF	BS	SA1	SA2	SA3	SA4
4	M	62	-	125	62	62	62	62
6	M	250	250	125	-	-	-	-
17	M	250	-	-	250	250	125	-
	I	250	-	-	-	-	-	-

M: Metanol ekstresi; I: İnfüzyon; SA: *Staphylococcus aureus*; EF: *Enterococcus faecalis*; BS: *Bacillus subtilis*; -: 250  $\mu\text{g/mL}$  test konsantrasyonu üzerinde etkisiz olarak kabul edilmiştir.

## TARTIŞMA

Tıbbi bitkiler uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle çay olarak tüketim öne çıkmaktadır. Tıbbi çay reçetelerinde genel olarak tarih boyunca insanlar tarafından kullanılan ve iyi tolere edilebilen, ılımlı-zayıf etkili droglar yer almaktadırlar. Çaylar genellikle %2'lik (100 mL su için yaklaşık 2 g drog kullanılarak) infüzyon veya dekoksasyon şeklinde hazırlanır ve günde 2-3 defa içilirler. Doz ayarlaması önemli olmakla birlikte, çoğu çay hafif etkili olduğu ve toksik maddeler ihtiva etmediği için keskin bir doz sınırı yoktur (18).

Solunum yolu enfeksiyonlarında, mono çay olarak, adaçayı, ıhlamur çiçek ve yaprakları ile dağ çayı sıklıkla önerilmektedir. Karışım çaylara bakıldığında ise içeriğin büyük kısmının zencefil, tarçın, havlıcan, zerdeçal, kuşburnu, hatmi ve hibiskus olduğu görülmüştür. Bunun yanında tabloda adı geçen diğer droglar ise değişen miktarlarda paket içeriklerine dahil edilmişlerdir.

Yapılan literatür taramasında, tek drog veya birkaç droğun birleşimi ile hazırlanan çeşitli infüzyon ve ekstratlar üzerinde antimikrobiyal aktivite çalışmalarının gerçekleştirildiği görülmüştür.

ıhlamur çiçeği ile yapılmış olan bir çalışmada droğun sulu ekstresinin 10, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli*, *B. subtilis* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı herhangi bir etki göstermediği saptanmıştır. Soğuk algınlığı ve öksürükte bitkilerin, antimikrobiyal etkisinden çok içeriğindeki müsilaja bağlı göğüs yumuşatıcı ve ekspektoran etkisinden dolayı kullanıldığı belirtilmiştir (19).

3 no'lu dağ çayı ile hazırlanan infüzyonunun sadece *S. pneumoniae*'ye karşı etkili olduğu, diğerlerine ise etki göstermediği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *Sideritis trojana* uçucu yağının *S. epidermidis* üzerinde güçlü inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir (MİK: 62.5 µg/mL) (20).

Çeşitli kaynaklarda adaçayı ile hazırlanan

hidroalkolik ekstre, infüzyon ve tentürlerin ağız ve boğaz enfeksiyonlarında dahilen veya gargara halinde haricen kullanıldığı kayıtlıdır (21).

Karışım çayların içeriğinde yer alan zencefil, tarçın, havlıcan, zerdeçal, kuşburnu, hatmi çiçeği ve hibiskus çiçeği gibi droglar için çeşitli aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiş fakat karışım olarak bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan çalışmalarda zencefilin hidroalkolik ekstresinin *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli* ve *C. albicans*'a karşı doza bağlı olarak etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bitkiden izole edilen gingerol türevlerinin anaerob Gram (-) bakteriler olan *Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis* ve *Prevotella intermedia*'e karşı 6-30 µg/mL, diğer oral patojenlere karşı ise 4-20 µg/mL konsantrasyonlarda etki gösterdiği saptanmıştır (22). Bitkinin soğuk algınlığına eşlik eden iştahsızlık, kusma ve diyareye karşı kullanıldığı, bunun yanında antienflamatuvar etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (23).

Tarçın uçucu yağındaki sinnalaldehitin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, öksürük, üşütme ve ateşlenmede kullanılan kombine preparatlarda ise aromatik ve korrijen olarak yer aldığı bilinmektedir (24-26).

Zencefil ile aynı familyada yer alan havlıcan ile hazırlanan sıcak ve soğuk maserasyon ile metanol ekstratlarının, 250-1000 µg/mL konsantrasyonlarda *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*'ye karşı orta veya güçlü şekilde etki gösterdiği fakat *A. niger* ve *C. albicans*'a etki göstermediği rapor edilmiştir (27).

Yine aynı familyada yer alan zerdeçalın metanol ekstresinin 50 µg/mL konsantrasyonda *E. coli* ve *V. parahaemolyticus*'a karşı iyi, *S. enterica*'ya karşı düşük etki gösterdiği, *S. aureus*'a karşı ise etkisiz olduğu belirlenmiştir. Zerdeçal ile yapılan diğer çalışmalarda ise metanol ekstresinin *B. subtilis* and *S. aureus*'a karşı etkili olduğu, hekzan ve etanol ekstratlarının 125-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında çeşitli Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir.

Ayrıca bitkinin içeriğinde yüksek oranda bulunan kurkuminin *Bacillus* ve *Staphylococcus* suşları yanında metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarına karşı da 125-250 µg/ml konsantrasyonlarda etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında bitkinin antifungal ve antiviral etkilerinin olduğu, ayrıca güçlü antienflamatuvar etkiye sahip olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (28).

Çayların bileşiminde yer alan ve yüksek oranda C vitamini içeren kuşburnu ile hazırlanan sulu ekstrenin çeşitli Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizmalara karşı zayıf etki gösterdiği, bunun yanında *C. albicans* üzerinde antifungal etki gösterdiği kayıtlıdır (29-31).

İçeriğinde müsilaj da bulunan hibiskus çiçekleri kırmızı rengi ve mayhoş tadı nedeniyle, kış çaylarında adjuvan, korrigen ve konstituent olarak sıklıkla yer almaktadır. Bitkinin sulu ekstresinin *S. typhimurium*'a karşı 100 mg/ml, etanolik ekstresinin ise *S. aureus*'a karşı 50 mg/ml konsantrasyonda etkili olduğu, fakat *B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. enteritidis* ve *K. pneumoniae*'ye karşı etki göstermediği belirlenmiştir (32). Bir diğer çalışmada ise su ve etanol ekstrelerinin *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, ve *P. aeruginosa*'ya karşı 5 mg/ml konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir (33). Başka bir çalışmada bitkinin çiçekleri ile hazırlanan etanol ekstresinin *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter* sp., *E. coli* ve *S. typhimurium*'a karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (34).

Türkiye'de yapılan bir araştırmada, *Cassia angustifolia* (sinameki), *Foeniculum vulgare* (rezene), *Pimpinella anisum* (anason), *Laurus nobilis* (defne), *Tilia vulgaris* (ıhlamur), *Urtica dioica* (ısırgan), *Petroselinum crispum* (maydanoz) ve *Anethum graveolens* (dereotu) bitkilerinden hazırlanan metanol ekstresi, infüzyon, dekoksasyon ve hidrosollerin *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *C. albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae* üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri

incelenmiş, bazı bitkilerde aktivite saptanmıştır (35).

Bu çalışma kapsamında incelenen bitkisel çaylarda, metanol ekstrelerinin mikroorganizmalara karşı orta veya güçlü seviyede antimikrobiyal etki gösterdiği fakat infüzyon yöntemi ile hazırlanan örneklerin çoğunun, belirlenen konsantrasyon aralığında (250 µg/mL'ye kadar) mikroorganizmalar üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır. Hazırlanan ekstrelerin tamamının, 250 µg/mL ve daha düşük konsantrasyon değerlerinde, standart *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* kökenlerine ve klinik *S. pneumoniae-4* izolatına karşı etki göstermediği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, kış çaylarının viral enfeksiyona eşlik eden üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlarında en çok rastlanan bakteriyel etmenler olan *S. pneumoniae* ve *S. aureus* suşlarına karşı değişen konsantrasyonlarda etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca çayların bileşiminde zencefil, zerdeçal gibi antienflamatuvar etkisi bulunan ve ıhlamur, hatmi gibi müsilaj taşıyan drogların da bulunması, kış çaylarının solunum yolu enfeksiyonlarında tedaviye destek amacıyla kullanılabileceğini göstermiştir.

Bununla birlikte tıbbi çayları hazırlarken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar bulunmaktadır.

Kaynağı bilinmeyen veya doz aralığı kısıtlı olan kuvvetli etkili droglar kullanılmamalıdır. Kullanılacak drogların farmakopelerde yer alan özelliklere uygunluğu, farmakolojik etkileri, yan etkisi, toksisitesi, bitki-ilaç etkileşimi potansiyeli, güvenilir doz aralıkları monograflar gibi güvenilir kaynaklardan kontrol edilmelidir. Tıbbi çay hazırlama amacıyla kullanılacak droglardaki aktif bileşenlerin miktarları, bitkinin toplama zamanına ve saklama koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca bitkilerin ince toz halinde öğütülmesi hava ile teması arttırmakta ve aktif bileşenlerin bozulmasına veya miktarlarının azalmasına neden olabilmektedir. Bu gibi durumlar tıbbi bitkilerde doz ayarlanması zorlaştırmakta ve raf ömürlerini kısaltmaktadır. Bitkiler doğru seçilir, iyi muhafaza edilir, usulüne uygun şekilde çay haline getirilirse tıbbi kullanımlarda

genellikle beklenen etki gözlenmektedir (18, 36).

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın ve gelişigüzel kullanılan antimikrobiyal ilaçlar, patojenik mikroorganizmalarda çoklu ilaç direnci görülmesine neden olmaktadır. Bitkiler gibi doğal kaynaklarda

antimikrobiyal etkili bileşiklerin araştırılması son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir (35). Bu çalışmada elde edilen sonuçların in vivo ve klinik araştırmalar gibi ileri çalışmalar için bir çıkış noktası oluşturabileceği tarafımızdan düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi 13-ECZ-011 no'lu Bilimsel Araştırma Projesi ile desteklenmiştir. Adı geçen kuruma katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1999.
2. Kökdil G. Tıbbi çaylar. TEB Eczacı Odası Yayınları, Galenova, 2002; 2: 19-21.
3. Hacıoğlu M, Dosler S, Birteksoz AS, Otuk G. Antimicrobial activities of widely consumed herbal teas, alone or in combination with antibiotics: an in vitro study. Peer J, 2017; 5: 1-17.
4. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chem, 2005; 89(1): 27-36.
5. Aoshima H, Hirata S, Ayabe S. Antioxidative and anti-hydrogen peroxide activities of various herbal teas. Food Chem, 2007; 103(2): 617-22.
6. Agagunduz D. Determination of the total antioxidant and oxidant status of some galactagogue and herbal teas. Food Sci Hum Wellness, 2020; 9(4): 377-82.

7. Augspole I, Duma M, Cinkmanis I, Ozola B. Herbal teas as a rich source of phenolic compounds. *Chemija*, 2018; 29(4): 257-26.
8. Buyukbalci A, El SN. Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant Foods Hum Nutr*, 2008; 63(1): 27-33.
9. Wu LC, Jou AFJ, Chen SH, Tien CY, Cheng CF, Fan NC, Ho JAA. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-browning activities of hot water extracts of oriental herbal teas. *Food Funct*, 2010; 1(2): 200-8.
10. Dalar A, Konczak I. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. *Ind Crops Prod*, 2013; 44: 383-90.
11. Oh J, Jo H, Cho AR, Kim SJ, Han J. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 2013; 3(2): 403-9.
12. Akşit S. Akut solunum yolu enfeksiyonları-1. *STED*, 2002; 11(4): 132-5.
13. Karaalp C, Yurtman AN, Karabay-Yavasoglu NU. Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea L.* flower head extracts. *Pharm Biol*, 2009; 47(1): 86-91.
14. Karamenderes C, Khan S, Tekwani BL, Jacob MR, Khan IA. Antiprotozoal and antimicrobial activities of *Centaurea L.* species growing in Turkey. *Pharm Biol*, 2006; 44(7): 534-9.
15. Aslan R, Taşkın Kafa AH, Hasbek M, Çelik C. Farklı esansiyel yağların in vitro antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2021; 78(4): 525-34.
16. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
17. Yeşil Çelikleş O, Hames Kocabas EE, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*, 2007; 100(2): 553-9.
18. Yeşilada E. Doğadan Gelen Sağlık: Bitki Çayları. İstanbul: Era Yayıncılık, 2011.
19. Yıldırım A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur ÖF, Bilaloğlu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of *Tilia* (*Tilia argenta* Desf ex DC), *Sage* (*Salvia triloba L.*) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agric Food Chem*, 2004; 48: 5030-4.
20. Kirimer N, Demirci B, Iscan G, Baser KHC, Duman H. Composition of the essential oils of two *Sideritis* species from Turkey and antimicrobial activity. *Chem Nat Comp*, 2008; 44: 121-3.
21. ESCOP Monographs. 2. baskı, Stuttgart: Thieme, 2003.
22. Park M, Bae J, Lee DS. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother Res*, 2008; 22(11): 1449.
23. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Vol. 1, Geneva, 1999.
24. PDR for Herbal Medicines, 2nd Ed., Thomson Medical Economics, Montvale, NJ, 2000.
25. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants, Vol. 2, Geneva, 2002.
26. Wichtl M, Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, 2004.
27. Srividya AR, Dhanabal SP, Misra VK, Suja G. Antioxidant and antimicrobial activity of *Alpinia officinarum*. *Indian J Pharm Sci*, 2010; 72(1): 145-8.

28. Soheil ZM, Habsah AK, Pouya H, Hassan T, Sazaly A, Zandi K. A Review on antibacterial, antiviral and antifungal activity of Curcumin. *BioMed Res Int*, Article ID 186864 2014; 2014: 1-12.
29. Brantner A, Grein E. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J Ethnopharmacol*, 1994; 44: 34-40.
30. Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD. Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol*, 2002; 83: 73-7.
31. Trovato A, Monforte MT, Forestieri AM, Pizzimenti F. In vitro anti-mycotic activity of some medicinal plants containing flavonoids. *Boll Chim Farm*, 2000; 139(5): 225-7.
32. Mak YW, Chuah LO, Ahmad R, Bhat R. Antioxidant and antibacterial activities of hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and cassia (*Senna bicapsularis* L.) flower extracts. *J King Saud Univ Sci*, 2013; 25(4): 275-82.
33. Al-Hasimi AG. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. *Afr J Food Sci*, 2012; 6(21): 506-11.
34. Borhan U, Tareq H, Sudip P, Tanjir A, Taslima N, Sohel A. Antibacterial activity of the ethanol extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* leaves and flowers against clinical isolates of bacteria. *Bangladesh J Life Sci*, 2010; 22(2): 65-73.
35. Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Albayrak S. Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in Turkey. *J Food Biochem*, 2012; 36(5): 547-54.
36. Arslan N. Tıbbi çaylar. *Sağlık Çevre Kültürü Derg.* 2008; 2: 20-2.

# A systematic review and meta-analysis of the prevalence, risk factors, agents and laboratory diagnosis of vulvovaginal candidiasis in Türkiye

## Türkiye’de vulvovajinal kandidiyaz prevalansı, risk faktörleri, etkenleri ve laboratuvar tanısına dair sistematik bir derleme ve meta-analizi

İmdat KILBAŞ<sup>1</sup> (ID), Elmas Pınar KAHRAMAN KILBAŞ<sup>2</sup> (ID), İhsan Hakkı ÇİFTÇİ<sup>3</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** Vulvovaginal candidiasis (VVC) is the most common superficial mycosis among women, and it is estimated that 75% of women experience at least one in their lifetime, and about 40-50% have a second exposure. This study aims to determine the prevalence, risk factors, etiological factors and laboratory diagnosis of VVC in Türkiye.

**Methods:** In the study, original scientific articles for the reporting of VVC epidemiological features published in English and Turkish languages in national and international databases (PubMed, Embase, Scopus, Google Scholar, Web of Science and Turkish Medline) between January 1995 and December 2021 were searched. Electronic databases were searched using various combinations of “vaginal yeast infection”, “vaginal candidiasis”, “vulvovaginal candidiasis Turkey”, “candidal vaginitis”, “*Candida* vaginitis”, “vaginal candidosis”, “*Candida* species”, “epidemiology” key terms.

**Results:** The mean prevalence of VVC in adult women was found to be 57.91% in all of the 28 included studies, and 68.21% in the 2-18 age group. Considering

### ÖZET

**Amaç:** Vulvovajinal kandidiyazis (VVK), kadınlar arasında en sık görülen yüzeysel mikozdur ve kadınların %75’inin yaşamları boyunca en az bir kez ve bunların da yaklaşık %40-50’sinin ikinci kez maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Bu çalışma, Türkiye’de VVK prevalansını, risk faktörlerini, etiyolojik etkenlerini ve laboratuvar tanısını belirlemeyi amaçlamıştır.

**Yöntem:** Çalışmada, Ocak 1995 ile Aralık 2021 tarihleri arasında ulusal ve uluslararası veri tabanlarında (PubMed, Embase, Scopus, Google Scholar, Web of Science ve Turkish Medline) İngilizce ve Türkçe dillerinde yayınlanan, VVK epidemiyolojik özelliklerinin raporlanmasına yönelik özgün bilimsel makaleler taranmıştır. Elektronik veri tabanlarında “vajinal maya enfeksiyonu”, “vajinal kandidiyazis”, “vulvovajinal kandidiyazis Türkiye”, “kandidal vajinit”, “*Candida* vajiniti”, “vajinal kandidoz”, “*Candida* türleri”, “epidemiyoloji” anahtar terimlerinin çeşitli kombinasyonları kullanılarak tarama yapılmıştır.

**Bulgular:** Dahil edilen 28 çalışmanın tamamında yetişkin kadınlarda VVC prevalansı ortalama %57,91; 2-18 yaş grubunda ise %68,21 olarak bulunmuştur. Etken

<sup>1</sup>Istanbul University, Institute of Health Sciences, Medical Microbiology Doctorate Program, Istanbul

<sup>2</sup>Fenerbahçe University, Health Services Vocational School, Department of Medical Laboratory Techniques, Istanbul

<sup>3</sup>Sakarya University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Sakarya



İletişim / Corresponding Author : Elmas Pınar KAHRAMAN KILBAŞ

Fenerbahçe Üni., Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Lab. Teknikleri Bölümü, İstanbul - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 05.07.2022

Kabul Tarihi / Accepted : 23.01.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.22308

Kılbaş İ, Kahraman Kılbaş EP, Çiftçi İH. A systematic review and meta-analysis of the prevalence, risk factors, agents and laboratory diagnosis of vulvovaginal candidiasis in Türkiye. Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(1): 91 - 102

the causative distribution, the most common *Candida albicans* (54.76%), *Candida glabrata* (24.04%), other *Candida* species (12.29%), *Candida krusei* (3.68%), *Candida kefyr* (3.37%), and *Candida tropicalis* (2.07%) positivity has been reported. In the included studies, the most common predisposing factors of the patients were pregnancy (35.71%) and diabetes (35.71%). When the articles were examined according to the year they were published and the provinces, it was seen that the prevalence of *Candida* did not differ significantly ( $p>0.05$ ). In the studies, VITEK@2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) automatic identification system (15), Germ tube (7) and CHROMagar (7) diagnostic methods were used to identify strains. As a result of the meta analysis, it was determined that there was a high level of heterogeneity among studies ( $I^2=95.28$ ).

**Conclusion:** As a result of our meta-analysis study, the prevalence of VVC was found to be high in women and children in Turkey. In addition, it was determined that non-albicans species increased in the etiology of VVC. It has been observed that the incidence of *C. glabrata* species in the etiology of VVC has increased since 1999. Considering that VVC infection increases the susceptibility to other sexually transmitted diseases, as well as the risk of preterm birth and congenital cutaneous candidiasis in pregnant women, it is essential to raise awareness of patients on issues such as treatment follow-up and protection from the disease.

**Key Words:** Vulvovaginal candidiasis, *Candida albicans*, non-albicans, Türkiye

dağılımına bakıldığında en yaygın *Candida albicans* (%54.76), *Candida glabrata* (%24.04), diğer *Candida* türleri (%12.29), *Candida krusei* (%3.68), *Candida kefyr* (%3.37) ve *Candida tropicalis* (%2.07) pozitifliği bildirilmiştir. Derlenen çalışmalarda hastaların en sık predispozan faktörleri gebelik (%35.71) ve diyabet (%35.71) belirlenmiştir. Makaleler yayımlandıkları yıl ve illere göre incelendiğinde; *Candida* prevalansının anlamlı farklılık göstermediği görülmüştür ( $p>0,05$ ). Çalışmalarda suşların tanımlanması için VITEK@2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) otomatik tanımlama sistemi (15), Germ tüpü (7) ve CHROMagar (7) tanı yöntemleri kullanılmıştır. Meta analiz sonucunda çalışmalar arasında yüksek düzeyde heterojenite olduğu belirlenmiştir ( $I^2=95,28$ ).

**Sonuç:** Meta-analiz çalışmamız sonucunda; Türkiye'de kadınlarda ve çocuklarda VVC prevalans oranı yüksek bulunmuştur. Ayrıca VVC etiyolojisinde albicans dışı türlerin arttığı tespit edilmiştir. 1999 yılından günümüze geldikçe VVC etiyolojisinde *C. glabrata* türlerinin görülme sıklığının arttığı görülmüştür. VVC enfeksiyonunun cinsel yolla bulaşan diğer hastalıklara karşı duyarlılığı ve ayrıca gebelerde erken doğum, konjenital kütanöz kandidiyaz riskini arttırdığı göz önünde bulundurulduğunda, tedavi takibi ve hastalıktan korunma gibi konularda hastaların bilinçlendirilmesi esastır.

**Anahtar Kelimeler:** Vulvovajinal kandidiyaz, *Candida albicans*, non-albicans, Türkiye

## INTRODUCTION

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a significant health problem that includes signs and symptoms associated with infections caused by *Candida*

species. VVC is the most common superficial mycosis among women, and it is estimated that 75% of women experience at least one exposure in their lifetime, and about 40-50% have a second exposure (1).

Although *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*,



*C. krusei* and *C. tropicalis* are the most frequently reported VVC agents, it has been stated that *C. albicans* is a species responsible for 80-95% of all VVC infections. However, it has been reported that the rate of cases caused by *C. glabrata* has increased significantly in the last two decades (2,3). Although there is usually only one type of causative agent in the etiology of VVC, two or more *Candida* species were found to be causative in 1-10% of women. The association of *C. albicans* and *C. glabrata* is more common in VVC infections with more than one agent (2).

In the formation of VVC; different factors such as hygienic habits, pregnancy, diabetes, immunosuppressive diseases and the administration of hormonal contraceptives, hormone replacement therapy, chemotherapy, reproductive age, use of broad-spectrum antibiotics and steroids can play a predisposing role for infections (4,5).

Although VVC is common, the exact incidence of this infection is unknown. Because there is no notification requirement, it can be diagnosed clinically without laboratory confirmation. Also, due to the widespread use of over-the-counter treatments, many VVC patients do not apply to the hospital. The primary diagnostic method of this infection is the fungal examination (direct examination of vaginal discharge with 10% KOH together and culture). It should be noted that culture-based epidemiological reports alone increase the incidence of the disease. Because 10% of women are colonized and culture-positive but asymptomatic (6,7).

VVC emerges as a problem that has increasing importance for our country and the whole world and needs to be taken seriously. Unfortunately, it is a disease with almost no clinical-laboratory cooperation. There is no standard treatment scheme in many clinics, and there is no algorithm for diagnosis in the relevant guidelines. In addition, non-culture-based diagnostic tests are used irregularly in our country to diagnose of VVC. Molecular tests are not available in routine laboratories. This study, in order to draw attention to

current problems and contribute to solution-oriented approaches; It is aimed to examine the prevalence of VVC in Turkey, the distribution of the agents, the predisposing factors, the demographic characteristics of the patients and the methods used in the diagnosis by systematic review and meta-analysis method.

## MATERIAL and METHOD

This systematic review and meta-analysis were conducted based on the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines (8). In the study, original scientific articles published in English and Turkish languages in national and international databases (PubMed, Embase, Scopus, Google Scholar, Web of Science and Turkish Medline) between January 1995 and December 2021 were searched.

For all English and Turkish population-based studies reporting the prevalence of VVC in women in Turkey; in all electronic databases, “vajinal maya enfeksiyonu”, “vajinal kandidiyazis”, “vulvovajinal kandidiyazis Türkiye”, “kandidal vajinit”, “Candida vajiniti”, “vajinal kandidoz”, “Candida türleri”, “epidemiyoloji”, “vaginal yeast infection”, “vaginal candidiasis”, “vulvovaginal candidiasis Turkey”, “candidal vaginitis”, “Candida vaginitis”, “vaginal candidosis”, “Candida species”, “epidemiology” various combinations of the key terms were used. Scanning and collection of related articles were done by three authors. The authors independently evaluated the publications for inclusion in the study, and inconsistencies were discussed and agreed upon by the authors.

Inclusion criteria for the study consisted of original articles reporting the prevalence of vulvovaginal candidiasis and causative organisms diagnosed according to laboratory results of women living in Turkey.

Studies with a sample group of fewer than 20 cases, not reporting the total number of patients or

isolates, not reporting the agent at the species level, only colonization or sporadic VVC studies reporting recurrent vulvovaginitis/chronic vulvovaginitis/atrophic vaginitis, reviews without original data, theses, case reports, case series, letters to the editor, studies with inconsistent data and congress

papers were excluded from the scope of the study within the framework of exclusion criteria (Figure 1).

The titles and abstracts were evaluated in the pre-reading process, and the full texts of the studies that the authors found appropriate by consensus were reached. Microsoft Excel spread sheets were

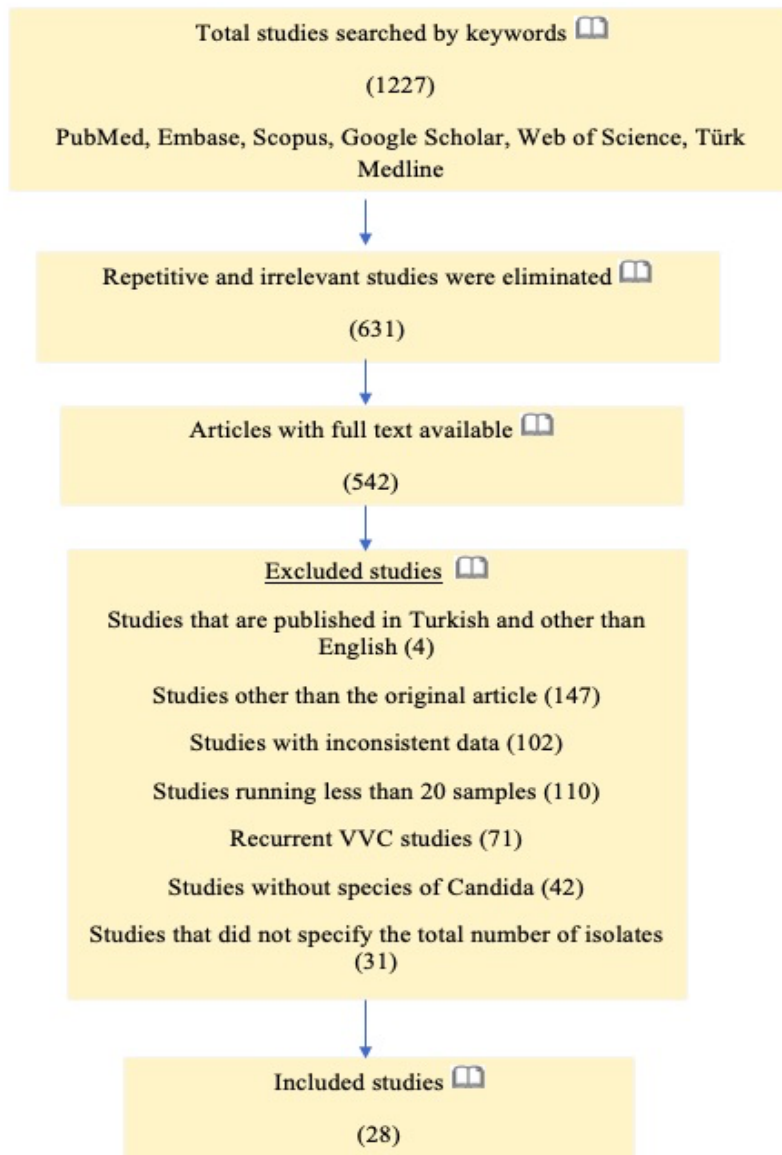


Figure 1. PRISMA flowchart showing the literature search and study selection strategy

prepared to collect data; the surname of the first author, the publication year of the article, study duration, study location, sample size, number of confirmed cases, causative types, age of patients, predominant risk factors, predominant clinical symptoms, and laboratory diagnostic methods of VVC were listed.

The data obtained from the literature review were analyzed in the IBM SPSS (Version 25.0) statistical package program. While evaluating the data, normal distribution analysis (Kolmogorov-Smirnov) was performed in addition to descriptive statistical methods (frequency, percentage, mean, standard deviation). Tests (t-test and One Way-ANOVA) were conducted to measure whether *Candida* species differ according to various variables. The study's effect sizes and heterogeneity were calculated with the Comprehensive Meta-Analysis (CMA, Version 2) program, and Forest plot analyzes were performed.

## RESULTS

The results were evaluated at the 95% confidence interval, at the  $p < 0.05$  significance level. Since eight of the 28 included studies only worked with *Candida*-positive samples (*Candida* prevalence would appear to be 100%, it would be misleading), they were not included in the statistical analysis. The methodological evaluation of the study was made with the criteria shown in Table 1. These quality criteria were not considered an exclusion criterion. The qualitative review of studies accepted for meta-analysis was

scored according to a checklist designed with critical evaluation by three independent researchers. These criteria were determined as the test method used, the number of patients included, and the time period in which the study was conducted (Table 1).

During the search of publications related to VVC, 1227 titles and abstracts were found. After the pre-reading evaluation, 542 full texts were included in the review, a total of 28 original articles were included in the study after the inclusion and exclusion criteria were applied (Figure 1). The characteristics of all original articles reviewed within the scope of the review are presented in detail in Table 1. The clinical characteristics of the patients in the included studies were variable; The most common predisposing factor reports were pregnancy (10/28) and diabetes (10/28).

In all 28 studies included, the most common *C. albicans* (54.76%), *C. glabrata* (24.04%), other *Candida* species (12.29%), *C. krusei* (3.68%), *C. kefyr* (3.37%) and *C. tropicalis* (2.07%) positivity were reported. The change graph of the *Candida* species by years is given in Figure 2. When the articles were analyzed according to the years and cities in which they were published, it was determined that the prevalence of *Candida* did not show a statistically significant difference. ( $p=0.59$ ,  $p=0.23$ ;  $p>0.05$ ) It was seen that most of the notifications were made from Adana (8/28) and Ankara (6/28) provinces. In addition, it was determined that the publications we included in the review about VVC were made between 1999-2005 at the most and that these publications decreased between 2014-2021.

**Table 1.** Criteria for the quality assessment of studies

	3 point	2 point	1 point
Identification method	AU+CN	AU	CN
Number of patients	>500	100-500	<100
Time period	≥3 year	2 year	≤1 year

AU: Automatised, CN: Convention

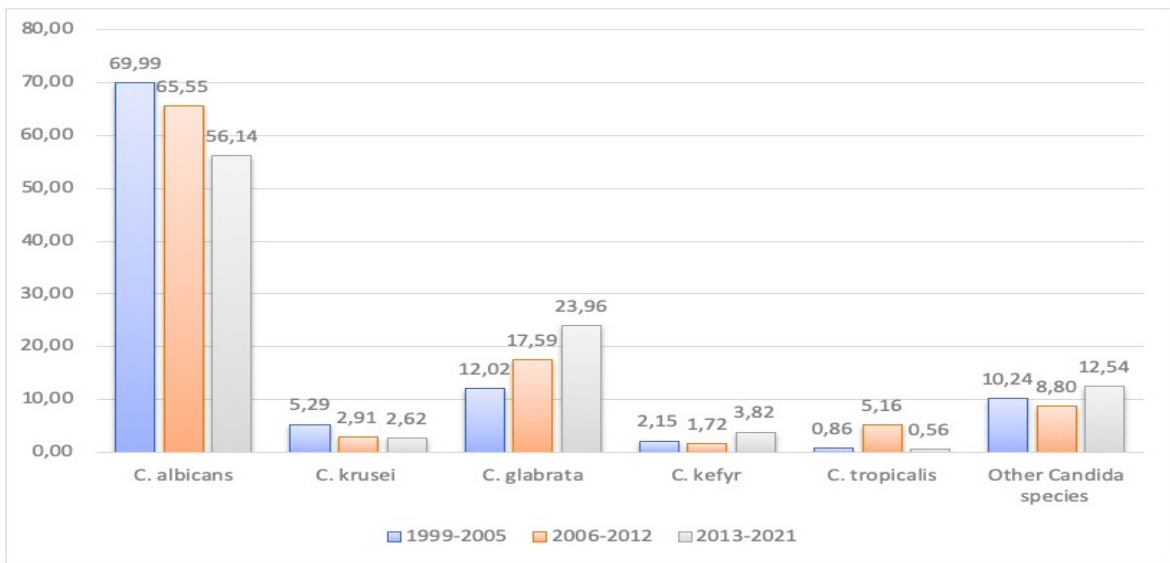


Figure 2. Distribution of *Candida* species by years

It has been reported that *Candida* strains isolated from VVC patients were studied from vaginal swab samples in 23 studies and vaginal discharge samples in five studies. A statistically significant difference was found between the prevalence of *C. tropicalis* and the sample type, and it was found that all strains were isolated from the vaginal swab samples, and there was no *C. tropicalis* strain isolated from the vaginal discharge sample. ( $p=0.007$ ;  $p<0.05$ )

VITEK®2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) was used to identify of strains in 15 of the original articles, Germ tube was used in 7, CHROMagar in 7, and other diagnostic methods listed in Table 2. No statistically significant difference was found between the diagnostic methods and the prevalence of *Candida* species. ( $p=0.31$ ;  $p>0.05$ )

Table 2a shows the data sets of the studies that included patients aged 16 and over, and in 2b, the data sets of the studies that included patients aged 2-18 years. When the data of two studies involving patients aged 2-18 years were examined, it was seen that Type 1 DM was detected as the

underlying disease. In the studies in Table 2.b, the most frequently isolated species was *C. albicans*, followed by *C. glabrata*. When the prevalence was analyzed according to years and cities in the studies in Table 2.b, a statistically significant difference was found ( $p=0.76$ ,  $p=0.56$ ). In addition, no statistically significant difference was found between the diagnostic methods and the prevalence of *Candida* species ( $p=0.09$ ). In qualitative studies, studies were scored between 3 and 9. The qualitative mean score of the studies was calculated as  $5.28 \pm 1.33$ . It is shown in Table 2.

In the random-effect model, it is assumed that the studies can predict different true effects. The actual effect sizes of all studies are different. The effect sizes estimated in the meta-analysis predict the mean of all studies' effect sizes. The difference can also be caused by the sample and method differences in the studies. Therefore, the random-effects model was used in our meta-analysis. As a result of the analysis, it was determined that there was a high level of heterogeneity between studies ( $I^2=95.28$ ) (Figure 3).

Table 2a. Datasets of studies included in the review

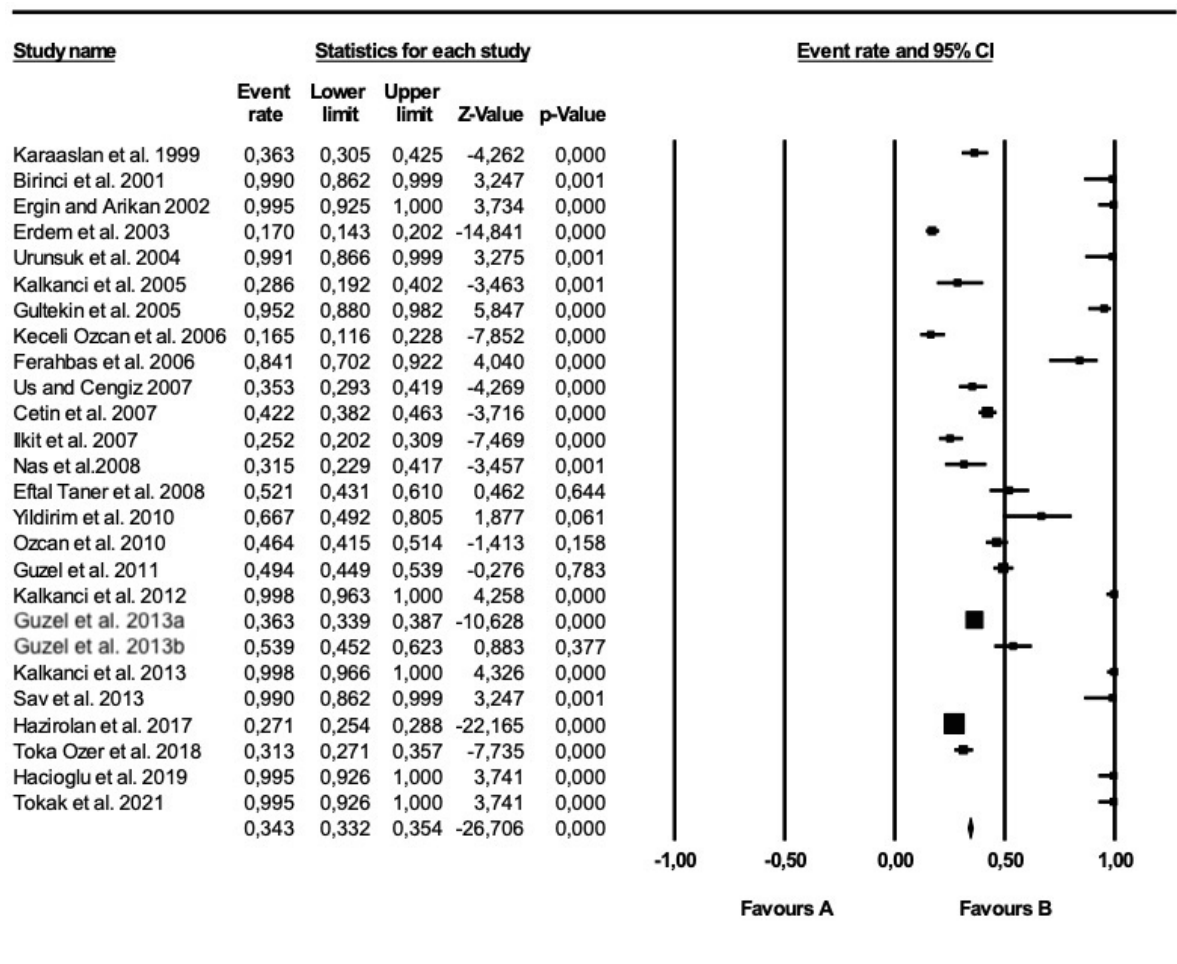
Author	City	N	n	Alb + (%)	N-alb + (%)	PF	ST	DMT	AR	QS
Karaaslan et al. 1999 (9)	Ankara	248	90	76.67	23.33	-	VD	Fungichrom I	18-51	4
Birinci et al. 2001 (10)	Samsun	50	50	100	0	-	VS	CHROMagar, VITEK®2	-	5
Ergin ve Arikan 2002 (11)	Ankara	99	99	67.67	32.33	-	VS	VITEK®2, GT	-	7
Erdem et al. 2003 (12)	Sivas	622	106	63.21	36.79	PR, DM, IF	VS	CANDIFAST	-	6
Urunsak et al. 2004 (13)	Adana	52	52	76.92	23.08	PR, DM, IF, CC	VS	VITEK®2	20-47	6
Gultekin et al. 2005 (14)	Aydin	84	80	56.25	43.75	-	VD	CHROMagar, GT	-	4
Kalkanci et al. 2005 (15)	Ankara	70	20	60	40	-	VS	VITEK®2	-	4
Ozcan et al. 2006 (16)	Kocaeli	170	28	75	25	DM, PR, AB, KK	VS	VITEK®2	25-35	5
Ferahbas et al. 2006 (17)	Kayseri	44	37	84.09	15.91	PR, LF, KF	VS	CHROMagar, VITEK®2	17-54	5
Cetin et al. 2007 (18)	Hatay	569	240	44.17	55.83	PR, DM	VS	VITEK®2	21-59	6
Ilkit et al. 2007 (19)	Adana	250	63	23.81	76.19	-	VS	Albicans ID2	-	5
Us ve Cengiz 2007 (20)	Ankara	218	77	53.25	46.75	PR	VS	CHROMagar, VITEK®2	-	6
Nas et al. 2008 (21)	Ankara	29	29	100	0	DM, P-MEN	VS	Asp pro	-	3
Eftal Taner et al. 2008 (22)	Izmir	117	61	57.38	42.62	-	VS	VITEK®2	-	5
Yildirim et al. 2010 (23)	Ankara	33	22	100	0	DM, PR	VS	VITEK®2	22-57	4
Ozcan et al. 2010 (24)	Adana	392	182	57.14	42.86	-	VS	CHROMagar, GT	-	5
Guzel et al. 2011 (25)	Adana	474	234	36.42	63.58	DM, HPO, HP	VS	CHROMagar, VITEK®2	18-49	6
Kalkanci et al. 2012 (26)	Adana	207	207	60	40	PR	VS	Fos	18-49	4
Guzel et al. 2013a (3)	Adana	1543	560	43.21	56.79	DM, PR, OCP	VD	CHROMagar, VITEK®2	-	9
Guzel et al. 2013b (27)	Adana	495	129	45	55	VI	VS	Fos	-	4
Kalkanci et al. 2013 (28)	Adana	228	228	50	50	-	VS	VITEK®2, GT	18-49	6
Sav et al. 2013 (29)	Kayseri	50	50	77.55	22.44	-	VD	VITEK®2, GT	-	5
Hazirolan et al. 2017 (30)	Malatya	2534	686	53.94	46.06	-	VS	GT, HWP1 gene polymorphisms	16-82	7
Toka Ozer et al. 2018 (5)	Konya	448	140	35.71	64.29	DM, PR, AB, CH	VD	GT	16-78	4
Hacioglu et al. 2019 (31)	Istanbul	100	100	84	16	-	VS	Fos and Pro	-	4
Tokak et al. 2021 (2)	Konya	100	98	57	43	HP, PR	VS	VITEK®2, API20	-	7
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>8922</b>	<b>3606</b>							

N: Number of samples, n: Number of positive samples, Alb +: *C. albicans* positive, N-Alb+: Non-Albicans positive, PF: Predisposing factor, ST: Sample type, DMT: Diagnostic method, AR: Age range, QR: Quality scale, DM: Diabetes mellitus, PR: Pregnancy, CH: Chemotherapy, IF: Immunodeficiency, OCP: Oral contraceptive pill, AB: Antibiotic use, CC: Corticosteroid use, KF: Kidney failure, LF: Liver failure, VS: Vaginal swab, VD: Vaginal discharge, DR-M: Direct microscopy, HP: Hyperthyroidism, HPO: Hypothyroidism, VI: Vaginal itching, P-MEN: Postmenopausal period, GT: Germ tube, Fos: Phospholipase activity, Pro: Proteinase activity, Asp pro: Aspartyl proteinase expression.

**Table 2b.** Characteristics of studies with pediatric patients included in the review

Author	City	N	n	Alb + (%)	N-Alb + (%)	PF	ST	DMT	AR	QS
Tunger et al. 2000 (32)	Manisa	801	266	68.00	32.00	-	VS	Mycotube (Roche)	10-18	8
Kendirici et al. 2004 (33)	Kayseri	35	25	72.00	28.00	Type 1 DM	VS	VITEK®2	2-17	4
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>836</b>	<b>291</b>							

N: Number of samples, n: Number of positive samples, Alb +: *C. albicans* positive, N-Alb+: Non-Albicans positive, PF: Predisposing factor, ST: Sample type, DMT: Diagnostic method, AR: Age range, QR: Quality scale, DM: Diabetes Mellitus



**Figure 3.** Forest plot analysis of the prevalence of VVC in the included studies

## DISCUSSION

This study is the first systematic research and meta-analysis to examine the prevalence of VVC, the distribution of causative agents (*C. albicans*/non-albicans) and predisposing factors in adult women and children (2-18 years of age) in Turkey over a 26 year period. In the light of the available data, the prevalence of VVC in adult women was found to be 57.91% on average and 68.21% in the 2-18 age group. Compared to the literature, it has been reported that the prevalence of VVC in Iranian women is 45% on average (6). Nurat et al. (34) reported that the general prevalence of VVC was 25%, that the prevalence of VVC was 33.8% in women aged 20-29, and 24.3% in women aged 30-39. Konadu et al. (35) reported the prevalence of VVC as 31.1% in children under the age of 19 in Ghana. In the study conducted by Emeklioglu et al. (36) in Kayseri, they found that the prevalence of VVC in children aged 3-18 was 55.2%. Differences in results in studies may be due to factors such as clinical diagnosis without laboratory confirmation, patients' lifestyles, contraceptive methods they use, and predisposing factors.

In our study, the most common species of VVC were; *C. albicans* (54.76%), *C. glabrata* (24.04%), other *Candida* species (12.29%), *C. krusei* (3.68%), *C. kefyr* (3.37%), and *C. tropicalis* (2.07%) was detected. Gamarra et al. (37) reported the most frequently isolated *Candida* species in 118 patients with VVC, respectively; *C. albicans* (85.9%), *C. glabrata* (4.9%), *C. tropicalis* (0.8%) and *C. krusei* (0.8%). Richter et al. (38) reported that *C. albicans* was most common with 76% in patients with VVC in the USA, followed by *C. glabrata* with 16%.

The most common risk factors for VVC in the patients included in our study were pregnancy (35.71%) and diabetes (35.71%). Sasani et al. (6) reported that oral contraceptive use was the most common risk factor for the development of VVC in Iranian women. It has been reported that VVC is mostly associated with pregnancy, systemic diseases such as diabetes, and

antibiotic and oral contraceptive use, respectively (39). In addition, in studies involving patients aged 2-18 years, the most common risk factor was reported as Type 1 DM. When high blood sugar levels are not controlled, the pH of the vaginal area increases and the concentration of glucose and vaginal glycogen increases with the proliferation of yeasts. It is known that vaginal colonization with *Candida* is higher in women using insulin or oral hypoglycemic agents (40).

This study showed that the mean age of those with VVC infection (11 of the included studies reported a mean age) was 32.26, which was consistent with other studies in the literature (5, 9, 13, 16, 18, 22, 23, 25, 26, 28, 30). Emeribe et al. (41) reported that it is most common in women aged 25-34 years. Konate et al. (42) reported the rate of patients between 21-40 as 42.7%. The VVC is seen frequently in this age range may be due to factors such as sexual activity, higher pregnancy rates in this range, hormonal changes, and use of oral contraceptives.

Our study has some limitations. These:

- Only 11 of the included studies reported the mean age, and only age ranges were reported in the other studies,
- High heterogeneity of studies and
- Inadequate reporting of important information such as clinical and demographic data of patients, and these limitations are due to the included studies.

The current frequency of fungal infections that occur every year in Turkey and the economic burden it brings to the country are not clearly known. As a result of our meta-analysis study, the prevalence of VVC in Turkey was found to be higher than in other studies in the literature. It has been determined that non-albicans species are on the increase in the etiology of VVC in our country, and it will be helpful to determine the agent at the species level in patients diagnosed with VVC, and to investigate the antifungal susceptibility levels, in terms of treatment effectiveness and to prevent the development of antifungal resistance. Demographic characteristics of patients and reporting

of underlying disease or accompanying symptoms are essential in determining VVC risk factors in studies. For this reason, it is recommended to report the characteristics of the patients entirely in the relevant publications. Monitoring the prevalence of

VVC, planning national epidemiological surveillance studies, creating prevention/prevention training programs can contribute to the protection of public health, the country's economy, and the creation of standard diagnosis/treatment algorithms.

### ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* This study does not require Ethics Committee Approval.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### REFERENCES

1. Faraji R, Rahimi MA, Rezvanmadani F, Hashemi M. Prevalence of vaginal candidiasis infection in diabetic women. *Afri J Microbiol Res*, 2012; 6:2773-8.
2. Tokak S, Kılıç IH, Eriç Horasanli J, Mutlu EG, Tasbent FE, Karagoz ID. Vaginal candidiasis in Konya area: Etiology, risk factors, virulence patterns, and antifungal susceptibilit. *Rev Romana Med Lab*, 2021; 29 (2): 201-15.
3. Guzel AB, Aydın M, Meral M, Kalkancı A, Ilkit M. Clinical characteristics of Turkish women with candida krusei vaginitis and antifungal susceptibility of the C. krusei isolates. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2013a; 1-7.
4. Sardi J, Silva D, Anibal PC, Baldin JJCMC, Ramalho SR, Rosalen PL, et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiology and risk factors, pathogenesis, resistance, and new therapeutic options. *Curr Fungal Infect Rep*, 2021; 15 (1): 1-9.
5. Toka Özer T, Cengiz T, Yılmaz H. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and treatment with isoconazol nitrate. *J Immunol Clin Microbiol*, 2018; 3 (1): 8-14.
6. Sasani E, Rafat Z, Ashrafi K, Salimi Y, Zandi M, Soltani S, et al. Vulvovaginal candidiasis in Iran: A systematic review and meta-analysis on the epidemiology, clinical manifestations, demographic characteristics, risk factors, etiologic agents and laboratory diagnosis. *Microb Pathog*, 2021; 154: 104802.
7. Jeanmonod R, Chippa V, Jeanmonod D. Vaginal Candidiasis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459317/>.
8. Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 Statement. *Syst Rev*, 2015; 4: 1-9.



9. Karaaslan A, Cengiz L, Boyacıoğlu İ, Cengiz AT, Özsan M. Vulvovajinal kandidiazisli olgulardan izolen edilen maya türlerinin dağılımı ve antifungallere duyarlılıkların saptanması. *Bull of Microbiol*, 1999; 33 (4): 319-25.
10. Birinci A, Saniç, A, Durupınar B. Determination of determination of minimum inhibitory concentrations of candida species isolated from vaginal swab specimens by using broth microdilution and e-test. *J Chem*, 2001; 13 (1): 43-6.
11. Ergin A, Arikian S. Comparison of microdilution and disc diffusion methods in assessing the in vitro activity of fluconazole and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against vaginal *Candida* isolates. *J Chemother*, 2002; 14 (5): 465-72.
12. Erdem H, Cetin M, Timuroglu T, Cetin A, Yanar O, Pahsa A. Identification of yeasts in public hospital primary care patients with or without clinical vaginitis. *ANZJOG*, 2003; 43 (4):312-6.
13. Urunsak M, Ilkit M, Evruke C, Urunsak I. Clinical and mycological efficacy of single-day oral treatment with itraconazole (400 mg) in acute vulvovaginal candidosis. *Mycoses*, 2004; 47 (9): 422-7.
14. Gültekin B, Yazici V, Aydin N. Vajinal örneklerden izole edilen candida suşlarının dağılımı ve chromagar candida besiyerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 2005; 39 (3): 319-24.
15. Kalkancı A, Biri A, Bozdayı G, Kuştımur S. Vulvovajinal kandidoz olgularından elde edilen candida spp. örneklerinin bazı antifungallere duyarlılıkları. *J Clin Obstet Gynecol*, 2005; 15 (2): 87-90.
16. Ozcan SK, Budak F, Yucesoy G, Susever S, Wilke A. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. *APMIS*, 2006; 114: 139-45.
17. Ferahbas A, Koc AN, Uksal U, Aygen E, Mistik S, Yıldız S. Terbinafine versus itraconazole and fluconazole in the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Am J Ther*, 2006; 13 (4): 332-6.
18. Cetin M, Ocak S, Gungoren A, Ulvi Hakverdi A. Distribution of *Candida* species in women with vulvovaginal symptoms and their association with different ages and contraceptive methods. *Scand J Infect Dis*, 2007; 39 (6-7): 584-8.
19. Ilkit M, Hilmioğlu Polat S, Tasbakan M, Aydemir S. Evaluation of Albicans ID2 and Biggy agar for the isolation and direct identification of vaginal yeast isolates. *JJ Med Microbiol*, 2007; 56 (6): 762-5.
20. Us E, Cengiz SA. Prevalence and phenotypic evaluation of *Candida dubliniensis* in pregnant women with vulvovaginal candidosis in a university hospital in Ankara. *Mycoses*, 2007; 50 (1): 13-20.
21. Nas T, Kalkancı A, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yolbakan S, et al. Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. *Folia Microbiol (Praha)*, 2008; 53 (2): 179-83.
22. Taner CF, Elveren B, Balsak B, Polat SH, Aygören MO. Mikotik vajinitlerde sertakonazol nitratin etkinliği ve tolerabilitesi. *Trakya Üniv Tıp Fak Derg*, 2008; 25 (3): 204-8.
23. Yıldırım Z, Kilic N, Kalkancı A. Fluorometric determination of acid proteinase activity in *Candida albicans* strains from diabetic patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*, 2010; 54 (5): e463-7.
24. Ozcan K, Ilkit M, Ates A, Turac-Bicer A, Demirhindi H. Performance of Chromogenic *Candida* Agar and CHROMagar *Candida* in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Med Mycol J*, 2010; 48 (1): 29-34.
25. Guzel AB, Ilkit M, Akar T, Burgut R, Demir SC. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID *Candida* agar versus CHROMagar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Med Mycol J*, 2011; 49 (1): 16-25.
26. Kalkancı A, Güzel AB, Jabban İİK, Aydin M, Ilkit M, Kuştımur S. Yeast vaginitis during pregnancy: susceptibility testing of 13 antifungal drugs and boric acid and the detection of four virulence factors. *Med Mycol J*, 2012; 50 (6): 585-93.

27. Guzel AB, Küçükgöz-Güleç Ü, Aydın M, Gümral R, Kalkancı A, Ilkit M. Candida vaginitis during contraceptive use: The influence of methods, antifungal susceptibility and virulence patterns. *J Obstet Gynecol*, 2013b; 33 (8): 850-6.
28. Kalkancı A, Güzel AB, Jabban IİK, Aydın M, Ilkit M, Kuştimur S. Candida vaginitis in non-pregnant patients: A study of antifungal susceptibility testing and virulence factors. *J Obstet Gynecol*, 2013; 33 (4): 378-83.
29. Sav H, Demir G, Atalay MA, Koç AN. Klinik örneklerden izole edilen candida türlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2013; 70 (4): 175-80.
30. Hazirolan G, Altun HU, Gumral R, Gursoy NC, Otlu B, Sancak B. Prevalence of *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis: First Turkish *Candida africana* isolates from vulvovaginal candidiasis. *JMM*, 2017; 27 (3): 376-81.
31. Hacıoğlu M, Guzel CB, Savage PB, Tan ASB. Antifungal susceptibilities, in vitro production of virulence factors and activities of ceragenins against *Candida* spp. isolated from vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol*, 2019; 57 (3): 291-9.
32. Tünger Ö, Özbakkaloğlu B, Ecemiş T, Koyuncu F. Vulvovajinitli kadınlarda maya mantarlarının sıklığı ve türlere göre dağılımı. *TMC Derg*, 2000; 30 (3-4): 127-30.
33. Kendirci M, Koç AN, Kurtoglu S, Keskin M, Kuyucu T. Vulvovaginal candidiasis in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2004; 17 (11): 1545-9.
34. Nurat AA, Ola BG, Olushola SM, Mikhail TA, Ayodeji AS. Detection and epidemiology of vulvovaginal candidiasis among asymptomatic pregnant women attending a tertiary hospital in Ogbomoso, Nigeria. *Nigeria Int J Biomed Res*, 2015; 6 (7): 518-23.
35. Konadu DG, Owusu-Ofori A, Yidana Z, Boadu F, Iddrisu LF, Adu-Gyasi D, et al. Prevalence of vulvovaginal candidiasis, bacterial vaginosis and trichomoniasis in pregnant women attending antenatal clinic in the middle belt of Ghana. *BMC Pregnancy Childb*, 2019; 19 (1): 341.
36. Emeklioğlu B, Çakır N, Çakır I, Kendirci M, Koç AN. Assessment of fungal genital infection frequency, antifungal sensitivity, and the impact of hemoglobin a1c levels on these infections in diabetic children. *Erciyes Med J*, 2021; 43 (5): 427-32.
37. Gamarra S, Morano S, Dudiuk C, Mancilla E, Nardin ME, Mendez E, et al. Epidemiology and antifungal susceptibilities of yeasts causing vulvovaginitis in a teaching hospital. *Mycopathologia*, 2014; 178 (3-4): 251-8.
38. Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal Susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol*, 2005; 43 (5): 2155-62.
39. Balcı O, Çapar M. Vajinal enfeksiyonlar. Vajinal enfeksiyonlar. *Türk J Obstet Gynecol*, 2005; 2 (5): 14-20.
40. Bassyouni RH, Wegdan AA, Abdelmoneim A, Said W, Aboelnaga F. Phospholipase and aspartyl proteinase activities of *Candida* species causing vulvovaginal candidiasis in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Microbiol Biotechnol*, 2015; 25 (10): 1734-41.
41. Emeribe AU, Nasir IA, Onyia J, Ifunanya AL. Prevalence of vulvovaginal candidiasis among nonpregnant women attending a tertiary health care facility in Abuja, Nigeria. *Res Rep Trop Med*, 2015; 6: 37-42.
42. Konaté A, Yavo W, Kassi FK, Djohan V, Angora EK, Barro-Kiki PC, et al. Aetiologies and contributing factors of vulvovaginal candidiasis in Abidjan (Cote d'Ivoire). *JMM*, 2014; 24 (2): 93-9.

# Tüberküloz dışı mikobakteriyel enfeksiyonlar: patogenezi ve risk faktörleri, tanı, tedavi, immün yanıt

## Nontuberculous mycobacterial infections: pathogenesis and risk factors, diagnosis, treatment, immune response

Gönül ASLAN<sup>1</sup> (ID), Leyla ERSOY<sup>1</sup> (ID)

### ÖZET

Tüberküloz dışı mikobakteri (TDM)'ler aquafilik ve jeofilik çevre organizmalarıdır. Genellikle bağışıklığı baskılanmış hastaları etkileyen, klinik vakalarının çoğunu pulmoner enfeksiyonların oluşturduğu, 150'den fazla türü içermektedir. Bunlar arasında en sık izole edilen ve klinik olarak anlamlı bulunan türler *Mycobacterium avium* kompleks (MAK), *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi* ve *Mycobacterium marinum*'dur. Pulmoner enfeksiyonların insidansı ve prevalansı dünya çapında artmaktadır. Pulmoner TDM hastalığı genellikle kronik akciğer hastalığı olan yaşlı nüfusu etkilerken aynı zamanda genetik yatkınlık ve çevresel maruziyetlerde hastalığın kazanılmasında rol oynamaktadır. Pulmoner TDM hastalığı tanısı konulabilmesi için hastaların klinik, mikrobiyolojik ve radyolojik tanı kriterlerinin tamamını karşılaması gerekmektedir. Moleküler yöntemlerdeki ilerlemeler, yeni türlerin tespitine ve TDM'nin tür ve alt tür düzeyinde tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Tanı ve tedavisi oldukça güç olan bu mikroorganizmalar yüksek nüks oranlarına sahiptir. TDM'ye çevresel

### ABSTRACT

Nontuberculous Mycobacteria (NTM) are aquatic and geophilic environmental organisms that typically affect immunocompromised patients, with the majority of clinical cases being pulmonary infections caused by more than 150 species. The most commonly isolated and clinically significant species among them are *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi*, and *Mycobacterium marinum*. The incidence and prevalence of pulmonary infections have increased worldwide. Pulmonary NTM disease typically affects the elderly population with chronic lung disease, but genetic predisposition and environmental exposures also play a role in acquiring the disease. Patients must meet all clinical, microbiological and radiological diagnostic criteria for a diagnosis of pulmonary NTM disease. Advances in molecular methods have enabled the detection of new species and the identification of NTM at the species and subspecies level. These microorganisms, which are difficult to diagnose and treat, have high recurrence rates. Although exposure

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Mersin



İletişim / Corresponding Author : Gönül ASLAN

Mersin Üni. Tıp Fak., Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Çiftlikköy Kampüsü Yenişehir/Mersin - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 24.04.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 11.08.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.40336

Aslan G, Ersoy L. Tüberküloz dışı mikobakteriyel enfeksiyonlar: patogenezi ve risk faktörleri, tanı, tedavi, immün yanıt  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(1): 103 - 118

maruziyet kaçınılmaz olmasına rağmen, enfeksiyon hastalığının nadir olmasının en önemli nedeni konak immün yanıtıdır. TDM enfeksiyonlarında patogeneze ve konak immün yanıtını aydınlatmaya yönelik araştırmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Günümüzde bir halk sağlığı sorununa dönüşmeye başlayan TDM ilişkili hastalıklar bitmeyen pandemi olarak nitelendirilen tüberkülozun gölgesinde kalmıő ve yeterli ilgiyi görememiştir. Bu derlemedeki amacımız; TDM'lerin epidemiyolojisi, tanı kriterleri, mikrobiyolojik tanı yöntemleri, TDM enfeksiyonlarının tedavisi ve özellikle konağın doğal bağışıklık yanıtına genel bir bakıő sunmaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Tüberküloz dışı mikobakteriler, enfeksiyon, patogeneze, virölans, risk faktörleri, tanı, tedavi, immünite

to NTM is inevitable, the rarity of the infection is mainly due to the host immune response. Research on the pathogenesis and host immune response in NTM infections has gained momentum in recent years. NTM associated diseases, which are becoming a public health problem today, have been overshadowed by tuberculosis, which is considered an ongoing pandemic, and have not received sufficient attention. The aim of this review is to provide an overview of the epidemiology, diagnostic criteria, microbiological diagnostic methods, treatment of NTM infections, and particularly a general view of the host's natural immune response to NTM.

**Key Words:** Nontuberculous mycobacteria, infection, pathogenesis, virulence, risk factors, diagnosis, treatment, immunity

## GİRİŞ

Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM), sıklıkla içme ve doğal su kaynaklarından, sıhhi tesisat sistemlerinden ve topraktan izole edilen aquafilik ve jeofilik çevre organizmalarıdır. Son yıllarda yapılan araştırmalar TDM enfeksiyonunun bir halk sağlığı sorunu haline geldiğine dikkat çekmektedir (1).

TDM'ler Runyon sınıflandırmasına göre üreme hızı, koloni morfolojisi ve pigmentasyon temelinde dört gruba ayrılmıştır. Grup I, II ve III, kültürde yavaş üreyen (fotokromojen, nonfotokromojen, skotokromojen), Grup IV, rutin bakteriyolojik ortamlarda yedi günden daha kısa sürede (hızlı) üreyen organizmalardır (2). DNA dizi analizi gibi günümüz teknolojisiyle ise 150'den fazla TDM tür ve alt türü tanımlanmıştır (3-5), bunlar arasında en sık izole edilen ve klinik olarak anlamlı bulunan türler *Mycobacterium avium* kompleks (MAK), *M. abscessus*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*,

*M. malmoense*, *M. xenopi* ve *M. marinum*'dur (2, 5).

TDM'lerin keşfi 19.yy'a dayanmakla beraber insanlarda hastalık yapabildiği 1950'li yıllara gelindiğinde fark edilmiştir (7). TDM kaynaklı hastalıklar dört farklı klinik sendromda tanımlanmıştır; i) kronik pulmoner hastalık (klinik olarak en sık karşılaşılan formu) (7), ii) deri/yumuşak doku/kemik hastalığı, iii) lenfadenit, iv) disemine (esas olarak HIV-insan immün yetmezlik virüsü- pozitif hastalarda) hastalık (3, 4). Pulmoner enfeksiyonlarda en sık izole edilen etken yavaş üreyen MAK ve *M. kansasii*, hızlı üreyen *M. abscessus* kompleks'dir (7). MAK pulmoner enfeksiyonların yanı sıra lenfadenopati ve özellikle AIDS hastalarında disemine hastalığa neden olmaktadır. *M. fortuitum* ve *M. chelonae* gibi hızlı üreyen TDM'ler kronik abselerde izole edilirken, *M. fortuitum* ve *M. kansasii* ile enfekte olmuş kişide *M. tuberculosis*'in sebep olduğu tüberküloz hastalığına benzer bir tablo ortaya çıkabilmektedir (2).

### TDM'nin Epidemiyoloji ve Ekolojisi

TDM enfeksiyonları birçok ülkede bulaşıcı hastalık olarak kabul edilmediği için bildirim zorunluluğu bulunmamaktadır. Bundan dolayı hastalık yükü, prevalansı, risk faktörlerine ait veriler konu ile ilgili yapılan çalışmalarla sınırlı kalmaktadır (8).

Son epidemiyolojik çalışmalar, TDM hastalarının %90'ından fazlasında pulmoner enfeksiyon insidansında artış olduğunu göstermektedir (3, 4, 9). Pulmoner TDM enfeksiyonu, yaşam kalitesinin önemli ölçüde bozulmasına, morbidite ve mortalite artışına ve tanı/ tedavide yüksek tıbbi maliyetlere neden olmaktadır. Vakalarının insidans ve prevalansındaki artış, konağın doğasına, patojene ve patojen-konak-çevre etkileşimi gibi çok faktörlü değişkenlere bağlıdır (6). Bakterinin virülansını artıran mutasyonlar, çevresel ve iklimsel değişiklikler, immünkompromise-yaşlı nüfusun artışıyla konak immünitesinde değişiklikler, diğer pulmoner hastalıkların insidansında artış, yüksek gelirli ülkelerde azalan tüberküloz (TB) yükü, dolayısıyla TDM enfeksiyonuna karşı bağışıklığın düşmesi, tanı yöntemlerinin gelişmesi (yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi-BT, laboratuvar testleri) ve sağlık çalışanlarında TDM ilişkili hastalıklara yönelik farkındalık oluşması gibi pek çok faktör insidans ve prevalans artışıyla ilişkili bulunmuştur (10).

TDM'ler insanlar için *M. tuberculosis*'ten daha az yaygın patojenlerdir. Fakat, küresel olarak bağışıklığı baskılanmış hasta popülasyonu için 100.000 nüfus başına tahmini 4,1-14,1 vaka ile yeni ortaya çıkan bir tehdit durumundadır (11). Başlangıçta, predispozan akciğer (AC) rahatsızlıkları olan kişilerde hastalık yapabilen, sınırlı virülansa sahip basit saprofitler olarak kabul edilmişlerdir. Fakat 1990'ların başlarında MAK türleri HIV'li hastalarda majör fırsatçı enfeksiyonların etiyolojik ajanı olarak ortaya çıkmıştır. Yanı sıra *M. abscessus* ve diğer TDM enfeksiyonlarının yaşlı hastalarda artış göstermesi, TDM'lerin tahmin edilenden daha geniş bir konak yelpazesini etkilediğini ortaya koymuştur (12).

TDM türlerinin dağılımı coğrafik ve iklimsel değişiklikler beraberinde, popülasyon yoğunluğu

gibi faktörlere bağlı olarak bölgeye/ülkeye göre değişmektedir (13). Amerika Birleşik Devletleri ve Güneydoğu Asya'da TDM hastalarının pulmoner örneklerinden izole edilen en yaygın patojenik türlerin başında MAK ve *M. abscessus* kompleksi gelmektedir (3). Altı kıtadan verilerin değerlendirildiği kapsamlı bir çalışmada ise 91 farklı TDM türü izole edilmiş, çoğu ülkede MAK baskın tür bulunmuş, bunu *M. gordonae* ve *M. xenopi* izlemiştir. Çalışmada, *M. xenopi* ve *M. malmoense* Doğu Asya'da oldukça nadir iken ağırlıklı olarak Avrupa'da yaygın olarak görülmüştür (13). Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise MAK, *M. fortuitum*, *M. abscessus* ve *M. chelonae* hakim türler olarak tespit edilmiş, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. kansasii*, *M. simiae* daha az olarak izole edilmiştir (14).

Düşük ve yüksek çevre sıcaklıklarına dayanabilen bu organizmalar, standart bakteri kültür ortamlarında kolayca üreyemezler, antibiyotik ve klor gibi dezenfektanlara ise oldukça dirençlidirler. Bu özellikleri göz önüne alındığında, TDM'ler her yerde bulunabilen ve kolayca gözden kaçan, tanısı ve tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmaktadır. Havadan, topraktan, tozdan, bitkilerden, doğal ve içme suyu kaynaklarından, biyofilmlerden, vahşi hayvanlardan, süt ve gıda ürünlerinden izole edilmişlerdir. Çeşitli TDM türlerinin çevresel nişleri Tablo 1'de verilmiştir (13, 18).

### TDM'lerin Bulaş Yolları

TDM bulaşı genellikle çevresel örneklerin inhalasyonu, ağız yoluyla alınması ve travmatize cilde teması yoluyla olmaktadır (15). İçme suyu, musluklar, boru hatları, su depoları ve bahçe toprağından izole edilmiş olan TDM'lerin, hasta örneklerinden elde edilen TDM izolatlarıyla aynı genotipe sahip olduğu gösterilmiştir, dolayısıyla insanların günlük aktiviteleri sırasında bu mikroorganizmalara maruziyeti olasıdır (6). Hücre duvarında bulunan lipid açısından zengin dış zar hem biyofilm oluşumunu hem de hidrofobik yapısı gereği aerosol oluşumunu kolaylaştırmakta ve inhalasyon yoluyla pulmoner enfeksiyonlara yol

açmaktadır (5, 6). MAK'ın içme suyu sistemlerinin uç noktalarından ve duő başlıklarından alınan aerosol örneklerinden, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum* ve *M. abscessus*'un duő başlığı biyofilmlerinden izole edildiği bildirilmiştir (3). Çocuklarda görülen servikal TDM lenfadenitleri ve HIV ile enfekte hastaların çoğunda gastrointestinal *M. avium* kolonizasyonu oral bulaş ile başlamaktadır (16). Normal konakçılarda deri ve yumuşak doku enfeksiyonları cerrahi kontaminasyon, travma ve benzeri durumların neden olduğu iyatrojenik veya kazara inokülasyon yoluyla oluşmaktadır (5).

Hastane su dağıtım sistemleri TDM'ler için rezervuar görevi görmekte ve hastane malzemelerini kontamine ederek nozokomiyal salgınlara ve yalancı

salgınlara neden olmaktadır (17). Son zamanlarda, açık kalp cerrahisi sırasında kullanılan cihazlardan *M. chimaera*'ya bağlı birkaç salgın bildirilmiştir (18, 19). Bu salgınlarla mücadele amacıyla kaynağın en kısa sürede belirlenmesi, izolatların tanımlanması, tiplendirilmesi, olası bulaş kaynaklarının gözden geçirilmesi, su sistemleri ve tıbbi cihazlara etkili sterilizasyon veya dezenfeksiyonun uygulanması gerekmektedir (20).

Yakın zamana kadar TDM'lerin insandan insana bulaşının mümkün olmadığına inanılıyorken, tüm genom dizileme ile kistik fibroz (KF) hastalarında *M. abscessus* kompleksin insandan insana bulaştığına dair ilk genetik kanıt sağlanmıştırdır (21).

Tablo 1. TDM'lerin çevresel nişleri (12)

Kaynak tipi	Kaynak	Yaygın TDM
Doğal su kaynakları	Akarsu, ırmak, göl, deniz suyu	MAK, <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. marinum</i>
İnsan yapımı su kaynakları	İçme suyu boru hattı, jakuzi, havuz, sıcak soğuk su tankı, su tesisatı, musluk, buz makinası, hastane su sistemleri	MAK, <i>M. kansasii</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. szulğai</i>
Aerosoller	Duő, jakuzi, hastane sıcak-soğuk su sistemleri	MAK, <i>M. kansasii</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. abscessus</i>
Diğer	Bahçe toprağı, ev içi tozlar	MAK, <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. kansasii</i> ,

### TDM Enfeksiyonunda Tanı Kriterleri

TDM'lerin solunum yolu örneklerinden izolasyonu, pulmoner hastalığı, kolonizasyonu veya hastalığa dönüşmeyen geçici enfeksiyonu yansıtabileceği için tanı koymada zorluklar yaşanabilmektedir (9). Özellikle tek bir solunum yolu örneğinden TDM izolasyonu, çevresel kontaminasyon sayılmakta ve genellikle klinik olarak önemsiz kabul edilmektedir (4). Tek bir balgam örneğinde MAK pozitif olan hastaların yalnızca %35-%42'si klinik olarak anlamlı bulunmuştur (3, 9).

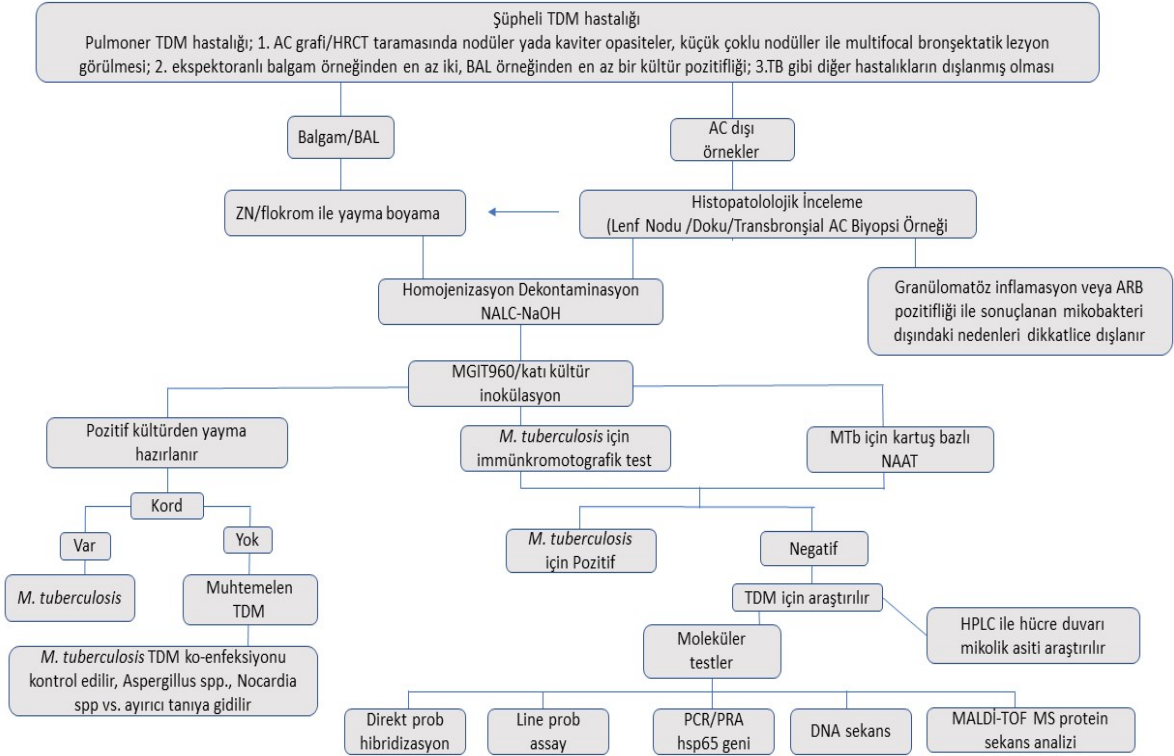
Kronik öksürük, balgam, hemoptizi, yorgunluk, halsizlik ve kilo kaybı gibi nonspesifik semptomlar pulmoner TDM enfeksiyonu olabileceği gibi altta yatan başka pulmoner hastalıkların göstergesi de olabilir (7). Tanının standardize edilmesi amacıyla uluslararası dernekler/kuruluşlar tarafından [American Toracic Society (ATS), European Respiratory Society (ERS), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) ve Infectious Diseases Society of America (IDSA)] rehberler hazırlamıştır. Bu rehberlere göre TDM kaynaklı bir hastalıktan söz

edebilmek için hastanın mikrobiyolojik, radyolojik, histolojik ve klinik bulgularının korelasyon içinde olması ve bir takım tanı kriterlerini karşılaması gerekmektedir (22).

Klinik ve radyolojik açıdan, pulmoner enfeksiyon tanısı; AC grafisinde nodüler/kaviter opasiteler veya yüksek çözünürlüklü BT’de küçük nodüller, multifokal bronşektazi saptanması, TB ve mantar enfeksiyonları gibi diğer hastalıkların dışlanmış olması gerekmektedir (23). Mikrobiyolojik olarak, en az iki ekspektorasyonlu balgam örneğinden veya bir bronşiyal yıkama / lavajdan aynı TDM türüne ait pozitif kültür veya transbronşiyal / AC doku biyopsi örneklerinde histopatolojik değişiklikler (granümatöz inflamasyon) tespit edilmesi gerekmektedir. Klinik ve radyolojik kriterleri karşılayan bireylerin balgamından izole edilen TDM’nin önemi pozitif kültürlerin sayısı

ve izole edilen türlere göre yorumlanmalıdır (22). Mikrobiyolojik ve moleküler yöntemlerle (Şekil 1, Tablo 2) hızlı bir şekilde tür düzeyinde tanımlama ve duyarlılık testlerinin yapılması, morbiditeyi, mortaliteyi ve tedavi maliyetlerini düşürecektir (2, 3, 7, 9).

Solunum yolu örneklerinden TDM izole edilen hastaların %25-60’ının pulmoner TDM enfeksiyon kriterlerini karşıladığı bildirilmiştir (23). Bu örneklerden MAK, *M. abscessus* kompleks, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi* ve *M. szulgai*’nin izolasyonu, nispeten gerçek pulmoner TDM enfeksiyonu olasılığını gösterirken, *M. gordonae*, *M. terrae* gibi patojenitesi düşük türler ve *M. fortuitum* kompleks, hastalığın etiyolojik ajanlarından ziyade genellikle kontaminant olarak değerlendirilmektedir (16).



Şekil 1. Pulmoner TDM enfeksiyonu tanı algoritması

Tablo 2. Pulmoner TDM hastalığının tansında kullanılan mikrobiyolojik ve moleküler yöntemler (25)

Yöntem	Fayda	Yorumlar
Aside dirençli yayma (Kinyoun veya rodamin-auramin)	Örnekte mikobakterilerin hızlı tespiti Pozitif testin organizmaların kontaminant olma olasılığını azalttığını düşündürür	Pulmoner TDM hastalığı, özellikle nodüler bronşektatik tip için zayıf duyarlılık Mikobakteriyel türleri ayırt edemiyor (morfoloji güvenilir değil)
Mikobakteriyel kültür	Sonraki tanımlama ve olası duyarlılık testi için bir izolat elde edilir	Katı ve sıvı ortam sistemleri tamamlayıcıdır Belirli dekontaminasyon prosedürleri (örn. %5 oksalik asit) belirli popülasyonlarda (örn. kistik fibroz hastaları) faydalı olabilir
Line prob assay (örn. GenoTypeMycobacteria Direct)	Balgam örneklerinde organizmaların doğrudan tanımlanması ( <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> )	Zayıf duyarlılık (~%60). Hızlı üreyen mikobakteriler için kullanışlı değil
Gen dizilimi (örn. 16S, hsp, rpo B, 16S-23S ITS)	Kültürde üreyen organizmaların tür düzeyinde tanımlanması	Bazı organizmalar, özellikle de hızlı üreyen mikobakteriler için tek bir gen kullanılarak tür düzeyine kadar ayırım yapılamaz Çoklu gen dizilimi türleri ayırt edebilir, ancak nispeten maliyetlidir
MALDI-TOF	Kültürde üreyen organizmaların tür düzeyinde tanımlanması	Tür tanımlaması veri tabanı kalitesine bağlıdır; halka açık veri tabanları genellikle eksiktir

### Tedavi

Mevcut ilaçlarla başarılı bir tedaviden sonra bile nüks ve reenfeksiyon oranları oldukça yüksektir. Bu nedenle, TDM kaynaklı hastalığı uygun şekilde önlemek ve tedavi etmek için enfeksiyonunun kaynağı ve epidemiyolojisi anlaşılmalıdır (6).

Pulmoner TDM enfeksiyonu tedavisinin planlanmasında enfekte konağın yaşı, eşlik eden tıbbi durumlar ve hastalık tipi dikkate alınmalı, hasta için uzun süreli çoklu antibiyotik kullanımının potansiyel riskleri ve faydaları analiz edilerek tedavi planlanmalıdır (23). Kronik pulmoner TDM enfeksiyonunun bir tipi olan fibrokaviter hastalık, yüksek ölüm oranı riski taşıdığı için acil tedavi gerektirir. Nodüler bronşektatik hastalık ise genellikle yavaş seyirlidir ve acil tedavi önerilmeyebilir. (23).

Pulmoner TDM enfeksiyonunun tedavisi, çoklu ilaçların uzun süreli (12-18 ay) kullanımını gerektiren maliyetli (MAK enfeksiyonu için kişi başı 14.730 USD ve *M. abscessus* kompleks enfeksiyonu için 47.240 USD)

bir süreçtir (24). Antibiyotik tedavisinin başarıyla tamamlanmasından sonra bile, özellikle nodüler bronşektatik pulmoner MAK enfeksiyonunda (%30-50) ve *M. abscessus* kompleks enfeksiyonlarında tedavi başarısızlığı ve nüks oranı yüksek görülmektedir. Birçok hastada tedaviye rağmen kronik enfeksiyon geliştiği görülmektedir (24). Pulmoner TDM enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan etiyolojik ajanlar ve tedavisinde kullanılan antibiyotikler Tablo 3'de verilmiştir (23).

### Pulmoner TDM Enfeksiyon Patogenezi ve Bilinen Risk Faktörleri

TDM'ler, düşük-orta derecede patojeniteye sahiptir ve konağa ait risk faktörleri, TDM enfeksiyonlarına karşı savunma yetersizliğinde önemli rol oynar. Bununla birlikte, TDM enfeksiyonu insidansının hızla artması ve sosyoekonomik düzeyi yüksek ülkelerde TB'yi geride bırakması, bazı bireylerin neden TDM enfeksiyonuna daha duyarlı oldukları konusunu anlamamızı sağlamaktadır (25).



Tablo 3. Pulmoner TDM hastalığının antibiyotik tedavisi (25)

Türler	Önerilen antibiyotikler	Alternatif antibiyotikler
<i>M. avium</i> kompleks	Kaviter olmayan nodüler bronşektatik form: Klaritromisin 1000 mg veya azitromisin 500 mg* artı Ethambutol 25 mg/kg* artı Rifampisin 600 mg* Fibrokaviter form veya kaviter nodüler bronşektatik form: Klaritromisin 1000 mg veya azitromisin 250 mg günlük artı Ethambutol 15 mg/kg günlük artı Rifampisin 450-600 mg günlük ve/veya streptomisin 10-15 mg/kg IM * veya amikasin 10-15 mg/kg IV*	Klofazimin, Moksifloksasin, Linezolid İnhaleamikasin
<i>M. abscessus</i> kompleks	Amikasin 10-15 mg/kg IV günlük artı Cefoxitin 12 g IV'e kadar veya imipenem 1000-2000 mg IV günlük artı Klaritromisin 1000 mg veya azitromisin 250 mg günlük	Clofazimin, Linezolid, Bedaquiline, Tigecycline, İnhaleamikasin
<i>M. kansasii</i>	İzoniazid 5 mg/kg günde en fazla 300 mg artı Rifampisin 10 mg/kg günlük en fazla 600 mg artı Ethambutol 15 mg/kg günlük veya Klaritromisin 1000 mg veya azitromisin 250 mg günlük Rifampisin 10 mg/kg günlük en fazla 600 mg günlük artı Ethambutol 15 mg/kg günlük	

\*Haftada üç kez; IM, kas içi; IV, intravenöz.

Hastalığın fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, bakteriye ait faktörlerin yanı sıra konağın bağışıklığı ve sahip olduğu solunum yolu problemlerinin hastalığın gelişiminde ve ilerlemesinde önemli olduğu düşünülmektedir (26). TDM enfeksiyonlarının ardındaki patogenezi açıklayan üç önemli gözlem vardır. Birincisi, HIV'li hastalarda, TDM enfeksiyonu tipik olarak yalnızca CD4<sup>+</sup> T lenfosit sayısı 50/L'nin altına düştüğünde artmaktadır, bu da mikobakteriyel direnç için spesifik T-hücre yanıtının gerekli olduğunu göstermektedir. İkincisi, HIV olmayan hasta grubunda, IFN- $\gamma$  ve interlökin (IL)-12 sentez ve yanıt yollarındaki spesifik mutasyonların varlığıdır. Üçüncüsü, nodüler pulmoner TDM enfeksiyonları ile özellikle vücut kitle indeksi ve yağ dokusu azalmış zayıf, uzun boylu post-menapoz dönemindeki belirli vücut tipine (örn. pektus ekskavatum, skolyoz, mitral kapak prolapsusu) sahip kadınlar arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (2).

Pulmoner TDM enfeksiyonu çoğunlukla edinsel veya konjenital yapısal AC hasarı oluşturan amfizem, bronşektazi veya KOAH gibi durumlarda ortaya çıkmaktadır. KOAH hastalarında TDM'ye yatkınlığın arttığını gösteren bir çalışmada %22 TDM kültür pozitifliği bildirilmiştir (25, 27). Buna karşılık, AC dışı ve disemine enfeksiyonlar hemen hemen her zaman bağışıklığı baskılanmış kişilerde ortaya çıkmakta ve tıpkı pulmoner TDM enfeksiyonu gibi edinilmiş veya genetik temelli olabilmektedir (25).

Yakın zamanda yapılan bir tam ekzom dizileme çalışması, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, pulmoner TDM hastalarında bağışıklık fonksiyonunu, siliyer fonksiyonu, bağ dokusunu ve KF transmembran iletkenlik regülatörünü kontrol eden genlerdeki mutasyon prevalansının arttığını ortaya koymuştur (TDM hastalarının %36-50) (28). Ayrıca primer siliyer diskinezi, alfa-1-antitripsin eksikliği, Williams-Campbell sendromu, Mounier Kuhn sendromu,

Sjögren sendromu, pulmoner alveoler proteinoz ve yaygın değişken immün yetmezlik de konağın TDM'ye yatkınlığını artıran genetik bozukluklar arasındadır (3, 5).

Şiddetli immün yetmezliğe neden olan ve disemine TDM hastalığına duyarlılığı artıran edinilmiş bozukluklar arasında; tedavi edilmemiş AIDS, anti-interferon gama (IFN- $\gamma$ ) otoantikoların varlığı, kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötikler, organ transplantasyonu sonrası kullanılan immünoşüpresifler, TNF- $\alpha$  (tümör nekroz faktörü- $\alpha$ ) blokerleri veya inflamatuvar durumları iyileőtirmek için diğer yeni biyolojik ajanların ve kortikosteroidlerin kullanımı, hematopoietik kök hücre naklini takiben primer ve sekonder immün yetmezlik gelişimi, greft versus host hastalığı ve diabetes mellitus gibi önemli predispozan faktörler bulunmaktadır (3, 5, 29).

Kore'de 2020'de yayınlanan raporda; 65 yaş üzeri, erkek cinsiyet, düşük vücut kitle indeksi, kronik pulmoner aspergilloz, pulmoner veya ekstrapulmoner malignite, kronik kalp veya karaciğer hastalığı ve yüksek eritrosit sedimentasyon hızının mortalite ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *M. abscessus* ve *M. intracellulare*'nin *M. avium*'dan daha yüksek ölüm oranlarına neden olduğu tespit edilmiştir (30).

## İMMÜNİTE

TDM'lere çevresel maruziyet neredeyse kaçınılmazdır buna rağmen pulmoner enfeksiyon nispeten nadirdir. Bu da normal konakçı savunma mekanizmalarının enfeksiyonu önlemek için yeterli olduğunu ve pulmoner TDM enfeksiyonu gelişen hastaların muhtemelen spesifik duyarlılığa sahip olduğunu düşündürmektedir (5, 16).

## Konakçı İmmün Yanıtını İndükleyen TDM Virülans Faktörleri

Mikobakteriler, hücre zarını koruyan ince bir peptidoglikan tabakası, mikolik asitler olarak adlandırılan yoğun uzun zincirli beta-hidroksi yağ asitleri, arabino galaktan ve açıl lipid tabakasına

sahip karmaŐık bir hücre duvarı ile çevrilidir (25, 31). Mikobakterilerin virülans faktörleri arasında Őüphesiz en iyi bilineni mumsu yapıya sahip olan bu hücre duvarıdır (5). Bu yapı antibiyotiklere ve konakçı bağışıklık savunmalarına karşı koruma sağlamasının (konağın IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  üretimini inhibe ederek) yanı sıra dış ortam Şartlarına dayanıklılık sağlamaktadır. Bir çalışmada, *M. avium* lipidleri ile makrofajların inkübasyonu sonucunda, makrofajlar tarafından immünoşüpresif prostaglandin E2 üretiminin stimüle edildiği ayrıca TDM'nin hücre içinde sağ kaldığı ve üreyebildiği saptanmıştır. Bu bulgular, TDM lipidlerinin immünoşüpresif etkisini göstermektedir (5).

TDM hücre duvarının kompleks yapısını oluşturan lipidler, makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde bulunan ekstraselüler patojen tanıma reseptörleri (PRR) tarafından tanınan patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP)'lerdir. Mikobakterilerdeki en önemli PAMP'lar, lipomannan (LM), lipoarabinomannan (LAM), mannosilatlı LAM (ManLAM), trehaloz dimikolat ve fosfatidil inositol mannosit (PIM)'dir (31). TDM hücre duvarının en dış kısmında bulunan *M. tuberculosis* ve *M. leprae*'da bulunmayan önemli bir PAMP ise glikopeptidolipid (GPL)'dir (5, 32).

## Glikopeptidolipidler (GPL)

GPL'nin tüm yüzey lipidleri arasındaki oranı TDM'nin serovarına ve türüne bağlı olarak değişmektedir (5). TDM'ler flagella, pili veya fimbria içermemelerine rağmen GPL'leri sayesinde, kültür ortamının yüzeyinde kayma hareketi yapabilir, biyofilm oluŐturabilir. Bu sayede TDM'lerin solunum yolu mukozasında daha iyi kolonize olabildiği düşünülmektedir (1, 5).

GPL'nin iki ana sınıfı vardır: ilki, birçok TDM, özellikle *M. abscessus*'da bulunan apolar, nonspesifik GPL (nsGPL)'dir. Diğeri *M. avium*'da bulunan polar, potansiyel serodiagnostik belirteç olarak yeterli antijeniteye sahip, serovara özğü GPL (ssGPL)'dir (1, 25). İn vivo biyolojik aktiviteleri tam olarak anlaŐılamamıŐ yaklaşık 31 farklı ssGPL tanımlanmıştır (5).

*M. abscessus*'un GPL'ye sahip varyantları S tipi, GPL'yi, *gpl* lokusunda oluşan tek nükleotid polimorfizmleri sonucunda kaybettiği düşünülen varyantları R tipi koloni oluşturmaktadır (31, 33). *M. abscessus*'un çevresel ortamlarda hayatta kalabilen ve invaziv olmayan S tipi varyantları duyarlı konakçıda enfeksiyonu başlatabilmektedir. nsGPL hücre duvarında bulunan ve toll-like reseptör (TLR) 2'nin ligandı olan PIM'i maskeler, *M. abscessus*'un TLR2 taşıyan bağışıklık hücreleri tarafından tanınmasını engeller. Bu yolla konak bağışıklığından kaçabilen basilin solunum yolu mukozasında kolonizasyonu kolaylaşmaktadır (31, 33). S varyantı hem fagozom ortamının asidifikasyonunu hemde fagozom-lizozom füzyonunu önlemekte, ayrıca R varyantlarından daha az apoptoz ve otofajiye neden olmakta, serbest radikal oksijen türlerinin (ROS) üretimini azaltmakta ve *M. abscessus*'un makrofajlar arasında yayılımını sınırlamaktadır (33).

Yüksek düzeyde immünojenik GPL, basili kaplayarak, enfekte bireylerde güçlü bir hümmoral tepkiye neden olur ve bu güçlü bağışıklık yanıtı, *M. abscessus*'un anti-GPL tepkisinden kaçabilen, GPL eksikliği olan suşlarının seçilimine yol açması mümkündür. GPL'nin eksikliği artmış apoptozise yol açarak hücre dışı replikasyonu ve kord oluşumunu teşvik eder, akut enfeksiyonları ve hastalığın en şiddetli formlarını ortaya çıkarır. Bu durum, GPL'nin kaybının diğer pro-inflamatuar hücre yüzey bileşenlerini açığa çıkarması nedeniyle, şiddetli inflamasyon ve akciğer hasarıyla sonuçlanır. Dolayısıyla, GPL'nin çift yönlü etkisi, *M. abscessus*'un çevresel bir mikroorganizmadan invaziv bir insan patojenine geçiş yapabilmesine olanak tanır (33). Bernut ve ark. (34) tarafından apoptotik makrofajlardan *M. abscessus* R varyantının salınmasının, diğer fagositer hücreler tarafından fagosite edilemeyecek kadar büyük kordların oluşumunu başlattığı bildirilmiştir. Bu kordların, hızlı bir şekilde konak dokularının yıkımına ve apse oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir.

*M. abscessus*'da bulunan nsGPL hücre içi hayatta kalmayı kolaylaştırırken *M. avium* ssGPL'si hücre içi

hayatta kalma için gereklidir ve sitokin tepkilerini etkiler, bu da serovar oligosakkaritlerin türe özgü patogeneze katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (5). *M. avium* ssGPL'nin immünomodülatör aktiviteleri çeşitlidir ve ekstrakte edildikleri serovara bağlıdır. Serovar 1, 2 ve 8 insan periferik kan mononükleer hücre (PBMC)'leri tarafından TNF- $\alpha$  ve/veya prostaglandin E2 üretimi indüklemektedir. ssGPL ayrıca fagositozu teşvik etmekte ve ardından fagozom-lizozom füzyonunu inhibe ederek hücre içi hayatta kalmayı sağlamaktadır (5).

### Lipoglikanlar

Tüm mikobakteriler PIM, LM ve LAM gibi virülansa katkı sağlayan bir dizi lipid sentezlerler. Bununla birlikte, bazı LAM'lar, mikobakterilerin nihai zararına olacak şekilde aşırı konakçı bağışıklık tepkisini tetikleyebilirler. Üç heterojen LAM sınıfı vardır: i) mannosit başlıklı ManLAM (patojenik *M. tuberculosis*, *M. leprae* ve *M. avium* ve fırsatçı patojen *M. marinum*'da bulunur), ii) PIM başlıklı PILAM (*M. fortuitum* ve *M. smegmatis*'te bulunur), iii), hem mannosit hem de PIM'den yoksun AraLAM (*M. chelonae*'de bulunur) (32). TDM'lerin ManLAM, PILAM veya AraLAM'ı ile konakçı bağışıklık tepkisi arasındaki etkileşimler kısmen açıklanmıştır (32). *M. fortuitum* ve *M. smegmatis*'in PILAM'ı farklılaşmış insan makrofajlarından IL-12, TNF- $\alpha$  ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indükler. *M. chelonae*'de ve diğer birçok hızlı üreyen TDM'de bulunan AraLAM'ın, akut bir inflamatuvar yanıtı ve TDM klirensi için gerekli olan nötrofil akışını tetiklediği tespit edilmiştir. *M. smegmatis*'in LM ve LAM'daki yapısal kusurları, aside dayanıklı boyanma yeteneğinin kaybolmasına,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere duyarlılığın artmasına ve insan farklılaşmış makrofajları tarafından daha hızlı eliminasyonuna neden olmaktadır (32).

Lipomannan, konakçı hücre makrofajlarında IL-12 üretimi ve apoptoz dahil olmak üzere güçlü bir proinflamatuvar sitokin yanıtı ortaya çıkarır. Myeloid farklılaşma faktör-88 (MyD88) ve TLR eksikliği olan farelerin kemik iliği kökenli makrofajları ile yapılan çalışmalar, *M. chelonae*, *M. kansasii* ve *M. bovis*

dahil olmak üzere çeşitli mikobakteriyel türlerdeki LM'nin farklı yollar aracılığıyla proinflamatuvar sitokin yanıtını hem stimüle edebildiği hem de inhibe edebildiği çift yönlü iŐlevinden bahsetmektedir (32, 35).

Fosfatidilinositol (PI), plazma zarına bulunan ve mikroorganizmanın canlılığını koruyan bu yapının sentezlenmesinde görevli olan enzimlerin konsantrasyonlarındaki değişiklik mikobakteriyel sağkalım ile korelasyon göstermektedir. Bu özelliği PI'ı ilaç geliŐtirme için potansiyel hedefler olarak ortaya çıkarmaktadır (32, 36).

Fosfatidilinositol mannosit (PIM), mikobakteriyel hücre zarının hem iç hem de dış kısmında bulunmakta, hiperglikosile edildiğinde, LM ve LAM'ın biyosentetik öncüsü olarak iŐlev görmektedir. Ayrıca PIM'in fagozom olgunlaşmasını önlediği ve erken endozomlar ile fagozomlar arasındaki füzyonu artırdığı bildirilmiştir (32, 37).

Trehaloz dimikolat, *M. leprae* dışında bilinen tüm mikobakterilerde bulunur. Mikobakteriyel hücre duvarının düşük geçirgenliğine katkıda bulunan ve R tipi morfoloji ile ilişkili olan temel yapısal bileŐendir. Trehaloz dimikolat yüksek konsantrasyonlarda kord benzeri yapıların oluşumunda rol oynamaktadır. Ayrıca, granülom oluşumu, doğal, humoral ve hücreyel bağışıklığın uyarılması ve çeşitli sitokinlerin (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10 ve IL-12) ve kemokinlerin indüklenmesi gibi immünmodülatör etkilere sahiptir (38).

Fenolik glikolipidlerin (PGL), önemli proinflamatuvar sitokinleri (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1B, MCP-1) ve nitrik oksit (NO) salınmasını TLR2 aracılı olarak inhibe ettiği ve konakçı bađıŐıklıđını zayıflattığı bildirilmektedir (39).

### TDM Enfeksiyonuna Karşı Doğal Bağışıklık Tepkisi

#### TDM-Makrofaj ilişkisi

Mikobakteriyel enfeksiyona karşı konak yanıtını aktive eden doğal bağışıklık mekanizmaları, solunum yolu epitel hücreleri ve makrofajlar dahil olmak üzere çoklu hücre tiplerinin koordinasyonunu iÇerir (40,

41). Doğal bağışıklığın primer savunma hücreleri olan alveolar makrofajların, mikobakterileri yok edebildiği veya hücre iÇine alınan TDM için bir rezervuar olabileceği bilinmektedir. TDM ile savaŐta makrofaja ait PRR'nin, PAMP'ları tanınmasıyla, fagositik yolların aktivasyonu, ROS, reaktif nitrojen türleri (RNS), serbest yağ asitleri ve antibakteriyel peptit üretimi, proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınması ile doğal bağışıklık yanıtı aktive olmaktadır (42, 43). İnflamatuvar yanıtın stimüle edilmesi M1 makrofaj polarizasyonu sayesinde olur iken, akut inflamatuvar yanıtı takiben, eferositoz ile makrofajlar hücre kalıntılarını ve apoptotik inflamatuvar hücreleri uzaklaŐtırabilir ve alternatif olarak aktive edilmiş M2 makrofajlarına polarize olabilir (42). *M. abscessus* ve *M. smegmatis*'in NO üretimi ve indüklenbilir NO sentaz, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  ve IL-6'nın gen ekspresyonu ile M1 makrofaj polarizasyonunu önemli ölçüde indüklediği bildirilmiştir (42). Ancak bazı raporlar, makrofaj tarafından fagosite edilen *M. avium*'un, bir transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B aktivasyonunu ve fagozomluzom füzyonunu inhibe ederek bu mekanizmaları bozduğunu ileri sürmektedir (43).

M1 ve M2 belirteçleri için negatif olan makrofajların (HLA-DR+, CD40-ve CD163-/polarize olmayan makrofajlar) da kronik inflamasyonla ilişkili olduğu bildirilmektedir (40). Pulmoner MAK hastalarında bozulmuŐ fagositik aktiviteden polarize olmayan alveolar makrofaj fenotipinin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. MAK ile enfekte bu makrofajların *in vitro* olarak bakterisidal aktivitesinin azaldığı ve alveolar makrofajlardaki disfonksiyonun, *Staphylococcus aureus* gibi diğer bakterilerin neden olduğu kronik enfeksiyona katkıda bulunabileceği tespit edilmiştir (40).

### Fagozom Olgunlaşması

Fagozomlar farklı endozom tipleri ile etkileŐime girererek erken bir fagozomdan geÇ bir fagozoma ve ardından da fagolizozomlara kademeli olarak olgunlaŐmaktadır (44). Fagolizozom, yüksek enzim iŐeriđine (lipazlar, hidrolazlar, proteazlar) ve bazı

antimikrobiyal moleküllere (örneğin, defensinler) sahip asidik bir ortamdır. Makrofaj olgunlaşması için temel mekanizmalar arasında fagozom asitlenmesi, ROS ve RNS oluşumu, antimikrobiyal peptit/protein oluşumu ve katepsin oluşumu yer alır. Mikobakteriler ise hücre içinde hayatta kalabilmek ve çoğalmak için fagolizozom olgunlaşmasını inhibe edebilir (31). *M. avium*'da LAM ve *M. tuberculosis*'de ManLAM, PGL-1 ve theraloz dimikolat gibi mikobakteriyel hücre duvarı lipidlerinin fagozom olgunlaşmasını modüle ettiği gösterilmiştir (31).

#### Aşırı konak immün yanıtı-TDM-Nötrofil ilişkisi

Pulmoner TDM enfeksiyonuna yanıt olarak bölgeye gelen nötrofillerden elastaz ve metalloproteazların salınımı mukozal bariyeri aşındırarak havayolu epitelinde hasara yol açabilmekte ve böylece TDM barındıran mikroabseler oluşmaktadır. Ayrıca elastaz, TDM'nin biyofilm oluşumunu artıran siliyer disfonksiyonuna, mukus bezi hiperplazisine ve mukus hipersekresyonuna da neden olabilir (25, 45). Elastaz ve diğer proteazların nötrofil yüzeylerinde ki Fcy reseptörlerini ve kompleman reseptörü (CR) 1'i parçalamasının yanı sıra mikobakteri yüzeyine tutunmuş olan immünooglobulinleri ve kompleman bileşenlerini de parçalamaları, mikobakterilerin opsonizasyonunu ve nötrofiller tarafından tanınmasını engellenmekte, fagositoz ve bakteriyel klirensi azaltmaktadır. Elastaz, eferositozu inhibe ederek apoptotik nötrofillerin klirensini bozabilir (50). Fagosite edilmemiş ölü nötrofiller inflamasyonu daha fazla tetiklemekte ve TDM klirensini daha da bozan yoğun mukus oluşumuna katkıda bulunmaktadır (25, 45).

#### Patojen tanıma reseptörleri (PRR)

Ekstraselüler PRR'ler, PAMP'leri tanıyan, fagositer hücre ve antijen sunan hücre reseptörleridir. Opsonik veya nonopsonik fagositoz, mikrobun kompleman ve antikorlar gibi çözünür PRR'lerle kaplı olup olmamasına bağlıdır. Opsonik reseptörler, kompleman ve antikorlar gibi çözünür PRR'leri tanıyan Fc reseptörlerini, integrinleri ve CR'leri içerir (31). Humoral bağışıklığın

mikobakteriyel enfeksiyonda koruyucu olmadığı düşünülmektedir fakat *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in opsonizasyonunun, makrofajlar tarafından fagosite edilmesinde ve öldürülmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (46).

PRR ailesinin nonopsonik ve en iyi bilinen reseptörü TLR'ler, mikobakterilerin hücre içine alınımı kolaylaştırmakta, hücre içi sinyal iletimini başlatmakta ve doğal /adaptif bağışıklık arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır (47). Diğer nonopsonik reseptörler; C tipi lektin reseptörleri (Dectin-1 ve -2, makrofajla indüklenebilir C tipi lektin [Mincle], makrofaj C tipi lektin [MCL], mannoz reseptörü [MR]), çöpçü reseptörler (CD36, kolajen yapılı makrofaj reseptörü [MARCO], SR-A, makrofajların apoptoz inhibitörü [AIM]), sitozolik NOD benzeri reseptörler (NLR'ler) ve RIG-I benzeri reseptörler (RLR'ler) 'dir (31, 48, 49).

#### Toll-like reseptör (TLR)

Toll-like reseptörler, fagositozu ve sinyal iletimini indükleyen, hücre içi ve dışı PAMP'ların tanınmasında temel role sahip PRR'lerdir. İnsanlarda, MyD88, TRIF, TIRAP ve TRAM gibi adaptör moleküllerden oluşan farklı Toll-IL-1 reseptörü (TIR) domeinlerini kullanarak çok sayıda sinyal yolunu aktive eden on TLR tanımlanmıştır (31). Mukozal ve doğal bağışıklık hücrelerinde, TLR 1, 2, 4, 5 ve 6, hücre yüzeyinde eksprese edilirken, TLR 3, 7, 8 ve 9, hücre içi endoplazmik retikulumda eksprese edilmektedir (43). TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 ve TLR9, mikobakteriyel hücre duvarı glikolipidlerinin veya hücre duvarı ile ilişkili diğer bileşenlerin tanınmasını sağlar. TLR2, 4,9 ve bunların adaptör molekülü MyD88, TB'ye karşı doğal bağışıklık yanıtında en belirgin rolü oynamaktadır (31). *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı TLR2 aracılı yanıt, dendritik hücre (DH) olgunlaşması, Th1, Th2, Th17 tipi bağışıklık yanıtının indüklenmesini ve makrofaj aktivasyonunun regülasyonunu sağlamaktadır. TLR2 ayrıca, *M. tuberculosis*'in 19- ve 24-kDa lipoproteininin yanı sıra LAM, LM ve PIM dahil olmak üzere mikobakteriyel ligand için ana reseptör olarak tanımlanmıştır (43). TLR2'nin

PBMC'de azalan ifadesi sonucunda IL-12p40 ve TNF- $\alpha$ 'nın üretimini azaldığı ve bu durumun pulmoner TDM hastalığına artan duyarlılıkla ilişkili olabileceği tespit edilmiştir (50). TLR2 bağımlı ssGPL ise Th1 tipi yanıtın baskılanmasından, IL-1, -6 ve TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını indüklenmesine kadar çok geniş bir immünmodülasyon sağlamaktadır (43).

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MAP1305 proteini, TLR4 ile doğrudan bağlanma yoluyla DH olgunlaşmasını ve proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, TNF- $\alpha$  ve IL-1B) üretimini indüklemektedir. Çocuklarda servikal lenfadenit, pulmoner enfeksiyonlar ve bağıışıklığı baskılanmış bireylerde disemine hastalığa neden olan *M. scrofulaceum*'un tanınmasında TLR4'ün rol oynadığı bildirilmiştir (31).

### C tipi lektin reseptörleri

*M. abscessus* ile enfekte makrofajlarda, Dectin-1 (dendritik hücre ile ilişkili C-tipi lektin) sinyali ve Dectin-1/TLR2, proinflamatuvar sitokin sekresyonunu indüklemektedir. Dectin-2, hücrel ve immünolojik süreçler üzerinde etkili olan hücre içi sinyal kaskadlarını tetikleyen ManLAM'ı tanımaktadır (31). Dectin-2 eksikliği olan farelerde, yetersiz *M. avium* klirensi gösterilmiş olsa da, Man-LAM'ın Dectin-2 aracılığıyla hem proinflamatuvar hem de anti-inflamatuar sitokin üretimini indüklemesi, Dectin-2'nin *M. avium* enfeksiyonunun ilerlemesinde de etkili olabileceğini göstermektedir (43).

### TDM Enfeksiyonuna Hücrel Aracılı Bağıışıklık Tepkileri, IFN- $\gamma$ /IL-12 Eksen

Patojenlerin doğal bağıışıklık mekanizmalarıyla tanınmasının ardından salınan sitokinlerin doğal ve kazanılmış bağıışıklık arasında köprü kurmada önemli rolü bulunmaktadır. Mikobakterileri fagosite eden makrofajlar, bakteriyel virülans faktörlerine yanıt olarak, T hücrelerinden ve doğal öldürücü (naturel killer-NK) hücrelerden IFN- $\gamma$  üretimini uyaran IL-12 ve IL-18 sentezini başlatmaktadır (43, 51). IL-12 tarafından aktive edilen CD4<sup>+</sup> T hücreleri, Th1'e farklılaşmakta ve yine IL-12 tarafından aktive edilen

Th1 hücreleri ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri, mikobakterilere karşı konak savunması için gerekli olan IFN- $\gamma$  salgılamaktadır. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  üretimini yanı sıra diğer sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini aktive etmektedir (43). CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin başka bir alt popülasyonu olan Th17 hücreleri, IL-17, IL-21 ve IL-22 üretmekte ve nötrofil infiltrasyonunu düzenleyerek TDM enfeksiyonunun ilerleyişini etkilemektedir (52). IFN- $\gamma$ /IL-12 eksen, mikobakterilerin neden olduğu enfeksiyonların kontrolünde, doğal ve kazanılmış bağıışıklık arasındaki iletişimi sağlaması açısından, çok önemli bir rol oynamaktadır (43). IFN- $\gamma$ /IL-12 ekseninde, TDM enfeksiyonlarına duyarlılığı artıran çeşitli genetik kusurlar tanımlanmıştır (Mikobakteriyel Hastalığa Mendel Duyarlılığı). IFN- $\gamma$  reseptörü 1 (IFN- $\gamma$ R1), IFN- $\gamma$ R2, IL-12p40, IL-12 reseptörü B1 (IL-12RB1) ve STAT1 molekülerinde ki mutasyonlar bu duyarlılığa örnek olarak verilebilir (52, 53).

Anti-IFN- $\gamma$  otoantikörlerinin neden olduğu edinilmiş immün yetmezlik de TDM enfeksiyonuna duyarlılıkla ilişkili bulunurken (53) bir çalışmada, edinilmiş immün yetmezlik sendromu olmayan Asyalı hastalarda bu otoantikörlerin sık görüldüğü bildirilmiştir (54).

TDM enfeksiyonu için önemli bir risk faktörü de, ciddi kombine immün yetmezlik (55), izole CD4<sup>+</sup> T lenfosit eksikliği (56) ve CD4<sup>+</sup> T lenfositleri yok eden HIV'in neden olduğu edinilmiş immün yetmezlik sendromunda görülen T hücre fonksiyonu kaybıdır (57).

### NK ve doğal öldürücü T hücreleri (NKT)

NK hücrelerinin, TDM enfeksiyonuna karşı doğal konak savunmasında önemli rolleri bulunmaktadır. Mikobakteriyel mikolik asit (MA), NK hücreleri üzerindeki doğal sitotoksitite reseptörü NKp44 için bir ligandır (58). NK hücreleri, fagolizozomal füzyonu aktive ederek hücre içi mikobakteriyel üremeyi engelleyebilen IFN- $\gamma$  ve IL-22 sentezlemektedir (59). NKT hücreleri ise lipid antijenlerini (örn. MA, LAM, PIM, glukoz monomikolat ve CD1 ailesinin bir üyesi olan GroMN) tanıyarak ve *M. tuberculosis* enfeksiyonunun

yanı sıra TDM enfeksiyonunda da immün yanıtı modüle etmede rol oynamaktadır (43).

Sonuç olarak, TDM'ler geçmişten günümüze bitmeyen pandemi olarak nitelendirilen TB'nin gölgesinde kalmıştır ve yeterli ilgiyi görememiştir. Son yıllarda küresel TDM enfeksiyon insidansı ve prevalansında tespit edilen artış, günümüzde bir halk sağlığı sorununa dönüşmeye başlayan TDM ilişkili hastalıklar konusunda farkındalığı artırmaktadır. Fakat birçok ülkede halen bulaşıcı hastalık olarak kabul edilmediği için bildirim zorunluluğu bulunmamakta ve yeterli sürveyans sağlanamamaktadır.

TDM enfeksiyonunun patogeneğinde kuşkusuz en önemli virülans faktörü, konak bağışıklık mekanizmalarından kaçışı, antibiyotikler ve çevresel

şartlara direnci sağlayan olağanüstü hücre duvarı yapısıdır. TDM'yi diğer mikobakterilerden ayıran hücre duvarında bulunan GPL yapısı ise virülansa katkısıyla önemli yer tutmaktadır. Basilin virülans faktörlerine karşı konak doğal bağışıklığının önemli hücrelerinin başında makrofaj ve nötrofillerin oluşturduğu savunma önemli yer tutarken adaptif immünitede hücresel yanıt ve IFN- $\gamma$ / IL-12 ekseninde gelişen immün cevap hastalığın prognozunu belirlemektedir.

TDM enfeksiyonlarının önemli morbidite ve mortalite nedeni olmaları son yıllarda TDM'lere ilgi odağı haline getirse de, TDM'lere ait virülans faktörleri, patogenez ve konak cevabı mekanizmalarını aydınlatacak araştırmalara, tedavide kullanılacak yeni ilaç ve aşı çalışmalarına ihtiyaç bulunmaktadır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Honda JR, Hess T, Malcolm KC, Ovrutsky AR, Bai X, Irani VR, et al. Pathogenic nontuberculous mycobacteria resist and inactivate cathelicidin: implication of a novel role for polar mycobacterial lipids. PLoS One, 2015;10(5):e0126994.
2. Kanimazhi A. Isolation and characterization of Non tuberculous Mycobacteria from clinical specimens: M.D. Microbiology. PSG Institute of Medical Sciences and Research, Coimbatore; 2015.
3. Shu CC, Wu MF, Pan SW, Wu TS, Lai HC, Lin MC. Host immune response against environmental nontuberculous mycobacteria and the risk populations of nontuberculous mycobacterial lung disease. J Formos Med Assoc, 2020;119 (Suppl 1):S13-S22.
4. Mortaz E, Moloudizargari M, Varahram M, Movassaghi M, Garssen J, Dizagie MK, et al. What immunological defects predispose to non-tuberculosis mycobacterial infections? Iran J Allergy Asthma Immunol, 2018:100-9.

5. Honda JR, Knight V, Chan ED. Pathogenesis and risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease. *Clin Chest Med*, 2015;36(1):1-11.
6. Jeon D. Infection source and epidemiology of nontuberculous mycobacterial lung disease. *Tuberc Respir Dis*, 2019;82(2):94-101.
7. Koh WJ. Nontuberculous mycobacteria overview. *Microbiol Spectr*, 2017;5(1):11.
8. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med*, 2015;36(1):13-34.
9. Lee MR, Yang CY, Shu CC, Lin CK, Wen YF, Lee SW, et al. Factors associated with subsequent nontuberculous mycobacterial lung disease in patients with a single sputum isolate on initial examination. *Clin Microbiol Infect*, 2015;21(3):250 e1-7.
10. Sharma SK, Upadhyay V. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. *Indian J Med Res*, 2020;152(3):185-226.
11. Saxena S, Spaink HP, Forn-Cuní G. Drug resistance in nontuberculous mycobacteria: mechanisms and models. *Biology*, 2021;10(2):96.
12. Orme IM, Ordway DJ. Host response to nontuberculous mycobacterial infections of current clinical importance. *Infect Immun*, 2014;82(9):3516-22.
13. Hoefsloot W, Van Ingen J, Andrejak C, Ängeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*, 2013;42(6):1604-13.
14. Ceyhan İ, Vezir S. Epidemiology of Opportunistic Pathogen nontuberculous mycobacteria in a Referral Hospital in Ankara. *Flora*, 2021;26(4):670-8.
15. Haworth CS, Banks J, Capstick T, Fisher AJ, Gorsuch T, Laurenson IF, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax*, 2017;72(Suppl 2):ii1-ii64.
16. Falkinham JO. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med*, 2015;36(1):35-41.
17. Sood G, Parrish N. Outbreaks of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis*, 2017;30(4):404-9.
18. Allen KB, Yuh DD, Schwartz SB, Lange RA, Hopkins R, Bauer K, et al. Nontuberculous mycobacterium infections associated with heater-cooler devices. *Ann Thorac Surg*, 2017;104(4):1237-42.
19. Williamson D, Howden B, Stinear T. Mycobacterium chimaera spread from heating and cooling units in heart surgery. *N Engl J Med*, 2017;376(6):600-2.
20. Cafri U, Aslan G, Direkel S, Tarhan G, Ceyhan İ, Emekdaş G. Identification and isolation of nontuberculous mycobacteria from environmental samples. *Mikrobiyol Bul*, 2010;44(3):395-403.
21. Bryant JM, Grogono DM, Rodriguez-Rincon D, Everall I, Brown KP, Moreno P, et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science*, 2016;354(6313):751-7.
22. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace Jr RJ, Andrejak C, et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *Clin Infect Dis*, 2020;56(1):2000535.
23. Stout JE, Koh WJ, Yew WW. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *Int J Infect Dis*, 2016;45:123-34.
24. Ratnatunga CN, Lutzky VP, Kupz A, Doolan DL, Reid DW, Field M, et al. The rise of nontuberculosis mycobacterial lung disease. *Front Immunol*, 2020;11:303.
25. Honda JR, Alper S, Bai X, Chan ED. Acquired and genetic host susceptibility factors and microbial pathogenic factors that predispose to nontuberculous mycobacterial infections. *Curr Opin Immunol*, 2018;54:66-73.



26. Matsuyama M, Matsumura S, Nonaka M, Nakajima M, Sakai C, Arai N, et al. Pathophysiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial (NTM) disease. *Respir Investig*, 2023;61(2):135-48.
27. Hoefsloot W, van Ingen J, Magis-Escurra C, Reijers MH, van Soolingen D, Dekhuijzen RP, et al. Prevalence of nontuberculous mycobacteria in COPD patients with exacerbations. *J Infect*, 2013;66(6):542-5.
28. Szymanski EP, Leung JM, Fowler CJ, Haney C, Hsu AP, Chen F, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. A multisystem, multigenic disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015;192(5):618-28.
29. Winthrop K, Baxter R, Liu L, Varley C, Curtis J, Baddley J, et al. Mycobacterial diseases and antitumour necrosis factor therapy in USA. *Ann Rheum Dis*, 2013;72(1):37-42.
30. Jhun BW, Moon SM, Jeon K, Kwon OJ, Yoo H, Carriere KC, et al. Prognostic factors associated with long-term mortality in 1445 patients with nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: a 15-year follow-up study. *Eur Respir J*, 2020;55(1):1900798.
31. Shamaei M, Mirsaeidi M. Nontuberculous mycobacteria, macrophages, and host innate immune response. *Infect Immun*, 2021;89(8):e00812-20.
32. Tran T, Bonham AJ, Chan ED, Honda JR. A paucity of knowledge regarding nontuberculous mycobacterial lipids compared to the tubercle bacillus. *Tuberculosis*, 2019;115:96-107.
33. Gutierrez AV, Viljoen A, Ghigo E, Herrmann JL, Kremer L. Glycopeptidolipids, a double-edged sword of the mycobacterium abscessus complex. *Front Microbiol*, 2018;9:1145.
34. Bernut A, Herrmann J-L, Kissa K, Dubremetz J-F, Gaillard J-L, Lutfalla G, et al. Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014;111(10):E943-E52.
35. Dao D, Kremer L, Guérardel Y, Molano A, Jacobs Jr W, Porcelli S, et al. Mycobacterium tuberculosis lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun*, 2004;72(4):2067-74.
36. Balla T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev*, 2013;93(3):1019-137.
37. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008;72(1):126-56.
38. Ryll R, Kumazawa Y, Yano I. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycotic acid-containing glycolipids-a review. *Microbiol Immunol*, 2001;45(12):801-11.
39. Elsaidi HR, Lowary TL. Effect of phenolic glycolipids from *Mycobacterium kansasii* on proinflammatory cytokine release. A structure-activity relationship study. *Chem Sci*, 2015;6(5):3161-72.
40. Ikegami H, Yamasaki K, Ogawa M, Nemoto K, Akata K, Noguchi S, et al. Reduced phagocytic activity of human alveolar macrophages infected with *Mycobacterium avium* complex. *J Infect Chemother*, 2022;28(11):1506-12.
41. Prasla Z, Sutliff RL, Sadikot RT. Macrophage signaling pathways in pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020;63(2):144-51.
42. Wang X, Chen S, Ren H, Chen J, Li J, Wang Y, et al. HMG2 regulates non-tuberculous mycobacteria survival via modulation of M1 macrophage polarization. *J Cell Mol Med*, 2019;23(12):7985-98.
43. Abe Y, Fukushima K, Hosono Y, Matsumoto Y, Motooka D, Ose N, et al. Host Immune Response and Novel Diagnostic Approach to NTM Infections. *Int J Mol Sci*, 2020;21(12):4351.
44. Awuh JA, Flo TH. Molecular basis of mycobacterial survival in macrophages. *Cell Mol Life Sci*, 2017;74(9):1625-48.

45. Malcolm KC, Nichols EM, Caceres SM, Kret JE, Martiniano SL, Sagel SD, et al. Mycobacterium abscessus induces a limited pattern of neutrophil activation that promotes pathogen survival. *PLoS One*, 2013;8(2):e57402.
46. Hostetter J, Kagan R, Steadham E. Opsonization effects on Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-macrophage interactions. *Clin Vaccine Immunol*, 2005;12(6):793-6.
47. Hossain M, Norazmi M-N. Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection—the double-edged sword? *Biomed Res Int*, 2013;2013:179174.
48. Marakalala MJ, Ndlovu H. Signaling C-type lectin receptors in antimycobacterial immunity. *PLoS Pathog*, 2017;13(6):e1006333.
49. Killick KE, Ní Cheallaigh C, O'Farrelly C, Hokamp K, MacHugh DE, Harris J. Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. *Cell microbiol*, 2013;15(9):1484-95.
50. Ryu Y, Kim E, Lee S, Kim S, Suh G, Chung M, et al. Impaired expression of Toll-like receptor 2 in nontuberculous mycobacterial lung disease. *Eur Respir J*, 2007;30(4):736-42.
51. Dorman SE, Holland SM. Interferon- $\gamma$  and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000;11(4):321-33.
52. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*, 2014;5:162.
53. Wu U-I, Holland SM. Host susceptibility to nontuberculous mycobacterial infections. *Lancet Infect Dis*, 2015;15(8):968-80.
54. Valour F, Perpoint T, S n chal A, Kong X-F, Bustamante J, Ferry T, et al. Interferon- $\gamma$  autoantibodies as predisposing factor for nontuberculous mycobacterial infection. *Emerg Infect Dis*, 2016;22(6):1124-6.
55. Marciano BE, Huang C-Y, Joshi G, Rezaei N, Carvalho BC, Allwood Z, et al. BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: complications, risks, and vaccination policies. *J Allergy Clin Immunol*, 2014;133(4):1134-41.
56. Yarmohammadi H, Cunningham-Rundles C. Idiopathic CD4 lymphocytopenia: pathogenesis, etiologies, clinical presentations and treatment strategies. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2017;119(4):374-8.
57. Hariadi NI, Blackwood RA. Disseminated Mycobacterium avium complex in an adolescent with perinatally-acquired HIV infection. *Infect Dis Rep*, 2017;9(2):6884.
58. Parodi M, Favoreel H, Candiano G, Gaggero S, Sivori S, Mingari MC, et al. Nkp44-Nkp44 ligand interactions in the regulation of natural killer cells and other innate lymphoid cells in humans. *Front Immunol*, 2019;10:719.
59. Rocco J, Irani V. Mycobacterium avium and modulation of the host macrophage immune mechanisms. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2011;15(4):447-52.

## TELİF HAKKI DEVİR FORMU / COPYRIGHT TRANSFER FORM



**HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH**  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Makale Türü/Article Type: ...../...../20...

(...) Araştırma/Research (..) Derleme/Review (..) Olgu Sunumu/Case Report

(..) Editöre Mektup/Letter to Editor (..) Teknik Rapor/Technical Report

Makale Başlığı/Article Entitled : .....

Sayın Editör,

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

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

Dear Editor,

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

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

(...1) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

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

(...2) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

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

(...3) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

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

(...4) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

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

(...5) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

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

Not / Note :

1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)
2. Formu aşağıdaki adrese gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below or deliver personally

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology  
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 E Blok Park Girişi 06100 Sıhhiye-ANKARA-TURKEY

Tel/Phone : +90 312 565 55 80

Faks/Fax : +90 312 565 55 91

e-posta/e-mail : hsgm.thdbd@saglik.gov.tr

