



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 82 ■ Sayı/Number 1 ■ Yıl/Year 2025

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

Doç. Dr. Muhammed Emin DEMİRKOL, Genel Müdür (General Director)

EDİTÖR

EDITOR IN CHIEF

Doç. Dr. Mustafa Kemal BAŞARALI (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

EDİTÖR YARDIMCILARI

DEPUTY EDITORS

Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN (Uluslararası Kıbrıs Üniversitesi Tıp Fakültesi)

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

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

Doç. Dr. Pınar MURSALOĞLU KAYNAR (Ankara Medipol Üni. Eczacılık Fakültesi)

YAYIN KURULU

EDITORIAL BOARD

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK (Uşak 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

Doç. 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)

Gülay 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 - 2025 / March - 2025

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

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 Alıntı GayriTicari-Türetilmez 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 Alıntı GayriTicari-Türetilmez 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 bağlantı 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 Alıntı-GayriTicari-Türetilmez 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) 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 almaz. Yazının hazırlanması sırasında, Türkçe kelimeler için Türk Dil Kurumundan (www.tdk.gov.tr), teknik terimler için Türk Tıp Terminolojisinden (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 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

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) 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) is advised for consulting Turkish words and Turkish Medical Terminology (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 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 WA, eds. *Pathologic Physiology: Mechanism of Disease*. Philadelphia. WB Saunders, 1974:457-72.

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

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

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

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

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

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

INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL

Scopus

ResearchGate

CAS
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
TIP
DİZİNİ

TÜRK
MEDLINE

TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

GENAMICS™
...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

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

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Kisseptin ve nörokinin genlerinin puberte tedavisindeki potansiyel rollerinin değerlendirilmesi
Evaluation of the potential roles of kisspeptin and neurokinin genes in puberty treatment
Hale ÖKSÜZ ÜÇKAYABAŞI, Ali ÜÇKAYABAŞI, Nermin Seda ILGAZ, Halil İbrahim ÖKSÜZ, Semiha DOĞAN, Seda AKBOLAT, Mehmet Bertan YILMAZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.57355 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 3 - 12


2. *Klebsiella pneumoniae* suşlarında kolistin direncinin saptanmasında otomatize sistemlerin sıvı mikrodilüsyon ile karşılaştırılması
Comparison of automated systems using liquid microdilution for the determination of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains
Burak EZER, Zekeriya TAŞKIN, Kadir KABA, Selin UĞRAKLI, Metin DOĞAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.48243 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 13 - 20


3. Kan kültürlerinde kalite göstergelerinin ve etken olan mikroorganizmaların dağılımının değerlendirilmesi
Evaluation of quality indicators and distribution of causative microorganisms in blood cultures
Nadire Seval GÜNDEM
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.04810 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 21 - 32


4. HBsAg negatif bağış kanlarında izole anti-HBc pozitifliği ve okült HBV enfeksiyonu araştırılması
Investigation of isolated anti-HBc positivity and occult HBV infection in HBsAg negative donated blood
Murat AFYON, İsmail Yaşar AVCI, Cumhuri ARTUK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.57701 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 33 - 40


5. Kitin sentez inhibitörü diflubenzuronun sivrisinek (*Culex pipiens*) larvalarının kütikulasına etkisinin belirlenmesi
Determination of chitin synthesis inhibitor diflubenzuron's effect on the cuticle of mosquito (*Culex pipiens*) larvae
Mehmet Salih YIKILMAZ, Leyla YILDIZ, Gamze TURGAY İZZETOĞLU
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.89083 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 41 - 52


6. COVID-19 vaccine literacy in Çankırı province
Çankırı ili COVID-19 Aşı okuryazarlığı
Ayşe AYKURT, Sinan BULUT, Oğuzhan AYKURT
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.12316 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 53 - 66


7. Analytical insights into edible plant volatiles: SPME-GC/MS analysis and antioxidant/anticancer evaluation with *in vitro* and *in silico* methods
Yenilebilir bitki uçucu maddelerine ilişkin analitik bilgiler: SPME-GC/MS analizi ve *in vitro* ve *in silico* yöntemlerle antioksidan/antikanser değerlendirme
Emine ATEŞ ARSLAN, Nilüfer VURAL, Emine Kübra İNAL4, Sibel KAYMAK, Mehmet Abdülkadir AKAY, Mustafa TAŞTEKİN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.65289 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 67 - 84


8. Mardin'de birinci basamak sağlık çalışanlarının aşı retleri konusundaki tutumları ve saha deneyimleri
Attitudes and field experiences of primary health care workers on vaccine refusals in Mardin
Aysun EKŞİOĞLU, Zeynur GÜMÜŞ, Esin Ceber TURFAN, Raika DURUSOY
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.29974 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 85 - 98


9. A machine learning approach for predicting familial and sporadic disease cases based on clinical symptoms: introduction of a new dataset
Klinik belirtilere dayalı ailesel ve sporadik hastalık vakalarını tahmin etmek için bir makine öğrenimi yaklaşımı: yeni bir veri kümesinin tanıtımı
Parisa SHARAFİ, Hilal ARSLAN, Sibel ERSOY EVANS, Ali VARAN, Şükriye AYTER
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.06337 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 99 - 106


10. Clinical quality assessment of coronary artery bypass graft surgery
Koroner arter bypass greft cerrahisi klinik kalitesinin değerlendirmesi
Zuhal ÇAYIRTEPE, Afsun Ezel ESATOĞLU, Atilla ARAL, Şahin KAVUNCUBAŞI
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.21208 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 107 - 118


11. Göz dokusunun farklı fiksatifler ve farklı doku takip yöntemleri kullanılarak histolojik olarak incelenmesi

Histological investigation of the eye tissue using different fixatives and different tissue preparation methods

Ebru ALİMOĞULLARI, Hazal DEMİR, Bahar KARTAL

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.59144 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

119 - 130



12. Identification and prevalence of *Coenurus cerebralis* in sheep: Diyarbakır example

Koyunlarda *Coenurus cerebralis*'in belirlenmesi ve yaygınlığı: Diyarbakır Örneği

Delil Adem ÇİFTÇİ, Banuçiçek YÜCESAN

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.53077 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

131 - 138



13. Evaluation of O rh-negative blood transfusion practices in emergency cases: A one-year study

Acil durumlarda O rh negatif kan transfüzyonu uygulamalarının değerlendirilmesi: Bir yıllık çalışma

Emine SARCAN

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.88123 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

139 - 150



14. Healthcare conflict and job satisfaction: A case of tertiary hospital

Sağlık hizmetlerinde çatışma ve iş tatmini: Üçüncü basamak hastane örneği

Şafak ÇINAR, Uğur UĞRAK, Gül MERSİNLİOĞLU SERİN

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.45549 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

151 - 164



■ Derleme / Review

15. Potential role of efflux pump inhibitors as a death traps in multidrug resistant pathogens and biofilm infections

Çoklu ilaca dirençli patojenler ve biyofilm enfeksiyonlarında eflux pompa inhibitörlerinin ölüm tuzakları olarak potansiyel rolü

Selma SEZGİN

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.79058 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

165 - 180



16. Atık su sürveyansı COVID-19 pandemisi izlemi için uygun bir yöntem midir?

Is wastewater surveillance an appropriate method for monitoring the COVID-19 pandemic?

Tülin ÇOBAN, Cavit Işık YAVUZ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.84669 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

181 - 196



17. Antimikobakteriyel ilaçların moleküler direnç mekanizmalarına genel bir bakış

An overview of the molecular resistance mechanisms of antimycobacterial drugs

Elif ÇİFTÇİ, Dilek SATANA

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2025.15045 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

197 - 206



Kisspeptin ve nörokinin genlerinin puberte tedavisindeki potansiyel rollerinin değerlendirilmesi

Evaluation of the potential roles of kisspeptin and neurokinin genes in puberty treatment

Hale ÖKSÜZ ÜÇKAYABAŞI¹ (ID), Ali ÜÇKAYABAŞI² (ID), Nermin Seda ILGAZ¹ (ID), Halil İbrahim ÖKSÜZ³ (ID), Semiha DOĞAN⁴ (ID), Seda AKBOLAT⁴ (ID), Mehmet Bertan YILMAZ¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Kisspeptin (KP) ve nörokinin (NK), hipotalamik nöronal aktivite ve pulsatilesini düzenleyerek üreme endokrin eksenini yöneten nöropeptitlerdir. Üreme sağlığındaki kritik rolleri ilk olarak, KP veya NK sinyalinin kodlayan genlerin mutasyonlarına bağlı olarak fonksiyonunu yitirmesi sonrası, konjenital hipogonadotropik hipogonadizm ve pubertal gelişim anomalilerinin gösterilmesi ile tanımlanmıştır. Bu çalışmada, puberteye girişte etkili rol oynayan KP ve NK'in mezenkimal kök kücre (MKH) temelli tedavideki etkinliğini araştırılmış ve bu genlerin ekspresyonlarının pasaj sayısı ile ilişkisi incelenmiştir.

Yöntem: Çalışmamızda, üç adet erişkin sıçan (*Rattus norvegicus*) kullanılmıştır. Sıçanların kemik iliği ve adipoz dokusundan MKH elde edilmiştir. Daha sonrasında yüzey belirteçleri kullanılarak akım sitometrisinde MKH analizi yapılmış ve RNA (ribonükleik asit) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir

ABSTRACT

Objective: Kisspeptin (KP) and neurokinin (NK) are neuropeptides that govern the reproductive endocrine axis through regulating hypothalamic neuronal activity and pulsatile. Their critical role in reproductive health was first described by the demonstration of congenital hypogonadotropic hypogonadism and pubertal developmental anomalies following loss of function due to mutations in genes encoding the KP or NK signaling. This study aimed to investigate the efficacy of KP and NK, in mesenchymal stem cell (MSC)-based treatment of different origin, and examine the relationship of the expression of these genes with the passage number.

Methods: Three adult rats (*Rattus norvegicus*) were used in our study. MSCs were obtained from bone marrow and adipose tissue of rats. The MSCs were analysed by flow cytometry using surface markers and RNA (ribonucleic acid) isolation was performed. Gene expressions of KP, NK and their receptors were investigated by real-time

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2019-12326 numaralı proje ile desteklenmiş olup Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., Adana, Türkiye

²İstanbul Kent Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji AD., İstanbul, Türkiye

³Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik AD., Adana, Türkiye

⁴Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji AD., Adana, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Mehmet Bertan YILMAZ
Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., Adana - Türkiye
E-posta / E-mail : mehmetbertanyilmaz@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 23.11.2023
Kabul Tarihi / Accepted : 05.02.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.57355

Öksüz Üçkayabaşı H, Üçkayabaşı A, Ilgaz NS, Öksüz Hİ, Doğan S, Akbolat S, Yılmaz MB. Kisspeptin ve nörokinin genlerinin puberte tedavisindeki potansiyel rollerinin değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 3 - 12

reaksiyonu (RT-PCR) ile KP, NK ve reseptörlerinin gen ifadeleri araştırılmış olup ve pasaj sayısı ile ilişkisi karşılaştırılmıştır. Her bir genin kendi içerisindeki farklı pasajlardaki ekspresyonlarının karşılaştırılmasında Welch paired t-testi kullanılmıştır. İstatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak kabul edilmiştir ($p \leq 0,05$).

Bulgular: Kültürü yapılan kemik iliği ve adipoz dokuya ait hücrelerin MKH oldukları tespit edilmiştir. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin Real-time PCR sonuçları değerlendirildiğinde, dördüncü pasaja kıyasla altıncı pasajda kisspeptin reseptör gen ifadesinin 14, yedinci pasajda ise 29 kat artışı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Taşikinin geninde dördüncü pasaja kıyasla beşinci pasajda gen ifadesinin neredeyse tamamen baskılandığı tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$). Taşikinin reseptör geninde, beşinci pasaj baz alındığında ise altıncı pasajda gen ifadesinin tamamen indüklendiği belirlenmiştir. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde ise, dördüncü pasaja kıyasla beşinci pasajda taşikinin reseptör gen ifadesinin 15, taşikinin gen ifadesinin 30 kat, yedinci pasajda ise KP reseptör gen ifadesinin üç kat artışı tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$).

Sonuç: Kemik iliği ve adipoz doku gibi bulunması kolay olan bir dokudan MKH elde edebilmenin ileri ki dönemler için tıp dünyasına bir ışık tutacağı düşünülmüştür. Ayrıca puberte dönemine geçişte çok önemli göreve sahip olan KP ve NK genlerinin ifadelerini incelerken pasaj sayılarına dikkat edilmesi, kullanılacak pasajdaki gen ifadeleri göz önünde bulundurularak pasaj sayısının seçilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hücre kültürü, kisspeptin, mezenkimal kök hücre, nörokinin, puberte, RT-PCR

polymerase chain reaction (RT-PCR) and their relationship with the passages number was compared. Welch paired t-test was used to compare the expression of each gene at different passages. Statistical significance was accepted as 0.05 ($p \leq 0.05$).

Results: The cultured bone marrow and adipose tissue cells were determined to be MSCs. When real-time PCR results of bone marrow-derived MSCs were evaluated, it was observed that kisspeptin receptor gene expression increased 14-fold in the sixth passage and 29-fold in the seventh passage compared to the fourth passage ($p \leq 0.05$). In the tachykinin gene, it was found that gene expression was almost completely suppressed in the fifth passage compared to the fourth passage ($p \leq 0.05$). In the tachykinin receptor gene, it was determined that gene expression was completely induced in the sixth passage, compared to the fifth passage ($p \leq 0.05$). When adipose tissue-derived MSC RT-PCR results were evaluated, it was observed that tachykinin receptor gene expression increased 15-fold, tachykinin gene expression increased 30-fold in the fifth passage, and KP receptor gene expression increased three-fold in the seventh passage compared to the fourth passage ($p \leq 0.05$).

Conclusion: MSCs can be obtained from an easily available tissue such as bone marrow and adipose tissue is thought to shed light on the medical science for the future. In addition, it was concluded that the number of passages should be considered when analyzing the expressions of KP and NK genes, which have a very important role in the transition to puberty, and the number of passages should be selected by considering the gene expressions in the passage to be used.

Key Words: Cell culture, kisspeptin, mesenchymal stem cell, neurokinin, puberty, RT-PCR

GİRİŞ

MKH; mezoderm tabakasından köken almakla birlikte vücudun çeşitli bölgelerinde nöral krista kaynaklı mezenkimal dokudan da gelişen hücrelerdir (1).

Kemik iliği, adipoz doku, göbek kordonu, kordon kanı, karaciğer, beyin, diş pulpası, deri ve fetal dokularda bulunan farklılaşmamış, çoğalma kapasitesi yüksek, kendini farklılaşmadan yenileyebilme özelliğine sahip, mezoderm farklılaşma yetisi çok fazla olan

MKH'ler kemik, kıkırdak, kas gibi farklı hücre tiplerine dönüşüm kapasitelerinin yanında ürettikleri birçok büyüme faktörü ve sitokinler nedeni ile immün baskılayıcı ve trofik etki potansiyeline de sahiptir (2,3). MKH'ler kemik iliği, deri, yağ dokusu, tendon, sinovyal membran, periodontal ligament ve sinir sistemi gibi birçok dokudan kolaylıkla elde edilebilir (2). Özellikle kemik iliği kökenli MKH'lerin pluripotensi özellikleri nedeni ile tıpta doku rejenerasyonu çalışmalarında kullanıldığı bilinse de hücre sayısının, proliferasyonun ve yaşla farklılaşma kapasitesinin azalmasından dolayı klinik uygulanabilirliği sınırlıdır (4,5). Bu nedenle, kemiğe alternatif olarak plasenta, adipoz; fetal akciğer, göbek kordon kanı gibi dokular araştırılmıştır (4). Bunlardan özellikle adipoz dokunun elde edilebilirliğinin kolay olması, kemik iliğine kıyasla daha fazla kök hücre üretebilmesi, ayrıca adipoz doku kökenli kök hücrelerin plastisitesinin yüksekliğinin hücre içi ve hücre dışı çalışmalarda kanıtlanması ile birlikte, adipoz doku kökenli MKH'ler ve jeneratif doku mühendisliği alanında birçok tıp branşının dikkatini çekmiştir (6). Yapılan çalışmalarda, MKH'lerin farklılaşma yeteneklerinin fazla olması, migrasyon özellikleri, hasarlı doku tamirine katkı sağlamaları, hasarlı olan hücrelerle füzyon yeteneklerinin olması, genetik geçmişlerinin kararlı olması, tümör oluşturma riskinin diğer kök hücre türlerine göre az olması gibi özellikleri ile puberte bozuklukları dahil olmak üzere birçok hastalık modeli ile ilişki oldukları gösterilmiştir (7-17). Yetişkin cinsiyet özellikleri ve üreme yeteneğinin kazanıldığı, çok çeşitli fizyolojik değişikliklerle karakterize bir gelişimsel dönem olan pubertenin başlangıcının temel endokrinolojik özelliği hipotalamustan pulsatil gonadotropin salıcı hormon (GnRH) salgılanması olup buradaki aksaklıklar puberteye geçişi engellemektedir (18,19). Hipotalamik GnRH salgılayan nöronlar, cinsiyete özgü hormonların sentezini kontrol eden karmaşık bir nöroendokrin ağı merkezinde yer almaktadır (19,20). Genetik, çevresel ve yapısal faktörler bu süreci kontrol etmektedir (19). Embriyolojik dönemdeki gelişim, enerji homeostazında rol oynayan hormonlar,

nöropeptidler, nörotransmitterler, transkripsiyon faktörleri, nöronal etkileşimler ve sinyal yolları gibi pek çok faktör GnRH salgı ve pulsatilitesinin düzenlenmesinde görev alır ve bu yollarda meydana gelen aksaklıklar, erken puberte, hipogonadotropik hipogonadizm veya konstitüsyonel büyüme ve puberte gecikmesi gibi patolojilere neden olur (18,19). GnRH nöronlarının düzenleyicileri arasında en önemlileri kisspeptin (KP), nörokinin (NK) B ve dinorfindir (20). KP ve reseptörü (GPR54), GnRH salgılanmasında kilit role sahiptir. Ayrıca, diğer taşıyıcılar; NK B (TAC3), reseptörü (TACR3) ve dinorfinin de bu yolda görev aldığı bilinmektedir (18). Bu çalışmada da kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'lerin pubertal bozuklukların tedavisine destek olup olmayacağını araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, sıçan kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin hücre kültürleri yapılmış olup farklı pasajlarda KP, NK ve reseptörlerinin gen ekspresyonları incelenerek tedaviye yönelik kullanım potansiyelleri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney hayvanlarının temini ve bakımı

Çalışmamızda Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen üç adet erişkin sıçan (*Rattus norvegicus*) kullanılmış, asepsi-antisepsi kurallarına uygun olarak normal oda koşulları altında (22 °C sıcaklık, %30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat) ad libitum olarak beslenmiş ve eter ile bayıltılarak deney öncesinde servikal dislokasyonla sakrifiye edilmişlerdir.

Yağ dokudan MKH eldesi ve hücre kültürü

Anestezi altında böbrek arkasındaki yağ dokudan MKH eldesi sağlanmıştır (21). Öncelikle çıkartılan yağ dokusu herhangi bir kontaminasyona karşı birçok kez antibiyotik içeren fosfat tamponunda yıkanmıştır. Yağ dokusu küçük parçalar şeklinde kesilerek %0,075 tip 1 kollajenaz / 10 mL Ca²⁺ içermeyen fosfat tamponu içinde bir orbital çalkalayıcı cihaza sabitlenerek 37 °C'de 60-90 dakika inkübatörde bekletilmiştir.

İnkübasyon sonunda tüpler dokunun iyice parçalanması için çalkalanmış, üzerine eşit miktarda fosfat tamponu eklenmiş ve homojenize edildikten sonra 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant (yağ hücreleri ve yıkama sıvısı) uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücreler 70 µm'lik steril süzgeçten geçirilmiştir. Süzgeçten geçen hücreler ve doku parçaları; α-minimum esansiyel ortam (α-MEM), %15 fetal bovine serum (FBS), %0,1 penisilin-streptomisin içeren hücre kültür ortamında, 25 cm² yüzeyli kültür kabına aktarılmıştır. 72 saat sonra kullanılmış ortam değiştirilmiştir. Hücrelerin üremesine göre kültür kabının %75'i kaplandıktan sonra pasaj yapılmıştır. Hücreler %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren MEM (fenol kırmızısı içermeyen) besiyerinde 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. KP ve NK inhibitörleri ile ayrı ayrı veya kombinasyonları ile muamele edilmiştir. Daha sonra bu hücreler petri kabında %70'lik yayılma gösterdikten sonra 24 saat boyunca besiyerinde (serum içermeyen) tutularak muameleleri gerçekleştirilmiştir.

Kemik iliğinden MKH eldesi ve hücre kültürü

Femur ve tibiadan MKH eldesi sağlanmıştır (22). Kemikler kas tabakasından olabildiğince temizlenmiştir. Fosfat tamponu içeren başka bir kaba aktarılmıştır. İnsülin enjektörleri hücre kültür ortamı ile doldurularak hazırlanmıştır. Kemiklerin sırasıyla epifiz uçları kesilmiştir. Epifiz ucu kesilen kemikten iç boşluktan insülin enjektörü içerisindeki hücre kültür ortamı basınçla akıtılmıştır. Tüm kemik ilikleri aynı tüpe toplanmış, 1000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 15 adet 25 cm² yüzeyli kültür kabına 2,5 mL olacak şekilde aktarılmıştır. Üzeri ortam ile 5 mL'ye tamamlanmış ve 37 °C'de %5 CO₂'li %99 oranında nem sağlayan inkübatöre kaldırılmıştır.

Akım sitometrisi ile MKH analizi

Hücre ortamı atılıp fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandıktan sonra yoğunluğu %85'e ulaşıncaya tripsin ile kaldırılmıştır. Hücre ortamı eklenerek tripsin

inaktive edilmiştir. Hücreler süspansiyon şeklinde santrifüj tüpünde toplanmış ve 5 dakika 300-400 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra hücre pelleti fosfat tamponu ile durulanmış ve yeniden pellet haline getirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet fosfat tamponunda tekrar süspansiyon edilmiştir. Hücre sayımı yapılmış ve ardından hücreler soğuk fosfat tamponu içinde 10⁶-10⁷ hücre olacak şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilmeden sonra 100 µL hacimde 10⁵-10⁷ hücre olacak şekilde floresan aktive hücre ayırma tüpüne (FACS) alınmıştır. Antikor eklenmiş ve karanlıkta 30-60 dakika 4 °C'de inkübe edilmiştir. Hücreler santrifüjlenmiş ve soğuk fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Hücreler 100-200 µL FACS solüsyonu ile yeniden süspansiyon hale getirilmiş, karanlıkta 4 °C'de saklanmış ve 24 saat içinde analizi yapılmıştır. Örnekler akım sitometrisi cihazı ile MKH yüzey belirteçleri açısından analiz edilmiştir. Pozitif marker olarak CD90, CD29 ve negatif marker olarak CD45 seçilmiştir.

RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve gen ekspresyonu

Total RNA izolasyonu TRizol (Sigma-Aldrich, Waltham, ABD) reaktifi kullanılarak sağlanmıştır (23). cDNA eldesi için 10XRT Buffer (2 µL), dNTP (0.8 µL), primer (2 µL), enzim (1 µL), deiyonize su (4,2 µL)'dan oluşan bir karışım hazırlanmış ve ependorf tüplere dağıtıldıktan sonra RNA eklenmiştir. Daha sonra örnekler termal cyclus cihazına yüklenmiştir. İki mikrolitre cDNA ve Taqman master mix (ThermoFisher, Waltham, ABD) kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ABI 7500 PCR sisteminde (Applied Biosystems, Waltham, ABD) MKH'lerin KP, NK ve reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Reaksiyon 50 °C'de 2 dk ve 95 °C'de 10 dk, takiben 40 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. 95 °C'de 15 sn ve 60 °C' 1 dk olarak inkübe edilmiştir. Kalıp ve enzim içermeyen kontroller kullanılarak genomik DNA varlığı ve reaksiyon özgüllüğü kontrol edilmiştir.

İstatistiksel analiz

Gen ifadelerinin analizi, üç bağımsız tekrarlı deneyin sonucunda elde edilen Ct (döngü eşik)

değerlerinin ortalaması alınarak yapılmıştır. Bu çalışmada β -actin geni referans gen olarak kullanılmıştır. Öncelikle araştırılmak istenen ilgili genin Ct değeri, referans genin Ct değerinden çıkartılarak normalize edilmiş ve delta Ct (Δ Ct) değeri hesaplanmıştır. Sonrasında kontrol grubunun Δ Ct değerleri, deney grubunun Δ Ct değerlerinden çıkartılarak $\Delta\Delta$ Ct değeri bulunmuştur. Gen ifadelerinin kat cinsinden artan ya da azalan değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak hesaplanmıştır. Gen ekspresyon bulgularımızın istatistiksel analizi "StatView 5.0" istatistik program paketi (SAS Institute, Cary NC, USA) kullanılarak yapılmıştır. Her bir genin kendi içerisindeki farklı pasajlardaki ekspresyonlarının karşılaştırılmasında Welch paired t-testi kullanılmıştır. Anlamlılık $\alpha=0,05$ ve $\beta=0,20$ olarak kabul edilmiştir. Şekil 1 ve Şekil 2'de mRNA değerleri ortalama \pm SEM (Standart error mean: standart hata ortalaması) olarak ifade edilmiştir (n=3).

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri

Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:04.11.2019, Karar no: 3).

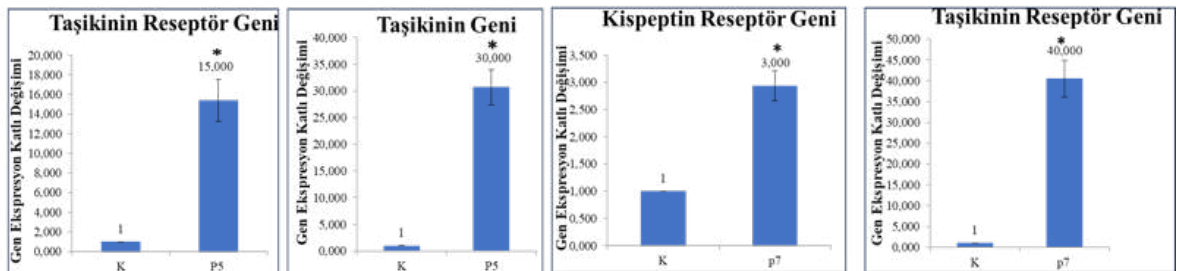
BULGULAR

Kültürü yapılan kemik iliği ve adipoz dokuya ait hücrelerin side scatter/ forward scatter (SSC/FSC) akım sitometri analizleri gerçekleştirilerek pozitif (CD29 ve CD90) ve negatif (CD 45) yüzey belirteçleri ile MKH oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3a, 3b).

Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin Real-time PCR sonuçlarını değerlendirdiğimizde, dördüncü pasaja kıyasla altıncı pasajda KP reseptör gen ifadesinin 14 kat, yedinci pasajda ise 29 kat artışı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Taşikinin geninde dördüncü pasaja kıyasla beşinci pasajda gen ifadesinin neredeyse tamamen baskılandığı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Taşikinin reseptör geninde, beşinci pasaj baz alındığında ise altıncı pasajda gen ifadesinin tamamen indüklendiği gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$) (Şekil 1).



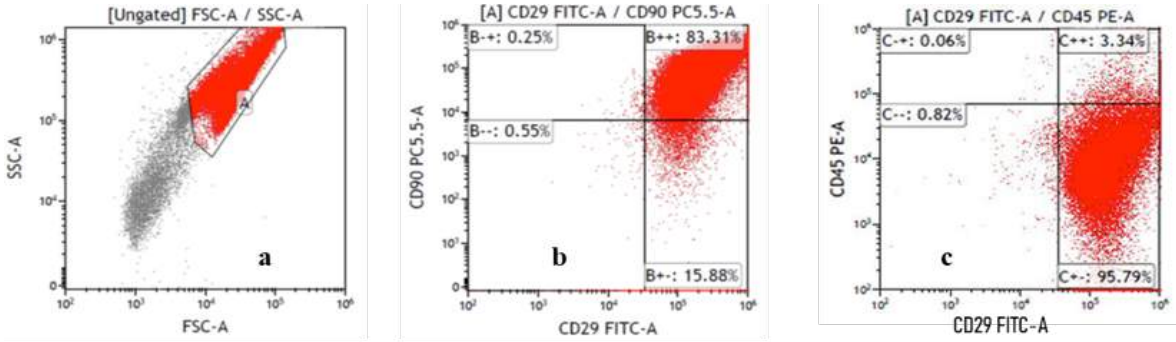
Şekil 1. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin Real-time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi (* $p \leq 0,05$ Welch paired testi. Veriler ortalama \pm SEM olarak ifade edildi (n=3).



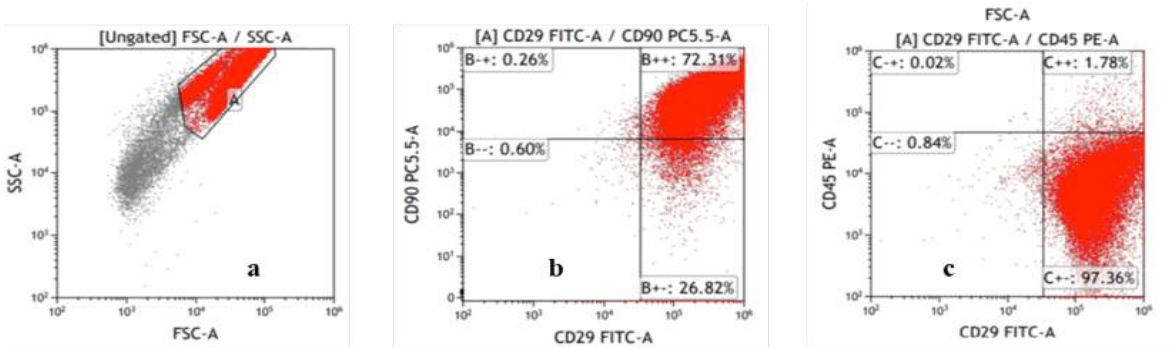
Şekil 2. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin Real-time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi (* $p \leq 0,05$ Welch paired testi. Veriler ortalama \pm SEM olarak ifade edildi (n=3).

Adipoz doku kaynaklı MKH' Real-time PCR sonuçlarını değerlendirdiğimizde, dördüncü pasaja kıyasla beşinci pasajda taşikinin reseptör gen ifadesinin 15 kat, taşikinin gen ifadesinin 30 kat, yedinci pasajda ise KP reseptör gen ifadesinin üç

kat artışı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Beşinci pasaja kıyasla ise yedinci pasajda taşikinin reseptör gen ifadesinin 40 kat artışı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$) (Şekil 2).



Şekil 3a. Granülitesi SSC ve büyüklüğü FSC olarak kemik iliği orjinli MKH'lerin genel popülasyonunun değerlendirilmesi (a), kullanılan pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90, CD29) MKH olduğunun tespiti (b), kullanılan CD45 ve CD29 yüzey belirteçlerinin yoğunluğu (c).



Şekil 3b. Granülitesi SSC ve büyüklüğü FSC olarak adipoz doku orjinli MKH'lerin genel popülasyonunun değerlendirilmesi (a), kullanılan pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90, CD29) MKH olduğunun tespiti (b), kullanılan CD45 ve CD29 yüzey belirteçlerinin yoğunluğu (c).

TARTIŞMA

Mezenkimal stromal hücreler olarak da bilinen MKH'ler, osteoblastlar, kondrositler, miyositler ve adipositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent stromal hücrelerdir (24). MKH'lerin puberte anomalileri dahil çeşitli hastalıklarla ilişkisi gösterildikten sonra bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır (7-17). Ancak ne dünyada ne de ülkemizde hem kemik iliği hem de adipoz doku

kaynaklı MKH'lere ait KP ve NK genlerinin birlikte araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Özellikle bu genlerin araştırılmasının nedeni KP ve NK'nın, üreme ve sinir sistemi de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynayan sinyal molekülleri olmalarıdır. Bu çalışmada, kemik iliği ve adipoz doku hücrelerinden izole edilen MKH'lerin KP ve NK genlerini ve reseptörlerini eksprese etmeleri ve bu genlerin puberte, hipogonadizm gibi üreme sistemi üzerindeki anahtar rolleri nedeniyle üreme

sisteminde meydana gelen hastalıklar ile muhtemel ilişkisi araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, hem kemik iliği hem de adipoz doku orjinli MKH'lere ait KP gen ifadesi hiçbir pasaj grubunda ifade olmasa da KP reseptör gen ifadesi ise pasaj sayısı ile korele bir şekilde artmıştır. Yapılan çalışmalarda da KP ve reseptörlerinin puberte ile ilişkisi araştırılmış olsa da (25-27) doğrudan pasaj sayısı ile ilişkisi irdelenmemiştir. Gottsch ve ark. (25), fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada; gonadotropin salgısının düzenlenmesinde KP'lerin rolünü araştırmıştır. Araştırmacılar KiSS-1 mRNA dağılımının haritasını çıkarmışlar ve KiSS-1 mRNA'nın anteroventral periventriküler çekirdek, periventriküler çekirdek ve kavisli çekirdek dahil olmak üzere gonadotropin salgılanmasının nöroendokrin düzenlenmesinde yer alan hipotalamus alanlarında eksprese edildiğini gözlemişlerdir. Ayrıca, bu çalışmada Kisspeptin-54 veya Kisspeptin-10'un intraserebroventriküler (ICV) olarak verildiğinde, luteinleştirici hormon (LH) ile folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını uyardığı gösterilmiştir (25). Diğer nöropeptidler için tam doz-yanıt eğrilerini ve bunların yetişkin erkek farede LH salgılanması üzerindeki etkilerini gösteren, doğrudan karşılaştırılabilir hiçbir çalışma literatürle paylaşılmamıştır. Başka bir çalışmada ise, Voigt ve ark. (26), yüksek üreme yeteneğine sahip dişi Damaraland köstebek farelerinde KP ve RFamid gen ifadesini incelemiştir. RFamid peptidi, KP ve RFamid ile ilgili peptid-3 (RFRP -3) gonadotropin salınımının güçlü düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir. Araştırmacılar bu çalışmalarında Kiss1 ekspresyonu anlamlı derecede yüksek bulmuştur (26). Yapılan başka bir çalışmada ise anne sütünden elde edilen MKH'lerin erkek sıçanlardaki Kisspeptin/Kiss1r-GnRH/GnIH sistemi üzerindeki etkisi araştırılmıştır (27). Her üç çalışmada KP ve reseptörlerinin nöroendokrin üreme eksenini yöneten hipotalamik devrenin bir parçası olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, bu çalışmaların hiçbirinde pasaj sayılarıyla ilişkileri araştırılmamış, ayrıca NK geni ya da reseptörleriyle

de birlikte değerlendirilmemiştir.

Çalışmamızda, kemik iliği kökenli MKH'lerin NK ve reseptörlerinin gen ifadelerinin pasaj sayısı ile birlikte korele bir şekilde azaldığı, adipoz doku kökenli MKH'lerin ise NK reseptörlerinin korele bir şekilde arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Voigt ve ark. (28), Damaraland köstebek fareleri üzerinde yaptıkları bir diğer çalışmada; reproduktif sistemle ilgili dinorfin ve Tac3 geni tarafından kodlanan NK B'nin gen ifadeleri incelenmiştir. Hipotalamustan normal GnRH sekresyonunun bozulması LH hormonunun yetersiz salgılanmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla gebelik engellenir. Dinorfin ve NK B, KP ile birlikte eksprese edilir. Bu nöron popülasyonu KNDy nöronları olarak adlandırılır. Araştırmacılar dinorfin ekspresyonunun azaldığını ve Tac3 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Her iki nöropeptidin de Damaraland köstebek farelerinde üremenin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. KNDy nöron ağından dinorfin salınımı, GnRH salınımını durdurma sinyali olarak işlev görmektedir. Çalışma sonuçları, üremeyen dişilerde normal pulsatil GnRH salınımının bozulduğunu, bunun nabız genliğini, frekansını veya her ikisini birden etkileyebileceğini göstermiştir. Bu çalışma nöropeptidlerin pubertal bozuklukların gelişim süreçlerindeki etkilerinin ne kadar önemli olduğunu vurgulamıştır (28). Çalışmamızda da benzer şekilde üremenin düzenlenmesinde ve puberte bozukluklarında öne çıkan genlerin MKH'de ifadesi araştırılmıştır.

Jeon ve ark. (29), 2016 yılında yaptıkları çalışmada ise insan kemik iliği, plasenta ve yağ dokusu dahil olmak üzere farklı kaynaklardan gelen MKH'leri fenotip, yüzey antijen ekspresyonu, farklılaşma yeteneği, proteom referans haritası ve kan akışı geri kazanımı açısından karakterize etmişlerdir. MKH'lerin benzer fenotipik ve yüzey antijeni ekspresyonuna sahip olmalarına rağmen hücresel kaynağa bağlı olarak ayırt edici farklılaşma potansiyellerine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, hücre kültürü aşamasında üçüncü ve dördüncü pasajlar kullanılmışken, çalışmamızda ise dördüncü, beşinci ve

altıncı pasajlar kullanarak MKH elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, flow sitometride CD73, CD90, CD105, CD44 ve CD45 yüzey antijenleri kullanılmışken, çalışmamızda CD90, CD45 ve CD29 yüzey antijenlerini kullanarak flow sitometrisinde elde ettiğimiz kök hücrenin MKH olup olmadığı tespit edilmiştir. Yusop ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışmada sıçan kemik iliğinden ve kompakt kemik hücrelerinden MKH izole etmişler ve osteojenik/adipojenik dokuya farklılaşmasını incelemişlerdir (29). Araştırmacılar MKH'lerin yüzey belirteçlerini agoroz jelde görüntülemişken, bizim yaptığımız çalışmada ise yüzey belirteçleri flowsitometride incelenmiştir.

Patki ve ark. (30), da farklı dokulardan elde edilen MKH'lerin multipotent özellikte olup olmadığını araştırmışlardır. Davies ark., (31) ise 2015 yılında adipoz ve kemik iliği MKH'lerinin izolasyonu, osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitelerini değiştirmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Ghorbani ark., (32) yaptıkları başka bir çalışmada, enzimatik yöntem kullanmadan adipoz dokudan MKH izole etmişlerdir. MKH'lerin pluripotente ve adiposite ve osteoblasta farklılaşma potansiyeli sergilediğini göstermişlerdir. Enzimatik yöntemin maliyetli, zaman alıcı olması ve heterojen bir hücre popülasyonu ile sonuçlanması nedeniyle tercih etmemişlerdir. Ayrıca hücre kültüründe DMEM'i kullanmışlardır. Çalışmamızda; enzimatik yöntem kullanarak adipoz dokudan MKH elde edilmiş ve hücre hasarı ya da kontaminasyon gözlenmemiştir. Ayrıca hücre kültüründe α -MEM'i tercih edilmiştir. Bu çalışmalarda da flowsitometri kullanılsa da herhangi bir gen ekspresyonuna bakılmamıştır.

Yapılan bir diğer çalışmada ise 43 yetişkin donörden alınan kemik iliği ve adipoz doku kültürlerinin ardışık pasajlarda immünofenotiplendirmesi yapılmıştır (33). Erken pasajlarda (ikinci, üçüncü pasaj veya 14-15 gün), kemik iliği ve adipoz dokudan türetilen MKH kültürlerinin çoğalma hızını da karşılaştırmışlardır. Kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin üçüncü-dördüncü pasajdan sonra yaşlanmaya girdiğini, adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin çoğunun ise

altıncı-sekizinci pasaja kadar yaşlanma özellikleri göstermediğini tespit etmişlerdir (33). Kemik iliği ve deri altı yağ dokusu, terapötik uygulamalar için olası MKH kaynakları olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, aynı hastanın farklı dokularından elde edilen MKH'nin fonksiyonel özellikleri ve terapötik etkinliği hala yeterince araştırılmamıştır. Bu sonuçlar, MKH'lerin çoğaltılması ve değerlendirilmesi açısından uygulamada özel protokoller geliştirmek ve optimize etmek için farklı kaynaklardan gelen MKH'nin de belirli özelliklerinin her zaman dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

Farklı orjinli MKH'lere ait KP ve NK gen ekspresyonlarının pasaj sayısı ile ilişkisinin incelendiği ilk çalışma özelliği taşıyan çalışmamız sonucunda dikkat çekici sonuçlara ulaşılmıştır. Kemik iliğinden elde edilen MKH'lere ait KP reseptör gen ifadesi incelendiğinde referansımızı pasaj (P) P4 olarak P6 ve P7 ile kıyaslandığında pasaj sayısının arttıkça gen ifadesinin de arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Taşikinin geninde ise P4 grubu referans alındığında P5 neredeyse tamamen baskılanmıştır. Taşikinin reseptör geninde ise P5 grubu referans alındığında P6 örnekleri tamamen baskılanmıştır. Çalışmamızın sonuçları taşikinin ve reseptörünün korele bir şekilde azaldığını göstermiştir. Adipoz dokudan elde edilen MKH'lere ait KP reseptör geni için P4 referans alındığında P7 grubunun gen ifadesinin üç kat arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Taşikinin geninde ise P4 grubu referans alındığında P5 grubunun gen ifadesinin 30 kat arttığı belirlenmiştir. Taşikinin reseptör geninde ise P4 grubu referans alındığında P5 grubu gen ifadesinin 15 kat; P5 grubu referans alındığında P7 grubu gen ifadesinin 40 kat indüklendiğini gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar da KP reseptör geni, taşikinin ve taşikinin reseptör genlerinin ilerleyen pasajlardaki ifadelerinin korele bir şekilde arttığını göstermiştir. Hem kemik iliği hem de adipoz yağ doku orjinli MKH'lere ait KP geni ise çalışılan hiçbir grupta eksprese olmamıştır. Çalışmamızı kısıtlayan en önemli nokta MKH'ye ait farklı bir gen ifadesine bakılmaması ve ayrıca bu genler protein düzeyinde çalışılmasını düşündürmüştür.

Sonuç olarak; kemik iliği ve adipoz doku gibi bulunması ve elde edilmesi kolay olan dokulardan MKH elde edebilmenin ileriki dönemler için tıp dünyasına bir ışık tutacağı düşünülmüştür. Ayrıca puberte dönemine geçişte çok önemli göreve sahip

olan KP ve NK genlerinin ifadelerini incelerken pasaj sayılarına dikkat edilmesi, kullanılacak pasajdaki gen ifadeleri göz önünde bulundurularak pasaj sayısının seçilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz (Proje Numarası: FYL-2019-12326).

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:04.11.2019, Karar no: 3).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ateş U. Kök hücreyi tanıyalım. FNG & Bilim Tıp Transp Derg, 2016; 1(1): 19-28.
2. Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. Tissue Cell, 2014; 46(1): 54-8.
3. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells, 2006; 24(5): 1294-301.
4. Jeon YJ, Kim J, Cho JH, Chung HM, Chae JI. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, placenta, and adipose tissue as sources of cell therapy. J Cell Biochem, 2016; 117(5): 1112-25.
5. Hao J, Zhang Y, Jing D, Shen Y, Tang G, Huang S, et al. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: perspective into mechanical induction of MSC fate. Acta Biomater, 2015; 20: 1-9.
6. Gündeşlioğlu ÖA, Karaçor Z, İnce B, Dadacı M, Aktan M, Duman S. Yağ doku kökenli kök hücreler ve plastik cerrahide uygulama alanları. Türk Plastik Rekonst Estetik Cer Derg, 2013; 21(3): 1-10.
7. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. Blood, 2007; 110(10): 3499-506.
8. Yang M, Chen J, Chen L. The roles of mesenchymal stem cell-derived exosomes in diabetes mellitus and its related complications. Front Endocrinol (Lausanne), 2022; 13: 1027686.
9. Lin Z, Wu Y, Xu Y, Li G, Li Z, Liu T. Mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer therapy resistance: recent advances and therapeutic potential. Mol Cancer, 2022; 21(1): 179.
10. Long Z, Zhang M, Zhang T, Zeng L, Yang K, Yang T, et al. The effectiveness and safety of mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of 28 randomized controlled trials. Stem Cells Int, 2022; 2022: 6151866.
11. Merimi M, El-Majzoub R, Lagneaux L, Moussa Agha D, Bouhtit F, Meuleman N, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine: current knowledge and future understandings. Front Cell Dev Biol, 2021; 9: 661532.

12. Kadri N, Amu S, Lacobaeus E, Boberg E, Le Blanc K. Current perspectives on mesenchymal stromal cell therapy for graft versus host disease. *Cell Mol Immunol*, 2023; 20: 613-25.
13. Wang C, Zhou H, Wu R, Guo Y, Gong L, Fu K, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and non-coding RNAs: regulatory and therapeutic role in liver diseases. *Biomed Pharmacother*, 2023; 114040.
14. Gonçalves RGJ, Vasques JF, da Silva-Junior AJ, Gubert F, Mendez-Otero R. Mesenchymal stem cell- and extracellular vesicle-based therapies for Alzheimer's disease: progress, advantages, and challenges. *Neural Regen Res*, 2023; 18(8): 1645-51.
15. Wang Y, Liu J, Wang H, Lv S, Liu Q, Li S, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate diabetic kidney disease through the NLRP3 signaling pathway. *Stem Cells*, 2023; 41(4): 368-83.
16. Ghasemi M, Roshandel E, Mohammadian M, Farhadhosseinabadi B, Akbarzadehlaleh P, Shamsasenjan K. Mesenchymal stromal cell-derived secretome-based therapy for neurodegenerative diseases: overview of clinical trials. *Stem Cell Res Ther*, 2023; 14(1): 122.
17. Yin T, Liu Y, Ji W, Zhuang J, Chen X, Gong B, et al. Engineered mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a state-of-the-art multifunctional weapon against Alzheimer's disease. *Theranostics*, 2023; 13(4): 1264-85.
18. Ata A, Özen S. Pubertal zamanlamadaki değişkenliklerin genetik düzenlenmesi. In: Ersoy B, ed. *Puberte ve Bozuklukları*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 2021: 8-14.
19. Erbaş İM, Abacı A. Pubertenin nöroendokrin kontrolü. In: Ersoy B, ed. *Puberte ve Bozuklukları*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 2021: 1-7.
20. Anderson RA, Millar RP. The roles of kisspeptin and neurokinin B in GnRH pulse generation in humans, and their potential clinical application. *J Neuroendocrinol*, 2022; 34(5): e13081.
21. Özen A, Gül Sancak İ, Ceylan A, Özgenç Ö. Isolation of adipose tissue-derived stem cells. *Turk J Vet Anim Sci*, 2016; 40: 137-41.
22. Boregowda SV, Krishnappa V, Phinney DG. Isolation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*, 2016; 1416: 205-23.
23. Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T, Wang K, Li G. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *J Orthop Translat*, 2014; 3(1): 26-33.
24. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl Med*, 2017; 6(6): 1445-51.
25. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 2004; 145(9): 4073-7.
26. Voigt C, Bennett NC. Reproductive status-dependent kisspeptin and RFamide-related peptide (Rfrp) gene expression in female Damaraland mole-rats. *J Neuroendocrinol*, 2018; 30(3): e12571.
27. Khamis T, Abdelalim AF, Abdallah SH, Saeed AA, Edress NM, Arisha AH. Early intervention with breast milk mesenchymal stem cells attenuates the development of diabetic-induced testicular dysfunction via hypothalamic Kisspeptin/Kiss1r-GnRH/GnIH system in male rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020; 1866(1): 165577.
28. Voigt C, Bennett N. Reproductive status-dependent dynorphin and neurokinin B gene expression in female Damaraland mole-rats. *J Chem Neuroanat*, 2019; 102: 101705.
29. Jeon YJ, Kim J, Cho JH, Chung HM, Chae JI. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, placenta, and adipose tissue as sources of cell therapy. *J Cell Biochem*, 2016; 117(5): 1112-25.
30. Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhone R. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell*, 2010; 23(2): 35-40.
31. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. *J Tissue Eng*, 2015; 6: 2041731415592356.
32. Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue Cell*, 2014; 46(1): 54-8.
33. Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, Tarasova OV, Anisimov SV, Zaritskey AY. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle*, 2012; 11(2): 377-83.

Klebsiella pneumoniae suşlarında kolistin direncinin saptanmasında otomatize sistemlerin sıvı mikrodilüsyon ile karşılaştırılması

Comparison of automated systems using liquid microdilution for the determination of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains

Burak EZER¹ (ID), Zekeriya TAŞKIN² (ID), Kadir KABA³ (ID), Selin UĞRAKLI² (ID), Metin DOĞAN² (ID)

ÖZET

Amaç: Çoklu ilaç direncine sahip *Klebsiella pneumoniae* suşlarında kolistin direncinin saptanmasında otomatize sistemler altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre hatalı sonuçlar vermektedir. Otomatize sistemlerin kolistin direncini doğru saptamasıyla ilgili kıyaslama yapılan çalışmalar literatürde kısıtlıdır. Bu çalışmada; üç yıllık dönemde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında kolistin duyarlılıklarının belirlenmesinde sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans alınarak Vitek2 Compact otomatize sistemi ve Phoenix otomatize sisteminin duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: *K. pneumoniae* suşlarının tanımlanması konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ve otomatize bakteri tanımlama sistemi (Vitek2 bioMérieux, MarcyL'Etoile, Fransa) ve Phoenix otomatize sistem (Bectondickinson, M50 , ABD) kullanılarak yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri de yine aynı cihazlarla

ABSTRACT

Objective: In the detection of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains with multidrug resistance, automated systems give more erroneous results than the gold standard method, the liquid microdilution method. Comparative studies on the correct detection of colistin resistance by automated systems are limited in the literature. In this study; it is aimed to compare Vitek2 Compact and Phoenix automated systems by using liquid microdilution method in the determination of colistin susceptibility in *K. pneumoniae* strains isolated from various clinical specimens over a three-year period.

Methods: Identification of *K. pneumoniae* strains was performed using conventional microbiological methods and automated bacterial identification systems which are Vitek2 (bioMérieux, MarcyL'Etoile, France) and Phoenix (Becton dickinson, M50 , USA). Antibiotic susceptibility tests were also performed with the same devices. Colistin sensitivity was determined

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Beyhekim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Konya, Türkiye

²Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Konya, Türkiye

³Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD., Konya, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Burak EZER

Beyhekim Mahallesi Devlethane Sokak No: 2/C Selçuklu / Konya - Türkiye

E-posta / E-mail : dr.burakezer@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 05.04.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 01.03.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.48243

Ezer B, Taşkin Z, Kaba K, Uğraklı S, Doğan M. *Klebsiella pneumoniae* suşlarında kolistin direncinin saptanmasında otomatize sistemlerin sıvı mikrodilüsyon ile karşılaştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 13 - 20

yapılmıştır. Kolistin duyarlılığı ise hem otomatize yöntemlerle hem de sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile eş zamanlı olarak belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda; Vitek2 otomatize sistem için Kategorik Uyum (KU) oranı %93,71 , Çok Büyük Hata (ÇBH) oranı %6,89 , Büyük Hata (BH) oranı ise %1,41 tespit edilmiştir. Phoenix otomatize sistem için ise KU oranı %95,05, ÇBH oranı %3,44, BH oranı ise %1,50 olarak tespit edilmiştir. Vitek2 için; özgülük %86,10, lambda değeri ise 0,82, kappa değeri 0,83 olarak tespit edilmiştir. Phoenix için ise; özgülük %88,20, lambda değeri ise 0,82, kappa değeri 0,87 olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: *K. pneumoniae* için kolistin duyarlılığının saptanmasında Phoenix otomatize sisteminin Vitek2 otomatize sisteme göre referans yöntemle daha uyumlu olduğu tespit edilmiş olup, bu konuyla ilgili destekleyici çok merkezli daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Vitek2, Phoenix, kolistin, direnc

simultaneously with both automated methods and liquid microdilution method.

Results: In our study, for the Vitek2 automated system, the Categorical Agreement (CA) ratio is 93.71%, the Very Major Error (VME) rate is 6.89%, and the Minor Error (ME) rate is 1.41%. For the Phoenix automated system, the CA ratio is 95.05%, the VME rate is 3.44%, and the ME rate is 1.51%. Vitek2; specificity is 86.10%, lambda value is 0.82, and kappa value is 0.83. For the Phoenix system, specificity is 88.20%, lambda value is 0.82, and kappa value is 0.87.

Conclusion: In determining colistin susceptibility for *K. pneumoniae*, the Phoenix automated system was found to be more compatible with the reference method than the Vitek2 automated system, and more supportive multicenter studies are needed on this subject.

Key Words: Vitek2, Phoenix, colistin, resistance

GİRİŞ

Çoklu ilaç direncine sahip *K. pneumoniae* suşlarının görülme sıklığı dünya genelinde artmaktadır. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* (CRKP) sağlık hizmetli ilişkili enfeksiyonlara sıklıkla yol açabilmekte ve mortalitesi yüksek salgınlara neden olabilmektedir (1). Karbapenem dirençli suşlar, tüm beta laktamlara in vitro dirençli olup, genelde kinolon direncine de sahip oldukları için bu hastalarda son seçenek olarak kolistin tercih edilmektedir. Bundan dolayı artan kolistin direnci, bu vakaların yönetimi açısından oldukça önemli bir sorun olarak görülmektedir. Plazmit aracılı direncin kolay yayılabilme potansiyeli nedeniyle kolistin direnci küresel bir sorun haline gelmiştir (2).

Kolistin duyarlılığın belirlenmesinde; disk difüzyon yöntemi, gradient difüzyon yöntemi ve otomatize sistemlerin kullanılabilmesinin yanı sıra, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) -

Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST)'ın aldığı ortak bir kararla, *Enterobacteriaceae*, *P. aurescens* ve *Acinetobacter* spp.'de kolistin duyarlılığının çalışılmasında en güvenilir yöntemin Mueller-Hinton buyyonda sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemi olduğu ve duyarlılıkların belirlenmesinde BMD yönteminin kullanılması gerektiği belirtilmiştir (3). Sıvı mikrodilüsyon yöntemi otomatik yöntemlere göre çalışması daha zahmetli yöntemdir. Bu nedenle standardizasyon ve karşılaştırmalı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada; üç yıllık periyotta hastanemiz klinik örneklerinde izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında kolistin duyarlılıkların belirlenmesinde sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans alınarak Vitek2 Compact otomatize sistemi ve Phoenix otomatize sisteminin duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Mayıs 2019 - Ekim 2022 yılları arasında kabul edilen klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae* suşları çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastanın birden fazla örneğinde üreyen izolatların ilki çalışmaya dahil edilmiştir. Suşların tanımlanması konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ve otomatize bakteri tanımlama sistemi Vitek2 (bioMérieux, MarcyL'Etoile, Fransa) ve Phoenix otomatize sistem (Becton dickinson, M50, ABD) kullanılarak yapılmış olup, antibiyotik duyarlılık testleri de yine aynı cihazlarla çalışılmıştır. Kolistin duyarlılığı ise hem otomatize yöntemlerle hem de sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile eş zamanlı olarak belirlenmiştir. Çalışmamıza dahil edilen suşların kolistin duyarlılıkları EUCAST kriterlerine göre *Enterobacteriace* spp. için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri $>2 \mu\text{g/mL}$ ise kolistine dirençli kabul edilmiştir (4). Antibiyotik duyarlılık testleri Ekim 2019- Mayıs 2022 yılları arasında Phoenix ve Vitek2 otomatize sistem ile çalışılmış fakat kolistin duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon testine göre bildirilmiştir.

Örneklem büyüklüğü için G power 3.1 analizi kullanılmış olup beklenen ve gözlenen değerler oluşturulmuştur. Program üzerinden ki-kare goodness testi kullanılarak hesaplamalar yapılmış olup alfa değeri 0,05 alınmıştır. Affect size W değeri 493 örnek olan grupta 0,84; 465 örnek olan grupta ise 0,87 olarak bulunmuştur. Beta değeri 1 olarak saptanmış, çalışmanın gücü %100 olarak hesaplanmıştır.

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Kolistin sülfat tozu Sigma (St Louis MO, USA) temin edilmiştir. 128 mg/L konsantrasyonda stok solüsyonları elde edilmiştir. İzolatlar stok solüsyon dilüsyonu yapıldıktan sonra uygun konsantrasyonlarda mikropleytlere eklenmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, ISO kriterlerine uygun olacak şekilde 96 kuyucuklu polistiren içeren steril pleytlerde BBL

Mueller Hinton II broth (Becton Dickinson) kullanılarak yapılmıştır. Stok solüsyonlardan seri dilüsyonlar (0,32-32 mg/L) yapılmıştır. Son kuyucuk kontrol olarak değerlendirilmiştir. Tüm izolatlardan 0,5 McFarland olacak şekilde süspansiyon hazırlanmıştır. Ardından mikrodilüsyon plaklarına 5×10^5 cfu/mL bakteri konsantrasyonu eklenip mikropleytler 36°C 'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu, pozitif kontrol olarak *Escherichia coli* NCTC 13846 suşu kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Otomatize sistemlerin sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans alınarak yapılan karşılaştırılmasında kategorik uyum (KU) oranı dikkate alınmıştır. Kategorik uyum; test suşunun EUCAST kriterlerine göre yorumlanan duyarlılık sonuçlarının (duyarlı, orta duyarlı, dirençli) uyumu olarak tanımlanmıştır. Büyük hata (BH) bir antibiyotik duyarlılık testinde dirençli, referans testinin duyarlı sonuç vermesi; çok büyük hata (ÇBH) ise bir antibiyotik duyarlılık testinde duyarlı iken referans testinin dirençli sonuç vermesi olarak tanımlanmıştır (5). Referans testi olan sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla, Vitek2 ve Phoenix sonuçları karşılaştırılıp; KU, ÇBH ve BH oranları hesaplanmıştır. Uluslararası Standartlar Teşkilatı (ISO) tarafından belirlenen kriterlere göre kabul edilebilir performans, KU için ≥ 90 ; ÇBH ve BH'ler için ≤ 3 olarak belirlenmiştir (6). Mikrotüp dilüsyon yöntemiyle; Vitek2 ve Phoenix otomatize sistemlerinin kolistin duyarlılık sonuçlarını karşılaştırmak için SPSS programı kullanılarak kapa ve lambda değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, mikrotüp dilüsyon yöntemiyle; Vitek2 ve Phoenix otomatize sistemlerinin kolistin duyarlılık sonuçları ki-kare testi kullanılarak kıyaslanmıştır. Hem Vitek2 hem Phoenix otomatize sistemi için; duyarlılık, özgüllük, negatif prediktif değer, pozitif prediktif değer ve doğruluk değerleri Excell programıyla hesaplanmıştır. Vitek2 ve Phoenix için güven aralıkları ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:10.02.2023, Karar no: 2023/4179).

BULGULAR

Çalışmaya alınan suşlardan 493 *K. pneumoniae* suşunun kolistin duyarlılıkları Vitek2 otomatize sistem

ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır. Eş zamanlı olarak 493 *K. pneumoniae* suşunun 465'i ise Phoenix otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır. 28 *K. pneumoniae* suşu ise ihale döneminde başka bir otomatize cihaza geçilmesinden dolayı Phoenix ile sıvı mikrodilüsyon karşılaştırılmasına dahil edilmemiştir.

K. pneumoniae izole edilen örneklerin dağılımına Tablo-1'de yer verilmiştir.

Tablo 1. *K.pneumoniae* izole edilen örneklerin dağılımı (%)

Örnek çeşidi	Yüzde
Bronkoalveolar lavaj	%43,82
Kan	%22,69
Yara	%11,61
İdrar	%9,83
Drenaj	%4,18
Kateter (intravasküler)	%2,61
Balgam	%2,09
Apse	%1,35
Beyin omurilik sıvısı	%0,5
Boğaz sürüntüsü	%0,5
Periton sıvısı	%0,3
Plevra sıvısı	%0,2
Vajen sürüntüsü	%0,2

Çalışmamızda Vitek2 otomatize sistemde elde edilen sonuçlara göre 493 izolatın 219'u kolistin dirençli (%44,4) olarak saptanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre de 493 izolatın 246 (%49,89)'sı kolistin dirençli olarak bulunmuştur. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve Vitek2 otomatize sistemin ikisinin de beraber kolistin duyarlı saptadığı izolat sayısı 240 (%48,68) olarak belirlenmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve Vitek2 otomatize sistemin ikisinin de beraber kolistin dirençli saptadığı izolat sayısı 212 (%43) tespit edilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yönteminin kolistin duyarlı, Vitek2 otomatize sistemin kolistin

dirençli saptadığı izolat sayısı 7 (%1,41) bulunmuştur. Sıvı mikrodilüsyon yönteminin kolistin dirençli, Vitek2 otomatize sistemin kolistin duyarlı saptadığı izolat sayısı 34 (%6,89) olduğu görülmüştür. Ki-kare testi sonucuna göre sıvı mikrodilüsyon ile Vitek2 yönteminin sonuçları arasında istatistiksel derecede anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$). Ki-kare testine göre anlamlı bir fark olmasına rağmen Vitek2 testi altın standart sıvı mikrodilüsyon test sonuçlarını yüksek derece doğru öngörmektedir ($\lambda=0,824$; $p<0,001$). Vitek2 ve sıvı mikrodilüsyon test sonuçları yüksek derecede uyumlu çıkmıştır ($Kappa:0,834$; $p<0,001$).

Çalışmamızda, Phoenix otomatize sistemde elde edilen sonuçlara göre 465 izolatin 127'si kolistin dirençli (%27,31) olarak saptanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre de 465 izolatin 136'sı (%29,24) kolistin dirençli olarak belirlenmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve Phoenix otomatize sistemin ikisinin de beraber kolistin duyarlı saptadığı izolat sayısı 322 (%88,21) tespit edilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve Phoenix otomatize sistemin ikisinin de beraber kolistin dirençli saptadığı izolat sayısı 120 (%25,8) olduğu görülmüştür. Sıvı mikrodilüsyon yönteminin kolistin dirençli, Phoenix otomatize sistemin kolistin duyarlı saptadığı izolat sayısı 16'dır (%3,44). Sıvı mikrodilüsyon yönteminin kolistin duyarlı, Phoenix otomatize sistemin kolistin dirençli saptadığı izolat sayısı ise 7 (%1,505) tespit edilmiştir. Ki-kare testi sonucuna göre sıvı mikrodilüsyon ile Phoenix yönteminin sonuçları arasında istatistiksel derecede anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,001$). Ki-kare testine göre anlamlı bir fark olmasına rağmen Phoenix testi altın standart sıvı mikrodilüsyon test sonuçlarını yüksek derece doğru öngörmektedir ($\lambda=0,825$; $p<0,001$). Phoenix ve sıvı mikrodilüsyon test sonuçları yüksek derecede uyumlu çıkmıştır (Kappa:0,878;

$p<0,001$). Genel olarak, Phoenix ve Vitek2 otomatize sistemleri altın standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi kadar iyi sonuç vermemesine rağmen ikisinin de sıvı mikrodilüsyon yöntemi sonucunu yüksek derecede öngörme ve uyum içinde olduğu saptanmıştır. Phoenix otomatize sistem sıvı mikrodilüsyon sonucunu öngörmede ve uyum açısından Vitek2 otomatize sistemine göre daha yüksek bulunmuştur.

Tablo-2'de kolistin duyarlılığı için Sıvı mikrodilüsyon , Vitek2 ve Phoenix otomatize sistem yöntemlerinin karşılaştırılmasına yer verilmiştir. (%95 güven aralıkları değerlerine parantez içinde yer verilmiştir).

Vitek2 için; duyarlılık %97,1 (%95,1-99), özgüllük %86,1 (%84,1-88,0), negatif prediktif değer %96,8 (%94,8-98,7), pozitif prediktif değer %87,6 (%85,6-89,5), doğruluk oranı %91,6 (%89,6-93,5), lambda değeri ise 0,8 (0,6-0,9), kappa değeri 0,8 (0,6-0,9) olarak tespit edilmiştir.

Phoenix için ise; duyarlılık %97,1 (%95,1-99), özgüllük %88,2 (%86,2-90,1), negatif prediktif değer %94,5 (%92,5-96,4), pozitif prediktif değer %95,3 (%93,3-97,2), doğruluk oranı %95 (%93-96,9), lambda değeri ise 0,8 (0,6-0,9), kappa değeri 0,8 (0,6-0,9) olarak belirlenmiştir.

Tablo 2. Kolistin duyarlılığı için sıvı mikrodilüsyon, Vitek2 ve Phoenix otomatize sistem yöntemlerinin karşılaştırılması

Yöntem	Dirençli(%)	Duyarlı(%)	KU	BH	ÇBH
Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	%49,89	%50,11	Referans	Referans	Referans
Vitek2 Otomatize Sistem	%44,42	%55,58	%93,71	%1,41	%6,89
Phoenix Otomatize sistem	%27,31	%72,68	%95,05	%1.505	%3,44

TARTIŞMA

Çoklu ilaca dirençli organizmalar, küresel olarak sağlıksistemleri üzerinde artan bir yük oluşturmaktadır. Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (CRE) artık dünya çapında rapor

edilmektedir. CRE enfeksiyonlarının tedavisinde güçlükler yaşanmaktadır ve sınırlı antibiyotik seçenekleri mevcuttur. Kolistin genelde CRE ile meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak kullanılan bir antimikrobiyal ajandır.

Polimiksinler, yüksek nefrotoksisite ve nörotoksisite oranlarına ilişkin endişeler nedeniyle klinisyenler tarafından daha az sıklıkla kullanılan antibiyotiklerdendir (7). Ancak son yıllarda artan CRE enfeksiyonu oranları nedeniyle polimiksinlerin kullanımı artmıştır (8). Birçok antibiyotiğin duyarlılıklarını araştırmak için çok değişik yöntemler kabul edilirken kolistin için durum farklılık göstermektedir. Disk difüzyon yönteminin, kolistin direncini tespit etmede güvenilir olmadığıyla ilgili çalışmalar mevcuttur (9, 10).

Kolistin E-test sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre %35,5 oranında hatalı sonuçlar verdiğini tespit eden çeşitli çalışmalar mevcuttur (11). 2017 yılında CLSI ve EUCAST tarafından kolistin duyarlılık testlerinde altın standart olarak sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (12).

Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde, otomatize yöntemler MİK oranlarını bildirmesi ve çalışılmasındaki kolaylıklardan dolayı bir çok laboratuvarıda tercih edilir hale gelmiştir. Küçük laboratuvarlarda sıvı mikrodilüsyon yönteminde kaliteyi sağlamak zordur. Ayrıca eğitilmiş personel yetersizliği ve sıvı mikrodilüsyon yönteminin rutin olarak uygulanamaması nedeniyle yarı veya tam otomatik tanımlama/antimikrobiyal duyarlılık testi (ID/AST) sistemlerinin kullanılması yaygınlaşmıştır. Yoğun bakım ünitelerinde şüpheli sepsis tedavisi için kullanımı artan kolistin duyarlılığını doğru tespit etmek açısından otomatize sistemlerin güvenilirliğinin sorgulanması gerekmektedir (13). 2017 yılındaki bir çalışmada; kolistin duyarlılık testi için %36'lık çok büyük bir hata oranıyla kolistin duyarlılığını tespit etmesinden dolayı Vitek2 otomatize sistemin güvenilirliğinin sorgulanması gerektiği belirtilmiştir (14). Başka bir çalışmada ise, Vitek2 otomatize sistem tarafından belirlenen kolistin MİK değerlerinin, özellikle *Enterobacter cloacae* ve *Acinetobacter baumannii* kompleks izolatları için güvenilir olmadığı rapor edilmiştir (15). Vitek2 otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon yönteminin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise KU oranını %96,7, ÇBH oranını %0, BH oranını %3,3 olarak tespit edilmiştir (16).

Çalışmamızda; Vitek2 ve Phoenix otomatize

sistemleri kolistin duyarlılığında referans metod kabul edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

Vitek 2 otomatize sistem için KU oranı %93,71 , ÇBH oranı %6,89 , BH oranı ise %1,41 bulunmuştur. Phoenix otomatize sistem için ise KU oranı %95,05, ÇBH oranı %3,44, BH oranı ise %1.505 tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre ÇBH oranının Vitek 2 ve Phoenix otomatize sistem için kabul edilebilir sınırlarda olmadığı, BH oranının ve KU oranının hem Vitek2 hem de Phoenix otomatize sistem için kabul edilebilir sınırlarda olduğu belirlenmiştir (KU için; ≥ 90 , ÇBH için; ≤ 3 , BH için; ≤ 3).

Çalışmamızda; Phoenix otomatize sistemle tespit edilen KU oranının Vitek2 otomatize sisteme göre daha yüksek olması; ÇBH oranının da Phoenix otomatize sistemde Vitek2 otomatize sisteme göre daha düşük olmasından dolayı, *K. pneumoniae* için kolistin duyarlılığının saptanmasında Phoenix otomatize sisteminin Vitek2 otomatize sisteme göre referans yöntemle daha uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Negatif prediktif değer hariç duyarlılık, özgünlük, pozitif prediktif değer, doğruluk, lambda değeri, kappa değeri Phoenix otomatize sistemde daha yüksek olduğu için Vitek2 otomatize sistemden kolistin direncini saptamada referans yöntemle daha uyumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları, bakteriye ait çeşitli virülans faktörleri ve izolatların geliştirdikleri farklı direnç mekanizmalarının bilinmemesidir.

Yapılmış çalışmalarda da genellikle Vitek2 otomatize sisteminin kolistin duyarlılığını tespit etmesinde beklentileri karşılamadığı görülmüş olup; Vitek2 otomatize sistemin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle yüksek oranda uyum gösterdiğini tespit etmiş olan çalışmalar da mevcuttur (17). Kolistin duyarlılığını test etmek için yapılan çalışmalar genellikle VITEK 2 (bioMérieux) ile yapılmıştır. 2021 yılında merkezimizden yapılmış başka bir çalışmada KU %93,3, BH oranı %1,1, Kappa değeri 0,85 olarak tespit edilmiş olup çalışmamıza da benzer sonuçlar elde edilmiştir. ÇBH oranı ise çalışmamızda %6,89 olarak daha düşük saptanmıştır (18). Çalışmamızda, ÇBH oranının daha düşük saptanmasının Vitek2 otomatize sistemin güncellemelerine bağlı iyileştirmelerine

ve suşlardaki direnç durumunun farklılığına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda ise Vitek2 otomatize sistemin yanı sıra Phoenix otomatize sistem de kullanılmış olup, Phoenix otomatize sistemle ilgili karşılaştırma çalışmaları literatürde daha azdır. Yapılan bir çalışmada, Vitek2 ve Phoenix otomatize sistemlerinin Enterobacteriaceae ailesi için kolistin duyarlılığı saptanmasında yanlış duyarlı sonuçlar verdiği ancak yanlış dirençli sonuçlar vermediğinden dolayı otomatize sistemlerin kolistin için verdiği dirençli sonuçların kabul edilebileceği belirtilmiştir (19). Güney Kore’de yapılan başka bir çalışmada ise Phoenix otomatize sistemle Gram negatif bakterilerde kolistin direncinin saptanması incelendiğinde, KU oranının %90 dan fazla, ÇBH ve BH oranının da %3 den az olduğu tespit edilmiş olup, Phoenix otomatize sistemlerin Gram negatif

bakterilerde kolistin direnci saptamada daha güvenilir olduğu çalışmamıza benzer şekilde bildirilmiştir (20). Sonuç olarak kolistin direncini saptamak için otomatize sistemlerin kullanılmaması, sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılması gerektiği görülmektedir. EUCAST da yeterli teknik ekipman ve eleman varlığında sıvı mikrodilüsyon yönteminin kolistin direncinin tespitinde kullanılmasını tavsiye etmektedir (21). Kullanımı gittikçe artan kolistin direnç oranlarının azımsanmayacak düzeyde olduğu, otomatize sistemlerle dirençli suşların gözden kaçabileceği bilinmektedir (22). Otomatize sistemlerden Phoenix otomatize sisteminin Vitek2 otomatize sisteme göre kolistin dirençli suşlarda referans yöntemle daha uyumlu sonuçlar verdiği çalışmamızda tespit edilmiş olup, destekleyici çok merkezli daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu’nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:10.02.2023, Karar no: 2023/4179).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Pereira GH, Garcia DdO, Mostardeiro M, Fanti KS, Levin AS. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: two-year epidemiologic follow-up in a tertiary hospital. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013;108:113-5.
2. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, 2009;9(4):228-36.
3. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1 Basel: EUCAST. http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents/, Date Accessed: March 20, 2018.
4. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E). As recommended by the joint CLSIEUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Basel: EUCAST. http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents/, Date Accessed: March 20, 2018.
5. Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters. Approved Guideline. 3rd ed. CLSI Document M23-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008.

6. ISO IOFS, vitro -Cltai, of dtsSt, of iaeop, 2: astd-P, antimicrobial Eopo, et al. ISO. Dis Clin North Am, 2016; 30(2): 391-414. <https://www.iso.org/standard/41631.html>.
7. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. Clin Microbiol Rev, 2008;21(3):449-65.
8. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. Clin Microbiol Rev, 2008;21(3):449-65.
9. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacilli. J Clin Microbiol, 2013;51(6):1678-84.
10. Moskowitz SM, Garber E, Chen Y, Clock SA, Tabibi S, Miller AK, et al. Colistin susceptibility testing: evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother, 2010;65(7):1416-23.
11. Rojas LJ, Salim M, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA, et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory detection and impact on mortality. Clin Infect Dis, 2017;64(6):711-8.
12. Matuschek E, Åhman J, Kahlmeter G, Yagupsky P. Antimicrobial susceptibility testing of *Kingella kingae* with broth microdilution and disk diffusion using EUCAST recommended media. Clin Microbiol Infect, 2018;24(4):396-401.
13. Despotovj A, Milpaevj B, Milpaevj I, Mitrovi N, Cirkovic A, Jovanovj Sa, et al. Hospital-acquired infections in the adult intensive care unit-epidemiology, antimicrobial resistance patterns, and risk factors for acquisition and mortality. Am J Infect Contr, 2020.
14. Chew KL, La MV, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: comparison of sensititre, MicroScan, Vitek 2, and etest with broth microdilution. J Clin Microbiol, 2017;55(9):2609-16.
15. Lai CC, Chen YS, Lee NY, Tang HJ, Lee SSJ, Lin CF, et al. Susceptibility rates of clinically important bacteria collected from intensive care units against colistin, carbapenems, and other comparative agents: results from Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART). Infect Drug Resist, 2019;12:627-40.
16. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, et al. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother, 2015;59(8):4625-30.
17. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMGA, Diederer BMW, Kluytmans JAJW, van Keulen PHJ. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant Enterobacter cloacae and *Acinetobacter baumannii* strains. Antimicrob Agents and Chemother, 2007;51:3726 -30.
18. Uğrakli S, Doğan M. Comparative evaluation of Vitek 2 and etest methods with the reference broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing of colistin among multi-drug resistant gram-negative bacteria. Flora J Infect Dis Clin Microbiol. 2021;26:518-27.
19. Pfennigwerth N, Kaminski A, Korte-Berwanger M, Pfeifer Y, Simon M, Werner G, et al. Evaluation of six commercial products for colistin susceptibility testing in Enterobacterales. Clin Microbiol Infect, 2019;25(11):1385-9.
20. Hong JS, Kim D, Kang DY, Park BY, Yang S, Yoon EJ, et al. Evaluation of the BD Phoenix M50 automated microbiology system for antimicrobial susceptibility testing with clinical isolates in Korea. Microb Drug Resist, 2019;25(8):1142-8.
21. Giske CG, Kahlmeter G. Colistin antimicrobial susceptibility testing-can the slow and challenging be replaced by the rapid and convenient? Clin Microbiol Infect, 2018;24(2):93-4.
22. Lee SY, Shin J-H, Lee K, Joo MY, Park K-H, Shin M-G, et al. Comparison of the Vitek 2, microscan, and etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of *Acinetobacter* species from a Korean University Hospital. J Clin Microbiol, 2013;51:1924-6.

Kan kültürlerinde kalite göstergelerinin ve etken olan mikroorganizmaların dağılımının değerlendirilmesi

Evaluation of quality indicators and distribution of causative microorganisms in blood cultures

Nadire Seval GÜNDEM¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Kan kültürü, kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında en sık kullanılan yöntemdir ve tedavinin yönlendirilmesine, enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasına ve mortalitenin azaltılmasına katkıda bulunmaktadır. Kan kültürü göstergeleri ise preanalitik, analitik ve postanalitik süreçlerin izlemine sağlayan, eksiklerin giderilmesi ve mevcut durumların iyileştirilmesi için yapılabilecekleri belirleyen parametrelerdir. Bu çalışmada, çeşitli kliniklerde yatan hastaların kan kültürlerinde sağlıkta kalite yönetim sistemine göre kalite göstergelerinin değerlendirilmesi ve etken olan mikroorganizmaların dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Ocak 2020-Aralık 2022 tarihleri arasında mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen toplam 6556 kan kültürü örneği geriye dönük olarak değerlendirilmiştir. Kan kültürlerinde kontaminasyon oranı, pozitif sonuç verme oranı, tek şişe alınan kan kültürü sayısı, iki ve üzeri set alınan kan kültürü sayısı, Gram boyama ile son tanımlama arasındaki uyumsuzluk oranı, reddedilen örneklerin oranı ve yalancı pozitif sonuç verme oranı gibi

ABSTRACT

Objective: Blood culture is the most commonly used method in the diagnosis of bloodstream infections and contributes to manage the treatment, take infection control measures and reduce mortality. Blood culture indicators are parameters that provide monitoring of preanalytical, analytical and postanalytical processes and determining what can be done to eliminate deficiencies and improve current situations. In this study, it was aimed to evaluate quality indicators according to health quality management system and to determine distribution of causative microorganisms in blood cultures of patients hospitalized in various clinics.

Methods: A total of 6556 blood culture samples sent to microbiology laboratory between January 2020 and December 2022 were evaluated retrospectively. All data regarding quality indicators such as contamination rate in blood cultures, the rate of positive results, the number of blood cultures taken from a single bottle, the number of blood cultures taken from two or more sets, rate of incompatibility between Gram staining and final identification, rate of rejected samples and

¹Dr. Ali Kemal Belviranlı Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Konya, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Nadire Seval GÜNDEM

Dr. Ali Kemal Belviranlı Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hast., Tıbbi Mik. Lab., Konya - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 15.02.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 20.09.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.04810

Gündem NS. Kan kültürlerinde kalite göstergelerinin ve etken olan mikroorganizmaların dağılımının değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 21 - 32

kalite göstergeleriyle ilgili tüm veriler laboratuvar bilgi yönetim sistemi üzerinden taranarak elde edilmiştir. Kan kültürü şişeleri otomatize kan kültürü cihazında inkübe edilmiş, pozitif sinyal veren örneklerin kültürü yapılarak izole edilen mikroorganizmalara otomatize sistemle tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testleri çalışılmıştır.

Bulgular: Toplam 6556 kan kültürünün 534 (%8,1)'ünde üreme saptanmıştır. Kontaminasyon saptanan ve reddedilen örneklerin oranı sırasıyla %1,8 ve %0,7 bulunmuştur. Çocuk yoğun bakım ünitesi (%53,6) ve çocuk servislerinde (%40,1) iki set ve üzeri kan kültürü alım oranlarındaki yükseklik diğer servislere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,001$). Yenidoğan yoğun bakım ünitesinden gelen örneklerin tek şişe alım (%68,4), kontaminasyon (%33,3), pozitif sonuç verme (%49,3) ve reddedilme oranlarının (%65,1) diğer kliniklerden gelen örneklerin oranlarına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. En sık izole edilen mikroorganizma Metisiline dirençli *Staphylococcus epidermidis* (%35,4) ve bunu Metisiline dirençli *Staphylococcus hominis* (%15,7) izlemiştir. *Klebsiella* spp. (%6,2) en sık izole edilen Gram negatif bakteri olarak bulunurken, non-fermentatif bakteriler (%2,3) ve *Candida* spp. (%0,9) ise kan kültürlerinden daha az sıklıkta izole edilen mikroorganizmalar olmuştur.

Sonuç: Bu çalışmada, hastaların büyük çoğunluğunu yenidoğan ve bir yaş altı hastalar oluşturduğu için tek şişe kan kültürü alımı gibi kalite göstergelerinde elde edilen oranın yüksek olması pediatrik popülasyondan kan kültürü alımının zorluklarını yansıtmaktadır. Kan kültürü kontaminasyon oranları ideal sınırlar içerisinde bulunmuş olsa da etken-kontaminant ayırımının yapılmasında laboratuvar-klinik işbirliğinin önemli olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kan kültürü, kan dolaşımı enfeksiyonları, kalite göstergeleri

rate of false positive results were obtained by scanning through laboratory information management system. Blood culture bottles were incubated in automated blood culture device, bottles giving positive signals were cultured and identification and antimicrobial susceptibility tests were performed to isolated microorganisms by automated system.

Results: Growth was detected in 534 (8.1%) of a total of 6556 blood cultures. The rates of samples detected to be contaminated and rejected were 1.8% and 0.7%, respectively. The higher rates of blood culture collection of two sets or more in pediatric intensive care unit (53.6%) and in pediatric wards (40.1%) showed a statistically significant difference compared to other services. It was observed that rates of single bottle collection (68.4%), contamination (33.3%), growth (49.3%) and rejection of samples (65.1%) sent from neonatal intensive care unit were higher than rates of samples sent from other clinics. The most frequently isolated microorganism was Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (35.4%), followed by Methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* (15.7%). While *Klebsiella* spp. (6.2%) was the most frequently isolated gram-negative bacteria, non-fermentative bacteria (2.3%) and *Candida* spp. (0.9%) were microorganisms rarely isolated from blood cultures.

Conclusion: In this study, since the majority of patients are newborns and patients under one year of age, the higher rates obtained in quality indicators such as single-bottle blood culture collection reflects difficulties in collecting blood cultures from pediatric population. Even if contamination rates were found to be within ideal limits, laboratory-clinical cooperation is important in distinguishing between agents and contaminants.

Key Words: Blood culture, blood stream infections, quality indicators

GİRİŞ

Kan dolaşımı enfeksiyonları dünya çapında hastanede yatan hastalarda artmış oranda morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Kan kültürü, bu enfeksiyonların tanısında en sık kullanılan yöntem olmakla birlikte aynı zamanda klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının önemli ve acil işlerinden biridir (1-3). Kan dolaşımı enfeksiyonlarının kaynağının belirlenmesi ve uygun antibiyotik seçimi için etken mikroorganizmaların hızlı bir şekilde izole edilmesi ve tanımlanması gerekmektedir. Günümüzde sıklıkla kan kültürü şişelerinin üreme açısından devamlı olarak izlenebildiği otomatize kan kültürü sistemleri kullanılmaktadır (4).

Yapılan çalışmalarda, otomatize kan kültürü sistemlerinin bakteri üremesini hızlı bir şekilde saptadığı gösterilmiştir (5). Kontaminant mikroorganizmalara bağlı alınan sonuçlar ise klinik açıdan sorun oluşturmaktadır. Kan kültürü kontaminasyonu örnek alımı sırasında oluşan çoğunlukla normal cilt florasından kaynaklanan bir durumdur. Uzun süre hastanede kalış, gereksiz antibiyotik kullanımı ve mali yüke neden olmaktadır. Gerçek enfeksiyon etkenleriyle kontaminantlar arasındaki ayırım da güçlükle yapılabilmektedir (6,7).

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kan kültürleriyle ilgili parametreler sağlıkta kalite standartları kapsamında gösterge yönetiminin bir parçası olarak kabul edilmektedir. Göstergeler; performans ölçümü ve kalite iyileştirme amacıyla kullanılan araçlardır. Kontaminasyon oranı, pozitif sonuç verme oranı, tek şişe alınan kan kültürü sayısı, iki ve üzeri set alınan kan kültürü sayısı, Gram boyama ile son tanımlama arasındaki uyumsuzluk oranı, reddedilen örneklerin oranı ve yalancı pozitif sonuç verme oranı kan kültürü kalite göstergeleri içerisinde yer almaktadır (8).

Bu çalışmada, çeşitli kliniklerde yatan hastaların kan kültürü örneklerinde etken olan mikroorganizmaların dağılımının belirlenmesi ve sağlıkta kalite yönetim sistemine göre kalite göstergelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2020-Aralık 2022 tarihleri arasında kadın doğum ve çocuk hastalıkları hastanesinin yoğun bakım üniteleri ve servislerinden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen toplam 6556 kan kültürü örneği geriye dönük olarak değerlendirilmiştir. Kan kültürleriyle ilgili tüm veriler laboratuvar bilgi yönetim sistemi (LBYS) üzerinden taranarak elde edilmiştir. Kan kültürleri standart enfeksiyon kontrol önlemlerine uyularak periferik bölgelerin venöz damarlarından kan kültürü şişelerine alınmış ve mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Yenidoğan ve çocuk hastalarda pediatrik kan kültürü şişeleri kullanılmış ve bu hastalardan en az 1-2 ml kan alınmıştır. Üzerinde hastanın adı-soyadı, örnek numarası olmayan, etiketsiz veya hatalı etiketlenmiş şişeler, kırık/çatlak/sızdıran şişeler ve kan kültürü şişesinde gönderilmeyen kan örnekleri ilgili klinik aranıp yeni örnek gönderilmesi istenerek reddedilmiştir. Kan kültürü şişeleri 5 gün takip edilmek üzere BACT/ALERT 3D (bioMerieux, Fransa) otomatize sisteminde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda sinyal saptanmayan şişeler negatif kabul edilerek “üreme olmadı” olarak sonuç girilmiştir. Kan kültürü şişesine alınan kan miktarının az olması, örnek alınımının üzerinden iki saatten fazla süre geçmiş şişe gönderilmesi gibi durumlarda örnek işleme alınmış, üreme olmaması durumunda “yetersiz örnek” veya “teslim süresi gecikmiş örnek” ifadeleri kullanılarak yalancı negatif sonuç olabileceği rapor edilmiştir.

Pozitif sinyal veren kan kültürü şişeleri cihazdan çıkartılıp, biyogüvenlik düzey 2 kabini içerisinde işleme alınmıştır. Şişe başlığı dezenfektanla (%70 etanol) silinip, kuruması beklenmiş, mikroskopik inceleme için 1-2 damla kan örneği bir lama damlatılarak ince yayma preparatı hazırlanmış, Gram boyama yapılmış, immersiyon objektifiyle (X100) incelenmiştir. Eş zamanlı olarak bu örneklerin %5 koyun kanlı agar (KKA) (RTA, Türkiye), çikolata agar (ÇA) (RTA, Türkiye) ve gram-negatif seçici besiyeri olan eozin metilen blue agar (EMB) (RTA, Türkiye)

besiyerine tek koloni düşürme tekniğiyle ekimleri yapılmıştır. KKA ve ÇA besiyerleri %5 CO₂'li ortamda, EMB plakları normal atmosfer şartlarında, 35-37 °C'de 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Gram boyama sonucuna göre gerektiği takdirde ek besiyerlerine (Sabouraud dekstroz agar vb.) ekim yapılmış ve uygun inkübasyon şartlarında inkübe edilmiştir. Plaklar günlük kontrol edilmiştir. Kültür plaklarında üreyen kolonilere Gram boyama, oksidaz, katalaz ve koagülaz gibi konvansiyonel testler uygulanmıştır. Etken olarak kabul edilen mikroorganizmalar için VITEK 2 (bioMerieux, Fransa) otomatize sisteminde identifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT) çalışılmıştır. ADT, EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) önerileri doğrultusunda yorumlanmıştır (9). Koagülaz negatif stafilokoklar için metisilin direnci otomatize sistem sefoksitin tarama testi ve disk difüzyon testiyle EUCAST önerilerine göre belirlenmiştir.

Pozitif sinyal alınan fakat Gram boyamada bakteri görülmeyen ve kültürlerde üreme saptanmayan örneklerin otomatize sistem üzerinden üreme eğrisi incelenmiş, üreme eğrisinin mikrobiyal üremeyi göstermediği durumlarda yalancı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Gram boyamada görülen mikroorganizma ile kültür sonucunda identifiye edilen mikroorganizmanın farklı olması ise uyumsuz sonuç olarak bildirilmiştir. Yenidoğan ve 1 yaş altı hastalar dışındaki hastalardan tek şişe kan kültürü gönderilmesi durumunda örnek işleme alınmış, üreme olmaması durumunda test "yalancı negatif sonuç olabilir, en az iki set kan kültürü gönderilmelidir" olarak sonuçlandırılmıştır. İki set ve üzeri kan kültürü gönderilen hastaların ise ilk kültüründe cilt florası/kontaminant olduğu düşünülen bir bakteri ürettiğinde, diğer kan kültüründe de aynı etkenin üremesi durumunda her iki izolat için tür düzeyinde tanımlama ve ADT uygulanmış, tanımlama ve ADT sonuçları aynı olan izolatlar etken olarak kabul edilmiştir. Tanımlama veya ADT sonucu farklı olan izolatlar ise kontaminant olarak değerlendirilmiştir. Yenidoğan ve 1 yaş altı hastalarda tek kan kültür şişesinden izole

edilen mikroorganizmaya tür düzeyinde tanımlama ve ADT yapıp hastanın klinik ve laboratuvar bulguları göz önünde bulundurularak sonuçlandırılmıştır.

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 (SPSS INC, Chicago, IL, ABD) programıyla gerçekleştirilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler frekans ve yüzde, ortalama±SS ile sunulmuştur. Kategorik veriler arasındaki ilişkilerin saptanması için ki-kare analizi kullanılmıştır. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:21.07.2023, Karar no: 2023/4428).

BULGULAR

Bu çalışmaya Ocak 2020-Aralık 2022 tarihleri arasında Dr. Ali Kemal Belviranlı Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesinin yoğun bakım üniteleri ve servislerinden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen toplam 6556 kan kültürü örneği dahil edilmiştir. Hastaların 2755'i (%42,0) kadın, 3801'i (%58,0) erkek olduğu belirlenmiştir. Yaş ortalaması 1.14±0,53 yıl olarak hesaplanmıştır. Hastaların büyük çoğunluğunu 0-1 yaş grubu (%91,2) oluşturmuştur. Bunu sırasıyla 2-5 (%4,5), 6-14 (%3) ve 15-18 yaş grubu (%0,9) takip etmiştir. Çalışmaya dahil edilen 18 yaş üstü hastaların oranı ise %0,4 tespit edilmiştir.

Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen toplam 6556 kan kültürü örneğinin 534 (%8,1)'ünde üreme saptanmıştır. Uyumsuz bulunarak reddedilen örnek sayısı 43 (%0,7) belirlenmiştir. Kontaminasyon gözlenen kan kültürü sayısı ise 120 (%1,8) olarak bulunmuştur. Yalancı pozitiflik sadece altı örnekte (%0,1) gözlenmiş olup, Gram boyama ile son tanımlama arasında uyumsuz sonuç hiçbir örnekte saptanmamıştır. Tek şişe olarak gönderilen kan kültürü oranı ise %88.4 olmuştur.

Kan kültürü göstergelerinin kliniklere göre dağılımına bakıldığında çocuk yoğun bakım ünitesi (%53,6) ve çocuk servislerinde (%40,1) iki set ve üzeri kan kültürü alım oranlarındaki yükseklik diğer servislere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir

($p < 0,001$). Yenidoğan yoğun bakım ünitesinden gelen kan kültürü örneklerinin tek şişe alım, kontaminasyon, pozitif sonuç verme ve reddedilme oranının diğer kliniklerden gelen örneklerin oranına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (Tablo 1). Bu bulgularla orantılı olarak 0-1 yaş grubunda olan hastalarda tek şişe

kullanım oranı daha yüksek (%95,3) iken 2-5 yaş grubu hastalarda iki set kullanım oranı daha yüksek (%20,8) bulunmuştur. Kontaminasyon, reddedilen örnek ve üreme olan örnek oranları 0-1 yaş grubunda diğer yaş gruplarına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (Tablo 2) ($p = 0,002$).

Tablo 1. Kan kültürü göstergelerinin kliniklere göre dağılımı

Klinik	Üreme saptanması		Kontaminasyon		Red		Tek şişe		İki ve üzeri şişe		Yalancı Pozitiflik		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
YYBÜ ¹	263	49,3	40	33,3	28	65,1	3963	68,4	0	0	5	83,3	
ÇYBÜ ^{2*}	60	11,2	19	15,9	0	0	0	0	407	53,6*	0	0	
Çocuk servisleri*	199	37,3	60	50	15	34,9	1769	30,5	305	40,1*	1	16,7	<0,001*
Acil servis	8	1,5	1	0,8	0	0	64	1,1	19	2,5	0	0	
KHDS ³	4	0,7	0	0	0	0	0	0	28	3,7	0	0	
Diğer ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,1	0	0	
Toplam	534	100	120	100	43	100	5796	100	760	100	6	100	

*: $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

YYBÜ¹: Yenidoğan yoğun bakım ünitesi

ÇYBÜ²: Çocuk yoğun bakım ünitesi

KHDS³: Kadın hastalıkları ve doğum servisleri

Diğer⁴: Çocuk cerrahisi, dahiliye vb.

Tablo 2. Kan kültürü göstergelerinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grupları	Üreme saptanması		Kontaminasyon		Red		Tek şişe		İki ve üzeri şişe		Yalancı Pozitiflik		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
0-1	496	92.9	105	87.5	42	97.7	5525	95.3	451	59.3	5	83.3	
2-5*	22	4.1	4	3.3	0	0	139	2.4	158	20.8*	0	0	
6-14	7	1.3	7	5.9	1	2.3	112	1.9	87	11.4	1	16.7	
15-18	5	0.9	4	3.3	0	0	18	0.3	38	5	0	0	
18 yaş üstü	4	0.8	0	0	0	0	2	0.1	26	3.4	0	0	
Toplam	534	100	120	100	43	100	5796	100	760	100	6	100	0.002*

*: $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

Kontaminasyon oranları başta olmak üzere diğer kan kültürü göstergeleri açısından erkek hastalarda kızlara göre daha yüksek oranlar elde edilmiş olsa da cinsiyet ve bu parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 3) ($p=0,900$).

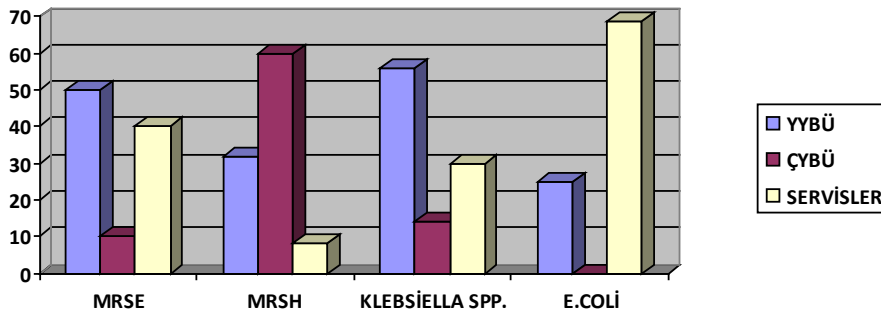
Kan kültürlerinden izole edilen ve etken olarak kabul edilen mikroorganizmaların ($n=407$) %76,2'sini koagülaz negatif stafilokoklar oluşturmuştur. Bunların 338'i (%83) metisiline dirençli olarak saptanmıştır. Metisiline dirençli *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) %35,4 oranıyla en sık izole edilen bakteri bulunmuştur. Bunu %15,7 oranıyla Metisiline dirençli *Staphylococcus hominis* izlemiştir. Gram negatif bakterilerden en sık izole edilen *Klebsiella* spp'dir (%6,2) Non-fermentatif bakteriler (%2,3) ve *Candida*

spp. (%0,9) ise kan kültürlerinden nadir izole edilen mikroorganizmalar olmuştur (Tablo 4).

MRSE yenidoğan yoğun bakım ünitesinde diğer mikroorganizmalara göre daha yüksek oranda (%53) gözlenirken, Metisilin dirençli *S. hominis* çocuk yoğun bakım ünitesinde yüksek oranlarda (%56) görülmüştür. Gram negatif bakterilerden *Klebsiella* spp.nin (%58) yenidoğan yoğun bakım ünitesinde daha sık görüldüğü, *Escherichia coli*'nin (%68) ise daha çok çocuk ve erişkin servislerinden izole edildiği saptanmıştır. Mikroorganizmaların kliniklere göre dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,001$). Şekil 1'de kan kültürlerinde sıklıkla üreyen mikroorganizmaların kliniklere göre dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 3. Kan kültürü göstergelerinin cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Üreme saptanması		Kontaminasyon		Red		Tek Şişe		İki set ve üzeri		Yalancı Pozitiflik		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Erkek	314	58,8	71	59,2	23	53,5	3382	58,4	419	55,1	2	33,3	0,900
Kadın	220	41,2	49	40,8	20	46,5	2414	41,6	341	44,9	4	66,7	
Toplam	534	100	120	100	43	100	5796	100	760	100	6	100	



Şekil 1. Kan kültürlerinde sıklıkla üreyen mikroorganizmaların kliniklere göre dağılımı

MRSE*: Metisilin dirençli *Staphylococcus epidermidis*, MRSH**: Metisilin dirençli *Staphylococcus hominis*

E.COLİ***: *Escherichia coli*, YBÜ: Yenidoğan yoğun bakım ünitesi

ÇYBÜ: Çocuk yoğun bakım ünitesi, SERVİSLER: Kadın hastalıkları ve doğum, Çocuk cerrahisi ve dahiliye servisleri.

Tablo 4. Kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmaların dağılımı

MİKROORGANİZMA	n	%
KOAGÜLAZ NEGATİF STAFİLOKOK	407	76.2
MR ¹ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	189	35.4
MR <i>Staphylococcus hominis</i>	84	15.7
MR <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	41	7.7
MR KNS ² (Diğer): <i>S³. capitis</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. lentus</i>	24	4.5
MS ⁴ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	38	7.1
MS <i>Staphylococcus hominis</i>	24	4.5
MS KNS (Diğer): <i>S. capitis</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. lentus</i>	7	1.3
<i>Streptococcus spp.</i>	25	4.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	3.8
<i>Enterococcus spp.</i>	8	1.5
Diğer:(<i>Listeria monocytogenes</i> ve <i>Rothia mucilaginosa</i> vb)	4	0.7
ENTEROBACTERALES	53	9.9
<i>Klebsiella spp.</i>	33	6.2
<i>Escherichia coli</i>	16	3
Diğer: <i>Enterobacter cloacae</i> complex, <i>Citrobacter braakii</i>, <i>Proteus mirabilis</i>, <i>Salmonella spp. group</i> vb.	4	0.7
NON FERMENTATİFLER	12	2.3
<i>Acinetobacter spp.</i>	7	1.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0.4
Diğer: <i>Morexella spp.</i> ve <i>Sphingomonas paucimobilis</i> vb.	3	0.6
MANTAR	5	0.9
<i>Candida spp.</i>	5	0.9
Toplam	534	100

MR¹:Metisilin dirençli, KNS²: Koagülaz Negatif Stafilokok, S³:Staphylococcus MS⁴: Metisilin duyarlı

TARTIŞMA

Sağlıkta kalite değerlendirmeleri kapsamında kan kültürlerinde gösterge adı altında ayrıntılı incelemeler yapılmaktadır. Kan kültürü kontaminasyon oranı da kalite göstergelerinden biridir ve laboratuvarlarda periyodik olarak izleminin yapılması gerekmektedir (8). Kontaminasyonun en önemli nedeni, cilt florasında bulunan mikroorganizmaların kan kültürü şişelerine inokülasyonudur ve sıklıkla preanalitik süreçte meydana gelmektedir. Rehberlerde kabul edilebilir kontaminasyon oranının %3'ün altında olması gerektiği bildirilmiştir (10-13). Bu çalışmada kan kültürü kontaminasyon oranı (%1,8) ideal sınırlar içerisinde bulunmuştur. Ülkemizde yapılan farklı yaş gruplarından hastaları kapsayan çalışmalarda kontaminasyon oranları %8,1-17,8 arasında bildirilmiştir. Sınır değerin üzerinde saptanan bu oranların kan kültürü alımı sırasında enfeksiyon kontrol önlemlerine yeteri kadar uyulmamasına ve eğitilmiş personel sayısının yetersizliğine bağlı olabileceği düşünülmüştür (3,10,14). Bu çalışmada yenidoğan yoğun bakımdan gelen kan kültürü örneklerinde kontaminasyon oranının diğer kliniklerden gelen örneklerin oranına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar yoğun bakım, acil servis ve hemodiyaliz ünitelerinde hasta yoğunluğunun fazla olması, eğitilmiş personel sayısının yetersizliği ve cihazların dekontaminasyonundaki eksiklikler gibi faktörlerle ilişkili olarak kontaminasyon oranlarının diğer servislere göre daha yüksek olduğunu vurgulayan çalışmaların verilerine benzerlik göstermiştir (2,3,6,15).

Hindistan'da 2020 yılında yapılan bir çalışmada; 56-75 yaş grubunda en yüksek kontaminasyon oranlarına rastlandığı rapor edilmiştir (2). Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada elde edilen veriler de bu sonuçları desteklemiştir (1). Bu sonuçlara benzer şekilde bir üniversite hastanesinde yapılan bir çalışmada; 60-79 yaş grubunda kontaminasyon oranları diğer yaş gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur (15). Bildirilen bulgulardan farklı

olarak bu çalışmada 0-1 yaş grubunda saptanan kontaminasyon oranlarının diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Hem ileri yaşlarda hem de bebeklerde kontaminasyon oranlarının yüksek olması her iki popülasyonda da venöz kan alımındaki güçlüklerle bağlı antiseptik uygulamalarının sağlanamamasıyla ilişkili olabilir. Kore'de bir çocuk hastanesinde yapılan çalışmada elde edilen bulgular, bu çalışmanın verilerini desteklemiştir ve kan kültürü alımı gibi invazif girişimlerde yaş grubu azaldıkça hasta uyumunun da azaldığını ortaya koymuştur (6).

Bu çalışmada, kan kültürlerinde kontaminasyon oranlarıyla birlikte üreme saptanması, reddedilme oranı gibi kalite göstergelerinde erkeklerde kızlara göre daha yüksek oranlar elde edilmiş olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Elde edilen bu veriler yapılan bazı çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur (3,6).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, kan kültürlerinde reddedilen örnek oranı %1,7 olarak bulunmuş, preanalitik dönemde oluşan hataların laboratuvar hatalarına dönüşmemesi için uygunsuz örneklerin reddedilmesi gerektiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada diğer bir kalite göstergesi olan Gram boyama ile son identifikasyon arasındaki uyum oranı ise %95-99 arasında saptanmış, Gram boyamanın hızlı sonuç veren, düşük maliyetli ve doğruluk oranı yüksek bir yöntem olarak tanıya katkı sağladığı sonucuna varılmıştır (14). Bu çalışmada reddedilen örneklerde daha düşük bir oran (%0,7) elde edilmiş olsa da reddedilen örneklerin tanıda gecikmeye, tedavi sürecinin uzamasına, artmış finansal yüke ve iş gücü kaybına neden olmasından dolayı bu oranların periyodik olarak izleminin yapılması, düzeltici-önleyici faaliyetler gerçekleştirilerek en aza indirgenmesi gerekmektedir. Ayrıca, Gram boyama ile son tanımlama arasında uyumsuz sonuç hiçbir örnekte saptanmamıştır. Gram boyamayla elde edilen sonucun zaman kaybetmeden kliniğe bildirilmesiyle antimikrobiyal seçimine ve tedavi sürecine katkıda bulunulduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda, hastadan alınan kan kültürü

seti sayısının hastanın klinik durumuna ve şüphelenilen enfeksiyona göre değişebileceği bildirilmekte, etken mikroorganizmanın yorumlanması ve tedavi kararının belirlenmesi için iki set ve üzeri kan kültürü alımı önerilmektedir. Tek kan kültürü seti ise yeni doğan dönemi hariç önerilmemektedir (3,12,16). Bu çalışmada tek şişe kan kültürü alım oranı yenidoğan yoğun bakım ünitesinde diğer kliniklerden daha fazla bulunmuştur. Çocuk yoğun bakım ve çocuk servislerinde ise iki set ve üzeri alınan kan kültürü oranındaki istatistiksel olarak anlamlı artış, bu oranın ilerleyen yaş gruplarında yükseldiğini göstermiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise yenidoğan yoğun bakım ünitesinde de iki set kan kültürü alımının etken olan patojenin daha iyi ayırt edilmesini sağladığı ve antibiyotik tedavisini yönlendirmeye katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (16). Bu çalışmanın verilerine benzer şekilde tek şişe alınan kan kültürlerinin çoğunlukla yenidoğan ve çocuk servislerinden gönderildiği bildirilen başka bir çalışmada, pediatrik popülasyondan kan almanın zorluklarının yanısıra etken-kontaminant ayrımının yapılmasında laboratuvar-klinik işbirliğinin önemine dikkat çekilmiştir (14).

Ülkemizde kan kültürü testleriyle ilgili yapılan farklı çalışmalarda mikroorganizma üreme oranı %7,5-29,4 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (3,4,10,14,17). Bu çalışmada saptanan üreme oranının (%8.1) da bu sonuçlara benzer olduğu görülmüştür. Yurt dışında yapılan bir çalışmada ise daha düşük bir oran (%6) elde edilmiş olup, bu durumun kültür alımından önce antibiyotik kullanımı, yetersiz örnek alımı ve örneğin laboratuvara transfer süresinin uzaması gibi preanalitik faktörlerle ilişkili olduğu belirtilmiş ve gerekli önlemlerin alınması gerektiği vurgulanmıştır (18).

Koagülaz negatif stafilocoklar, pediatrik popülasyon başta olmak üzere farklı yaş gruplarındaki hastalardan alınan kan kültürlerinden en sık izole edilen mikroorganizmalar olarak belirlenmişlerdir (4,10,17,19-21). Bazı çalışmalarda ise en sık izole edilen kontaminantlar olarak kabul edilmişlerdir

(1,6,7,15,16). Kan kültürlerinde üreyen bu bakterilerin etken-kontaminant ayrımının yapılamaması, klinik ve laboratuvar açısından zorlu bir süreç olarak tanımlanmış, bu ayrımın yapılmasında altın standart bir yöntem bulunamamıştır (1,3,10-12).

Son yıllarda koagülaz negatif stafilocoklar özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni önemli nozokomiyal patojenler olarak kabul edilmektedir. Biyofilm oluşturmaları, adezin genleri ve mecA genine bağlı olarak kazanılmış metisilin direnci sonucu tüm beta laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları bu bakterilerin patojenitesine katkıda bulunmaktadır (12,22). Metisilin direnci bu çalışmada %83 bulunurken, ülkemizde yapılan çalışmalarda %73-89,2 arasında değişen benzer oranlar bildirilmiştir (4,17,21,23,24). Yenidoğan kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole edilen mikroorganizmaları kapsayan çalışmalarda bu çalışmanın bulgularıyla uyumlu olarak en sık koagülaz negatif stafilocoklar izole edilmiş bunu *Klebsiella* spp. veya *E. coli* izlemiştir. Non-fermentatif bakterilerin ise daha az sıklıkta izole edildiği saptanmıştır (19,20). Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda, çocuk hastaların kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilocokları, *Klebsiella* spp. *Enterococcus* spp., ve *Salmonella* spp.'nin izlediği gözlenmiştir (17,21). Başka bir çalışmada ise farklı yaş gruplarındaki hastalardan alınan kan kültürlerinden izole edilen bakteriler içerisinde ilk sırada *E. coli*'nin, ikinci sırada ise *S. aureus*'un yer aldığı rapor edilmiştir (24). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından oluşturulmuş olan Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) raporunda da 2016 yılı verilerine göre *E. coli*, kan kültürlerinden en sık izole edilen Gram negatif bakteri olarak bildirilmiştir (25). İran'da yapılan bir çalışmada ise yenidoğanda kan dolaşımı enfeksiyonlarından en sık izole edilen bakteriler *Pseudomonas aeruginosa* ve *S. aureus* olarak bulunmuştur (7). Kanada'da yapılan bir çalışmada bakteremi epidemiyolojisinin aşılama ve antimikrobiyal profilaksi prosedürlerine göre ülkeden ülkeye değişebileceği rapor edilmiştir (5).

Bu sonuçlar ışığında kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizma profilinin hastaların yaş grubuna, bağışıklık durumuna göre değişebileceği gibi ülkeden ülkeye hatta bir ülkede bölgeden bölgeye göre farklılık gösterebileceği sonucu çıkarılabilir.

Bu çalışma, bir dal hastanesinde gerçekleştirilen ve örnekleminin büyük çoğunluğunu 0-1 yaş grubu hastaların oluşturduğu bir çalışmadır. Kan kültürü örneklerinin önemli bir kısmı tek şişe olarak gönderilmiş olup, kontaminant/gerçek etken ayırımı için üremelere ek olarak hastanın diğer test parametreleri ve kliniğinin de dikkate alınması gerekmektedir. Ayrıca, belirli bir popülasyonu içeren tek merkezli bir çalışma olması da bu çalışmanın kısıtlılığıdır. Farklı yaş gruplarını içeren daha büyük ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır. Kısıtlılıklarına rağmen bölgemizde kan kültürü göstergelerinde

belirlenen oranları rapor eden ve ilerleyen dönemlerde yapılacak çalışmalara yön verecek değerli veriler içeren nadir bir çalışma olduğu düşünülmektedir.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında başta kontaminasyon oranları olmak üzere kan kültürleriyle ilgili tüm kalite göstergelerinin periyodik olarak izlemi yapılmalıdır. Preanalitik, analitik ve postanalitik süreçlerle ilgili önlemler alınarak bildirilen bu oranların ideal sınırlar içerisinde olması sağlanmalıdır. Sağlık personeline dezenfeksiyon/antisepsi ve enfeksiyon kontrol önlemlerine uyulması konularında eğitim verilmelidir. Eğitimlerde kan kültürü alımı sürecinden başlayarak etken-kontaminant ayırımının yapılmasına kadar tüm aşamalarda laboratuvar-klinik işbirliğinin önemi vurgulanmalıdır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:21.07.2023, Karar no: 2023/4428).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Hemeg HA, Almutairi AZ, Alharbi NL. Blood culture contamination in a tertiary care hospital of Saudi Arabia. *Saudi Med J*, 2020; 41 (5): 508-15.
2. Gunvanti R, Lakshmi JT, Ariyanachi K. Blood culture contamination rate as a quality indicator - A prospective observational study. *J Clin Med*, 2022;17(2):311-16.
3. Arı N, Şölen EY, Yılmaz N. Kan kültüründe kalite yönetim sisteminin önemi: Kontaminasyon oranları. *Turk J Clin Lab*, 2021; 4: 446-50.
4. Atik TK, Özel Y, Yılmaz U, Ünlü M, Ünlü GV. Kan kültürlerinden soyutlanan bakterilerin tanımlanması ve antimikrobiyal direnç oranlarının saptanması. *ANKEM Derg*, 2021;35(2):53-62.
5. Lefebvre CE, Renaud C, Chartrand C. Time to positivity of blood cultures in infants 0 to 90 days old presenting to the emergency department: Is 36 Hours Enough? *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2017;6(1):28-32.
6. Min H, Park CS, Kim DS, Kim KH. Blood culture contamination in hospitalized pediatric patients: A single institution experience. *Korean J Pediatr*, 2014; 57: 178-85.
7. Hashemizadeh Z, Bazargani A, Davarpanah MA. Blood culture contamination in a neonatal intensive care unit in Shiraz, Southwest-Central Iran. *Med Princ Pract*, 2011;20:133-36.
8. Sağlıkta Kalite Standartları, Gösterge Yönetimi Rehberi, Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, Sağlıkta Kalite, Akreditasyon ve Çalışan Hakları Dairesi Başkanlığı. (Sürüm 2.3), 2023.
9. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version: 12, Danimarka: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
10. Şirin MC, Ağuş N, Yılmaz N. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2017; 74(3): 269 -78.
11. Sidhu SK, Malhotra SK, Devi P, Tuli AK. Significance of coagulase negative Staphylococcus from blood cultures: Persisting problems and partial progress in resource constrained settings. *Iran J Microbiol*, 2016;8 (6):366-71.
12. Osaki S, Kikuchi K, Moritoki Y. Distinguishing coagulase-negative Staphylococcus bacteremia from contamination using blood-culture positive bottle detection pattern and time to positivity. *J Infect Chemother*, 2020;26: 672-5.
13. KLİMUD. Klinik örnekten sonuç raporuna uygulama rehberi, kan dolaşımı örnekleri, Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği, Ankara: KLİMUD; 2022.
14. Öksüz Ş, Dönmez B, Keskin BH. Evaluation of quality assurance indicators and contamination rate in blood culture. *Konuralp Med J*, 2021;13(3): 557-62.
15. Aiesh BM, Daraghme D, Nasreen Abu-Shamleh N. Blood culture contamination in a tertiary care hospital: A retrospective three-year study. *BMC Infect Dis*, 2023;23:448.
16. Konak M, Kılınc MY, Dikmen İ. Double blood culture policy is more effective than single in neonatal intensive units. *J Contemp Med*, 2022;12(6):866-71.
17. Yiş R. Evaluation of blood cultures in a children's hospital located in Southeastern Anatolia. *Turk Pediatri Ars*, 2015; 50: 102-7.
18. Saavedra JC, Fonseca D, Abrahamyan A. Bloodstream infections and antibiotic resistance at a regional hospital, Colombia, 2019-2021. *Rev Panam Salud Publica*, 2023;47:1-5.
19. Alzahrani HA, Ismail KA, Shbat M. Identification of microorganisms causing neonatal sepsis and their antibiotic susceptibility. *Int J Med Res Health Sci*, 2023 12(2): 21-34.
20. Bennaoui F, El Idrissi Slitine N, Benbahia A, Soraa N, Maoulainine FMR. Blood culture: Profile of bacterial infections of newborns admitted from maternity. *Open J Bacteriol*, 2018;2(1): 1-3.

21. Ergül AB, Işık H, Altıntop YA, Torun YA. Bir çocuk yoğun bakım biriminde kan kültürlerinin geriye dönük değerlendirilmesi: Üç yıllık sonuçlar. *Türk Pediatri Ars*, 2017; 52: 154-619.
22. Papadimitriou-Olivgeri I, Giornezis N, Papadimitriou-Olivgeris M. Number of positive blood cultures, biofilmformation, and adhesion genes in differentiating true coagulase-negative staphylococci bacteremia from contamination. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016; 35:57-669.
23. Er İ, Çetin C, Baydemir C, Arslan U. Yenidoğan yoğun bakım hastalarının kan kültüründeki koagülaz negatif stafilokok üremeleri: Enfeksiyon Mu? Kontaminasyon Mu? *Fırat Med J*, 2020; 25 (2): 79-85.
24. Müderris T, Yurtsever SG, Baran N. Kan kültürlerinde izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin son beş yıldaki değişimi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2019; 76(3): 231-42.
25. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi Yıllık Raporu. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2016.

HBsAg negatif bağış kanlarında izole anti-HBc pozitifliği ve okült HBV enfeksiyonu araştırılması

Investigation of isolated anti-HBc positivity and occult HBV infection in HBsAg negative donated blood

Murat AFYON¹ (ID), İsmail Yaşar AVCI² (ID), Cumhuri ARTUK² (ID)

ÖZET

Amaç: Okült HBV enfeksiyonu (OHB), enfeksiyonun pencere dönemi dışında güncel duyarlı testler ile HBsAg negatif bireylerin karaciğer dokusunda HBV DNA varlığı (serumda tespit edilebilen veya edilemeyen HBV DNA ile) olarak tanımlanabilir. Bu çalışma bağış kanlarının HBsAg negatif plazma örneklerinde anti-HBc, HBV DNA polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve anti-HBs çalışılarak izole anti-HBc pozitifliği OHB araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: 19 Mart 2010 ve 28 Nisan 2010 tarihleri arasında yapılan HBsAg, antiHCV ve antiHIV negatif 1063 bağış kanının Ulusal Kan ve Kan Ürünleri Rehberi gereği bir yıl süre ile -80 °C'de saklanmış plazma örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen bütün plazma örneklerinde anti-HBc ve HBV DNA PCR çalışılarak OHB araştırılmıştır. Anti-HBc ve/veya HBV DNA PCR pozitif örneklerde ise anti-HBs çalışılmıştır.

Bulgular: Çalışmada 87 (%8,2) donör plazma örneğinde anti-HBc pozitifliği saptanmıştır. Anti-HBc pozitif donörlerin yaş ortalamasının 30±11,5 yıl, izole

ABSTRACT

Objective: Occult HBV infection (OHI) can be defined as the presence of HBV DNA in the liver tissue of HBsAg negative individuals (with detectable or undetectable HBV DNA in the serum) by current sensitive tests, except window period of infection. This study was carried out to investigate isolated anti-HBc positivity and OHI, by using anti-HBc, HBV DNA PCR and anti-HBs, in the plasma samples of HBsAg negative donated blood.

Methods: The one thousand and sixty three plasma samples of HBsAg, anti-HCV and anti-HIV negative blood which were donated between 19 March and 28 April 2010 stored at -80 °C for one year in accordance with National Blood and Blood Products Guide, were included in the study. OHB was investigated by using anti-HBc and HBV DNA PCR in all plasma samples which were included in the study. In anti-HBc and/or HBV DNA PCR positive samples, anti-HBs investigation was conducted.

Results: Anti-HBc positivity was detected in 87 (8.2%) donor plasma samples. The mean age of anti-

¹Deniz Kuvvetleri Komutanlığı Sağlık Şube Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Murat AFYON

Deniz Kuvvetleri Komutanlığı Sağlık Şube Müdürlüğü, Çankaya / Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : afyon.m7617@dzkk.tsk.tr

Geliş Tarihi / Received : 01.03.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 27.12.2023

anti-HBc pozitif donörlerin $38\pm 15,9$ yıl ve anti-HBc ve titreye bakılmaksızın anti-HBs pozitif donörlerin yaş ortalamasının ise $28,8\pm 10,4$ yıl olarak tespit edilmiştir. İzole anti-HBc pozitiflik oranının %1,03 (n=11) olduğu ve anti-HBs ile birlikte pozitifliğe göre anlamlı olarak ileri yaşta görüldüğü bulunmuştur (p=0,047). Donör plazma örneklerinin hiçbirinde HBV DNA PCR pozitifliği saptanmamıştır.

Sonuç: Kan merkezine başvuran donörlerde izole anti-HBc pozitiflik oranı Türkiye’de kan donörlerinde daha önce yapılmış çalışmalara göre düşük bulunmuştur. Her ne kadar yasal zorunluluk olmasa da Türkiye’de de Kızılay Bölge Kan Merkezleri 1 Kasım 2014 tarihi itibarı ile bağış kanlarında nükleik asit amplifikasyon testleri (NAT) çalışmaya başlamış olup kan donörlerinin taranmasında HBsAg’ye ek olarak anti-HBc ve/veya nükleik asit amplifikasyon testlerinin kullanımının gerekli olduğunu ve konuya ilişkin geniş ölçekli çalışmaların yapılmasının uygun olacağını değerlendirmektediriz.

Anahtar Kelimeler: Kan donörü, HBV DNA PCR, okült HBV enfeksiyonu

HBc positive donors or isolated anti-HBc positive donors or anti-HBc/anti-HBs positive donors were; $30\pm 11,5$ years, $38\pm 15,9$ years and $28,8\pm 10,4$ years, respectively. Among all plasma samples included in the study; the rate of isolated anti-HBc positivity was 1.03% (n=11) and isolated anti-HBc positivity was seen significantly in older age, compared to anti-HBc positivity with anti-HBs positivity (p=0.047). As a result of this study, HBV DNA PCR positivity was not detected in any of the donor plasma samples.

Conclusion: The rates of isolated anti-HBc positivity in blood donors admitted to our center was found lower than earlier studies conducted among blood donors in Turkey. In Turkey, although there is no legal obligation, Kızılay Regional Blood Centers have started to work on NAT in onated blood as of 1 November 2014. We suggest that large-scale studies to investigate the use of antiHBc and/or nucleic acid amplification tests in addition to HBsAg for screening of blood donors.

Key Words: Blood donor, HBV DNA PCR, occult HBV infection

GİRİŞ

Hepatit B Virüsü (HBV) enfeksiyonunun iyileşmesi, klasik bilgilerde Hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg) kaybolması ile birlikte HBV deoksiribonükleik asidinin (HBV DNA) negatifleşmesi olarak tanımlanmaktadır (1). Ancak yapılan çalışmalarda pencere dönemi dışında, HBsAg negatif iken diğer serolojik belirteçlerin varlığında veya yokluğunda kan veya dokularda HBV DNA varlığı gösterilmiş olup okült HBV enfeksiyonu (OHB) pencere dönemi dışında güncel duyarlı testler ile HBsAg negatif bireylerin karaciğer dokusunda HBV DNA varlığı (serumda tespit edilebilen veya edilemeyen HBV DNA ile) olarak tanımlanmıştır (2-8).

HBV replikasyonunda viral prekürsörlerin sentezi için kalıp görevi gören uçları kovalent olarak birbirine bağlı kapalı çembersel DNA’nın (cccDNA) hepatosit çekirdeğinde uzun süreli varlığının OHB’nin moleküler temelini oluşturduğu genel bir görüştür. OHB oluşumu multifaktöryel olarak değerlendirilmekle birlikte bu duruma neden olan muhtemel mekanizmalar HBV genomunda mutasyonlar, koenfeksiyon, apolipoprotein B messenger ribonükleik asit (mRNA) editing enzyme catalytic polypeptide (APOBEC) ile HBV replikasyonunun baskılanması, konak immün cevabı, epigenetik değişiklikler, konak genomuna integrasyon, immünkompleks oluşumu ve periferik kan mononükleer hücrelerinde HBV enfeksiyonu başlıkları altında sıralanabilir (6, 9).

Antikor profiline göre OHB, seropozitif (anti-HBc ve/veya anti-HBs pozitif) veya seronegatif (anti-HBc ve anti-HBs negatif) olarak iki gruba ayrılabilir (6). HBsAg ve anti-HBs negatifliğinde anti-HBc pozitifliği izole anti-HBc pozitifliği olarak değerlendirilmekte olup seropozitif OHB prevalansını etkileyen önemli bir etmen olduğu düşünülmektedir (10). İzole anti-HBc pozitifliği akut enfeksiyonun uzamış pencere dönemi, uzun yıllar süren HBV taşıyıcılığından sonra dolaşımdaki HBsAg'nin ölçülebilenden düşük seviyelere inmesi, HBV enfeksiyonundan iyileşme sonrası anti-HBs oluşan bireylerde uzun bir süre sonra anti-HBs'nin tespit edilemez hale gelmesi sonucunda veya değişen oranlarda (%35'e varan) yalancı pozitiflikler şeklinde görülebilir (3, 11).

Yapılan çalışmalarda OHB'nin kan transfüzyonu, hemodiyaliz ve organ transplantasyonu ile HBV bulaşı açısından risk oluşturduğu ve OHB'nin neden olabileceği olası transfüzyon ile HBV bulaşını, anti-HBc taranmasının önleyebileceğini belirten çalışmalar mevcuttur (3-6). Bulaşın önlenmesine yönelik anti-HBc kullanan ülkeler mevcut olsa da anti-HBc pozitif örneklerde değişen oranlarda yalancı pozitiflikler sonucu bağışçı kaybı, anti-HBc prevalansının %10'dan yüksek olduğu ülkelerde ek bağışçı kaybında artış, pencere dönemi bulaşlarını önlemede yetersizliği ve seronegatif OHB bulaşını da önleyememesi anti-HBc'nin tarama testi olarak kullanımında karşımıza çıkan problemler olarak tariflenmektedir (12-14).

Türkiye'de kan donörlerinin taranmasında HBsAg'ye ek olarak anti-HBc ve/veya nükleik asit amplifikasyon testlerinin kullanımına yönelik bir yasal zorunluluk olmamakla birlikte bu çalışmada bağış kanlarının HBsAg negatif plazma örneklerinde anti-HBc, HBV DNA polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve anti-HBs çalışılarak izole anti-HBc pozitifliği ve OHB araştırılması ve söz konusu testlerin gerekliliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Gülhane Askeri Tıp Fakültesi Kan Eğitim Merkezi ve Kan Bankası Müdürlüğü'ne 19 Mart 2010 ve 28

Nisan 2010 tarihleri arasında kan bağışı yapan ve HBsAg, HCV'ye karşı antikor (anti-HCV) ve human immundeficiency Virus (HIV)'e karşı antikor (anti-HIV) testleri mikropartikül Enzyme Immunoassay (Abbott, Amerika Birleşik Devletleri) yöntemi ile negatif olarak tespit edilen 1063 adet bağışçının Ulusal Kan ve Kan Ürünleri Rehberi gereği bir yıl süre ile -80 °C'de saklanmış ve ilgili mevzuat gereği saklama süresi tamamlanmış şahit numunelerinden elde edilen plazma örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen numunelerde 16-31 Mayıs 2011 tarihleri arasında; bütün plazma örneklerinde anti-HBc ve HBV DNA PCR çalışılarak OHB araştırılmış ve anti-HBc ve/veya HBV DNA PCR pozitif örneklerde ise anti-HBs varlığı çalışılmıştır.

Anti-HBs ve anti-HBc serolojik belirteçlerini araştırmak amacıyla kemilüminesen mikropartikül immünassay prensibiyle çalışan Architect i2000 SR (Abbott/Almanya) cihazı, Architect anti-HBs ve anti-HBc II kitleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır.

HBV DNA'nın araştırılması için Gülhane Askeri Tıp Fakültesi Tıbbi Viroloji Bilim Dalı laboratuvarında önce DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrası dizayn edilen primerler ve prob (Tablo I) kullanılarak gerçek zamanlı PCR (Real-time PCR: RT-PCR) işlemi uygulanmıştır. RT-PCR için önce ince duvarlı ve cihazının optik okuyucusu için uygun olan 0,2 mililitrelik tüpler içinde her bir örnek için son hacmi 20 mikrolitre (μL) olacak şekilde PCR karışımı hazırlanmış ve içine 5 μL DNA çözültisi konulmuştur. Hazırlanan karışımlar RT-PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR döngüleri Kubar ve ark.'nın (15) çalışmasına göre uygulanmıştır (15). Amplifikasyon, verilerin elde edilmesi ve tüm analizler ABI PRISM 7700 Sequence Detector cihazı ile yapılmıştır. Standart dilüsyonların kullanıldığı reaksiyonlarda tipe özgül PCR'ın saptama duyarlılığı 10 plazmid/reaksiyon olarak bulunmuştur.

Anti-HBc pozitif tespit edilen bağışların yapıldığı tarihteki bağışçının yaşına kayıtlardan ulaşılarak izole anti-HBc pozitifliği ve anti-HBs pozitifliği ile birlikte olan anti-HBc pozitifliğinin yaş ile ilişkisini saptamaya

yönelik istatistiksel analizler için “Statistical Package for Social Sciences (SPSS)” 15.0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Kayıtlardan yaşına ulaşamayan altı bağışçı istatistiksel analizlerin dışında tutulmuştur. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogramlar) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Simirnov/Shapiro-Wilk testi) ile test edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Veri dağılımının normalliğine bağlı olarak sürekli değişkenleri karşılaştırmak üzere Mann-

Whitney U testi veya Student t testi kullanılmıştır. Analizlerde $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bu çalışma, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiş (Tarih:17.05.2010, Karar no: 1491-817-10/1539) ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Bilimsel Kurulu Başkanlığı'nca AR-2010/37 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tablo 1. HBV DNA PCR'da kullanılan primerler ve probu

Adı	Primerler* ve prob** (5'@3')	Amplikon uzunluğu (Baz çifti)
HBVP1	CAAAAATCCTCACAATACCRCA	
HBVP2	CAAAGAAAATTGGTAACAGCG	
HBVPR	FAM TGTGTCYTGCCWAAATTCGCAG BHQ	580

* R, W dejeneratif bazları göstermektedir (Wobble bazlar), burada R=A/G, W=A/T

** FAM ve BHQ proba ait floresan işaretlerdir.

BULGULAR

Çalışmamız sonucunda 87 plazma örneğinde (%8,18) anti-HBc pozitifliği tespit edilmiştir. Anti-HBc pozitif 87 bağışçı plazma örneğinden 11'inde (%12,64) anti-HBs negatif olarak bulunmuştur. Çalışmaya alınan tüm bağışçı plazma örnekleri içinde izole anti-HBc pozitiflik oranı %1,03 (11/1063) olarak belirlenmiştir.

Anti-HBc pozitif donörlerin yaş ortalaması $29,96 \pm 11,47$, izole anti-HBc pozitif donörlerin yaş ortalaması $38,09 \pm 15,90$ ve anti-HBc ve titreye bakılmaksızın anti-HBs pozitif donörlerin yaş ortalaması ise $28,85 \pm 10,41$ olarak tespit edilmiştir. İzole anti-HBc pozitif donörlerin yaş ortalamasının ile anti-HBc ve titreye bakılmaksızın anti-HBs pozitif donörlerin yaş ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,047$) yüksek olduğu bulunmuştur.

Çalışmamız sonucunda donör plazma örneklerinin hiçbirinde HBV DNA PCR pozitifliği belirlenmemiştir. Anti-HBc pozitif donör plazma örneklerinde HBV DNA PCR tekrarlanmış ancak yine bütün örneklerde negatif sonuç elde edilmiştir.

TARTIŞMA

HBV enfeksiyonunun tanısında kullanılan serolojik testler enfeksiyonunun akut veya kronik dönemlerinin ayrılmasında, enfektivitenin değerlendirilmesinde, immünitenin araştırılmasında ve kan ve organ donörlerinin taranmasında rutin olarak kullanılmaktadır (1). Anti-HBc'nin pozitifliği kişinin HBV ile karşılaştığını göstermekle birlikte akut, kronik veya eski enfeksiyonu birbirinden ayırt etmemektedir. Anti-HBc pozitiflik oranları çalışma yapılan bölgenin HBV prevalansına ve çalışılan

gruba bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Türkiye ve benzer endemisiteye sahip bölgelerde kan donörlerinde bildirilen HBsAg negatifken anti-HBc pozitiflik oranları %4,21-%18 arasında bildirilmiştir (11, 13, 14, 16-20). Çalışmamız sonucunda ise %8,18 oranında anti-HBc pozitifliği tespit edilmiştir.

HBsAg ve anti-HBs negatifliğinde anti-HBc pozitifliği izole anti-HBc pozitifliği olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamız sonucunda tüm HBsAg negatif bağışçı plazma örnekleri içinde izole anti-HBc pozitiflik oranı ise %1,03 (11/1063) olarak belirlenmiştir. Anti-HBc reaktif örneklerde değişen oranlarda (%35'e varan) yalancı pozitiflikler de elde edilmektedir (3, 11). Çalışmamıza dahil edilen bağışçı plazma örnek miktarlarının yetersiz olmasından dolayı çalışmamızda pozitif örneklerde anti-HBc tekrarlanamamıştır.

İzole anti-HBc pozitiflik oranları da çalışma yapılan bölgenin HBV prevalansına ve çalışılan gruba bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda; izole anti-HBc pozitifliği antiHCV pozitif hastalar ve hemodiyaliz hastaları gibi farklı hasta gruplarında %0-%13,6 arasında ve kan bağışçılarındaki ise %2-%2,5 oranında bildirilmiştir (14, 19, 21, 22). Diğer orta endemisite ülkelerinde yapılan bazı çalışmalarda ise izole anti-HBc pozitiflik oranları kan bağışçılarındaki %0,62-%1,93 arasında rapor edilmiştir (11, 16, 17). Bununla birlikte Türkiye'de yapılan bir diğer çalışmada ise çalışmaya dahil edilen 57 191 kan bağışçısının 5125 (%8,5)'inin anti-HBc test sonucu pozitif olduğu, bu kişilerden ulaşılabilenlerde bağışçı geri kazanım protokolü gereğince yapılan değerlendirme neticesinde ise izole anti-HBc pozitiflik oranının %7,5 (33/439) tespit edildiği belirtilmiştir (23).

Çalışmamız sonucunda kan bağışçılarındaki tespit edilen anti-HBc pozitiflik oranı (%8,18) ve izole anti-HBc pozitiflik oranı (%1,03) orta endemisite bölgelerinde alınmış sonuçlar ile benzer olarak görülmüştür. Ancak Türkiye'de kan donörlerinde daha önce yapılmış çalışmalara göre izole anti-HBc pozitiflik oranı düşük olarak değerlendirilmiştir. Bu

sonucun çalışmanın yapıldığı tarihte farklılık, bağış kanı ve bağışçı seçim kriterlerinde artan hassasiyetler, çalışmaya dahil edilen örnek büyüklüğünde ve anti-HBc çalışılan kitlerde farklılık nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamız sonucunda izole anti-HBc pozitif bağışçıların yaş ortalaması $38,09 \pm 15,90$ ve anti-HBc ile anti-HBs pozitif donörlerin yaş ortalaması ise $28,85 \pm 10,41$ olarak tespit edilmiştir. İstatiksel değerlendirme sonucunda iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,047$). Bu durumun geçirilmiş HBV enfeksiyonu sonrası ilerleyen yaşlarda anti-HBs titrelerinin düşmesi ve sonunda anti-HBc'nin tek belirteç olarak kalması nedeniyle olduğu düşünülmüştür. Farklı çalışmalarda anti-HBs titrelerinin ilerleyen yaşlarda anlamlı olarak düştüğü görülmüştür (24).

OHB, pencere dönemi dışında güncel duyarlı testler ile HBsAg negatif bireylerin karaciğer dokusunda HBV DNA varlığı (serumda tespit edilebilen veya edilemeyen HBV DNA ile) olarak tanımlanabilir ve bu bireylerde tespit edilebilirse serum HBV DNA düzeyi HBsAg pozitif kişilere göre anlamlı olarak düşük görülmüştür (genellikle 200 IU/mL) (4, 6). Çalışmamızda bağışçı plazma örneklerinin hiçbirinde, OHB veya HBV pencere dönemi varlığı düşündürcek HBV DNA PCR pozitifliği tespit edilmemiştir.

OHB hemodiyaliz hastalarında %0-%50, intravenöz ilaç bağımlılarında %45, hemofili hastalarında %51, karaciğer rezeksiyonu veya abdominal cerrahi sırasında karaciğer biyopsisi yapılarak intrahepatik HBV DNA varlığı araştırılan karaciğer hastalığı olmayanlarda %16 ve izole anti-HBc pozitifliği olan tip 2 diyabetik hastalarda %11 oranında bildirilmiştir (25-31). Türkiye'de ise farklı hasta gruplarında veya kan bağışçılarındaki yapılan çalışmalarda OHB prevalansı %0-%36,4 olarak bulunmuştur (19, 22, 23, 25, 31-34).

Transfüzyon ile ilişkili HBV bulaşını azaltmak amacıyla gönüllü bağışçıların tercihi, yeni duyarlı HBsAg testlerinin geliştirilmesi, tarama testi olarak anti-HBc veya titrasyonu, anti-HBs titrasyonu ve/veya NAT kullanımı şeklinde yaklaşımlar mevcuttur (35).

HBsAg testlerinde yenilikler olsa da özellikle kan bağışlarında HBV belirteci olarak tarama testlerinde sadece HBsAg'nin kullanımı yetersiz olduğu bilinmektedir (35). İzole anti-HBc pozitifliği durumunda HBV DNA pozitifliği oranının yüksek olmasından dolayı daha enfeksiyöz olduğu ve anti-HBc'nin OHB için bir ön tarama testi olabileceği düşünülmektedir (36). OHB'nin neden olabileceği olası transfüzyon ile HBV bulaşını anti-HBc taranmasının önleyebileceğini belirten pek çok çalışma mevcuttur (36). Ancak her ne kadar bazı ülkelerde kullanıyor olsa da ve bulaşı azalttığı gösterilmiş olsa da anti-HBc reaktif örneklerde değişen oranlarda yalancı pozitiflikler sonucu bağışçı kaybı, anti-HBc prevalansının %10'dan yüksek olduğu ülkelerde ek bağışçı kaybında artış, pencere dönemi bulaşlarını önlemede yetersizliği ve seronegatif OHB bulaşını da önleyememesi anti-HBc'nin tarama testi olarak kullanımında karşımıza çıkan problemler olarak tariflenmektedir (12-14, 35).

Anti-HBs içeren kan komponentinin transfüzyonu ile bulaş durumu halen tartışmalıdır (7). Anti-HBs'nin 100 IU/mL üzerinde hatta 1000 IU/mL ve üstünde varlığında bile HBV DNA pozitifliği gösterilmiştir (11). Avrupa Birliği'nde rehberlere göre anti-HBc pozitiflerden kan bağışı kabul edilmesi için bağışta HBV DNA negatif ve anti-HBs titresinin en az 100 IU/mL olması gerekmektedir (37).

Kan güvenliğini arttırmak amacıyla NAT, değişen örnek miktarları havuzlanarak minipool NAT (MP-NAT), tek serumda kullanılan individual NAT (ID-NAT), HCV, HIV ve HBV için ayrı ayrı, ikili (HIV/HCV) ve üçlü (HIV/HCV/HBV) multipleks sistemler şeklinde uygulanmaktadır. MP-NAT şeklinde bile NAT uygulamasının HBsAg'den daha etkin olduğu ve HBsAg öncesi veya sonrası pencere döneminde enfekte

bağışları ekarte edebildiği ve lisanslı güncel HBsAg testleri ile karşılaştırıldığında pencere döneminin MP-NAT ile 9-11 gün, ID-NAT ile 25-36 gün kısaldığı bildirilmiştir (38, 39). Gelişmiş ülkelerde zaten düşük olan transfüzyon bulaş riskini NAT'ın azalttığını, ancak sıfırlayamadığını da belirtmek gerekir. MP-NAT ve ID-NAT taramasına rağmen transfüzyonla HBV bulaşları meydana gelmiştir (40, 41). Her ne kadar yasal zorunluluk olmasa da Türkiye'de de Kızılay Bölge Kan Merkezleri 1 Kasım 2014 tarihi itibarı ile bağış kanlarında NAT çalışmaya başlamıştır.

Sonuç olarak; çalışmamız sonucunda kan bağışçılarında tespit edilen anti-HBc pozitiflik oranı (%8,18) ve izole anti-HBc pozitiflik oranı (%1,03) orta endemisite bölgelerinde alınmış sonuçlar ile benzer olarak görülmektedir. Ancak Türkiye'de kan donörlerinde daha önce yapılmış çalışmalara göre izole anti-HBc pozitiflik oranı düşük olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, HBV DNA PCR pozitifliği tespit edilmese de OHB'nin özellikle izole anti-HBc pozitifliği durumunda karşımıza çıkabileceği ve dalgalanmalar gösterebileceği bilinmektedir. OHB taşıyıcılarından özellikle transfüzyon yolu ile HBV bulaşını önlemek için endemik olan ve olmayan bölgelerde farklı stratejiler gerekmektedir. Düşük endemisiteye sahip bölgelerde anti-HBc taramasının uygulanma durumu halen tartışmalıdır. ID-NAT'ın sonunda HBsAg ve anti-HBc testlerinin yerini alıp almayacağını ise yapılacak çalışmalar gösterecektir. HBV endemik bölgelerde ise öncelik; geniş çaplı çalışmalar ile kan bağışçıları arasında OHB prevalansının tespit edilmesi ve sonrasında HBV bulaş riskini azaltmak amacıyla ID-NAT uygulanmasının maliyet etkinliğinin belirlenmesi olmalıdır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:17.05.2010, Karar no: 1491-817-10/1539).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Koziel MR, Thio CL. Hepatitis B virus and hepatitis D virus. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. USA: Churchill-Livingstone, 2010; 2059-87.
2. Hoofnagle JH, Seeff LB, Bales ZB, Zimmerman HJ. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *New Eng J Med*, 1978; 298 (25): 1379-83.
3. Hu KQ. Occult Hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepatit*, 2002; 9 (4): 243-57.
4. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vax Sanguinis*, 2004; 86 (2): 83-91.
5. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis*, 2002; 2(8): 479-86.
6. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2008; 49: 652-7.
7. Afyon M, Artuk C. Is occult Hepatitis B virus infection with detectable anti-HBs infectious or not? *Middle East J Dig Dis*, 2016; 8(2): 147-9.
8. Afyon M, Artuk C. Hepatit B virüs enfeksiyonunda atipik serolojik profiller. *TAF Preven Med Bull*, 2016; 15(3): 267-76.
9. Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*, 2012; 25(1): 142-63.
10. Minuk GY, Sun D, Uhanova J, Zhang M, Caouette S, Nicolle LE, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. *J Hepatol*, 2005; 42(4): 480-5.
11. Manzini P, Giroto M, Borsotti R, Giachino O, Guaschino R, Lanteri M, et al. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Haematologica*, 2007; 92(12): 1664-70.
12. Xu L, Wei Y, Chen T, Lu J, Zhu CL, Ni Z, et al. Occult HBV infection in anti-HBs positive young adults after neonatal HB vaccination. *Vaccine*, 2010; 28(37): 5986-92.
13. Kleinman SH, Kuhns MC, Todd DS, Glynn SA, McNamara A, DiMarco A, et al. Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti-HBc: implications for transfusion transmission and donor screening. *Transfusion*, 2003; 4 (6): 696-704.
14. Kaya S, Kesbiç H, Alanoğlu G, Arıdoğan BC, Çetin ES, Taş T, et al. Kan donörlerinde izole hepatit B virüs core antikörlerinin araştırılması. *Nobel Med*, 2009; 5 (Suppl 1): 17-21.
15. Kubar A, Saygun I, Yapar M, Ozdemir A, Slots J. Real-time PCR quantification of cytomegalovirus in aggressive periodontitis lesions using TaqMan technology. *J Periodont Res*, 2004; 39(2): 81-6.
16. Zervou EK, Dalekos GN, Boumba, DS, Tsianos EV. Value of anti-HBc screening of blood donors for prevention of HBV infection: results of a 3-year prospective study in Northwestern Greece. *Transfusion*, 2001; 41(5): 652-8.
17. Garcia-Montalvo BM, Farfa ´n-Ale JA, Acosta-Viana KY, Puerto-Manzano FI. Hepatitis B virus DNA in blood donors with anti-HBc as a possible indicator of active hepatitis B virus infection in Yucatan, Mexico. *Transfusion Med*, 2005; 15(5): 371-8.
18. Arraes LC, Ximenes R, Andrieu JM, Lu W, Barreto S, Pereira LM, et al. The biological meaning of anti-HBc positive result in blood donors: relation to HBV DNA and to other serological markers. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 2003; 45(3): 137-40.
19. Bal H, Heper Y, Kumaş LT, Mıstık R, Töre O. İzole anti-HBc pozitif olgularda HBV DNA varlığının araştırılması ve bu olguların kan bankacılığı açısından önemi. *Mikrobiyol Bul*, 2009; 43(2): 243-50.
20. Güney Ç, Avcı İY, Yapar M, Başustaoğlu AC, Kubar A. Kan vericilerinin serumlarında saptanan HBsAg negatifliğinin doğrulanması [Confirmation of HBsAg negativity in sera obtained from blood donors]. *Mikrobiyol Bul*, 2001; 35(3): 459-63.

21. Özdemir D, Yılmaz Z, Şencan İ, Yıldırım M, Küçükbayrak A. İzole anti-Hbc pozitifliği saptanan hastaların hepatit B aşısına karşı immün yanıtlarının değerlendirilmesi. *Düzce Tıp Fak Derg*, 2008; 1(10): 28-31.
22. Göröl V, Özkul H, Atmaca S, Şit D, Çelik M. Kronik HCV'li hemodiyaliz hastalarında occult HBV enfeksiyonu sıklığı. *Akademik Gastroenterol Derg*, 2005; 4(2): 106-11.
23. Yılmaz S, Yazıcı M, Eldemir S, Günçikan MN, Şafak Yılmaz E, Eker İ, Avcı İY, et al. Anti-HBc testinin bağışçı seçimindeki rolü, güncel algoritmaya katkısı; Gülhane deneyimi Türkiye için örnek model olur mu? *Mikrobiyol Bul*, 2022; 56(2): 288-303.
24. Çakmak A, Sırmatel F. Kronik hepatit B olgularının aile içi bireylerinde aşlamaya alınan cevabın yaşla ilgisinin incelenmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2009; 29(6): 1491-5.
25. Altındiş M, Uslan İ, Çetinkaya Z, Yüksel Ş, Çiftçi İH, Demirtürk N, et al. Hemodiyaliz hastalarının gizli hepatit B varlığı yönünden araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2007; 41(2): 227-33.
26. Kanbay M, Gur G, Akcay A, Selcuk H, Yılmaz U, Arslan H. Is hepatitis C virus positivity a contributing factor to occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients? *Dig Dis Sci*, 2006; 51(11): 1962-6.
27. Fabrizi F, Messa PG, Lunghi, G, Aucella F, Bisegna S, Mangano S, et al. Occult hepatitis B virus infection in dialysis patients: a multicentre survey. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005; 21(11): 1341-7.
28. Torbenson M, Kannangai R, Astemborski J, Strathdee SA, Vlahov D, Thomas DL. High prevalence of occult hepatitis B in Baltimore injection drug users. *Hepatology*, 2004; 39: 51-7.
29. Toyoda H, Hayashi K, Murakami Y, Honda T, Katano Y, Nakano I, et al. Prevalence and clinical implications of occult hepatitis B viral infection in hemophilia patients in Japan. *J Med Virol*, 2004; 73: 195-9.
30. Raimondo G, Navarra G, Mondello S, Costantino L, Colloredo G, Cucinotta E, et al. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease. *J Hepatol*, 2008; 48: 743-6.
31. Demir M, Serin E, Göktürk S, Ozturk NA, Kulaksizoglu S, Yılmaz U. The prevalence of occult hepatitis B virus infection in type 2 diabetes mellitus patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2008; 20: 668-73.
32. Kasapoğlu B, Türkay C. Okült (OCCULT) Hepatit B enfeksiyonu. *Güncel Gastroenterol*, 2007; 11(2): 51-6.
33. Bal H, Heper Y, Kumaş LT, Mıstık R, Töre O. İzole anti-HBc pozitif olgularda HBV DNA varlığının araştırılması ve bu olguların kan bankacılığı açısından önemi. *Mikrobiyol Bul*, 2009; 43(2): 243-50.
34. Yıldırım M, Yavuz MT, Özdemir D, Behçet M, Şencan İ. İzole anti-HBc pozitif hastalarda saptanan yüksek hepatit B virusu DNA oranı. *Mikrobiyol Bul*, 2008; 42(3): 535-6.
35. Comanor L, Holland P. Hepatitis B virus blood screening: unfinished agendas. *Vox Sang*, 2006; 91(1): 1-12.
36. Hollinger FB, Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. *J Viral Hepat*, 2010; 17: 1-15.
37. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. France: European Directorate for Quality of Medicine and Healthcare. 17th Edition. 2014.
38. Biswas R, Tabor E, Hsia, Wright DJ, Laycock ME, Fiebig EW, et al. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion*, 2003; 43(6): 788-98.
39. Yoshikawa A, Gotanda Y, Minegishi K, Taira R, Hino S, Tadokoro K, et al. Lengths of hepatitis B viremia and antigenemia in blood donors: preliminary evidence of occult (hepatitis B surface antigen-negative) infection in the acute stage. *Transfusion*, 2007; 47: 1162-71.
40. Gerlich WH, Bremer C, Saniewski M, Schüttler CG, Wend UC, Willems WR, et al. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. *Dig Dis*, 2010; 28(1): 116-25.
41. Lelie N, Busch M, Kleinman S. Residual risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (TT-HBV) infection by NAT-screened blood components: a review of observed versus modeled infectivity from donors with window period and occult HBV infections. *Transfusion*, 2021; 61(11): 3190-201.

Kitin sentez inhibitörü diflubenzuronun sivrisinek (*Culex pipiens*) larvalarının kütikulasına etkisinin belirlenmesi

Determination of chitin synthesis inhibitor diflubenzuron's effect on the cuticle of mosquito (*Culex pipiens*) larvae

Mehmet Salih YIKILMAZ¹ (ID), Leyla YILDIZ¹ (ID), Gamze TURGAY İZZETOĞLU¹ (ID)

ÖZET

Amaç: *Culex* cinsine ait dişi sivrisinek türleri hastalık taşınımı bakımından önemli bir bulaşıcı hastalık vektördür. Deri değişimi (ekdizis) sivrisinek gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Sivrisineklerde integüment tek tabakalı ektodermal hücrelerden ve bunların salgıladığı kütikül tabakasından meydana gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün larval mücadelede kullanılmak üzere tavsiye ettiği böcek büyüme düzenleyicileri (IGR) ve bazı biyoinsektisitler arasında diflubenzuron (DFB) ticari olarak en çok kullanılanlar arasındadır. DFB, böceklerde kütikül oluşumunu olumsuz etkilediği için kitin sentez inhibitörü olarak tanımlanmıştır. DFB kitin sentezini inhibe ederek kütikül kompozisyonunu değiştirip, kitinin endokütikülda depolanması sırasında anomaliler oluşmasına ve deri değişiminin olması gerektiği şekilde gerçekleşmemesine sebep olmaktadır. Bu çalışmada, DFB uygulanmış üçüncü ve dördüncü evre sivrisinek (*Culex pipiens*) larvalarının kütikülalarında meydana gelen değişikliklerin, makro düzeyde ve histolojik olarak belirlenmesi ve olası anormalliklerin açığa çıkarılması amaçlanmıştır.

ABSTRACT

Objective: Female mosquito species belonging to *Culex* sp. are important infectious disease vectors in terms of disease transmission. Ecdysis plays an important role in mosquito development. In mosquitoes, the integument consists of a single layer of ectodermal cells and the cuticle layer secreted by them. Among the insect growth regulators (IGR) and some bioinsecticides recommended by the World Health Organization for use in larval control, diflubenzuron (DFB) is among the most used commercially. DFB has been defined as a chitin synthesis inhibitor because it negatively affects cuticle formation in insects. DFB inhibits chitin synthesis, altering the composition of the cuticle and causing anomalies in the storage of chitin in the endocuticle, thereby preventing the proper occurrence of molting in the integument. In this study, it was aimed to determine the changes occurring in the cuticles of third and fourth instar mosquito (*Culex pipiens*) larvae treated with DFB at the macroscopic and histologic levels and to reveal possible abnormalities.

¹Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Gamze TURGAY İZZETOĞLU
Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bornova / İzmir - Türkiye
E-posta / E-mail : gamze.turgay@ege.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 29.03.2024
Kabul Tarihi / Accepted : 11.07.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.89083

Yıkılmaz MS, Yıldız L, Turgay İzzetoğlu G. Kitin sentez inhibitörü diflubenzuronun sivrisinek (*Culex pipiens*) larvalarının kütikulasına etkisinin belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 41 - 52

Yöntem: Sivrisineklerle mücadelede en iyi sonuçlar larval mücadele ile alınmaktadır. Bu sebeple, *C. pipiens*'in üçüncü ve dördüncü larval evrelerinin bulunduğu su dolu kaba m²'ye 2,5 mg olacak şekilde DFB uygulanarak, 2-3 gün boyunca larvalardaki deri değiştirme davranışı takip edilmiştir. Aynı evrelere ait DFB uygulanmış (uygulama) ve uygulanmamış (kontrol) *C. pipiens* larvaları ayrıntılı bir şekilde karşılaştırılarak incelenmiş ve makroskopik olarak fotoğraflanmıştır. Ayrıca Bouin ile total olarak tespit edilen kontrol ve uygulama grubu sivrisinek larvaları rutin histolojik basamakların ardından 5-6 µm enine kesitler alınmıştır. Bu kesitlere Pollak's trikrom ve Heidenhain's Azan-Mallory boyama prosedürü uygulanarak preparatlar hazırlanmış ve detaylı incelemelerin ardından fotoğrafları çekilmiştir.

Bulgular: Uygulama yapılmış her iki evrenin de larvalarında makroskopik olarak şekil bozuklukları belirlenmiştir. Histolojik olarak da kütikülanın incelendiği ve hemen altında yer alan epidermal hücre tabakasının da altında yağ doku yığılması olduğu görülmüştür.

Sonuç: Sivrisineklerde büyüme esnasında meydana gelen deri değiştirme sürecinde, kitin sentez inhibitörlerinden biri olan DFB'nin kütikül oluşumunu olumsuz etkilediği hem morfolojik hem de histolojik olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Culex pipiens*, diflubenzuron, histoloji, integüment, kitin sentez inhibitör, kütikula

Methods: The best results in mosquito control are obtained with larvae control. For this reason, DFB was applied at a rate of 2.5mg per m² to the water-filled container containing the third and fourth larval stages of *C. pipiens*, and to ecdysis behavior of the larvae followed for 2-3 days. DFB-treated and non-DFB-treated (control) *C. pipiens* larvae of the same stages were compared in detail, examined and macroscopically photographed. In addition, 5-6 µm cross-sections were taken from the control and treatment groups mosquito larvae, which were fixed as a total using Bouin fixative, following routine histological steps. Preparations were made by staining Pollak's trichrome and Heidenhain's Azan-Mallory process, then detailed observation and photographed.

Results: Macroscopic abnormalities were determined in the larvae of both treatment stages. Histologically, it was observed that the cuticle was thin and there were fat body accumulations under the epidermal cell layer just below it.

Conclusion: As a result, it has been determined both morphologically and histologically that DFB, one of the chitin synthesis inhibitors, negatively affects cuticle formation during ecdysis that occurs during growth in mosquitoes.

Key Words: *Culex pipiens*, diflubenzuron, histology, integument, chitin synthesis inhibitor, cuticle

GİRİŞ

Culex cinsine ait dişi sivrisinek türleri hastalık taşıyıcı bakımından önemli bir bulaşıcı hastalık vektörüdür (1). Ayrıca arbovirüslerin vektörleri olarak *Lymphatic filariasis*'e (fil hastalığı) yol açan nematodlardan biri olan *Wucheria bancrofti* parazitinin, St. Louis, West Nile, Eastern equine, Venezuelen equine ve Japanese ensefalitleri ile Sindbis ateşi, Rift Valley ateşi hastalıklarına neden

olmaktadır (2-12). Sivrisineklerle mücadelede tür, gelişim safhası, uygulama alanı gibi bazı durumlar göz önünde bulundurulduğunda, en iyi sonuçlar larval mücadele ile alınmaktadır. Bunun yanında ergin mücadelesi de göz ardı edilemeyecek kadar kullanılan bir diğer yöntemdir (13). Sivrisineklerle mücadelenin önemli bir kısmını insektisitler oluşturmaktadır (14).

Dünya Sağlık Örgütü'nün larval mücadelede kullanılmak üzere tavsiye ettiği böcek büyüme düzenleyicileri (IGR) ve bazı biyoinsektisitler (15,

16) arasında diflubenzuron (DFB) ticari olarak en çok kullanılanlar arasındadır (17-19). DFB'nin böceklerde kütikül oluşumunu olumsuz etkilediği belirlenmiş ve takip eden yıllarda böceklerdeki larvisidal ve ovisidal etkisi onaylanarak kitin sentez inhibitörü olarak tanımlanmıştır. DFB günümüze kadar birçok böcek türüyle mücadelede kullanılmaktadır. Mulla ve ark. (20), beş cins (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta* ve *Psarophora*) ve 16 tür sivrisinek larvasını DFB'ye maruz bıraktıktan sonra ergin oluşumunun engellendiğini belirlemişlerdir. DFB sivrisinek larvalarında çok düşük oranlarda (ppm ve ppb seviyesinde) bile etki göstermektedir. Ayrıca ortam koşullarına göre değişmekle birlikte suda 3-4 ay boyunca etkisinin sürdüğü bilinmektedir (19).

Deri değişimi sivrisinek gelişiminde önemli rol oynamaktadır (21). Sivrisineklerde integüment tek tabakalı ektodermal hücrelerden ve bunların salgıladığı kütikül tabakasından meydana gelir (21-23). Kütikül genellikle epikütikula, ekzokütikula ve endokütikula olmak üzere üç ayrı katmandan oluşur. Ekzo ve endokütikula bazen prokütikula olarak da adlandırılır. Son iki tabakadan herhangi biri indirgenebilir veya olmayabilir (24). Tüm epidermal hücreler, deri değiştirme esnasında kütikül modifikasyonu ve sindirilmesiyle ilişkili olan kütikül bileşenleri ve enzimleri salgırlar (23, 25).

Böceklerin büyümesi kütikül ile sınırlanmıştır. Böceğin büyümesine izin vermek için kütikül, eski kütikülün enzimler tarafından kısmen parçalanmasını ve yeni kütikülün biyosentezini içeren süreçler yoluyla deri değiştirme sırasında periyodik olarak atılmaktadır (26). Bu iki süreç sırasıyla apolizis ve ekdizis olarak bilinir. Ekdizisten sonra, yeni kütikül genişler ve kimyasal olarak modifiye edilir. Çoğu böcekte, yeni kütikülün yoğun birikimi deri değişim arası (intermolt) periyodu boyunca devam eder (23).

Ekdizis'in başlangıcında mitoz bölünme sonucunda hücre sayısı artar ve ekdizisi takip eden süre boyunca keskin, nispeten küçük bir düşüşe uğrar. Toplam hücre sayısında net bir artış vardır, bu sebeple birim alan başına sayı orijinal değerine

geri dönse de epiderminin genel alanı ve dolayısıyla oluşturduğu kütikül artar (23,25). Deri değiştirmeyi takiben besleme döneminde, hücrelerin üzerindeki kütikül ortaya çıktıkça ve hücreler yana doğru yayıldığında hücre yoğunluğu azalır. Daha sonra, mitoz gerçekleştiğinde ve hücre sayısı arttığında, hücre yoğunluğu keskin bir şekilde artar. Larval-pupal deri değiştirmede, larva pupaya dönüşürken boyunun kısalması ve hücrelerin yeniden düzenlenmesinden dolayı yoğunlukta bir miktar artış meydana gelebilir. Epidermal hücre yoğunluğunda meydana gelen bu değişikliklerle birlikte hücre şekillerinin değişmesi de gerçekleşir (23). Ekdizis hemolenf basıncının artması sonucunda, eski kütikülün kalıntılarının dorsal hat boyunca çatlaması ile meydana gelir. Ayrılan kütikula, eski epikütikula ve ekzokütikulanın sindirilemeyen protein, lipit ve kitinlerini içerir. Yeni deri değiştirmiş olan bir böcek, eski deri sınırlamasından kurtulduğunda, yeni kütikulasını genişletir. Bu olay, kırışmış ve katlanmış epikütikulanın düzeltilmesi, prokütikulanın gerilmesi amacıyla vücudun farklı bölgelerinde hemolenf basıncının artması veya su alınımıyla gerçekleşir (27).

Hücre şeklindeki değişikliklerin bir sonucu olarak, epidermal hücre yüzeyinde gerilme meydana gelir ve bu da epidermal hücrelerin kütikülden ayrılmasına neden olur. Bu olaya apolizis denir (23).

DFB, benzoil üre ailesinden böcek büyüme düzenleyicisi olarak sınıflandırılmaktadır. Hedef organizmaların dış iskeletinin oluşumunu ve larva büyümesini kesintiye uğratan seçici olmayan kitin sentezi inhibitörüdür (1). DFB kitin sentezini inhibe ederek kütikül kompozisyonunu değiştirir. Böylece kitinin endokütikulada depolanmasında anomaliler oluşur ve deri değişimi olması gerektiği şekliyle gerçekleşmez. Sivrisineklerde, larva deri değiştirirken meydana gelen yeni kütikula şeffaflaşır. Bazı durumlarda kütikula yer yer yarılıp parçalanır. Bazı durumlarda yeni deri tam olarak oluşturulamaz ve eski deri de atılmaz. Böylece hem eski deri katmanlarının hem de yeni deri katmanlarına sahip larva veya pupalar gözlenir (28-30).

Bu çalışmanın amacı, bir kitin sentez inhibitörü olan DFB uygulanmış üçüncü ve dördüncü evre sivrisinek (*C. pipiens*) larvalarında kütikülada meydana gelen değişikliklerin, makro düzeyde ve histolojik olarak belirlenmesi ve olası anormalliklerin açığa çıkarılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hayvan Eldesi ve Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan *C. pipiens* üçüncü ve dördüncü evre larvaları, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Egemikal Analiz Laboratuvarı Haşere Grubu Biyolojik Etkinlik Laboratuvarı'ndaki kültürlerden 01.05.2023-10.05.2023 tarihleri arasında temin edilmiştir. Larvalar gelişimlerini devam ettirebilmeleri ve besleyici olması nedeniyle öğütülmüş tavuk ciğeriyle, erginler ise %10'luk şekerli suyla beslenmiştir. Sivrisineklerin gelişimlerinin normal bir şekilde devam etmesi için, laboratuvar koşulları bütün yetiştirme süreci boyunca 25 °C sıcaklıkta, %65-70 nemde, 12 saat gündüz/12 saat gece olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Laboratuvar ortamında kültürü yapılan sivrisinek popülasyonlarının, küçük su dolu bir kaba bıraktığı yumurtalar dikkat bir şekilde 15cmx25cmx5cm boyutlarındaki kaplara alınmıştır. Açılan yumurtalardan çıkan larvalar öğütülmüş tavuk ciğeriyle beslenmiştir. Üçüncü larval evreye ulaşan sivrisinekler kontrol ve uygulama grubu olacak şekilde iki farklı kaba alınmıştır. Aynı işlem dördüncü larval evre için de tekrarlanmıştır.

Diflubenzuron (DFB) Uygulanması

Culex pipiens'in üçüncü ve dördüncü larval evrelerini bulunduğu su dolu kaba m²'ye 2.5 mg olacak şekilde DFB uygulanmıştır. 2-3 gün boyunca larval evrelerde deri değiştirme davranışı olup olmadığı takip edilmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırmalar yapılarak makro düzeydeki farklar belirlenmiştir. Bu aşamada kontrol grupları (üçüncü evre larvalar için 10 adet, dördüncü evre larvalar için 10 adet) ile üçüncü evre (10 adet) ve dördüncü evre (10 adet) uygulama gruplarından olmak üzere toplamda 40 adet alınan

örnekler histolojik durumları belirlenmek üzere bouin tespit solüsyonunda fikse edilmiştir.

Morfolojik İnceleme

Kontrol ve uygulama grubu sivrisinek *C. pipiens* üçüncü ve dördüncü larval evreleri Olympus marka stereomikroskop altında ayrıntılı bir şekilde incelenmiş, makroskobik fotoğrafları Kameram dijital görüntü analiz yazılımı kullanılarak çekilmiştir.

Histolojik İnceleme

Bouin (doymuş pikrik asit 75mL, %40'luk formaldehit 25mL, asetik asit 5mL) ile 24 saat boyunca tespit edilen kontrol ve uygulama grubu sivrisinek *C. pipiens*'ler %70'lik alkol ile bouinin etkisi örneklerden uzaklaşana kadar yıkama yapılmıştır. Sonra konsantrasyonları artan alkol serilerinde tutulan örneklerden mevcut suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra örneklerden hem alkolün giderilmesi hem de gömme ortamı olarak kullanılacak olan parafinle uyum sağlaması bakımından kontrollü bir şekilde örnekler ksilolde tutulmuştur. Parafine gömme işleminin ardından mikrotom adı verilen cihazlar yardımıyla 5-6 µm enine kesitler alınarak, önce kesitlere obje çevresinde bulunan parafinin giderilmesi için ksilol uygulaması sonra da konsantrasyonları azalan alkol serilerine tabii tutularak boyamaya hazırlık aşamaları tamamlanmıştır. Çalışmayı oluşturan yapılar da detayı görme amacıyla kesitlere Pollak's trikrom boyama prosedürü ve Heidenhain'in Azan-Mallory boyama prosedürü (31, 32) yöntemleri aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

Pollak's Boyama Prosedürü (31,32): Rutin basamakların tamamlanmasından sonra Mayer'in Hematoksileni'nde beş dakika bekletilmiştir. Çeşme suyunda mavileşene kadar yıkama yapılmıştır. Saf sudan geçirilmiştir. Sonra Trikrom boyasında 7 dk tutulmuştur. Saf su ile çalkalanmıştır. Boyaları sabitleme amaçlı birkaç saniye saf su ile hazırlanmış %0,2'lik asetik asitte bekletilmiştir.

Azan Stain, Mallory Heidenhain's boyama prosedürü (31, 32): Azokarmin'de 1 buçuk saat bekletilmiştir. Ardından saf su ile çalkalanmıştır.

Boyanın fazlalığı anilin alkol ile uzaklaştırılmıştır. Boyayı sabitleme amaçlı 1-2 dk %96 alkol ile hazırlanmış %1'lik asetik asitte tutulmuştur. Bu işlemde sonra fosfotungustik asitte 3,5 saat bekletildikten sonra saf su ile çalkalanıp anilin mavisinde 3 saat bekletilmiştir. Fosfotungustik asitte tekrar 4 dk bekletildikten sonra 1-2 dk saf su ile hazırlanmış %1'lik asetik asitte bırakılmıştır.

Son olarak ayrı ayrı uygulanan her iki boyamanın ardından dehidrasyon amacıyla konsantrasyonları artan alkol serilerinden ve ardından alkolün tamamen giderilmesi ve kapatıcı kimyasal olan entellan ile uyum sağlanması için ksilolde bekletilen preparatlar sırasıyla lamel kapatılarak incelemeye hazır hale getirilmişlerdir. Preparatlar mikroskopta

gözlemlenmiş ve ZEN görüntü analiz yazılımı kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.

BULGULAR

Morfolojik Bulgular

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DFB uygulanmış *C. pipiens*'in üçüncü evre larvalarında morfolojik olarak şekil bozuklukları görülmüştür. Bunlar; baş, toraks, sifon ve anal papilla kısmında kararmalar ile toraks kısmında kütikülanın birikmesiyle oluşan kırışıklıklar (Şekil 1. A-B), toraks ile baş kısmının bağlantı yaptığı bölgede uzama, toraksta kararmalar, abdomen kısmında yer yer şeffaflaşmalar gözlemlenmiştir (Şekil 1. A-C).



Şekil 1. Üçüncü evre *Culex pipiens* larvalarında DFB'nin morfolojik etkileri.

A. Kontrol grubu, B, C. DFB uygulanmış grup. ab; abdomen, ap; anal papilla, b; baş, s; sifon t; toraks.

Kontrol grubuna göre; DFB uygulanmış *C. pipiens*'in dördüncü evre larvalarında baş, toraks, anal papilla ve sifon kısımlarında kararmalar (Şekil 2. B-C-D), larvaların toraks kısmında şeffaflaşma (Şekil 2. C) ve toraksın dorsal kısmında yırtılmalar (Şekil

2. D) şeklinde morfolojik bozukluklar belirlenmiştir. Ayrıca, üçüncü ve dördüncü larval evrede DFB uygulanmış gruplardaki bireylerin hiçbiri gerektiği gibi deri değiştirip pupa aşamasına geçememiştir.



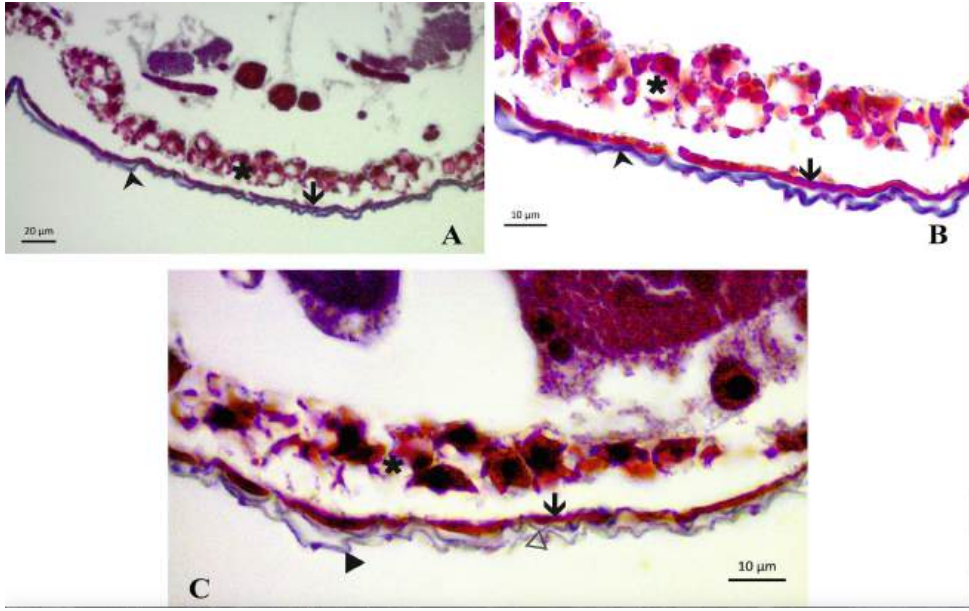
Şekil 2. Dördüncü evre *Culex pipiens* larvalarında DFB'nin morfolojik etkileri.

A. Kontrol grubu, B, C. DFB uygulanmış grup. ab; abdomen, ap; anal papilla, b; baş, s; sifon, t; toraks.

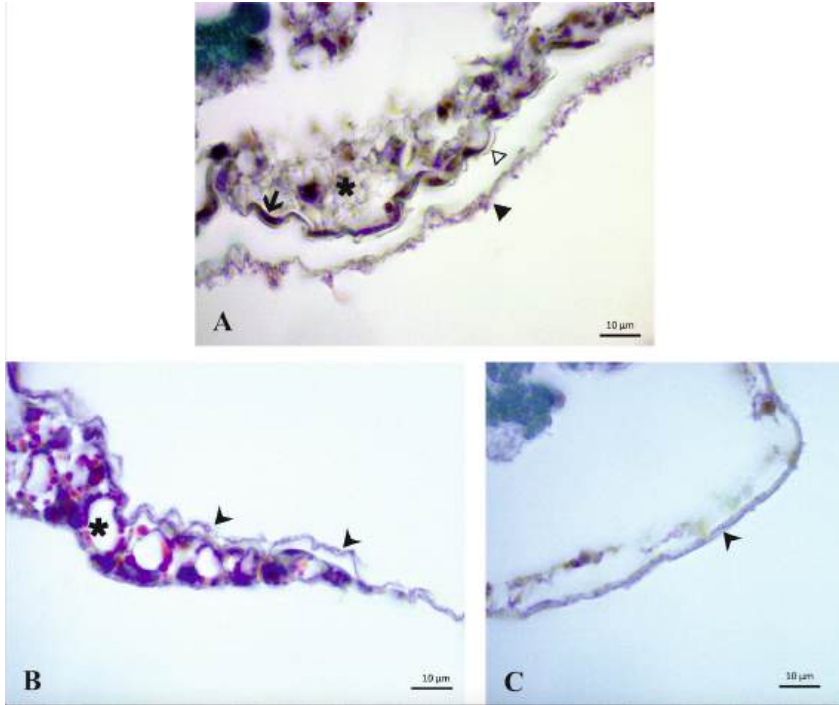
Histolojik Bulgular

Üçüncü larval evreye ait kontrol grubu *C. pipiens*'lerden alınan enine kesitlerde kütiküla altında tek sıra epidermal hücre tabakası yer almıştır (Şekil 3. C ve 4. A). Hücre tabakası, alt kısımda yer alan yağ doku ile ilişkilidir (Şekil 3. C ve 4. A). Ayrıca epidermal hücre nükleusları da net bir şekilde gözükmekte ve deri değiştirme esnasında meydana gelen ve daha da ilerlemiş apoliz olarak

düşündüğümüz aşama gözlenmiştir (Şekil 4 A). Eski kütiküla, yeni oluşmakta olan kütiküladan tam olarak ayrılmamakla birlikte, birbirlerine yakın yer almıştır (Şekil 3. C). DFB uygulaması sonrasında bu evre larvaların kontrol grubuna göre kütikulasının kompakt yapısının bozulduğu ve gevşediğini (Şekil 4. B), ayrıca yok denecek kadar incelendiğini söylemek mümkündür (Şekil 4. B-C).



Şekil 3. Kontrol grubu *Culex pipiens* üçüncü ve dördüncü larval evrelerinin kütiküla tabakasının histolojisi. A. Dördüncü larval evre, B. Dördüncü larval evre, C. Üçüncü larval evre (boya: Heidenhain's Azan-Mallory). ↓; epidermal hücreler, ▲; kütiküla, ▾; eski kütiküla, ◁; yeni kütiküla, *; yağ doku.

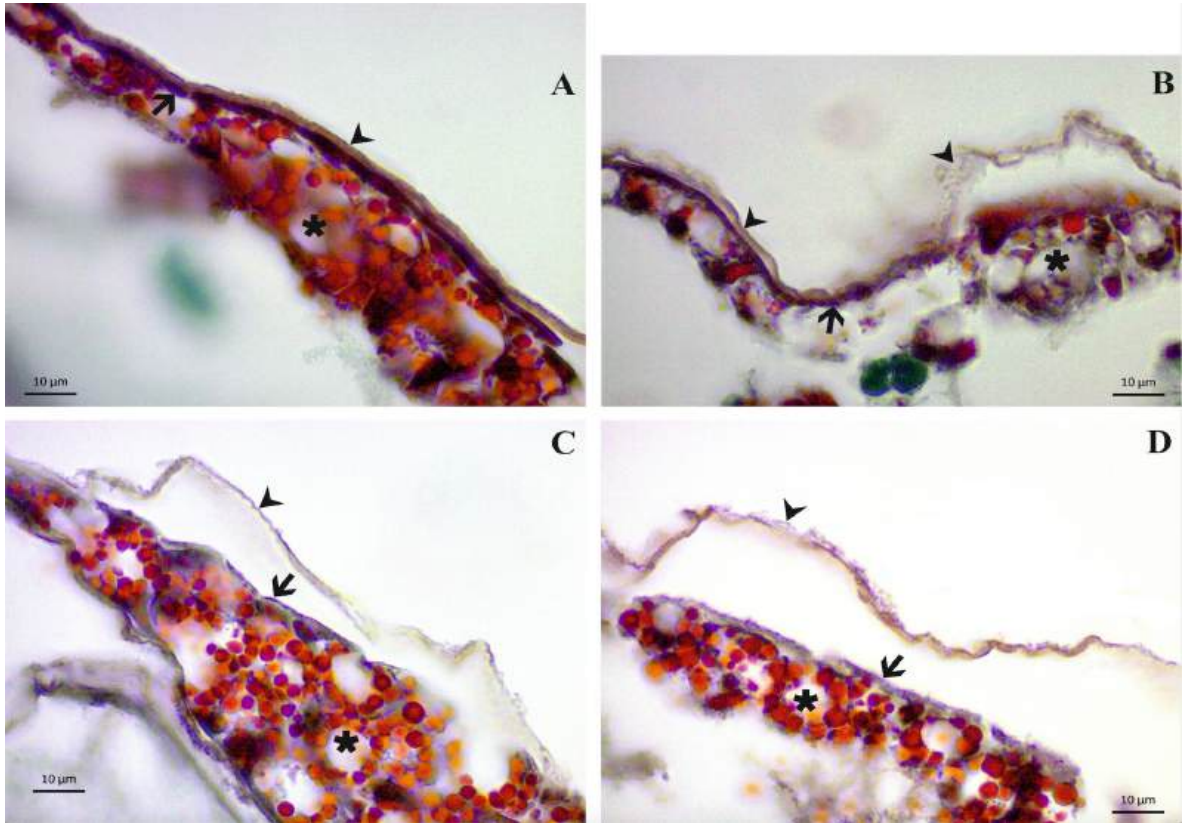


Şekil 4. *Culex pipiens* üçüncü larval evrelerinin kütiküla tabakasının histolojisi. A. Kontrol grubu, B, C. DFB uygulanmış grup (boya: Pollak's trikrom). ↓; epidermal hücreler, ▲; kütiküla, ▾; eski kütiküla, ◁; yeni kütiküla, *; yağ doku.

Dördüncü larval evreye ait kontrol grubu *C. pipiens*'lerden alınan enine kesitlerde kütiküla Azan Stain, Mallory Heidenhain's boyası mavi-mor renklerinde boyanmıştır (Şekil 3. A-B). Kütikülanın hemen altında üçüncü larval evrede olduğu gibi epidermal hücre tabakası yer almakta (Şekil 3. A-B) ve yine kütiküla çok ince olduğu için histolojik düzeyde tabakalanmalar net bir şekilde ayırt edilememiştir. Epidermal hücre tabakasının altında yağ doku yığılmaları gözükmiştir (Şekil 3. A-B ve 5. A). DFB uygulanmış dördüncü evre larvaların enine kesitlerinin bazılarında kütikülanın kompakt

yapısı kaybolmuş ve epidermal hücrelerle bağlantısı kopmuştur (Şekil 5. B-C-D). Kütikülanın kontrol grubuna göre incelendiği DFB uygulanmış gruplarda net olarak görülmüştür (Şekil 5. B-C-D).

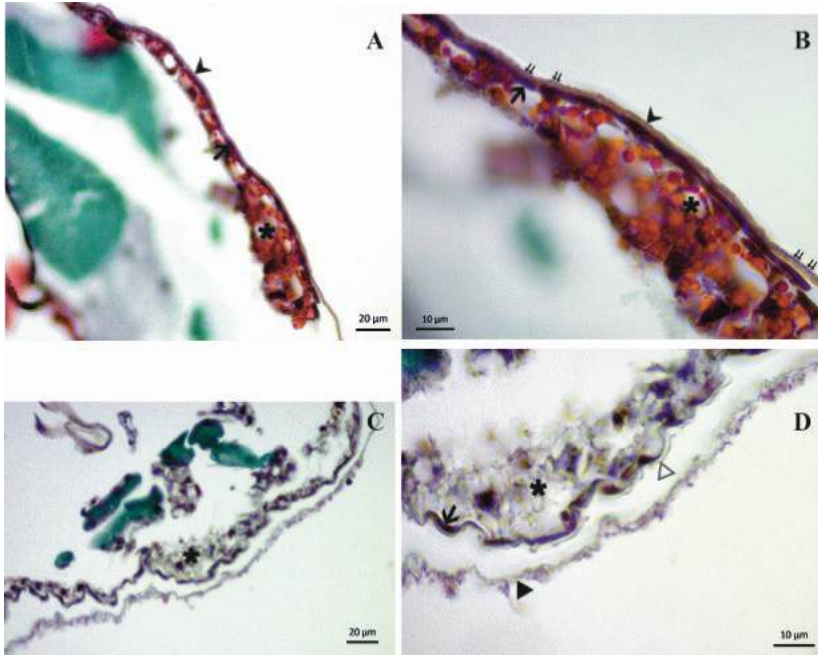
Üçüncü ve dördüncü larval evre kontrol grubundan alınan enine kesitler karşılaştırıldığında gelişime bağlı olarak, üçüncü larval evre kütikülasının (Şekil 6. C-D), dördüncü larval evre kütikülasına (Şekil 6. A-B) göre ince olduğu gözlemlenmiştir. Kütikülanın en dışında, yer yer koyu mavi hat halinde epikütiküla tabakası gözükmiştir (Şekil 6. B). Epidermal hücreler yağ doku ile ilişkili görülmüştür (Şekil 6).



Şekil 5. *Culex pipiens* dördüncü larval evrelerinin kütiküla tabakasının histolojisi.

A. Kontrol grubu. B, C, D. DFB uygulanmış grup (boya: Pollak's trikrom).

▼; epidermal hücreler, ▲; kütiküla, *; yağ doku.



Şekil 6. Kontrol grubu *Culex pipiens* üçüncü ve dördüncü larval evrelerinin kütiküla tabakasının histolojisi.

A, B. Dördüncü larval evre, C, D. Üçüncü larval evre (boya: Pollak's trikrom).

↙; epidermal hücreler, ||; epikütiküla, ▲; kütiküla, ►; eski kütiküla, <◁; yeni kütiküla, *; yağ doku

TARTIŞMA

Birçok temel entomoloji kitabında böcek kütikülası ve tabakaları ayrıntılı şekilde verilmiştir (21-23). Ancak örnek olarak verilen böcekler daha çok karasal olup, genellikle kütiküla tabakası kalındır. Ayrıca sivrisineklerle karşılaştırıldıklarında epey büyük hayvanlar oldukları gözden önünde bulundurulmalıdır. Sivrisinek larvaları sucul canlılardır ve oldukça narin böceklerdir. Ayrıca sifonlarının yanı sıra deri solunumu da yaptıkları bilinmektedir (33). Bu nedenle alınan histolojik kesitlerde kütikül tabakalarının net bir şekilde ayırt edilememesi normal karşılanmalıdır. Kütikül tabakasının tamamının yer yer 1 µm'den bile ince olduğu görülmektedir.

Özellikle dördüncü evre larvalarda kütikülayı oluşturan epidermal hücrelerin yağ doku ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Bu da yağ dokuda da depolanan protein, karbonhidrat ve yağların kütikül oluşumunda bir şekilde kullanıldıklarını düşündürmüştür.

DFB uygulanmış larvaların genel görüntüleri Khater (34)'in sonuçlarıyla uyum göstermiştir. Larvalardaki genel şekil bozuklukları, baş-abdomen ve torakstaki kararmalar benzerdir. Bazı larvalarda kütikülada gözlenen şeffaflaşmalar da yeterince kitin sentezi yapılmadığına işaret etmiştir. Üçüncü evre larvada toraksta gözlenen kütikül kırışıklıkları apolizis olayının gerçekleştiğini, ancak ekdizis olayının tam olarak gerçekleşemediğini, yani eski kütikülanın atılmadığını ve bu nedenle söz konusu kırışıklıkların oluştuğu düşünülmüştür (Şekil 1.B). Bazı örneklerde gözlenen şeffaflaşmalar ise kitin sentezinin yeterince yapılmadığını ve eski kütikülanın apolizise uğradıktan sonra incilmesi ile ışık geçirgenliğinin arttığını ve mikroskop altında şeffaf bir görüntü oluştuğu yönündedir. Özellikle dördüncü evre bazı larvalarda toraks kısmında kütikülanın yarılması, bu evrede bir miktar kitin sentezlendiğini ve apolizisin gerçekleştiğini ancak ekdizis olayının tam anlamıyla meydana gelmediğini ve toraksta bir ayrılma olduktan

sonra ekdizisin kesintiye uğradığı tahmin edilmiştir.

Histolojik kesitlerde DFB'nin etkisini çok net görmek mümkün olmamıştır. Ancak bazı işaretler dolaylı olarak etkinin belirlenmesinde yardımcı olmuştur. Sivrisinek larvasının kütikülası zaten çok incedir. Etkinin belirgin biçimde görülmesi ışık mikroskobu aşamasında oldukça zordur. Buna rağmen gevşemiş, epidermal hücrelerle bağlantısı kopmuş ve görece incelmış kütiküla etkinin yorumlanması aşamasında yardımcı olmuştur. Ancak daha net yorumlarda bulunabilmek için elektron mikroskobu teknikleriyle daha detaylı incelemeler yapmak yerinde olacaktır.

Bu çalışmayla, sivrisineklerde büyüme esnasında meydana gelen deri değiştirme sürecinde, kitin sentez inhibitörlerinden biri olan DFB'nin kütikül oluşumunu olumsuz etkilediği belirlenmiştir. DFB halk sağlığına yönelik sivrisinek ve ev sineği (=karasinek) larvalarının kontrolünün yanında birçok tarım zararlısının kontrolünde de kullanılmaktadır (17-19). DFB, sivrisinek larvalarına karşı Avrupa'da mevcut olan çok az aktif içerikten biri olduğundan,

DFB direnci *C. pipiens* kontrolü için büyük önem taşımaktadır (35). DFB'nin kitin sentezini tam olarak nasıl inhibe ettiği kesin olarak açıklanamamıştır (18, 28). DFB sivrisinek larvalarıyla mücadele için uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmıştır. Bu süreçte içme sularında da birikme gözlenmiştir. Etki mekanizmasının tam olarak açıklanamaması dolayısıyla insan sağlığında oluşturması muhtemel etkileri ön görülememektedir. Bu nedenle T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2018'den itibaren sivrisinekle mücadelede kullanılması yasaklanmıştır.

Sonuç olarak; DFB sivrisinek larvalarıyla mücadelede çok düşük miktarlarda bile etki gösterebilen bir sentetik maddedir. Bu maddenin başka eklem bacaklıların bulunmadığı su kütlelerinde kullanımı faydalı olabilmektedir. Ayrıca omurgalılara zarar vermemesi DFB'yi kullanıma uygun bir ürün haline getirmektedir. Etki mekanizmasının aydınlatılması DFB'yi potansiyel tehlike olmaktan çıkaracak ve kullanımı tekrar gündeme gelecektir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Pešić B, Kulišić Z, Teodorović R, Trailović SM, Djokić V, Djordjevic M. Comparison of mosquito larvicidal formulations of diflubenzuron on *Culex pipiens* mosquitoes in Belgrade, Serbia. *Acta Vet*, 2022; 72(1): 87-99.
2. Nazni WA, Lee HL, Azahari AH. Adult and larval insecticide susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Say) mosquitoes in Kuala Lumpur Malaysia. *Trop Biomed*, 2005; 22(1): 63-8.
3. Hardstone MC, Leichter C, Harrington LC, Kasai S, Tomita T, Scott JG. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance confers limited and larval specific cross-resistance in the southern house mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Pestic Biochem Physiol*, 2007; 89(3): 175-84.
4. Norris LC, Norris DE. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes after the introduction of insecticide-treated bed nets in Macha, Zambia. *J Vector Ecol*, 2011; 36(2): 411-20.
5. Becker N, Jöst A, Weitzel T. The *Culex pipiens* complex in Europe. *J Am Mosq Control Assoc*, 2012; 28(4): 53-67.
6. Zhao M, Dong Y, Ran X, Guo X, Xing D, Zhang Y, et al. Sodium channel point mutations associated with pyrethroid resistance in Chinese strains of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*, 2014; 7: 369.
7. Scott JG, Yoshimizu MH, Kasai S. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Pestic Biochem Physiol*, 2015; 120: 68-76.
8. Shi L, Hu H, Ma K, Zhou D, Yu J, Zhong D, et al. Development of resistance to pyrethroid in *Culex pipiens pallens* population under different insecticide selection pressures. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015; 9(8): e0003928.
9. Yanola J, Chamnanya S, Lumjuan N, Somboon P. Insecticides resistance in the *Culex quinquefasciatus* populations from northern Thailand and possible resistance mechanisms. *Acta Trop*, 2015; 149: 232-8.
10. Yuan JZ, Li QF, Huang JB, Gao JF. Effect of chlorfenapyr on cypermethrin-resistant *Culex pipiens pallens* Coq mosquitoes. *Acta Trop*, 2015; 143: 13-7.
11. Taskin BG, Dogaroglu T, Kilic S, Dogac E, Taskin V. Seasonal Dynamics of insecticide resistance, multiple resistance, and morphometric variation in field populations of *Culex pipiens*. *Pestic Biochem Physiol*, 2016; 129: 14-27.
12. Uyar Y, Bakır E. Batı Nil Virüsü (BNV) ve Türkiye’de Batı Nil Virüsü’nün güncel durumu. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2016; 73(3): 279-92.
13. Zhu F, Lavine L, O’Neal S, Lavine M, Foss C, Walsh D. Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. *Insects*, 2016; 7(1): 2.
14. Capinera JL. *Encyclopedia of Entomology*. 2nd ed. New York: Springer. 2008.
15. Nauen R. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Manag Sci*, 2007; 63(7): 628-633.
16. Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2012.
17. Stenersen J. *Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology*, 1st ed, USA: CRC Press. 2004.
18. Perry AS, Yamamoto I, Ishaaya I, Perry R. *Insecticides In Agriculture and Environment Retrospects and Prospects*, Berlin: Springer. 1998.
19. Dhadialla TS. *Advances in insect physiology*, 1st ed, Academic Press Elsevier, 2012.
20. Mulla MS, Norland RL, Ikeshoji T, Kramer WL. Insect growth regulators for the control of aquatic midges. *J Econ Entomol*, 67 (2): 165-70.
21. Gillot C. *Entomology*. 3rd ed. Springer. 2005.

22. Clements AN. The Biology of Mosquitoes. Vol 1. London: CABI Publishing. 2000.
23. Chapman RF. The Insects: Structure and function, 5th ed, Cambridge University Press, New York, 2013.
24. Nation JL. Insect physiology and biochemistry, 3rd ed, CRC Press, 2015.
25. Gilbert L. Insect Endocrinology, 1st ed, Elsevier, 2012.
26. Montaña-Reyes A, Llanderal-Cázares C, Valdez-Carrasco J, Miranda-Perkins K, Sánchez-Arroyo H. Susceptibility and alterations by diflubenzuron in larvae of *Aedes aegypti*. Arch Insect Biochem Physiol, 2019; 102 (2): e21604.
27. Gullan PJ, Cranston PS. The Insects: An outline of entomology, 5th ed, Wiley-Blackwell, 2014.
28. Ishaaya I. Biochemical sites of insecticide action and resistance, 1st ed, Springer, 2001.
29. Emden HF, Service MW. Pest and vector control, Cambridge University Press, 2004.
30. Perveen F. Insecticides Advances in integrated pest management, 1st ed, InTech, Croatia, 2011.
31. Humason GL. Animal tissue techniques, United States of America, 1962.
32. Öber A. Zoolojide laboratuvar teknikleri, 3. baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, No: 183, İzmir, 2009.
33. Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, et al. Mosquitoes and their control, 2nd ed, Springer, 2010.
34. Khater HF. Biocontrol of some insects. PhD Thesis, Zagazig University, Benha Branch, Egypt. 2003.
35. Mastrantonio V, Porretta D, Lucchesi V, Güz N, Çağatay NS, Bellini R, et al. Evolution of adaptive variation in the mosquito *Culex pipiens*: Multiple independent origins of insecticide resistance mutations. Insects, 2021; 12 (8): 676.

COVID-19 vaccine literacy in Çankırı province

Çankırı ili COVID-19 Aşı okuryazarlığı

Ayşe AYKURT¹ (ID), Sinan BULUT² (ID), Oğuzhan AYKURT³ (ID)

ABSTRACT

Objective: COVID-19 vaccines are at the forefront of the most important protective factors in the fight against the epidemic, but there are different attitudes towards the vaccine. Vaccine literacy indicates the capacity of individuals to obtain, process and understand basic health information and services to make sound health decisions about vaccines. This study aimed to evaluate the vaccination literacy level of Çankırı province and to determine the factors affecting vaccination literacy.

Methods: The research is a cross-sectional type research. The population of the research consists of individuals aged 18 and over who are registered to the family health center located in Çankırı province and all districts. In this study, a questionnaire was used as a data collection tool. The survey consists of two parts. In the first part, there are 12 questions, including socio-demographic characteristics. In the second part, there is the COVID-19 vaccine literacy scale. Research data was collected between 01.12.2021 and 31.01.2022. The determined sample was allocated in the research was used in proportion to the district population and 400

ÖZET

Amaç: Salgınla mücadelede en önemli koruyucu faktörlerin başında COVID-19 aşıları gelmekte, ancak aşıya karşı farklı tutumlar görülmektedir. Aşı okuryazarlığı, kişilerin aşılar hakkındaki doğru kararları vermek için temel sağlık bilgileri ve hizmetlerini elde etme, işleme ve anlama kapasitesini göstermektedir. Bu çalışmada, Çankırı ilinde yaşayanların COVID-19 aşı okuryazarlık düzeyinin değerlendirilmesi ve aşı okuryazarlığına etki eden faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışma kesitsel tipte bir çalışmadır. Araştırmanın evreni, Çankırı ili merkez ve çevre ilçelerde yer alan aile sağlığı merkezlerine (ASM) kayıtlı 18 yaş ve üzeri bireyler oluşturmuştur. Araştırmada veri toplama aracı olarak anket kullanılmıştır. Anket iki bölüm olarak hazırlanmıştır. Birinci bölümde sosyo-demografik özellikleri içeren 12 soru, ikinci bölümde ise COVID-19 aşısı okuryazarlık ölçeği yer almıştır. Araştırma verileri 01.12.2021 - 31.01.2022 tarihleri arasında toplanmıştır. Araştırmada hesaplanan örneklem büyüklüğü ilçe nüfuslarına oranlanarak kullanılmış ve 400 kişiye ulaşılmıştır. Veriler SPSS 25.0 paket programında analiz

¹Çankırı Karatekin University, Institute of Health Science, Çankırı, Türkiye

²Çankırı Karatekin University, Faculty of Health Science, Çankırı, Türkiye

³Çankırı Provincial Directorate of Health, Çankırı, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Sinan BULUT

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sağlık Yönetimi Bölümü, Çankırı - Türkiye

E-posta / E-mail : sinanbulut@karatekin.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 24.12.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 07.05.2024

people were reached. The data were analyzed in the SPSS 25.0 package program.

Results: COVID vaccine literacy level in Çankırı province was determined as medium level (2.80 ± 0.53). In the study, when the COVID-19 vaccine status and the COVID-19 vaccine literacy levels were examined, the literacy level was found to be higher in the individuals who were vaccinated. Although the COVID-19 vaccine literacy levels are lower in districts with a high elderly population, no statistically significant difference was observed and in accordance with the literature, it was found to be lower in the older age group than in other groups. In the study, when the COVID-19 vaccine status and the COVID-19 vaccine literacy levels were examined, the literacy level was found to be higher in the individuals who were vaccinated and showed similar results with other studies.

Conclusion: Vaccination, one of the most important methods of combating infectious diseases and is necessary for public health. Vaccination has increasingly become more important for protection against COVID-19, which has emerged as an important health problem in recent years. Within the scope of the fight against pandemics, the vaccination literacy level should be increased, especially in elderly individuals aged 65 and over, and it is evaluated that disease rates and deaths will be reduced by increasing vaccination rates.

Key Words: Vaccine literacy, Covid-19, health

edilmiştir.

Bulgular: Çankırı ili COVID-19 aşısı okuryazarlık düzeyi $2,80 \pm 0,53$ ile orta düzeyde olduğu görülmüştür. COVID-19 aşısı olma durumu ile COVID-19 aşısı okuryazarlığı düzeyleri incelendiğinde aşısı olan bireylerde okuryazarlık düzeyi daha yüksek olarak saptanmıştır. En yüksek COVID-19 aşısı okuryazarlık düzeyi Çankırı Merkez ilçede bulunmuştur. 60 yaş ve üstü bireylerde COVID-19 aşısı okuryazarlık düzeyi anlamlı olarak diğer gruplara göre daha düşük bulunmuştur. Yaşlı nüfusun fazla bulunduğu ilçelerde COVID-19 aşısı okuryazarlık düzeyleri daha düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ve literatür ile uyumlu olarak ileri yaş grubunda, diğer gruplara göre daha düşük saptanmıştır. Çalışmada, COVID-19 aşısı olma durumu ile COVID-19 aşısı okuryazarlığı düzeyleri birlikte değerlendirildiğinde aşısı olan bireylerde okuryazarlık düzeyi daha yüksek olarak saptanmıştır.

Sonuç: Enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve ortadan kaldırılması için en önemli mücadele yöntemlerinden biri olan aşısı, toplum sağlığı için gereklilik taşımaktadır. Son yıllarda önemli bir sağlık sorunu olarak ortaya çıkan COVID-19'dan korunma için de aşısı önemini giderek artırmıştır. Gelecekte yaşanabilecek pandemilerle mücadelede özellikle 65 yaş ve üzeri yaşlı bireylerde aşısı okuryazarlık düzeyi artırılmalı ve aşılama oranları yükseltilerek hastalanma oranlarının ve ölümlerin azaltılacağı değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aşısı okuryazarlığı, COVID-19, sağlık

INTRODUCTION

After the first cases were reported in December 2019 in Wuhan, Hubei Province, China, on January 7, 2020, the new type of coronavirus disease (COVID-19), as defined by World Health Organization (WHO), was first seen in Türkiye on March 11,

2020. The first case in Çankırı was seen in a patient originating from abroad on March 22, 2020, and the first death was on April 12, 2020. Within the scope of combating COVID-19 in Çankırı, the Operations Center and Filiation Center were first established under the Provincial Health Directorate, and then the detailed filiation of COVID-19 positive cases

was carried out, which was aimed at preventing the increase in cases with follow-up. From past to present, the medical world frequently encounters the latest health-threatening pandemics under the name of COVID-19. Learning the characteristics of epidemic diseases, finding the necessary protection methods against them, and exploring vaccine and treatment options in order to end the disease are the most important steps in the fight against the epidemic. Immunization is one of the most effective methods of combating epidemic diseases. Although COVID-19 vaccine studies in Türkiye are not effective at the desired level, significant progress has been made in immunization over the past few decades.

Although it is known that immunization studies started in the 1700s during the Ottoman Empire, a Rabies Treatment Institution was established under the name of Daül-Kelp and Bacteriology Operating Room in the clinic of the professor Alexander Zoeros Pasha in 1887. This center became the first rabies treatment center with the feature of being the first in its region. Diphtheria serum was also successfully produced in the center (1). Refik Saydam Hygiene Institution was established in 1928 in order to carry out social protection works for public health. This establishment has also started to work on vaccine and serum production. In 1936, 17 different types of vaccines were started to be produced at the Hygiene Institute; vaccines for typhoid, dysentery, plague, cholera, meningococcus, brucellosis, pertussis, BCG, diphtheria, tetanus, rabies, smallpox. Rabies serum began to be produced in 1937 and scorpion serum in 1942. For the first time, powdered smallpox vaccine was produced in 1965, and powdered BCG vaccine was started in 1983. In 1961, the “Socialization of Health Services Law” numbered 224 was enacted, and vaccination studies became widespread. The Extended Immunization Program has been implemented by the Ministry of Health since 1981. With the vaccination campaigns initiated, the vaccination rates, which were at the level of 25-35% until 1985, increased to 92%. Hepatitis B vaccine in 1998, *Hemophilus influenza*

type B (Hib) in 2006, conjugated pneumococcal vaccine (KPA) in 2008, and most recently hepatitis A and varicella vaccines in 2013 were added to the National Vaccination Schedule. Smallpox vaccine has been abolished in our country since 1980, and the last polio case was seen in November 1996. WHO in June 2002; Türkiye and the European region were declared as “Polio-Free Zone” (2).

Infectious diseases are less common in adult age groups, especially when compared to children. However, due to reasons such as the fact that individuals who could not be vaccinated in childhood become more susceptible to diseases in adulthood, that some vaccines do not have a lifetime protection from the disease (e.g. tetanus, diphtheria, whooping cough), and that they are more likely to encounter many vaccine-preventable diseases in work and social life. Continuation of vaccination services, especially in old age, is very important for public health. The frequent displacement of people in the world due to various reasons, the fact that 214 million people live as immigrants around the world, and this figure reaches 405 million in 2050, according to estimates, bring great risks in terms of the spread of infectious diseases. Collective travel organization, (cross organizations, etc.) and vaccination of the population exposed to migration have emerged as an important health service need. Many studies have shown that only 10-20% of the targeted groups in adults can be vaccinated. Adult vaccination is not seen as an important part of social preventive health services due to the burden of immunization on the country’s economy. In a rapidly changing world, there is a need for an immunization program that will cover not only children but also all life periods of people (3). Adult immunization levels, including developed western countries, cannot reach the desired target levels. Between 2006 and 2015, WHO and the United Nations Children’s Fund (UNICEF) developed the “Global Immunization Vision and Strategy” program. In this program, topics such as the coverage and integration of immunization for all ages, the introduction of

new vaccines and technologies, the importance and realization of global vaccination were included (4). Adult vaccine studies are cost-effective studies because they play an important role in both the prevention of infectious diseases and the control of comorbid diseases (5).

There are various types of literacy in the field of health due to the fact that health literacy has a very comprehensive definition. One of them is vaccine literacy. Vaccine literacy has been defined as the degree to which one has the capacity to obtain, apply, and understand basic health information and services in order to make appropriate health decisions about vaccines (6). In addition, vaccine literacy does not only mean having knowledge about vaccines; it also includes the transformation of vaccines into a system that can be expressed in more detail (7).

Vaccination practice, which is one of the most effective methods of protection from the disease during the pandemic process, and the infodemic, which is one of the difficulties that cause this process to not be effective at the expected level, increase the importance of COVID-19 vaccine literacy and show the contribution of the COVID-19 vaccine literacy level to the pandemic management.

The aim of the research is to evaluate the COVID-19 vaccine literacy level of Çankırı province, determine the factors affecting COVID-19 vaccine literacy, and show the COVID-19 vaccine literacy level, demographic characteristics, and vaccine attitudes.

MATERIAL and METHOD

Population and sample

The universe of the research consists of individuals registered in the Family Health Center (FHC) located in Çankırı province, the central district, and all districts. In the study, the sample size and the number of universes are known, the sample size calculation method is based on the sample calculation method, and the formula “ $n = \frac{N * p * q * Z^2}{[(N-1) * d^2] + (p * q * Z^2)}$ ” was used and the sample size was calculated. The

number was found to be 384.

The determined sample number was allocated according to the FHC populations in the center and districts, the total number of samples was taken as 400 (Table 1).

Data collection and analysis

In this study, a questionnaire was used as a data collection tool. The survey consists of two parts. In the first part, there are 12 questions, including socio-demographic characteristics. In the second part, there is the COVID-19 vaccine literacy scale.

COVID-19 Vaccine Literacy Scale: It was developed by Ishikawa et al. (8) to assess health literacy in people with chronic diseases and adapted as the COVID-19 vaccine literacy scale by Biasio et al. (9). Durmus et al. (10) Turkish validity and reliability study of the scale was carried out, and the scale’s validity and reliability were found to be appropriate. The scale consists of two dimensions and 12 statements. In the study, between 01.12.2021 and 31.01.2022, all FHCs in Çankırı were visited, and individuals aged 18 and over who came to the FHC were randomly selected, and a face-to-face questionnaire was applied by obtaining informed consent from the volunteers who agreed to participate in the study.

In the study, data were recorded and analyzed with the Statistical Package for Social Science (SPSS) 25.0 statistical program. It was accepted that the data was normally distributed because the kurtosis and skewness values were between -2.0 and +2.0. Validity and reliability analyzes were performed in the evaluation of the data, and numbers, percentages, arithmetic mean and standard deviation values were used in descriptive statistical methods. Pearson Chi-Square Analysis was used for the relationship between categorical variables, independent samples t test was used to show the difference between two independent samples, analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means of more than two independent samples, and pearson correlation analysis was used as correlation analysis.

The study was approved by the Çankırı Karatekin University, Health Science Research Ethics Committee (Date: 09.11.2021 and Number: 3). Prior to the study,

informed consent form was also provided at the beginning of the questionnaire for each participant.

Table 1. Sample distribution according to family health centers

City / County	Family Health Center	Total Population	Number of Samples
Çankırı	Taşmescit	21.401	50
	Cumhuriyet	26.520	62
	Aksu	7.375	17
	Dr. Refik Saydam	9.854	23
	Zübeyde Hanım	18.363	43
	Esentepe	3.025	7
	Emir Karatekin	2.549	6
	Karataş	5.985	14
Yapraklı	Yapraklı	2.357	6
	Yüklü	3.431	8
Atkaracalar		2.476	6
Bayramören		1.618	4
Çerkeş		13.805	33
Eldivan		3.733	9
İlgaz		12.150	29
Kızılırmak		7.189	17
Korgun		3.846	9
Kurşunlu		7.181	17
Orta		7.698	18
Şabanözü		9.280	22
	Total	169.836	400

RESULTS

Socio-demographic characteristics of the samples were summarized in Table 2. 43.5% of the people participating in the study were male; 56.5% of them were women. 125 people (31.2%) between the ages of 18 and 30; 163 people (40.8%) between the ages of 31 and 40; and 112 (28%) over the age of 40. 304 participants were married (76.0%), and 96 participants were single (24.0%).

When the educational status is examined, the most undergraduate graduates (43.5%) are high school graduates (25.0%), followed by associate degree graduates (14.5%) and graduate or doctorate graduates (6.8%). While there are 213 people (53.3%) working in the public sector, 83 people (20.8%) are not working. Although their places of residence are proportional to their family medicine population, 222 people (55.5%) participated from Çankırı central district (Table 2).

Table 2. Socio-demographic characteristics of the participants

Features		N	%
Gender	Male	174	43.5
	Female	226	56.5
Age	18-30	125	31.2
	31-43	163	40.8
	+44	112	28.0
Marital Status	Married	304	76.0
	Single	96	24.0
Educational Status	Primary school	18	4.5
	Secondary school	23	5.8
	High school	100	25.0
	Associate degree	58	14.5
	University	174	43.5
	Master's / PhD	27	6.8
Working Status	Public	213	53.3
	Special	56	14.0
	Own working place	22	5.5
	Student	26	6.5
	Unemployed	83	20.8
City / District	Centrum	222	55.5
	Ilgaz	29	7.2
	Çerkeş	33	8.3
	Kurşunlu	17	4.3
	Atkaracalar	6	1.5
	Bayramören	4	1.0
	Orta	18	4.5
	Şabanözü	22	5.5
	Kızılırmak	17	4.3
	Korgun	9	2.3
	Eldivan	9	2.3
	Yapraklı	14	3.5

In terms of the health histories of the participants, it was seen that 28.7% of them smoked, 14.8% of them had at least 1 chronic disease and used regular medication, and the most common chronic disease was hypertension (5.8%). It was determined that those who had COVID-19 disease were 30.8% and those who

had the COVID-19 vaccine were 88.0%. According to the COVID-19 vaccine type, it was observed that the most doses of mRNA vaccine (34.8%) were administered by those in the heterologous vaccination group who received 2 doses of inactivated and 1 dose of mRNA and 2 doses of inactive and 2 doses of mRNA (Table 3).

Table 3. The health characteristics of the participants

Features		N	%
Cigarette	Smoker	115	28.7
	Non-Smoker	285	71.3
Regular Medication	Uses	59	14.8
	Not using	341	85.3
Presence of chronic disease	Hypertension	23	5.8
	Diabetes Mellitus	11	2.8
	Hypothyroidism	10	2.5
	FMF	4	1.0
	Ankylosing spondylitis	4	1.0
	Asthma	4	1.0
	Gout	1	0.3
	Pemphigus Vulgaris	1	0.3
Get a Covid-19	Yes	123	30.8
	No	277	69.3
Covid-19 Vaccine	Done	352	88.0
	Not done	48	12.0
Covid-19 Vaccine Type	I'm not vaccinated	48	12.0
	2 doses of inactivated vaccine	42	10.5
	3 doses of inactivated vaccine	44	11.0
	1 dose of mRNA vaccine	10	2.5
	2 doses of mRNA vaccine	139	34.8
	3 doses of mRNA vaccine	11	2.8
	2 doses of inactivated and 1 dose of mRNA vaccine	54	13.5
	2 doses of inactivated and 2 doses of mRNA vaccine	52	13.0

When a total of 48 people (12%) who did not receive the COVID-19 vaccine were examined, the most marked reasons for not getting vaccinated were “I don’t believe in the effect of the vaccine” (33,1%), “I am afraid of the side effects” (31,3%), and “I am waiting for the Turkish vaccine” (18,8%) (Table 4).

When COVID-19 vaccine literacy levels were examined according to sociodemographic characteristics, no statistically significant difference was found between vaccine literacy levels according to gender, marital status, drug use, chronic disease, or COVID-19 history. In addition, a statistically significant difference was found between the COVID-19

vaccination history and vaccine literacy and vaccine literacy subgroups, and COVID-19 vaccine literacy was found to be higher in those who were vaccinated. When cigarette smoking and COVID-19 vaccine literacy levels were examined, although they were lower in smokers, no significant difference was found (Table 5).

When the education levels, vaccination literacy levels, and subgroup skills are examined, it is observed that functional skills increase as the education level increases, and the functional skills of primary school graduates are statistically significantly lower than all other groups ($p=0.0001$) (Post Hoc Hochberg’s GT2).

Table 4. Reasons for not being vaccinated against COVID-19

Reasons For Not Being Vaccinated	N	%
I do not believe in the effect of the vaccine	16	33.3
I'm afraid of the side effects	15	31.3
I'm waiting for the Turkish vaccine	9	18.8
I am pregnant / breastfeeding	7	14.6
I want natural immunity	1	2.1
TOTAL	48	100.0

Table 5. Vaccine literacy levels according to the socio-demographic characteristics of the participants

		Functional Skills				Communication Skills			Vaccine Literacy		
		N	Mean	St d	p	Mean	St d	p	Mean	St d	p
Gender	Female	226	2.74	0.73	0.498	2.86	0.68	0.678	2.79	0.51	0.809
	Male	174	2.79	0.84		2.83	0.64		2.81	0.56	
Marital Status	Married	304	2.78	0.79	0.314	2.84	0.66	0.937	2.81	0.54	0.498
	Single	96	2.69	0.73		2.85	0.63		2.77	0.51	
Smoking	Yes	115	2.64	0.71	0.052	2.82	0.68	0.645	2.73	0.53	0.087
	No	285	2.81	0.79		2.85	0.65		2.83	0.53	
Drug Use	Yes	59	2.73	0.89	0.788	2.81	0.70	0.695	2.77	0.67	0.664
	No	341	2.76	0.75		2.85	0.65		2.80	0.51	
History of passing Covid-19	Yes	123	2.77	0.78	0.785	2.78	0.62	0.241	2.78	0.49	0.602
	No	277	2.75	0.77		2.87	0.67		2.81	0.55	
Covid-19 vaccine status	Yes	352	2.79	0.77	0.024	2.87	0.65	0.013*	2.83	0.53	0.002
	No	48	2.51	0.77		2.61	0.65		2.56	0.55	

When the communicative skills subgroup was examined, it was found that as the education level of the groups increased, this skill level also increased, and the communicative skill levels of the individuals with primary and secondary education were found to be statistically significantly lower than the other groups ($p=0.0001$) (Post Hoc Hochberg's GT2). Considering the relationship between vaccination literacy and education level, it was determined that individuals with primary school education had a statistically significantly lower vaccination literacy level than all other groups, and at the

same time, undergraduate and graduate education levels were statistically significantly higher than individuals with primary, secondary, high school, and associate degree education levels. It was determined that the level of COVID-19 vaccine literacy increased as the education level increased ($p=0.0001$) (Post Hoc Hochberg's GT2) (Table 6).

When the functional skills and communicative skills are compared, the group that has the highest subgroup score, which forms the subgroups of COVID-19 vaccine literacy with their working status, is followed by people working in the public sector,

those working in the private sector, those with their own workplaces, students, and the unemployed. When the subgroups were compared among themselves, the functional skills, communicative

skills, and COVID-19 vaccine literacy levels of the public working group were found to be statistically significantly higher than those of the non-working group ($p=0.001$) (Post Hoc Hochberg's GT2).

Table 6. Vaccine literacy levels of the participants according to their educational, working status and generations

		Functional Skills				Communication Skills			Vaccine Literacy		
		N	Mean	St d	p	Mean	St d	p	Mean	St d	p
Education Status	Primary School	18	1.73*	0.58	<0.001	2.06**	0.12	<0.001	1.90***	0.48	<0.001
	Secondary School	23	2.51	0.65		2.32**	0.72		2.41	0.46	
	High School	100	2.64	0.72		2.57	0.64		2.61	0.47	
	Associate Degree	58	2.68	0.66		2.95	0.48		2.81	0.39	
	University	174	2.93	0.76		3.05	0.58		2.99***	0.47	
	Master's/PhD	27	3.12	0.79		3.25	0.48		3.18***	0.43	
Working Status	Public	213	2.92*	0.74	<0.001	2.96**	0.61	<0.001	2.94***	0.49	<0.001
	Special	56	2.70	0.76		2.83	0.57		2.77	0.50	
	Own Working	22	2.60	0.83		2.78	0.71		2.69	0.60	
	Student	26	2.57	0.61		2.89	0.50		2.73	0.44	
	Unemployed	83	2.47*	0.80		2.54**	0.76		2.51***	0.57	
Generations	Generation Z	27	2.46	0.67	0.02	2.62	0.72	0.01	2.54	0.53	<0.001
	Generation Y	271	2.83*	0.76		2.89**	0.64		2.86***	0.48	
	Generation X	81	2.73	0.74		2.87**	0.65		2.80	0.55	
	Baby Boom	21	2.27	0.98		2.36	0.68		2.32	0.76	

When vaccination literacy levels and subgroups are investigated according to generations, in the functional skills subgroup, the Y generation has the highest score with 2.83 points, while the baby boom generation constitutes the lowest score group with 2.27 points. When subgroups were compared among themselves, the Y generation was found to be statistically significantly higher than both the BP generation and the Z generation ($p<0.05$) (Post Hoc Gabriel).

Considering the subgroups of communicative skills, the Y generation had the highest score (2,89), while a statistically significant difference was found between X-BP and Y-BP ($p=0.01$) (Post Hoc Gabriel).

When the total scores of COVID-19 vaccine literacy levels are analysed by generation, the Y generation scores 2.86; Generation X scores 2.80; Generation Z scores 2.54; and the BP generation scores 2.32

points. Y generation was found to be statistically significantly higher than Z generation and BP generation ($p = 0.023$; $p = 0.020$) (Post Hoc Gabriel).

When the correlation analysis between vaccination literacy level and its sub-dimensions was examined, a significant positive correlation was found between vaccination literacy level and both functional and communicative skills ($p<0.01$). There was also a statistically significant positive correlation between functional and communicative skills, which are both sub-dimensions ($p<0.05$). At the same time, a statistically significant negative correlation was found between age and functional skills ($p<0.05$). While there was no significant correlation between communicative skills and age, a statistically significant negative correlation was found between general COVID-19 vaccine literacy and age ($p<0.05$) (Table 6).

When the COVID-19 vaccine literacy level and subgroup skills are examined according to Çankırın districts, the central district scores the highest score in functional skills scoring, while the Korgun district receives the lowest score. While central district has the highest score in communicative skills, the lowest score is seen in Eldivan district.

When the COVID-19 vaccine literacy level is analysed by district, the highest literacy level is seen in the central district, the second rank is in the Sabanözü district, and the lowest literacy level is found in the Eldivan district. No statistically significant difference was found between the districts, both in subgroups and in the COVID-19 vaccine literacy level (Table 7).

Table 7. Covid-19 vaccine literacy levels by district

		Functional Skills				Communication Skills			Vaccine Literacy		
		N	Mean	St. d	p	Mean	St. d	p	Mean	St. d	p
District	Merkez	222	2.87	0.75	0.061	2.98	0.61	0.061	2.93	0.49	0.073
	İlgaz	29	2.64	0.79		2.63	0.78		2.64	0.64	
	Çerkeş	33	2.74	0.69		2.73	0.81		2.73	0.53	
	Kurşunlu	17	2.58	0.82		2.80	0.49		2.69	0.45	
	Atkaracalar	6	2.70	0.62		2.81	0.62		2.76	0.46	
	Bayramören	4	2.56	0.23		2.43	0.84		2.50	0.51	
	Orta	18	2.62	0.77		2.63	0.50		2.63	0.50	
	Şabanözü	22	2.72	0.64		2.81	0.53		2.77	0.37	
	Kızılırmak	17	2.79	0.91		2.70	0.78		2.75	0.57	
	Korgun	9	2.23	0.51		2.79	0.36		2.46	0.30	
	Eldivan	9	2.27	0.98		2.21	0.55		2.22	0.62	
	Yapraklı	14	2.41	0.98		2.44	0.70		2.42	0.79	

DISCUSSION

The findings of this study, which was conducted to show the COVID-19 vaccine literacy level in Çankırın province and to determine the factors affecting the vaccine literacy level, were discussed together with the studies in the relevant literature.

In this study, no significant difference was found between gender and COVID-19 vaccine literacy levels. Although there are no detailed studies on COVID-19 vaccine literacy in the literature, there are many studies on health literacy. In some studies conducted with university students, health literacy levels were found to be higher in women than in men, and this was found to be statistically significant (11,12). At the same time, there are

many studies in the literature showing that there is no significant difference between health literacy and gender (13,14). In this study, no significant difference was found between gender and COVID-19 vaccine literacy levels. It is thought that the reason for such different results in the studies is that the populations in which the studies are conducted are different, and the socio-demographic and cultural characteristics vary according to the sample studied.

Although there are not enough studies in the literature comparing COVID-19 vaccine literacy and marital status, there are various studies on health literacy levels. In addition to studies in which singles have higher health literacy levels than married people (15,16), there are studies in which married people have higher health literacy levels than singles

(17). In this study, although the COVID-19 vaccine literacy levels of married people were higher than those of singles, no statistically significant difference was found. There are different results in many studies in the literature. It can be thought that it may have originated from different age and sociocultural groups.

Considering the chronic disease status, regular drug use, and COVID-19 vaccine literacy levels in our study, there was no statistically significant difference, although the COVID-19 vaccine literacy levels were lower in patients using regular medication. In the literature, there are studies in which health literacy levels decrease as the number of chronic diseases increases (18). At the same time, in another study conducted with patients using regular hypertension drugs, no significant difference was found between health literacy level and regular drug use (19). The most important reason for the different results in the literature has been evaluated as the difference in chronic diseases and the variability of age groups.

When smoking and COVID-19 vaccine literacy levels are examined, COVID-19 vaccine literacy levels and sub-skill groups were found to be lower in smokers, but no statistically significant difference was found. In many studies in the literature, no significant difference was found between smoking and health literacy levels (20-22). Smoking: It is thought that many factors such as age, gender, economic situation, and smoking cessation policies in countries affect it. For this reason, studies with different results are found in the literature.

In this study, when the COVID-19 vaccine status and COVID-19 vaccine literacy levels were examined, the literacy level was found to be higher in individuals who were vaccinated. In Durmus et al. (10), the communicative skills subgroup and vaccine literacy levels of those who have knowledge about the COVID-19 vaccine were found to be higher, which supports this study. Individuals with a high vaccination literacy level show sensitivity to issues that will affect the course of many epidemics, such as prevention of diseases, reduction of

transmission, and vaccination applications. They also conduct research on the COVID-19 vaccine, and these studies affect vaccine preferences.

The highest vaccination literacy level is seen in postgraduate and doctoral graduates; it has been determined that the lowest is among primary school graduates. It is seen that as education levels increase, COVID-19 vaccine literacy levels and subgroup skills increase. Similar to this study, in other studies in the literature, COVID-19 vaccine literacy levels increase as the level of education increases (9,10). It is obvious that the processes of accessing, understanding, evaluating, and applying information are based on certain education and training.

In our study, the highest vaccination literacy level was seen in people working in the public sector, but the lowest vaccination literacy level was found in the non-working population. Although there is no study on this subject in the literature, a weak positive correlation was found between social status and health literacy levels in the European Health Literacy Survey (23). Considering that social status is in a close relationship with income, education level, and welfare level, the fact that COVID-19 vaccine literacy levels are lower in the non-working group can be explained by this situation.

The vaccine literacy level in Çankırı province is 2.80 ± 0.53 ; functional level is $2.760.77$; and the communication level was determined at 2.84 ± 0.66 . Scoring is made between 1-4 on the scale; the vaccine literacy level increases as it approaches 4, below 2.5 is considered limited, and the COVID-19 vaccine literacy level in ankiri province is determined as medium level. When the districts are examined, Korgun, Yaprakli, and Eldivan districts have a score below 2.50. According to TUIK 2021 data, Çankırı is the 5th province with the highest rate of elderly population (16.9%) and also the 5th province (32.1%) with the highest rate of single-person elderly households (24). At the same time, the common features of these districts are that they have the highest proportion of elderly people. Based on these

data, although COVID-19 vaccine literacy levels are lower in districts with a high elderly population, no statistically significant difference was observed.

In this study, vaccination literacy levels were examined according to generations, and the Y generation (born in 1981-1996) was found to be the age group with the highest vaccination literacy levels (2.83) and subgroups. The Y generation is followed by the X generation (born in 1965-1980) (2,73), followed by the Z generation (born 1997-2012), and the BP generation (born 1946-1964). In this study, the Y generation was statistically found to be significantly higher than the Z generation and the BP generation. Looking at the health literacy levels according to the age variable in the literature, it was seen that the highest age group was 28-37 years old, and the health literacy levels decreased as the age increased (13,25,26). It is

thought that regression in cognitive functions with ageing may cause problems in accessing information, understanding and evaluating information, and then using it, negatively affecting the level of literacy. However, unlike other studies, it is thought that the low level of COVID-19 vaccine literacy, especially in the Z generation (18-25 years old), is due to the different priorities of the young people in this age period and their lack of interest in the field of health.

As a result, it is the vaccines that ensure the formation of social immunity in the fight against the COVID-19 pandemic, which affects our country and the whole world. In order to prevent COVID-19, which affects individuals aged 65 and over more, and to reduce the effect of the virus in case of transmission, vaccination and vaccination programmes should be better explained, and society should be better informed.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Çankırı Karatekin University, Health Science Research Ethics Committee (Date: 09.11.2021 and Number: 3).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Türkiye’de aşının tarihçesi. <https://covid19asi.saglik.gov.tr/TR-77801/turkiyede-asinin-tarihcesi.html>, Accessed Date: 05.06.2022.
2. Buzgan T. Vaccine policies in our country. In: Badur S, Bakır M, eds. Aşı Kitabı. İstanbul: Express Basımevi. 2012:55-63.
3. Erişkin Bağışıklama Rehberi Çalışma Grubu. Erişkin Bağışıklama Rehberi. Ankara: Türkiye Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği. 2016.
4. Sönmez C. 2006-2015 Global immünizasyon vizyon ve stratejisi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2006; 63(EK-1): 9-10.
5. Özgüneş İ. Current vaccines in adults. ANKEM Derg, 2014; 28(Ek 2), 193-8.
6. Ratzan S. Vaccine literacy: a new shot for advancing health. J Health Commun, 2011; 16(3): 227-9.
7. Biasio LR. Vaccine literacy is undervalued. Hum Vaccin Immunother, 2019; 15(11): 2552-3.
8. Ishikawa H, Takeuchi T, Yano E. Measuring functional, communicative, and critical health literacy among diabetic patients. Diabetes Care, 2008; 31(5): 874-9.
9. Biasio L, Bonaccorsi G, Lorini C, Pecorelli S. Assessing COVID-19 vaccine literacy: a preliminary online survey. Hum Vaccin Immunother, 2021; 17(5): 1304-12.
10. Durmuş A, Akbolat M, Amarat M. COVID-19 Aşı okuryazarlığı ölçeğinin Türkçe geçerlilik ve güvenilirliği. Cukurova Med J, 2021; 46(2): 732-41.
11. Sukys S, Cesnaitiene VJ, Ossowsky ZM. Is health education at university associated with students’ health literacy? evidence from cross-sectional study applying HLS-EU-Q. Biomed Res Int, 2017:1-9.
12. Ergün S. Sağlık yüksekokulu öğrencilerinde sağlık okuryazarlığı. Kocaeli Medical J, 2017; 6(3): 1-6.
13. Darvishpour J, Omid S, Farmanbar R. The relationship between health literacy and hypertension treatment control and follow-up. Caspian J Health Res, 2016; 2(1): 1-8.
14. Lima J, Abreu D, Bandeira E, Garlet B, Martins N. Functional health literacy in older adults with hypertension in the family health strategy. Rev. Bras Enferm, 2020, 73(Suppl. S3): e20190.
15. Kaya ŞD, Uludağ A. Relationship between the health and media literacy. Mehmet Akif Ersoy Üni Sosyal Bil Enst Derg, 2017; 9(22): 194-206.
16. Biçer EB, Malatyalı İ. Sağlık okuryazarlık düzeyinin belirlenmesi: Sivas Cumhuriyet Üniversitesi örneği. Ankara Sağ Hizmet Derg, 2018; 17(2): 1-15.
17. Temel AB, Çimen Z. Kronik hastalığı olan yaşlı bireylerde sağlık okuryazarlığı, sağlık algısı ve ilişkili faktörler. Ege Üni Hemşirelik Fak Derg, 2015; 33(3): 105-25.
18. Heijmans M, Waverijn G, Rademakers J, van der Vaart R, Rijken M. Functional, communicative and critical health literacy of chronic disease patients and their importance for self-management. Patient Educ Couns, 2015; 98(1): 41-8.
19. Shi D, Li J, Wang Y, Wang S, Liu K, Shi R, et al. Association between health literacy and hypertension management in a Chinese community: a retrospective cohort study. Intern Emerg Med, 2017; 12: 765-76.
20. Sezgin Ö. Isparta Gül Küçük Sanayi Sitesi küçük ölçekli iş yeri çalışanlarında sağlık okuryazarlığı düzeyi ve ilişkili faktörler. Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2019.

21. Durmaz S, Sürücü E, Özvuramaz S. Mermer fabrikası işçilerinde sağlık okuryazarlığı, sağlık algısı düzeyleri ve ilişkili faktörlerin belirlenmesi. *Med Sci*, 2020;15(3): 81-91.
22. Sarhan MB, Fujii Y, Kiriya J, Fujiya R, Giacaman R, Kitamura A, et al. Exploring health literacy and its associated factors among Palestinian university students: a cross sectional study. *Health Promot Int*, 2021; 36(3): 854-65.
23. Pelikan JM, Röthlin F, Ganahl K. On behalf of the European Health Literacy Project Consortium. Comparative report on health literacy in eight EU Member States. The European Health literacy Survey HLS-EU, Vienna: Ludwig Boltzmann Institute. 2012.
24. Yaşlı nüfus oranının en yüksek ve en düşük olduğu 10 il. Adrese dayalı nüfus kayıt sistemi. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=45500>, Erşim Tarihi: 05.06.2022.
25. McNaughton CD, Kripalani S, Cawthon C, Mion LC, Wallston KA, Roumie CL. Association of health literacy with elevated blood pressure: a cohort study of hospitalized patients. *Med Care*, 2014; 52(4): 346-53.
26. Levinthal BR, Morrow DG, Tu W, Wu J, Murray MD. Cognition and health literacy in patients with hypertension. *J Gen Intern Med*, 2008; 23: 1172-6.

Analytical insights into edible plant volatiles: SPME-GC/MS analysis and antioxidant/anticancer evaluation with *in vitro* and *in silico* methods

Yenilebilir bitki uçucu maddelerine ilişkin analitik bilgiler: SPME-GC/MS analizi ve *in vitro* ve *in silico* yöntemlerle antioksidan/antikanser değerlendirme

Emine ATEŞ ARSLAN¹ (ID), Nilüfer VURAL^{2,3} (ID), Emine Kübra İNAL⁴ (ID), Sibel KAYMAK² (ID), Mehmet Abdülkadir AKAY⁴ (ID), Mustafa TAŞTEKİN⁴ (ID)

ABSTRACT

Objective: Due to the secondary metabolites, edible plants have been a recent focus in the literature for their biotherapeutic effects and functional food potentials. Discovering the aromatic bioactive components of plants consumed as food is of great importance in an ethnobotanical vision. In this context, the study investigated *Helichrysum arenarium* L., *Origanum sipyleum* L., *Plantago major* L., and *Rumex* spp. species both *in vitro* and *in silico*.

Methods: The volatile composition and identification of these plants were determined using carboxen-polydimethylsiloxane / solid-phase microextraction (CAR-PDMS/SPME) fiber with gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) method. Moreover, the antioxidant activities of the plants were determined using a 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical and β -carotene-linoleic acid assays. To determine their antioxidant activities and inhibitory effects on oral cancer, molecular docking analysis was conducted. Also, ADMET (absorption, distribution, metabolism, elimination and toxicity) properties were identified, the

ÖZET

Amaç: Yenilebilir bitkiler, sekonder metabolitleri kaynaklı, biyoterapötik etkileri ve fonksiyonel gıda potansiyelleri açısından literatürde son zamanların odak noktası olmuştur. Gıda olarak tüketilen bitkilerin aromatik biyoaktif bileşenlerinin keşfedilmesi etnobotanik vizyonda büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, *Helichrysum arenarium* L., *Origanum sipyleum* L., *Plantago major* L. ve *Rumex* spp. türleri hem *in vitro* hem de *in silico* olarak araştırılmıştır.

Yöntem: Bu bitkilerin uçucu bileşimi ve tanımlanması karboxen-polidimetilsiloksan/katı faz mikroekstraksiyon (CAR-PDMS/SPME) fiber ile gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bitkilerin antioksidan aktiviteleri 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali ve β -karoten-linoleik asit analizleri kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidan aktiviteleri ve oral kansere yönelik inhibitör etkilerini belirlemek amacıyla moleküler docking (yanaştırma) analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, ADMET (absorbsiyon, dağılım, metabolizma, eliminasyon ve toksisite) özellikleri belirlenmiş,

¹Ministry of Health, Turkish Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Ankara, Türkiye

²Ankara Yıldırım Beyazıt University, Institute of Public Health, Department of Traditional, Complementary and Integrative Medicine, Biotherapeutic Products Research and Development Program, Ankara, Türkiye

³Ankara Yıldırım Beyazıt University, Vocational School of Technical Sciences, Department of Food Processing, Ankara, Türkiye

⁴Ankara University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Nilüfer VURAL

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etlik, Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : nilufervural@aybu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 21.07.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 29.11.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.65289

Ateş Arslan E, Vural N, İnal EK, Kaymak S, Akay MA, Taştekin M. Analytical insights into edible plant volatiles: SPME-GC/MS analysis and antioxidant/anticancer evaluation with *in vitro* and *in silico* methods. Türk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 67 - 84

presence of carcinogenic and mutagenic components was investigated, and their potentials for various diseases were revealed through PASS (prediction of activity spectra for substances) analysis.

Results: The results indicate that the plants exhibit a rich profile of volatile bioactive compounds, with the highest bioactive compound content found in *Rumex* spp. Compared with other plants, *Helichrysum arenarium* was found to have the highest antioxidant potential and in silico anticancer potential. Additionally, it was determined that the various volatile compounds of the plants could have protective effects on the gastrointestinal system and could be used particularly for stomach complaints.

Conclusion: This investigation shows that these plants may have pharmaceutical and dietary potential as functional foods.

Key Words: Gas chromatography-mass spectroscopy, edible plants, functional food, molecular docking simulation

karsinojenik ve mutajenik bileşenlerin varlığı araştırılmış ve çeşitli hastalıklara yönelik potansiyelleri PASS (maddelerin aktivite spektrumlarının tahmini) analizi ile ortaya konulmuştur.

Bulgular: Sonuçlar, bitkilerin zengin bir uçucu biyoaktif bileşen profili sergilediğini ve en yüksek biyoaktif bileşen içeriğinin *Rumex* spp.'de bulunduğunu göstermiştir. Diğer bitkilerle karşılaştırıldığında, *Helichrysum arenarium*'un en yüksek antioksidan ve in silico antikanser potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bitkilerin çeşitli uçucu bileşenlerinin gastrointestinal sistem üzerinde koruyucu etkileri olabileceği ve özellikle mide şikayetlerinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Sonuç: Bu araştırmada kullanılan bitkilerin fonksiyonel gıdalar olarak farmasötik ve diyet potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Gaz kromatografi-kütle spektrometresi, yenilebilir bitkiler, fonksiyonel gıda, moleküler docking simülasyonu

INTRODUCTION

The exploration of plants and their significance in therapeutic approaches dates to the early stages of human civilization. These natural resources contain various bioactive compounds resulting from the production of plant secondary metabolites. Ethnopharmacology and pharmacognosy stand out as two major scientific fields dedicated to uncovering new natural remedies from these plants (1). In addition, an emerging discipline, reverse pharmacognosy, uses computational tools to enhance the efficiency of drug discovery and design processes. In addition, the field of traditional phytotherapy, which encompasses the medicinal use of plants, stands as both a historical and contemporary precursor among disease treatment options (2). Nowadays, in less-developed countries, over 80% of the population primarily relies on herbal products to obtain healing benefits. Plant-derived components that provide these health

benefits are referred to as phytochemicals, which are also considered micronutrients in diets (3). Phytochemicals exhibit not only high antioxidant activities but also possess properties such as chelation of metal ions, stimulation of detoxifying enzymes, and inhibition of transcription factors that initiate and support tumor development. Simultaneously, they have a wide range of diverse features, including preventive effects on degenerative diseases, anti-allergenic, anti-inflammatory, antimicrobial, antithrombotic, anticarcinogenic, antiatherogenic, antiulcer, and vasodilator effects (4). Embracing a diet rich in edible plants not only fulfills nutritional requirements but also serves as a proactive approach to promoting health and well-being through the powerful influence of phytochemicals. According to the plant database system of the Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Türkiye is home to 12,141 different plant species, most of which are actively consumed in diets. Among the taxonomic

diversity, Ankara, ranking seventh, has several Anatolian culinary cultures based on these plants (5).

Türkiye has a rich diversity of species within the *Lamiaceae* family, with 49 genera and 629 species naturally distributed across the country. In addition, this family harbors 360 endemic taxa in Türkiye. Among these, *Origanum* stands out with 23 species and 27 taxa naturally occurring in Türkiye with great biotherapeutic potentials such as antimicrobial, antioxidant, and antiviral properties (6). On the other hand, the *Helichrysum* species is represented in the Turkish flora by 27 taxa, 15 of which are endemic and commonly found in Anatolia. These plant species are known for their antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antiproliferative, antiradical, cholinergic, hepatoprotective, and detoxifying properties (7). *Rumex* is another plant group with a wide distribution in Türkiye (22 species) and is known for its appetite stimulant and blood purifier features in traditional uses. Among the properties tested on people in our healing books from the 15th century, there are different biotherapeutic effects of the plants, such as preventing intestinal worms, antipyretic, and diuretic effects when consumed raw (8). Lastly, *Plantago* leaves, belonging to the *Plantagiaceae* family, have been used as a wound-healing herbal agent in traditional medicine for many years. *P. major* contains high concentrations of mucilaginous carbohydrates and is frequently used to treat intestinal diseases (9). In addition, it has been traditionally used as an analgesic and antipyretic in wound healing and other skin diseases, for treating infectious diseases, in problems related to digestive and respiratory organs, and in reproductive and circulatory problems (8). One of the important steps in benefiting from plants considering their traditional use is the correct selection of plant species. Most of the time, the same plant species named in different regions differ from each other. Because the basis of regional naming is that people living in the region recognize the plants and use them for different purposes, plants that are similar in appearance,

taste, and smell can sometimes receive the same name. Although this makes a great contribution ethnobotanically, it can sometimes cause confusion (10). Such differently named edible plants constitute the basis of antioxidant sources for consumers. While green edible plants are used to increase the organoleptic qualities (aroma, flavor, and taste) of many food products, their possible health-promoting effects are one of the popular research topics. Phytochemicals in edible plants can include hundreds of different volatile and non-volatile compounds such as polyphenols, terpenes, and alkaloids. In addition to providing “sweetness”, “spicy”, “floral” and “herbal” properties in plant species, volatile compounds can also have a strong pharmaceutical effect (11). *Rumex*, *Plantago* and other plant species, which are very popular edible plants around the world, may some of their components have a great bioactive volatile compound potential. Therefore, in this study, four different edible plant species were collected and analyzed by solid phase microextraction- gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS). Additionally, *in vitro* antioxidant and *in silico* anticancer properties were investigated.

MATERIAL and METHOD

Chemicals and reagents

All the analytical grade chemicals were used to perform both chemical and biological experiments. Ethanol, methanol, hexane, acetone, and other solvents were purchased from Merck. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma Aldrich. Milli-Q water was used for the preparation of solutions.

Plant materials

Fresh plant samples (*Helichrysum arenarium* L., *Origanum sipyleum* L., *Plantago major* L., and *Rumex* spp.) consumed by local people in meals were purchased from the local bazaar in Ayas, a region in Ankara Province in Central Anatolia Region, Türkiye, in June-August 2023. The aerial parts of the plants

were washed, cleaned, and shade-dried at room temperature without an airflow (25 °C) for 15 days.

Isolation of the volatiles by SPME

First, the carboxen/polydimethylsiloxane (CAR-PDMS) SPME fiber was conditioned in the GC/MS device injection port at 220 °C for 10 min. The conditioned fiber was inserted into glass vials; the mouth was tightly closed with a crimple containing 0.5 g of plant sample through an SPME holder. Afterward, plant volatile components were allowed to be absorbed into the SPME fiber for 30 min at 80 °C. Finally, the fiber was drawn into the holder, taken from the vial, and placed into the injection port of the device (12).

GC/MS analysis

The volatile compounds were analyzed via GC using the Shimadzu GC-17A/QP5000 system equipped with both a flame ionization detector (FID) and a mass selective detector (MSD) (12). A supelcowax-10 capillary column (30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 film thickness) was employed, with helium serving as the carrier gas at a flow rate of 1.8 mL/min. The temperature program involved an initial hold at 40 °C for two minutes, followed by a gradual increase of 2 °C per minute until reaching 220 °C, where it was maintained for 30 minutes. The injector and MSD transfer line temperatures were set at 200 °C and 250 °C, respectively, while the FID temperature was maintained at 300 °C. The analytes were detected via electron impact ionization (70 eV) in SCAN mode over the mass range of m/z 50 to 550. Compound identification relied on comparing spectra and retention times against standards. This comparison encompassed relative retention times to a C8-C32 n-alkanes mixture, mass spectra from various sources including NBS75K, Wiley 7, NIST MS search 2.0 library data, and literature references. All analyses were conducted in triplicate.

Total antioxidant activities

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and β -carotene-linoleic acid assays were used to determine the antioxidant activities of aqueous plant

extracts (13). For DPPH activity, 500 μ L of 120 μ M DPPH ethanol solution and 500 μ L of pure ethanol were added to 200 μ L of plant extracts prepared at different concentrations, and the resulting mixture was incubated at room temperature and in the dark for 30 min. As a result of the incubation, the intensity of the purple color (resulting from the reaction) in all samples was determined by absorbance measurements against blank (200 μ L dH₂O, 500 μ L DPPH, 500 μ L ethyl alcohol) at 517 nm. The results were evaluated using the calibration curve created with different concentration values of standard gallic acid solutions. Antioxidant capacity was also determined by investigating the inhibition of volatile organic compounds and conjugated diene hydroperoxides resulting from the oxidation of linoleic acid. This method relies on the alteration of the yellow color of β -carotene, depending on its reaction with radicals generated during linoleic acid oxidation which the velocity of β -carotene bleaching is attenuated in the presence of antioxidants. This alteration serves as the basis for evaluating the antioxidant activity of the plant samples in comparison to well-established synthetic and natural antioxidants, such as butylated hydroxytoluene (BHT). The antioxidative capacities of the aqueous plant extracts were measured against BHT at equivalent concentrations, with a blank comprising only 350 μ L of ethanol. All experiments were replicated three times for robustness and reliability.

In silico studies

Molecular docking

Structures of target proteins were retrieved from the Protein Data Bank (PDB) (Table 1). Each protein structure was used as a receptor and remained rigid. For the docking preparation procedure of proteins, the following steps were applied: (i) energy minimization was performed with 100 steepest descent steps with a 0.02 Å step size and an update interval of 10, (ii) water molecules non-complex ions were removed, and (iii) polar hydrogen atom and AM1-BCC charges were added. For ligand structure retrieval and preparation, chemical structures were downloaded

Table 1. Molecular docking parameters

Structure Name	PDB ID	Target Activity	Grid Box Center Coordinates	Grid Box Size
Kelch-Neh2 complex	2FLU	Antioxidant Activity	center_x = 18 center_y = 17 center_z = 8	size_x = 21 size_y = 21 size_z = 21
EGFR kinase domain	1XKK	Oral Cancer	center_x = 24 center_y = 37 center_z = 36	size_x = 32 size_y = 26 size_z = 26

from the PubChem database in .sdf format. To determine anticancer and antioxidant properties at the molecular level, semi-flexible molecular docking simulations were performed by using AutoDock Vina (14). The binding energy poses of each protein were visualized with Discovery Studio Visualizer (15).

Carcinogenicity and mutagenicity prediction

The potential of any chemical to induce carcinogenicity and mutagenicity in humans and animals were predicted computationally by using CarcinoPred-EL (16) and Lazar (17) prediction web-based tools. To enable the system to perform predictions computationally, the compounds in chemical SMILES format were initially introduced into the system sequentially, and predictions were made by selecting appropriate in silico analysis conditions.

PASS prediction

The PASS online web tool helps predict the expected biological function profile of a chemical substance with similarities to a drug molecule. Computational predictions can be obtained by inserting chemical SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) formats of the chemical structures. The PASS tool prediction results in 2 category labels of “probability to be active” (Pa) or “probability to be inactive” (Pi) as biological activity (18).

ADME/T analysis

ADME/T analysis was performed as the last step of the in silico experiments. SwissADME (19) web tool and literature data were used for these predictions. For analysis, the SMILES chemical data format of all of the bioactive compounds was also retrieved from

the PubChem database.

Statistical analysis

The data underwent statistical analysis using a one-way analysis of variance (ANOVA) with SPSS software (version 27.0.0). To assess differences in biochemical parameters across groups, a post-hoc Tukey test was applied. Statistical significance was assigned to p values below 0.05. Results are presented as the mean \pm standard error of the mean for each test group.

RESULTS

Volatile profiles of plants

Unlike other chemical extraction methods of volatiles, SPME fiber can quantify the highly volatile compounds of the plant samples. The bioactive volatile composition of the plants is given in Table 2. A total of 112 volatile compounds were identified from four different plants. Compared to other plant species, the highest emission of volatile compounds was observed in *Rumex* spp. The component acetic acid was found to be common for all four plants (Figure 1). Particularly, a significant amount of shared volatile components was identified between *P. major* and *Rumex* spp.

Antioxidant activities

The antioxidant analysis results obtained from both experimental methods are presented in Table 3. As can be understood from the results, the highest antioxidant activity was found in *H. arenarium* according to the DPPH test, while the results from the other test indicate that *P. major* exhibits the highest antioxidant activity).

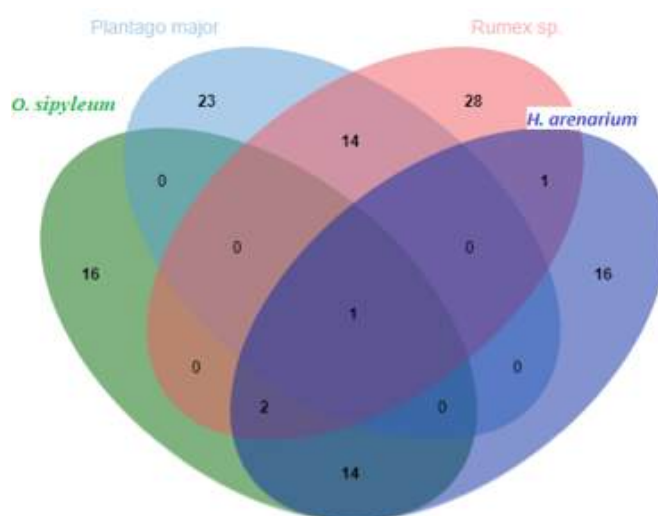


Figure 1. Venn diagram distribution of the plant volatiles

Table 2. Volatile component analysis results with GC-MS after CAR-PDMS/SPME extraction

Volatile compounds of Plants		CAR-PDMS/SPME fibre				Identification Method
		<i>Helichrysum arenarium</i> L.	<i>Origanum sipyleum</i> L.	<i>Plantago major</i> L.	<i>Rumex</i> spp.	
Compound		%	%	%	%	
1	2-Pentadecyn-1-ol	-	-	2,47±0,03	-	a
2	Acetaldehyde	0.11±0.01	1.02±0.02	-	0.98±0.03	a
3	Mercaptomethane	-	-	-	0.15±0.00	a
4	Acetone	0.70±0.02	0.27±0.02	-	0.19±0.01	a
5	n-Butanal	0.06±0.01	-	0.11±0.01	0.29±0.00	a,b
6	Isobutanal	-	-	-	0.40±0.03	a,b
7	2-Methylbutanal	-	-	0.22±0.01	0.68±0.03	a,b
8	Isobutyric anhydride	0.15±0.01	-	-	-	a
9	Methyl Isobutyl Ketone	-	-	-	0.15±0.01	a
10	Acetic acid	0.08±0.01	0.11±0.00	0.24±0.05	3.39±0.05	a,b
11	2-Methylpentanol	0.16±0.01	-	-	-	a
12	Furfural	-	-	2.68±0.02	-	a
13	Alpha-pinene	1.65±0.08	0.39±0.02	-	-	a
14	Camphene	0.09±0.01	0.21±0.01	-	-	a
15	n-Pentanal	-	-	0.18±0.03	-	a

Table 2 (cont.) Volatile component analysis results with GC-MS after CAR-PDMS/SPME extraction

Compound	CAR-PDMS/SPME fibre				Identification Method
	<i>Helichrysum arenarium</i> L.	<i>Origanum sipyleum</i> L.	<i>Plantago major</i> L.	<i>Rumex</i> spp.	
	%	%	%	%	
16 2,4-Pentadienal-	-	-	0.27±0.02	-	a
17 2-Pentenal, (E)-	-	-	0.20±0.05	-	a
18 Sabinene	-	0.39±0.02	-	-	a,b
19 2-Hexenal	-	-	0.16±0.01	-	a,b
20 Furfuryl alcohol	-	-	-	0.56±0.02	a
21 1,3-Cyclopentenedione	-	-	-	0.53±0.03	a
22 2-.Beta.-pinene	0.06±0.04	0.29±0.01	-	-	a,b
23 Beta.-mycrene	0.95±0.01	6.15±0.00	-	-	a,b
24 2-Acetyl furan	-	-	-	0.61±0.02	a
25 Pyrazine, 2,6-dimethyl-	-	-	-	0.39±0.03	a
26 Benzaldehyde	-	-	1.75±0.03	0.66±0.05	a,b
27 5-Methyl furfural	-	-	1.62±0.03	0.57±0.03	a
28 3-Pentanone, 2,4-dimethyl-	-	-	0.31±0.02	-	a
29 1-Octen-3-ol	1.24±0.08	0.65±0.02	-	-	a,b
30 Heptanoic acid	0.26±0.01	-	-	-	a,b
31 6-Methylhept-5-en-2-one	1.09±0.05	-	-	-	a
32 n-Octanal	-	-	-	0.16±0.01	a,b
33 2,4-Heptadienal, (E,E)-	-	-	3.78±0.05	0.36±0.02	a,b
34 Benzeneacetaldehyde	-	-	3.24±0.02	0.38±0.02	a
35 .Beta.-Phellandrene	-	0.17±0.02	-	-	a,b
36 .Alpha.-Terpinene	0.39±0.04	-	-	-	a,b
37 Cymol	2.58±0.50	9.95±0.12	-	-	a,b
38 .Beta.-Terpinyl acetate	13.24±0.3	-	-	-	a
39 1,8-Cineole	7.75±0.21	1.47±0.01	-	-	a,b
40 l-Limonene	-	1.44±0.02	-	-	a,b
41 Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	-	-	-	1.56±0.05	a
42 1-Octanol	-	-	-	0.18±0.02	a
43 1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-beta-ocimene	1.15±0.08	0.59±0.03	-	-	a
44 .Gamma.-Terpinene	0.99±0.01	17.36±0.28	-	-	a,b
45 Thymol	-	20.18±0.32	-	-	a,b
46 Carvacrol	-	10.18±0.24	-	-	a,b
47 .Alpha.-Cubebene	-	0.24±0.01	-	-	a
48 .Alpha.-Copaene	-	2.67±0.03	-	-	a
49 3-Decanone	0.28±0.01	-	-	-	a
50 Alpha-terpinolene	0.75±0.01	1.45±0.02	-	-	a

Table 2 (cont). Volatile component analysis results with GC-MS after CAR-PDMS/SPME extraction

Volatile compounds of Plants		CAR-PDMS/SPME fibre				Identification Method
		<i>Helichrysum arenarium</i> L.	<i>Origanum sipyleum</i> L.	<i>Plantago major</i> L.	<i>Rumex</i> spp.	
Compound		%	%	%	%	
51	Linalool	0.55±0.01	0.28±0.01	-	-	a,b
52	Heptanoic acid	-	-	-	0.23±0.02	a
53	Nonanal	-	-	0.38±0.02	1.65±0.05	a
54	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde, 1-methyl-	-	-	-	0.67±0.03	
55	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	-	-	-	7.12±0.07	a
56	p-Cymene	-	0.63±0.03	-	-	a,b
57	D-Fenchyl alcohol	0.17±0.01	-	-	-	a,b
58	Borneol	0.41±0.03	1.66±0.03	-	-	a
59	Phenylethyl Alcohol	-	-	1.56±0.06	-	a
60	Alpha-Terpineol	0.45±0.03	0.78±0.02	-	-	a
61	Octanoic acid	-	-	0.68±0.00	-	a
62	Linalyl propionate	0.35±0.02	-	-	-	a
63	Trans-2,cis-6-Nonadienal	-	-	0.25±0.01	-	a
64	2-Allylphenol	-	-	0.69±0.02	-	a
65	Decanal	-	-	0.32±0.01	-	a,b
66	4H-Pyran-4-one, 3,5-dihydroxy-2-methyl-	-	-	-	1.12±0.05	a
67	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	-	-	-	0.39±0.03	a
68	Benzofuran, 2,3-dihydro-	-	-	-	2.57±0.05	a
69	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-	-	-	2.30±0.05	5.27±0.07	a
70	Nonanoic acid	-	-	0.67±0.03	2.98±0.05	a
71	Trans-Caryophyllene	21.02±0.31	2.98±0.03	-	-	a,b
72	2,6-Dimethyl-3(2-methyl-1-butyl)pyrazine	-	-	-	0.98±0.04	a
73	.Beta.-Cyclocitral	-	-	0.14±0.01	-	a
74	2-Methoxy-4-vinylphenol	-	-	0.13±0.01	6.27±0.07	a
75	1-Octanol, 2,7-dimethyl-	-	-	0.18±0.03	-	a
76	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	-	-	0.38±0.03	-	a
77	Decanoic acid	-	-	-	0.45±0.02	a,b
78	Limonene oxide	-	-	-	0.32±0.01	a
79	Naphthalene, 1,2-dihydro-1,1,6-trimethyl-	-	-	1.73±0.04	-	a
80	Dodecane, 2,6,11-trimethyl-	-	-	0.48±0.06	-	a

Table 2 (cont.) Volatile component analysis results with GC-MS after CAR-PDMS/SPME extraction

Volatile compounds of Plants	CAR-PDMS/SPME fibre				Identification Method
	<i>Helichrysum arenarium</i> L.	<i>Origanum sipyleum</i> L.	<i>Plantago major</i> L.	<i>Rumex</i> spp.	
Compound	%	%	%	%	
81 Dodecan-2-one	-	-	0.95±0.02	-	a
82 (E)-Geranylacetone	-	-	0.58±0.03	1.55±0.05	a
83 Aromadendrene	0.25±0.01	0.23±0.02	-	-	a
84 .Alpha.-Humulene	30.77±0.31	0.65±0.01	-	-	a
85 .beta.-Ionone	-	-	2.62±0.03	1.38±0.06	a
86 Naphthalene, 1,2-dihydro-2,5,8-trimethyl-	-	-	1.54±0.02	-	a
87 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	-	-	-	0.85±0.02	a
88 Germacrene	-	0.44±0.01	-	-	a,b
89 1-Hexadecanol	-	-	-	0.28±0.03	a
90 Hexadecanal	-	-	-	0.38±0.04	a,ba
91 Methanone, dicyclohexyl-	-	-	-	0.82±0.03	a
92 Methyl pentadecanoate	-	-	-	0.25±0.03	a
93 Neophytadiene	-	-	12.45±0.13	1.25±0.03	a
94 β-Farnesene	0.28±0.02	-	-	-	a
95 .Gamma.-Cadinene	0.39±0.03	-	-	-	a
96 Eudesma-4(14),11-diene	2.28±0.02	-	-	-	a
97 Phytol	-	-	7.32±0.18	0.96±0.03	a
98 2-Undecanone, 6,10-dimethyl-	-	-	8.95±0.13	-	a
99 Farnesylacetone	-	-	0.23±0.00	4.36±0.07	a
100 (+) Spathulenol	-	0.63±0.01	-	-	a
101 (-)-Caryophyllene oxide	-	0.83±0.02	-	-	a
102 1-Decanol, 2-hexyl-	-	-	1.75±0.02	-	a
103 Unknown	-	-	2.32±0.02	-	a
104 Hexadecane	-	-	-	0.26±0.02	a,b
105 n-Hexadecanoic acid	-	-	-	2.49±0.05	a,b
106 Isophytol	-	-	0.21±0.00	-	a
107 .Beta.-selinene	1.04±0.02	-	-	-	a
108 Heptadecane	-	0.25±0.00	-	-	a
109 .Delta.-Cadinene	1.24±0.03	-	-	-	a
110 Hexadecanoic acid, methyl ester	-	-	0.29±0.03	-	a
111 9-Octadecenoic acid	-	-	-	0.18±0.02	a
112 n-Nonadecane	-	-	-	0.43±0.05	a

a : Compounds listed in order of elution from a DB-5 column.

b : Identification of components based on standard compounds

All values are mean ± standard deviation of triplicates (p<0.05), Percentage concentrations obtained by peak area normalization

Table 3. Antioxidant activities of the aqueous plant extracts

Sample	Inhibition IC50 (mg/mL) (DPPH)	Inhibition % (-carotene- Linoleic acid)
<i>Helichrysum arenarium L.</i>	0.037±0.010	18.50 ±0.09
<i>Origanum sipyleum L.</i>	1.043±0.094	85.40±1.98
<i>Plantago major L.</i>	0.085±0.003	89.07±0.75
<i>Rumex spp.</i>	1.985±0.125	56.43±0.25
BHT	3.457±0.092	97.55±1.45

BHT: Standard antioxidant

*Values are mean of three replicate determinations (n=3) ± standard error. Mean values followed by different letters in a column are significantly different (p<0.05).

In silico analysis

When mechanically applied force is exerted during the chewing of plant-based foods, plant tissues, including cell walls and other structures, undergo fragmentation. This mechanical disruption leads to the release of volatile compounds from plant cells. Considering that areas exposed to volatile compounds include the oral cavity, the potential anticancer effects of these volatile compounds have been evaluated *in silico*. The relevant ligands and analysis results were presented in the heatmap clustering provided in Figure 2 and Figure 3.

The computational analysis results regarding the probability of volatile compounds being mutagenic and carcinogenic are presented in Table 4. The average values calculated using the XGBoost method for highly carcinogenic compounds are close to 1, whereas the values obtained from plant volatiles remain below the average carcinogenicity (0.5). These bioactive compounds, currently utilized in the pharmaceutical and cosmetic industries, as evident from the results, do not possess carcinogenic or mutagenic effects at moderate concentrations.

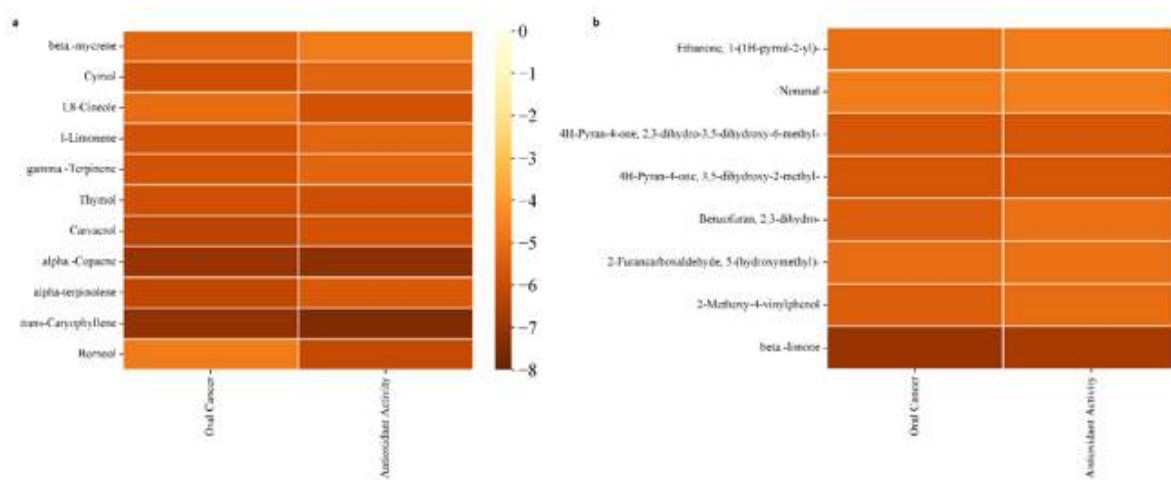


Figure 2. Clustered hierarchical heatmap showing binding affinities from a) *O. sipyleum* and b) *Rumex spp.*

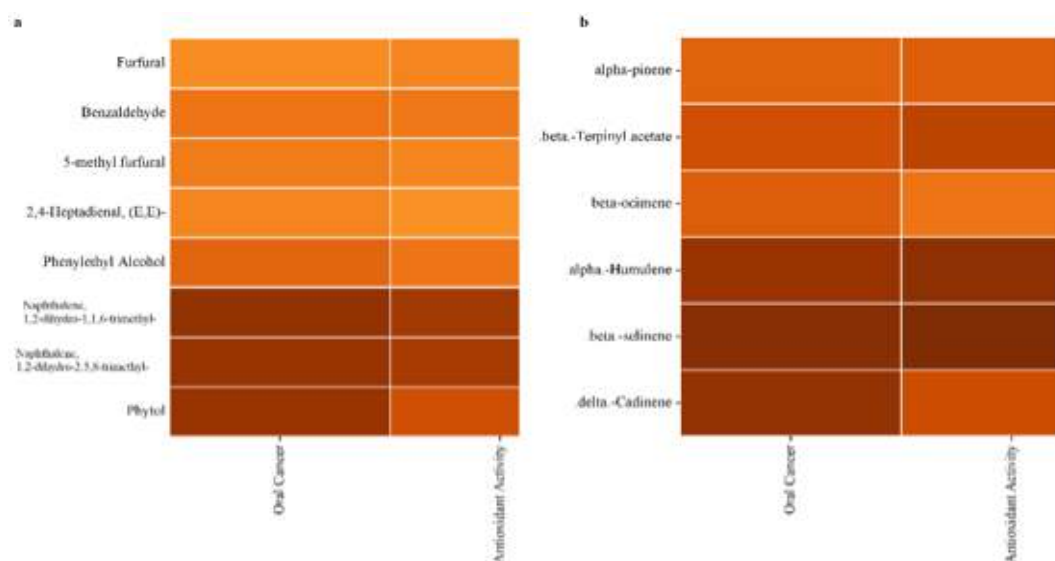


Figure 3. Clustered hierarchical heatmap showing binding affinities from a) *P. major* and b) *H. arenarium*

Table 4. Carcinogenicity and mutagenicity prediction results

Compounds	Carcinogenicity Score (CarcinoPred -EL/ XGBoost Method)	Predicted Result	Mutagenicity Prediction	Acute toxicity (Daphnia magna) (mg/L)
Thymol	0.49	Non-Carcinogen	non-mutagenic	7.4
.Gamma. -Terpinene	0.49	Non-Carcinogen	non-mutagenic	1.85
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	0.43	Non-Carcinogen	mutagenic	-
2-Methoxy-4-vinylphenol	0.49	Non-Carcinogen	non-mutagenic	2.13
Neophytadiene	0.45	Non-Carcinogen	non-mutagenic	0.473
2-Undecanone, 6,10-dimethyl-	0.46	Non-Carcinogen	non-mutagenic	0.329
.Alpha. -Humulene	0.47	Non-Carcinogen	non-mutagenic	0.57
Trans-Caryophyllene	0.49	Non-Carcinogen	non-mutagenic	4.8

In this study, analysis of the possibilities of plant volatiles activity through PASS online tool revealed that all the most abundant plant volatiles exhibit anticancer and have similarities with digestive system

drugs related activities (Table 5). According to the results of the obtained ADMET analysis, all analyzed volatile components have the potential to be used as drugs according to Lipinski's Rule of 5 (Table 6).

Table 5. PASS predictions

Compounds	Antimetastatic		Antineoplastic		Anti-inflammatory		Mucomembranous protector		Gastrin inhibitor	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Thymol	0.28	0.08	0.29	0.09	0.54	0.04	0.92	0.004	0.64	0.01
.Gamma.-Terpinene	0.47	0.02	0.55	0.05	0.7	0.01	0.39	0.17	0.25	0.24
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5- dihydroxy-6-methyl-	0.44	0.03	0.54	0.05	0.47	0.06	-	-	-	-
2-Methoxy-4- vinylphenol	0.34	0.06	0.52	0.06	0.35	0.122	-	-	-	-
Neophytadiene	0.36	0.05	0.46	0.08	0.24	0.223	-	-	-	-
2-Undecanone, 6,10-dimethyl-	0.5	0.01	0.55	0.005	0.41	0.01	0.87	0.005	0.6	0.02
.Alpha.-Humulene	0.56	0.008	0.83	0.008	0.74	0.01	0.39	0.17	0.25	0.23
Trans-Caryophyllene	0.57	0.008	0.91	0.005	0.74	0.01	0.44	0.15	0.25	0.24

Table 6. ADMET prediction

Compound	Molecular Weight (g/mol)	Lipophilicity (ilogP)	Solubility (mg/ml)	GI (gastrointestinal) absorption	BBB (blood-brain barrier)	Lipinski Ro5
Thymol	150.22	2.32	9.74E-02	High	Yes	Yes
.Gamma.-Terpinene	136.23	2.73	4.79E-02	Low	Yes	Yes
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5- dihydroxy-6-methyl-	144.13	1.19	4.50E+01	High	No	Yes
2-Methoxy-4- vinylphenol	150.17	2.14	2.31E-01	High	Yes	Yes
Neophytadiene	278.52	5.05	4.74E-05	Low	No	Yes
2-Undecanone, 6,10-dimethyl-	198.34	3.22	7.98E-02	High	Yes	Yes
.Alpha.-Humulene	204.35	3.29	2.17E-02	Low	No	Yes
Trans-Caryophyllene	204.35	3.25	2.78E-02	Low	No	Yes

DISCUSSION

Volatile profiles of plants

In a study focused on the chemical composition of *O. sipyleum* essential oil, our findings revealed the presence of 10 common compounds, including thymol, linalool, and carvacrol (20). In another study of the same species, Semiz et al. (21), reported p-cymene as the highest essential oil volatile component, and 15 of the 34 volatile compounds that analyzed were determined to be the same as the volatile compounds in our study. On the other hand, Judzentiene et al. (22), reported palmitic acid (23.8 ± 1.13) and myristic acid (14.9 ± 1.05) are the highest volatile constituents of *H. arenarium* essential oil. It was determined that 6 out of 20 compounds, including beta-selinene were common with our analysis. According to the results of essential oil analysis of species collected from three different regions in Bulgaria, α -pinene (34.64-44.35%), sabinene (10.63-11.1%), germacrene D (3.56-4.86%) and β -gurjunene (3.61%) components were dominant (23). In the analysis of *H. arenarium* essential oil collected from the Caucasus region, the largest group of compounds was determined to be aliphatic acids (34.6%), and 11.9% dodecanoic acid and 9.8% decanoic acid were reported (24). On the other hand, Lemberkovics et al. (25), reported that the dominant compound was methyl palmitate (21.7-28.5%) from Poland and Hungary regions. These discrepancies in chemical profiles may be a consequence of different environmental factors, such as plant harvesting strategies, soil type, precipitation, etc. For the *Rumex* spp., as a result of the volatile component analysis of the hydroalcoholic extracts of the *R. obtusifolius*, 1, 2, 3-benzenetriol (pyrogallol) (62.8%) and for the *R. crispus* 5-eicosene (31.7%) were reported as the dominant volatile compound (26,27). Among the four plants that were analyzed, *P. major* emerges as perhaps the species with the most changeable chemical content ecologically. In the Iranian region, Haghghi et al. (28), reported the volatile component 2-dodecen-1-yl (-) succinic anhydride (15.29%) as

the main compound of the *P. major*. Jamilah et al. (29), reported volatiles of *P. major* differ with varying solvents. The main constituents in petroleum ether extract were reported as phytol 13.22%, and for methanol diglycerol, 30.31% and glycol 18.91%; ethyl acetate extract was glycerine 30.70%, benzene 21.81% and for aqueous extract were ethno-phenol 27.47% and diathiapentene 14.53% .

Antioxidant activities

Popa et al. (30), reported the DPPH activity in aqueous extracts of *H. arenarium* obtained from Romania as 0.151 mg/ml while Czinner et al. (31), found a similar IC50 value of 0.14 for samples from the Hungarian region. The DPPH value reported by Karima et al. (32), for Algerian *P. major* is 0.1 mg/mL, while the inhibition value in the β -carotene/linoleate test is 50.16%. The results indicate a higher antioxidant activity in the plant species collected from the Ankara region. It is known that *Origanum* species generally exhibit high antioxidant activity and obtained results confirm this assertion for the species. Most of the antioxidant studies on *O. sipyleum* have been conducted on samples from Türkiye, and these studies generally report IC50 values ranging around 0.1 mg/mL and an average inhibition activity of approximately 80% in the β -carotene/linoleic acid assay (33). On the other hand, in the literature, *Rumex* species have been reported to exhibit highly variable results in terms of antioxidant activities. The antioxidant analysis results conducted on edible wild *Rumex* species in Russia have reported IC50 values ranging from 3 to 69 mg/mL (34).

In silico analysis

Molecular docking

The heatmap was plotted by <http://www.bioinformatics.com.cn/srplot>, an online platform for data analysis and visualization. Based on the results of the clustered hierarchical heatmap, the highest antioxidant activity was detected in the volatiles of *H. arenarium* species. Although *O. sipyleum* exhibited the most potent antioxidant activity with trans-caryophyllene (-7.5 kcal/mol), the synergistic

antioxidant effect of volatile components was found to be the highest in this species. It has been determined that the volatile components of edible plants exhibit moderate binding affinities against oral cancer with an average of -6 kcal/mol binding affinity scores. The selected target in oral cancer has been preferred due to its promising discovery of upregulation in recent drug development studies (35). As a result of our *in silico* analyses, docking scores and binding positions that were obtained showed similarities with FDA (Food and Drug Administration)-approved kinase inhibitors such as afatinib, dacomitinib, and sapitinib. We could not find a literature study directly investigating the effects of

these volatile compounds on oral cancer (Table 2). However, in some studies exploring the potential of essential oils and volatile components for oral cancer, including aromadendrene, among other compounds, have been identified (36,37). When molecular-level analyses are examined in 2D, it appears that alkyl bonds are predominant. Since the formation of alkyl bonds is dependent on hydrophobicity, it is determined that this interaction between the ligand and the protein arises from the protein's hydrophobicity. Unlike other molecular bindings, the observed pi-sigma bond in the naphthalene, 1,2-dihydro-1,1,6-trimethyl- ligand originates from the ring structure's active region (Figure 4).

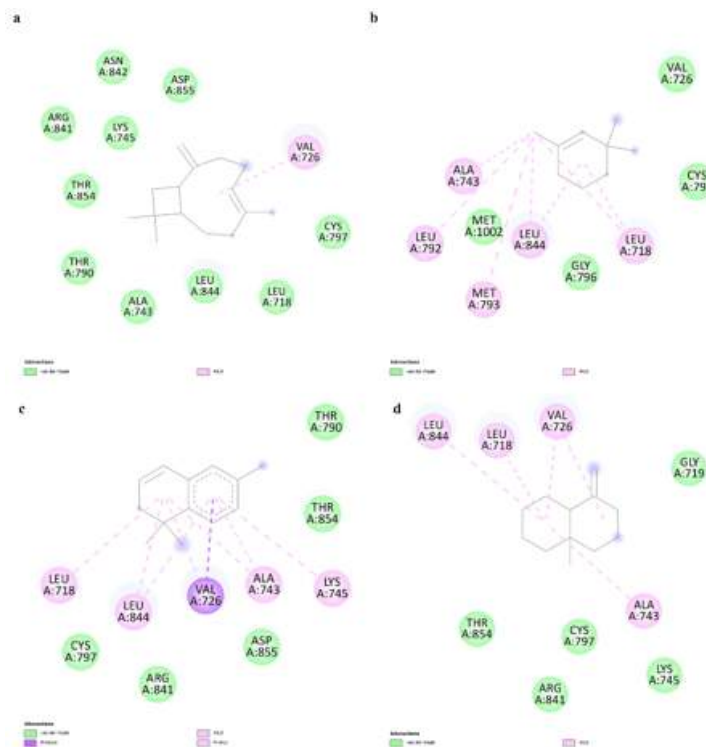


Figure 4. Two dimensional binding geometry of a) trans-Caryophyllene (*O. sipyleum*), b) .beta.-Ionone (*Rumex* spp.), c) naphthalene, 1,2-dihydro-1,1,6-trimethyl- (*P. major*) and d) .beta.-selinene (*H. arenarium*)

PASS prediction and ADMET results

It is known that Pa values above 60% indicate strong similarity, as known from previous studies (38). In addition to the absence of a structure resembling digestive drugs in approximately 50% of the compounds constituting the *Rumex* spp., there was also an average resemblance to anticancer drugs. However, notably high similarities in antineoplastic and anti-inflammatory activity were observed in *P. major* and *H. arenarium* species ($Pa > 0.7$). These findings parallel the potential ethnomedicinal use of both plant species in addressing issues related to digestion and indigestion (39).

In addition to drug similarities, these natural volatile components themselves exhibit characteristic pharmacological properties (40). In this study, which sheds light on the potential of natural herbal volatiles as drug molecules for oral cancer, it is expected that the components provide permeability across the BBB and exert an effect on the target organ. The obtained results indicate that while some of the volatile components abundant in plants provide permeability, others do not. Having synergistic blood-brain barrier permeability for plant volatiles is a significant

advantage in preventing adverse effects on the brain and prolonged exposure to the active substance.

In conclusion, investigating the pharmacological potentials of edible plants is crucial for both pharmaceutical and food research. These plants are known by different names in various regions of our country and are actively consumed. During the mechanical breakdown of edible plants in the mouth, volatile compounds are also exposed directly to the oral cavity. Analysis conducted in the study revealed that all four plants are rich in volatile compounds, which exhibit *in vitro* and *in silico* antioxidant properties. Molecular-level analyses on oral cancer also indicated that the volatiles of these plants harbor anticancer potential without exhibiting carcinogenic or mutagenic properties. It has been determined that the species exhibiting the highest pharmacological activity is *H. arenarium*. This research evaluates *in silico* anticancer activity of natural plant volatiles by targeting oral cancer and antioxidant proteins. Further *in vitro* and *in vivo* validations are necessary to investigate their safety profile and potential interactions with other drugs.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Leonti M, Casu L, de Oliveira Martins DT, Rodrigues E, Benítez G. Ecological theories and major hypotheses in ethnobotany: their relevance for ethnopharmacology and pharmacognosy in the context of historical data. *Rev Bras Farmacol*, 2020;30(4):451-66.
2. Pirintsos S, Panagiotopoulos A, Bariotakis M, Daskalakis V, Lionis C, Sourvinos G, et al. From traditional ethnopharmacology to modern natural drug discovery: a methodology discussion and specific examples. *Molecules*, 2022;27(13):4060.
3. Godswill AG, Somtochukwu IV, Ikechukwu AO, Kate EC. Health benefits of micronutrients (vitamins and minerals) and their associated deficiency diseases: a systematic review. *Int J Food Sci*, 2020;3(1):1-32.
4. Leitzmann C. Characteristics and health benefits of phytochemicals. *Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine, Forsch Komplementmed*, 2016;23(2):69-74.
5. Acıbuca V, Budak DB. Dünya’da ve Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. *Çukurova Tarım Gıda Bil Derg*, 2018;33(1):37-44.
6. Selvi S, Polat R, Çakılciöğlü U, Celep F, Dirmenci T, Ertuğ ZF. An ethnobotanical review on medicinal plants of the Lamiaceae family in Turkey. *Turk J Botany*, 2022;46(4):283-332.
7. Trivellini A, Lucchesini M, Maggini R, Mosadegh H, Villamarin TS, Vernieri P, Mensuali-Sodi A, Pardossi A. Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. *Indust Crop Product*, 2016 May 1;83:241-54.
8. Cinbilgel I, Kurt Y, Johm J. Oregano and/or marjoram: Traditional oil production and ethnomedical utilization of *Origanum* species in southern Türkiye. 2019;16:100257.
9. Akinyede KA, Cupido CN, Hughes GD, Oguntibeju OO, Ekpo OEJP. Medicinal properties and In vitro biological activities of selected *Helichrysum* species from South Africa: a review. 2021;10(8):1566.
10. Minina EA, Staal J, Alvarez VE, Berges JA, Berman-Frank I, Beyaert R, et al. Classification and nomenclature of metacaspases and paracaspases: no more confusion with caspases. *Molecular Cell*, 2020;77(5):927-9.
11. Pinto T, Aires A, Cosme F, Bacelar E, Morais MC, Oliveira I, et al. Bioactive (poly) phenols, volatile compounds from vegetables, medicinal and aromatic plants. *Foods*, 2021;10(1):106.
12. Vural N. Chemometrics data analysis and controversial carcinogenic effect of *Ocimum basilicum* L. rich in methyl eugenol. *J Food Measure Charact*, 2021;15(5):4825-37.
13. Göze İ, Kaymak S, Vural N. Chemical profiling of essential oils: investigations into modulating milk production in dairy cows using in silico methods. *Sci Phytochem*, 2024;3(1):27-37.
14. Huey R, Morris GM, Forli S. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. California: The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory. 2011.
15. Biovia Discovery Studio Modeling Environment. USA: Dassault Systèmes. 2015.
16. Zhang L, Ai H, Chen W, Yin Z, Hu H, Zhu J, et al. CarcinoPred-EL: novel models for predicting the carcinogenicity of chemicals using molecular fingerprints and ensemble learning methods. *Sci Rep*, 2017;7(1):2118.
17. Maunz A, Gütlein M, Rautenberg M, Vorgrimmler D, Gebele D, Helma C. Lazar: a modular predictive toxicology framework. *Front Pharmacol*, 2013; 4:38.
18. Filimonov D, Lagunin A, Gloriovova T, Rudik A, Druzhilovskii D, Pogodin P, et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chem Heterocycl Compd*, 2014;50:444-57.

19. Daina A, Michielin O, Zoete VJS. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 2017;7(1):42717.
20. Oluk EA, Çakır A, Yaşa I, Çapanlar S, Kırmızıgül S. Comparison of the antimicrobial activity and essential oil content of wild and micropropagated *Origanum sipyleum* L.: A medicinal herb native to Türkiye. *J Med Plant Res*, 2013;7(6):230-3.
21. Semiz G, Semiz A, Mercan-Doğan N. Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant and antibiofilm activities of four *Origanum* species from southeastern Türkiye. *Int J Food Prop*, 2018;21(1):194-204.
22. Judzentiene A, Budiene J, Nedveckyte I, Garjonyte R. Antioxidant and toxic activity of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench and *Helichrysum italicum* (Roth) G. don essential oils and extracts. *Molecules*, 2022;27(4):1311.
23. Zheljazkov VD, Semerdjieva I, Yankova-Tsvetkova E, Astatkie T, Stanev S, Dincheva I, et al. Chemical profile and antimicrobial activity of the essential oils of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. and *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don. *Plants (Basel)*, 2022;11(7):951.
24. Czinner E, Lemberkovics É, Bihátsi-Karsai E, Vitányi G, Lelik L. Composition of the essential oil from the inflorescence of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *J Essent Oil Res*, 2000;12(6):728-30.
25. Lemberkovics E, Czinner E, Balázs A, Bihátsi-Karsai E, Vitanyi G, Lelik L, et al. New data on composition of essential oil from inflorescence of everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.). *Acta Pharm Hung*, 2001;71(2):187-91.
26. Nazari H, Bakhshandeh N, Gholami M, Mehrzad J, Bineshian F. Anti-Candida activities and GC mass analysis of seeds hydroalcoholic extract of *Rumex obtusifolius*. *Jundishapur J Microbiol*, 2017;10(7).
27. Idris OA, Wintola OA, Afolayan AJ. Comparison of the proximate composition, vitamins (ascorbic acid, α -tocopherol and retinol), anti-nutrients (phytate and oxalate) and the GC-MS analysis of the essential oil of the root and leaf of *Rumex crispus* L. *Plants (Basel)*, 2019;8(3):51.
28. Haghghi SR, Yazdinezhad A, Bagheri K, Sharafi AJP, Research B. Volatile constituents and toxicity of essential oils extracted from aerial parts of *Plantago Lanceolata* and *Plantago Major* growing in Iran. *Pharm Biomed Res*, 2022; 8(3): 205-24. 2022.
29. Jamilah J, Sharifa A, Sharifah N. GC-MS analysis of various extracts from leaf of *Plantago major* used as traditional medicine. *World Appl Sci J*, 2012;17:67-70.
30. Popa G, Danaïla-Giudea S, Damian E, Margarit G, Gropoșila-Constantinesu D. Evaluation of Bioactive Compounds With Antioxidant Activity of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. In *Florescens Extracts*. 2023;67(2)
31. Czinner E, Hagymási K, Blázovics A, Kéry Á, Szóke É, Lemberkovics É. In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *J Ethnopharm*, 2000;73(3):437-43.
32. Karima S, Farida S, Mihoub Z. Antioxidant and antimicrobial activities of *Plantago major*. *Int J Pharmacy Pharm Sci*, 2015;7(5):58-64.
33. Kaska A. The phenolic content, antioxidant and cytotoxic activities of *Origanum sipyleum* from Türkiye. *Int J Sec Metab*, 2018;5(4):343-52.
34. Nakiboglu M, Urek RO, Kayali HA, Tarhan L. Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Türkiye. *Food Chem*, 2007;104(2):630-5.
35. Feduraev P, Skrypnik L, Nebreeva S, Dzhobadze G, Vatagina A, Kalinina E, et al. Variability of phenolic compound accumulation and antioxidant activity in wild plants of some *Rumex* species (Polygonaceae). *Antioxidants (Basel)*, 2022;11(2):311.

36. Santi MD, Zhang M, Liu N, Viet CT, Xie T, Jensen DD, et al. Repurposing EGFR inhibitors for oral Cancer Pain and Opioid Tolerance. *Pharmaceuticals*, 2023;16(11):1558.
37. Alam A, Jawaid T, Alsanad SM, Kamal M, Balaha MF. Composition, Antibacterial Efficacy, and Anticancer Activity of Essential Oil Extracted from *Psidium guajava* (L.) Leaves, 2023;12(2):246.
38. Ray A, Jena S, Sahoo A, Kamila PK, Das PK, Mohanty S, et al. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of bark essential oil of *Cryptocarya amygdalina* from India. *J Essent Oil-Bear Plants*, 2021;24(3):617-31.
39. Rudik AV, Dmitriev AV, Lagunin AA, Filimonov DA, Poroikov V, Joci VJ. Metabolism site prediction based on xenobiotic structural formulas and PASS prediction algorithm. *J Chem Inf Model*, 2014;54(2):498-507.
40. Gonçalves S, Moreira E, Andrade PB, Valentão P, Romano A. *JEFR Technology*. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the total phenolic contents and antioxidant activity of wild Mediterranean edible plant extracts. *Eur Food Res Technol*, 2019;245:753-62.

Mardin’de birinci basamak sağlık çalışanlarının aşı retleri konusundaki tutumları ve saha deneyimleri

Attitudes and field experiences of primary health care workers on vaccine refusals in Mardin

Aysun EKŞİOĞLU¹ (ID), Zeynur GÜMÜŞ² (ID), Esin Ceber TURFAN¹ (ID), Raika DURUSOY³ (ID)

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, birinci basamak sağlık çalışanlarının aşı retleri konusundaki tutumlarını ve saha deneyimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Tanımlayıcı tipteki araştırma Mardin İl Sağlık Müdürlüğü’ne bağlı tüm birimlerde (ilçe sağlık müdürlükleri, sağlıklı yaşam merkezleri dahil) doktor, ebe, hemşire ve diğer sağlık çalışanları olmak üzere toplam 201 kişi (kapsayıcılık oranı:%91,4) ile gerçekleştirilmiştir. Araştırma verilerinin toplanmasında anket formu ve aşı karşıtlığı ölçeği kullanılmıştır. Tanımlayıcı veriler sayı ve yüzdelerle gösterilmiştir. Ölçek toplam ve alt boyut puanları ile demografik ve aşı uygulamalarına yönelik değişkenler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Bulgular: Sağlık çalışanlarının %5,0’i aşı reddini desteklemekte, %15,4’ü aşı tereddütü yaşamaktadır. Aşı yaptırmada en fazla bildirilen endişe nedeni aşı içeriklerini güvenli bulunmamasıdır. Katılımcıların neredeyse tamamı çocukluk (%99,0) ve COVID aşılari

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the attitudes and field experiences of primary health care workers on vaccine refusals.

Methods: This descriptive study was conducted with a total of 201 people (inclusion rate: 91.4%) including doctors, midwives, nurses and other healthcare professionals in all units (including district health directorates, Healthy Living Centres) of Mardin Provincial Health Directorate. A questionnaire form and antivaccination scale were used to collect the data. Descriptive data are shown with numbers and percentages. It was used to Mann Whitney U test to evaluate the relationships between the total and sub-dimension scores of the scale, demographic and vaccination practice variables.

Results: 5.0% of healthcare workers supported vaccine refusal, and 15.4% had vaccine hesitation. The most commonly reported reason for concern about vaccination was not finding vaccine ingredients safe. Almost all participants have experienced vaccine refusal

¹Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik AD., İzmir, Türkiye

²Mardin Kızıltepe İlçe Sağlık Müdürlüğü, Mardin, Türkiye

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD., İzmir, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Aysun EKŞİOĞLU

Deniz Kuvvetleri Komutanlığı Sağlık Şube Müdürlüğü, Çankaya / Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : aysun.basgun@ege.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 23.05.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 18.04.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.29974

Ekşioğlu A, Gümüş Z, Turfan EC, Durusoy R. Mardin’de birinci basamak sağlık çalışanlarının aşı retleri konusundaki tutumları ve saha deneyimleri. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 85 - 98

(%99,5) kapsamında aşı reddiyle karşılaşmıştır. Aşı karşıtlığı ölçeği toplam puanı ile erkeklerde (ortanca 30 (24-54)) kadınlara (ortanca 25 (22-32)) göre, hekimlerde (ortanca 27 (23-47)) diğer çalışanlara göre (ortanca 25 (22-35)), aşı karşıtı olan/tereddüt yaşayanlarda (ortanca 58 (45-73)) olmayanlara göre ve aşıları güvenli bulmayanlarda (ortanca 75 (64-83)) güvenli bulanlara göre (ortanca 25 (22-32)) daha yüksek saptanmıştır ($p<0,05$).

Sonuç: Sağlık çalışanlarının bölgedeki bağışıklama hizmetleri kapsamında yüksek oranda aşı reddi ile karşılaştıkları ve dikkate değer bir düzeyde aşı tereddütü yaşadığı ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aşı, aşı reddi, aşı tereddütü, sağlık çalışanı

for childhood (99.0%) and COVID vaccines (99.5%). The total score of the vaccine opposition scale was higher in males (median 30 (24-54)) than in females (median 25 (22-32)), in physicians (median 27 (23-47)) than in other employees (median 25 (22-35)), in those who were against vaccines/experienced hesitation (median 58 (45-73)) than in those who were not, and in those who did not find vaccines safe (median 75 (64-83)) than in those who found them safe (median 25 (22-32)) ($p<0.05$).

Conclusion: It has been revealed that healthcare workers are faced with a high rate of vaccine refusal/hesitancy within the scope of immunization services in the region, they are experiencing a significant level of hesitancy about vaccination and they need training on this subject.

Key Words: Vaccine, vaccine refusal, hesitancy, healthcare worker

GİRİŞ

Bağışıklama, temel sağlık hizmetlerinin önemli bir bileşeni ve tartışılmaz bir insan hakkıdır. Aşılar, bulaşıcı hastalık salgınlarının önlenmesi ve kontrolü için de kritik öneme sahiptir (1). Küresel olarak, 2018'de 19,4 milyon çocuğun (%14) tam aşıli olmadığı bildirilmiştir (2). 2021'de ise yaklaşık 25,0 milyon çocuğun aşılanmamış veya eksik aşılandığı, bu sayının 5,9 milyon daha fazla olduğu belirtilmektedir (3). Dünya Sağlık Örgütü ise küresel aşılama kapsamının son on yılın en düşük seviyelerine gerileyerek 2019-2021 döneminde sıfır doz çocuk sayısında %40'lık bir artış gösterdiğine dikkat çekmiştir (4). COVID-19 salgını ve buna bağlı aksaklıkların sağlık sistemini zorladığı ve aşılama çalışmalarını olumsuz etkilediği bilinmektedir (1). Bununla birlikte 2022 yılında difteri, boğmaca, tetanoz, grip ve kızamık gibi hastalıklara karşı bağışıklama oranlarının arttığı, bu doğrultuda her yıl 3,5-5 milyon ölümün önlendiği

vurgulanmaktadır (4). Aşılama, halk sağlığının en önemli başarılarından biri olarak gösterilse de; dini, bilimsel ve politik düşünceler doğrultusunda aşıları sorgulayan ve kimi zaman reddeden kişiler ve gruplar olmuştur (5). Özellikle son on yılda başta Amerika olmak üzere dünyanın pek çok ülkesinde başlayan aşı karşıtlığı ülkemizde de bir hayli fazla sayıda taraftar edinmeye başlamıştır (6). Aşı reddi ve tereddütü dünyada olduğu gibi Türkiye'de son yıllarda artış göstermektedir. Ülkemizde çocuklarına aşı yaptırmak istemeyen ailelerin sayısı; 2011 yılında 183 iken, 2013'te 980, 2015 yılında 5 bin 400, 2016 yılında 12 bin seviyesine yükselmiş, aşı reddi ile ilgili 2018 yılı itibari ile belirtilen aile sayısı ise 40 bin düzeyine ulaşmıştır (7). Aşı karşıtlığıyla ilgili tartışmalarda, sağlık çalışanlarının, toplumun aşılarla yönelik güvenini inşa etmede önemli bir etki oluşturduğu bahsedilmektedir (8-11). Bu nedenle sağlık çalışanlarının aşılarla yönelik endişelerinin dinlenmesi önemlidir. Sağlık çalışanlarının aşı bilgisi,

kabulü veya reddinin toplumun aşılmasında etkili olabileceği düşünüldüğünden, bu çalışmada birinci basamak sağlık çalışanlarının aşı retleri konusundaki saha deneyimleri, tutumları ve bunu etkileyen faktörlerin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Tanımlayıcı tasarımdaki araştırmanın evrenini Şubat - Haziran 2022 tarihleri arasında Mardin İl Sağlık Müdürlüğü'ne bağlı tüm Birinci Basamak Sağlık Hizmeti birimlerinde (bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalıklar birimi, eğitim birimi, çevre sağlığı birimi, aile hekimliği birimi, ruh sağlığı birimi, ağız ve diş sağlığı birimi, sağlıklı beslenme ve obezite danışma birimi, ilçe sağlık müdürlükleri, Kanseri Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi (KETEM), sağlıklı yaşam merkezleri dahil) görev yapan doktor, ebe, hemşire ve diğer tüm sağlık çalışanları oluşturmuştur. Bu birimlerde görev yapan toplam sağlık çalışanı sayısı 220 kişi olup, veri toplama tarihlerinde izinli ve raporlu olanlar haricinde 201 kişiye ulaşılmıştır (%91,4 kapsayıcılık). Çalışma verileri, katılımcıların onamlarının alınmasının ardından veri toplama formlarının kendileri tarafından doldurulmasıyla toplanmıştır.

Katılımcılara, sosyo- demografik özelliklere yönelik 10 soru, aşı uygulamaları konusunda görüşlerine yönelik 32 soru olmak üzere toplam 42 soruluk bir anket uygulanmıştır. Çalışmada “aşı tereddüdü (kararsızlığı)” aşığı kabullenmekte gecikme veya aşığı ulaşılmasına rağmen uygulamayı reddetme; “aşı reddi” ise tüm aşılı reddetme iradesi ile yaptırmama durumu olarak kabul edilmiştir (12). Aşı karşıtlığına ilişkin tutumları ise Kılınçarslan ve ark.(13) tarafından geliştirilen aşı karşıtlığı ölçeği ile değerlendirilmiştir. Ölçek, dört faktörden 21 maddeden oluşmakta, maddeler likert tipte sınıflanmış olup, ‘1 kesinlikle katılıyorum’, ‘2 katılıyorum’, ‘3 kısmen katılıyorum’, ‘4 katılmıyorum’ ve ‘5 kesinlikle katılmıyorum’ biçiminde puanlanmıştır. Ölçeğin, “Aşı yararı ve koruyucu değeri”, “Aşı karşıtlığı”, “Aşı olmamak için çözümler” ve “Aşı tereddüdünün

meşrulaştırılması” olmak üzere dört alt boyutu bulunmaktadır. Aşı yararı ve koruyucu değeri alt ölçeği maddeleri ters puanlanmaktadır. Ölçeğin kesme değeri bulunmamaktadır, puan arttıkça aşı karşıtlığı/ tereddüdü artmaktadır. Uzun form için Cronbach alfa iç tutarlılık katsayısı 0.855 olup bu çalışmada ölçeğin Cronbach alfa güvenilirlik katsayısı değeri 0,96 bulunmuştur.

İstatistik analizler için IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sosyo- demografik ve tanımlayıcı özelliklere ilişkin değişkenler, sayı ve yüzde dağılımı ile gösterilmiştir. Aşı reddi tutum ölçeği ile bağımsız değişkenler arasındaki karşılaştırmalarda -değişkenler normal dağılım göstermediğinden- Mann Whitney U testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiş (Tarih:08.07.2021, Karar no: 21-7T/26) ve çalışma öncesinde Mardin İl Sağlık Müdürlüğünden veri toplama izni alınmıştır.

BULGULAR

Araştırma kapsamında toplam 201 (%91,4) sağlık çalışanına ulaşılmıştır. Katılımcıların %24,4'ü doktor (n=49), %33,8'i ebe (n=68), %17,4'ü hemşire (n=35), %9,5'i sağlık memuru (n=19), %3,5'i ATT (n=7) ve %11,4 diğer sağlık çalışanı (n=23) olduğu görülmüştür. Araştırmaya %64,2 kadın, %35,8'i erkek sağlık çalışanı katılmıştır (Tablo 1).

Sağlık çalışanlarının kendileri ve çocuklarının aşı uygulamaları ile aşı retleri konusundaki görüşlerine ait veriler Tablo 2'de sunulmuştur. Katılımcıların yaklaşık beşte biri aşılı hakkındaki bilgi düzeyinin biraz yeterli olduğunu belirtmiştir. Genel bağışıklama programı konusunda ise her dört katılımcıdan biri eğitim aldığını bildirmiştir. Katılımcıların %79,6'sı aşı reddini desteklemiyorken, %5,0'i aşı reddini desteklediğini, %15,4'ü ise aşı tereddüdü yaşadığını belirtmiştir. Çocuğu olan katılımcıların %85,1'i

Tablo 1. Araştırmaya katılan bireylerin demografik özellikleri

Özellikler	N=201	%
Yaş (yıl)	32,77±6,13 (min:22,maks:53)	
Cinsiyet	Kadın	129 64,2
	Erkek	72 35,8
Eğitim durumu	Lise	7 3,5
	Ön lisans	27 13,4
	Lisans	151 75,1
	Lisansüstü	16 8,0
Hizmet yılı	0-5 yıl	68 33,8
	6-10 yıl	68 33,8
	11-20 yıl	53 26,4
	21 yıl ve üzeri	12 6,0
Çalıştığı Birim	Aile Sağlığı Merkezi	80 39,8
	Bulaşıcı Hastalıklar ve Bağışıklama	17 8,5
	İlçe Sağlık Merkezi	68 33,8
	Sağlık Evi	4 2,0
	İl Sağlık Müdürlüğü	32 15,9
Çocuk sahibi olma durumu	Var	101 50,2
	Yok	100 49,8

“aşı takviminde yer alan rutin çocukluk aşılarını” düzenli olarak yaptırmış/yaptırmakta olup, %2,0’si yaptırmadığını, %12,9’u da eksik aşıları olduğunu belirtmiştir. Sağlık çalışanlarının kendi aşılarını yaptırma durumları değerlendirildiğinde en fazla Hepatit B, en az pnömokok aşısı uygulandığı bulunmuştur.

Sağlık çalışanlarının bağışıklama saha uygulamaları sırasında karşılaştıkları aşı retleri ve ilgili değişkenlere Tablo 3’te yer verilmiştir. Katılımcıların neredeyse tamamı hem Genişletilmiş Bağışıklama Programı kapsamındaki çocukluk aşılarında hem de

COVID-19 bağışıklaması uygulamalarında aşı reddi ile karşılaşmıştır. Aşı uygulamalarında en yüksek sıklıkta görülen aşı reddi nedeni “aşı içeriğinde zararlı maddeler olması”dır. Aşı reddi ile karşılaşıldığında sağlık çalışanlarının neredeyse yarısı aileleri ikna etmeye çalıştığını belirtmiştir.

Sağlık çalışanlarının Genel Bağışıklama Programı ve COVID Bağışıklama Programı kapsamında sahada en sık karşılaştığı aşı reddi nedenleri Şekil 1 ve Şekil 2’de verilmiştir. Aşı içeriğinde zararlı maddeler olması en fazla bildirilen neden olmuştur.

Tablo 2. Sağlık çalışanlarının kendilerinin, çocuklarının aşı uygulamaları ve aşı reddi konusundaki görüşleri

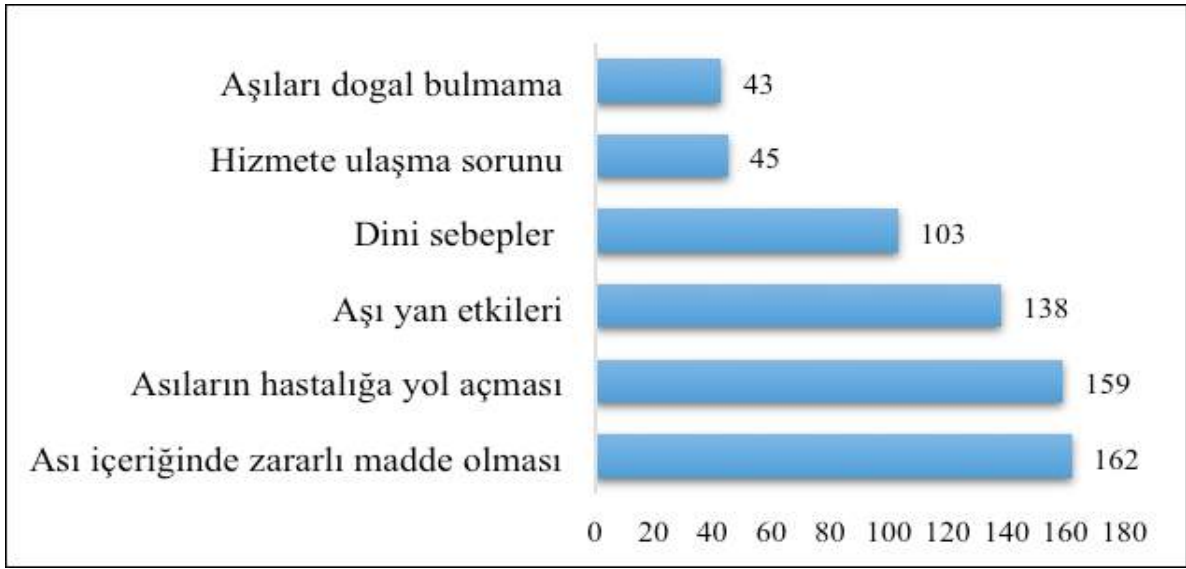
Özellikler	N=201	%	
Aşılar hakkında bilgi düzeyi	Yetersiz	4	2,0
	Biraz yeterli	41	20,4
	Yeterli	99	49,3
	Çok yeterli	57	28,3
Bağışıklama konusunda resmi bir eğitime katılma durumu (son 1 yıl içinde)	Evet	48	23,9
	Hayır	153	76,1
Aşıları etkin bulma	Evet	189	94,0
	Hayır	12	6,0
Aşıları güvenli bulma	Evet	183	91,0
	Hayır	18	9,0
Ulusal aşı programı zorunlu uygulanmalı mıdır?	Zorunlu	142	70,6
	Gönüllülük esasına dayalı	59	29,4
Aşı reddine ilişkin görüşü	Aşı reddi fikrine karşı	160	79,6
	Aşı reddini destekleyen	10	5,0
	Aşı tereddüdü/kararsızlığı	31	15,4
Aşı reddinin azalmasında sağlık çalışanının rolü var mıdır?	Evet	183	91,0
	Hayır	18	9,0
Geleneksel/alternatif yöntemler aşının yerini tutar mı?	Evet	15	7,5
	Hayır	186	92,5
Rutin çocuk aşı takvimindeki aşıları gerekli bulma	Gerekli bulmuyorum	7	3,5
	Nötr	10	5,0
	Gerekli buluyorum	184	91,5
Çocuğunun rutin aşılarını yaptırma durumu*	Evet	86	85,1
	Hayır	4	2,0
	Eksik aşıları var	14	12,9
COVID geçirme durumu	Evet	70	34,8
	Hayır	131	65,2
COVID aşısı yaptırma durumu	Evet	182	90,5
	Hayır	19	9,5

*Çocuğu olan bireyler analize dahil edilmiştir.

Tablo 3. Sağlık çalışanlarının bağışıklama saha çalışmalarında karşılaştığı durumlar

Özellikler		N=201	%
Aşı reddi ile karşılaşma (Çocuk Aşılıarı)	Karşılaşan	199	99,0
	Karşılaşmayan	2	1,0
Karşılaştığı aşı reddi nedenleri*	Aşıların içeriğinde zararlı maddeler olması	162	80,6
	Aşıların sakatlık/hastalık vb. durumlara yol açma riski olması	159	79,1
	Aşı yan etkilerinden çekinme	138	68,7
	Dini açıdan doğru bulunmaması	103	51,2
	Hizmete ulaşma sorunu olması	45	22,4
	Doğal olmaması	43	21,4
	Sağlık çalışanına güvenmeme	28	13,9
	Pahalı olması	11	5,5
Aşı reddiyle karşılaştığında davranışı (Çocuk Aşılıarı)	İkna etmeye çalışma	93	46,3
	Bilimsel kanıt sunma	74	36,8
	Fikrine saygı duyarak, müdahale etmeme	34	16,9
Aşı karşıtlarını ikna etmede izlediği yöntem* (Çocuk Aşılıarı)	Aşı olmaması durumunda karşılaşılabilecekleri sorunları aktarmak	146	72,6
	Aşıların güvenli olduğunu söylemek	136	67,7
	Aşıların hem kendisini hem de tüm toplumu koruduğunu söylemek	127	63,2
	Bilimsel çalışmaların sonuçlarını paylaşmak	79	39,3
COVID bağışıklaması ile ilgili uygulamalarda görev aldınız mı?	Evet	177	88,1
	Hayır	24	11,9
COVID aşı reddi ile karşılaşma durumu	Evet	200	99,5
	Hayır	1	0,5
COVID aşı uygulamalarında en sık karşılaşılan aşı reddi nedenleri*	Aşıların içeriğine güvensizlik	178	88,6
	Yan etkileri hakkında endişe	151	75,1
	Vücuda zarar vereceği, başka bir hastalığa yol açacağı düşüncesi	146	72,6
	Aşı üreten firma/ülkelere güvensizlik	129	64,2
	Medyadaki haber, bilgi vb	115	57,2
	Gerekli olduğunu düşünmeme	68	33,8
	Dini sebepler	50	24,9
	Tıbbi nedenler	35	17,4
	Sağlık çalışanlarına güvensizlik	33	16,4
Başka uygulamalarla (Alternatif Tıp vb.) hastalığa karşı korunmak isteme	20	10,0	
Aşılar/bağışıklama ile ilgili eğitim/güncelleme eğitimi almaya ihtiyacı	Evet	118	58,7
	Hayır	83	41,3

*Birden fazla yanıt verilmiştir



Şekil 1. Sağlık çalışanlarının Genel Bağışıklama Programı kapsamında karşılaştığı aşı reddi nedenleri



Şekil 2. Sağlık çalışanlarının COVID Aşıları Programı Kapsamında karşılaştığı aşı reddi nedenleri

Aşı karşıtlığı ölçeği toplam puanı ile alt boyutlarının bazı değişkenler açısından karşılaştırması yapıldığında, cinsiyetler arasında fark olup, erkeklerde ölçek puanları daha yüksektir ($p < 0,05$). Hekimlerde diğer sağlık çalışanlarına göre aşı tereddüdünün meşrulaştırılması alt boyutu, çocuk sahibi olan bireylerde ise olmayanlara kıyasla aşı karşıtlığı alt boyutundan elde edilen puan

anamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Aşı karşıtı olduğunu belirtenlerde ve aşıları güvenli bulmayanlarda aşı karşıtlığı ölçeğinin toplam ve alt boyut puanları anlamlı olarak daha yüksek tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Aşı konusunda resmi bir eğitim alan ve almayanlar açısından ölçek puanları açısından anlamlı bir fark elde edilmemiştir ($p > 0,05$) (Tablo 4).

Tablo 4. Aşı karışıklığı ölçeği toplam puanları ve alt boyutlarının bazı değişkenler açısından karşılaştırılması

Değişken	AŞI KARŞITLIĞI ÖLÇEĞİ					Ölçek Toplam Ortanca (25p.-75p.)
	Aşı Yararı ve Koruyuculuk Değeri Alt Boyutu (A)	Aşı Karışıklığı Alt Boyutu (B)	Aşı Olmamak İçin Çözümler Alt Boyutu (C)	Aşı Tereddüdünün Meşrulaştırılması Alt Boyutu (D)		
Cinsiyet	N	Ortanca (25p.-75p.)	Ortanca (25p.-75p.)	Ortanca (25p.-75p.)	Ortanca (25p.-75p.)	Ortanca (25p.-75p.)
Kadın	129	5 (5-6)	10 (7-14)	6 (5-9)	5 (5-6)	25 (22-32)
Erkek	72	5 (5-12)	12 (7-21)	9 (5-15)	6 (5-9)	30 (24-54)
Meslek	p	p < 0,001*	p < 0,005*	p < 0,005*	p < 0,001*	p < 0,001*
Hekim	49	5 (5-11)	10 (7-20)	7 (5-15)	5 (5-9)	27 (23-47)
Diğer sağlık çalışanları	152	5 (5-7)	11 (7-16)	6 (5-10)	5 (5-6)	25 (22-35)
		p: 0,291	p: 0,471	p: 0,215	p < 0,0005*	p: 0,173
Çocuk sahibi olma						
Var	101	5 (5-7)	12 (8-17)	7 (5-12)	5 (5-7)	28 (22-39)
Yok	100	5 (5-7)	9 (7-15)	5 (5-10)	5 (5-6)	25 (22-32)
		p: 0,896	p < 0,005*	P: 0,446	p: 0,533	p: 0,140
Aşı karışıklığı konusundaki görüşü						
Karşı değilim	160	5 (5-5)	9 (7-12)	7 (5-8)	5 (5-6)	24 (22-30)
Aşı karışıklığı+tereddütü	41	14 (11-20)	22 (18-26)	16 (12-19)	9 (6-11)	58 (45-73)
		p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,001*
Aşılarda güvenli bulma durumu						
Bulan	183	5 (5-6)	10 (7-14)	6 (5-9)	5 (5-6)	25 (22-32)
Bulmayan	18	20 (16-23)	26 (24-28)	20 (17-21)	11 (10-14)	75 (64-83)
		p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,001*
Aşılarda resmî bir eğitim alma (son 1 yıl içinde)						
Eğitim alan	48	5 (5-6)	11 (8-16)	7 (5-11)	5 (5-6)	28 (22-39)
Eğitim almayan	153	5 (5-7)	10 (7-17)	6 (5-11)	5 (6-7)	25 (22-38)
		p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

TARTIŞMA

Bağışıklama hizmetleri ülkemizde büyük oranda birinci basamak sağlık kuruluşlarında yapılmaktadır ve burada görev yapan sağlık çalışanları da aşı reddi ile karşılaşma olasılığı yüksek bir gruptur. Bu çalışma birinci basamak sağlık hizmetleri kapsamında görev yapan sağlık çalışanlarını kapsamaktadır. Katılımcıların yaklaşık beşte biri aşılarda güvenle tartışabilecek ölçüde bilgi düzeyi açısından kendini biraz yeterli bulmuş, yarısından fazlası eğitim alma ihtiyacı duyduğunu belirtmiştir. Aşılar konusunda farkındalık ve bilgi sağlık çalışanının aşığı tavsiye etme isteğini artırmaktadır (14). Isparta'da birinci basamak sağlık çalışanlarına yönelik aşı konusunda eğitim müdahalesi uygulanan bir çalışmada, bölgedeki aşılama oranlarındaki artışın, sağlık çalışanlarının eğitimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (15). Bosna Hersek'te yapılan bir çalışmada; sağlık çalışanları aşılama programlarına ilişkin bilgilerini tatmin edici olduğunu, ancak aşı tereddütlerini ele almak için ek eğitime ihtiyaç duyduklarını belirtmiştir (16). Birleşik Krallık'ta ebeleri kapsayan bir çalışmada, katılımcıların %76'sı gebelere rutin olarak aşılama konusunda tavsiyede bulunmaları gerektiğini kabul etmiş, ancak sadece %25'i bu konuda kendini yeterli bulmuştur (17). Niğde'de aile sağlığı merkezi çalışanlarına yapılan bir çalışmada, mesleki ve hizmet içi eğitimlerde aşı reddi konusunda eğitim alma oranları %15 dolaylarında tespit edilmiştir (18). Yapılan çalışmaların büyük kısmı aşılarda konusunda sağlık çalışanlarının bilgi gereksinimi olduğuna işaret etmiştir (18-20). Sağlık çalışanlarının, aşı retlerini azaltmak için toplumda aşı karşıtlığına karşı bilimsel kanıtlara dayalı bilgi sunmaları, aşılarda güvenliği ve etkinliği hakkında yanlış bilgilere karşı mücadele etmeleri önemlidir (9,21). Ailelerle temas halinde olan sağlık çalışanlarının yeterince bilgilendirilmesi, açık ve doğru mesajlar iletebileceklerinden emin olunması gerekir.

Bu çalışmanın önemli bulgularından biri, sağlık çalışanlarının büyük bir kısmının ulusal aşı programının

zorunlu olması gerektiğini düşünmesidir. Bu sonuç İtalya'da pediatristlerin aşılama yönelik tutumlarını inceleyen ve hekimlerin ulusal aşılama programını gerekli gören çalışma bulgusuyla uyumludur (10). Birçok ülkede, aşılarda zorunlu olup olmadığı hakkında tartışmalar yaşanmaktadır. Bazıları, aşılamanın toplumun genel sağlığı için önemli olduğunu ve aşılarda zorunlu olması gerektiğini savunurken, bir kısmı bireysel özgürlüklerin korunması kapsamında zorunlu olmaması gerektiğini savunmaktadır (22-24). Araştırmanın yürütüldüğü ilde aşılama oranlarının diğer illere kıyasla daha düşük seyrettiği ve aşı retleriyle karşılaşma durumunun daha yüksek olduğu düşünüldüğünde, aşı uygulama zorunluluğu sağlık çalışanları tarafından bir alternatif olarak görülüyor olabilir.

Aşı reddi tüm aşılarda kendi iradesiyle yaptırmamayı ifade ederken aşı tereddütü aşığı kabullenmekte gecikme veya aşığı ulaşılmasına rağmen reddetme durumudur. Aşı tereddütü bir ya da daha fazla aşı için geçerli olabilir (12). Katılımcıların %79,6'sı aşı reddini desteklemiyorken, %5'i aşı reddini desteklediğini, %15,4'ü ise aşı tereddütü yaşadığını belirtmiştir. Bunun yanı sıra hekimlerde diğer sağlık çalışanlarına göre aşı karşıtlığı alt boyutundan elde edilen puan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Akar ve Öztürk'ün (25) hekimlerin aşı karşıtlığı konusunda bilgi ve tutumlarını ele aldıkları çalışmalarında, aşı sonrası gelişebilecek komplikasyon riski, otizm gelişebileceği düşüncesi, aşılarda uygun koşullarda saklanmadığı ve aşılarda yurt dışında üretilmesinden kaynaklı endişeler taşıdıkları görülmüştür. Hekimlere yönelik başka bir çalışmada, %10,5'inin herhangi bir aşığı karşı tereddüt yaşadığı dile getirilmiştir (11). Mersin'de hemşirelere yönelik bir çalışma %16'sının aşı tereddütü yaşadığını göstermiştir (20). Bu sonuç, Türkiye'de sağlık çalışanları arasında yürütülen benzer çalışmalara ek olarak, aşı tereddütünün yalnızca genel popülasyonda değil, sağlık çalışanlarında da var olduğunu göstermektedir. Paterson ve ark. (14)'ün 185 makaleyi incelediği çalışmasında Türkiye'de aşı reddi oranı %6 olarak

belirtilmiş, Kanada, Fransa, Çin ve İsrail’de de benzer veriler ortaya konmuştur. Karlsson ve ark. (8)’nin çalışmasında; sağlık çalışanlarının %13,0’ü aşı kararında tereddüt ettiğini, %6,3’ü aşığı ertelediğini ve %4,1’i çocuklarına aşı yaptırmayı reddettiğini bildirmiştir. Aynı zamanda %13,8’i çocukluk aşıları, %26’sı da grip aşısı konusunda tereddüt ettiklerinde hastalarını yönlendirmediklerini belirtmiştir (8). Sağlık çalışanının aşı reddi ya da tereddütü tutumuna sahip olması, aşı konusunda tereddütlü ebeveynler ile karşılaştığında doğru bir yaklaşım sergilemesini etkileyebileceği gibi ailelere aşığı önermesini de engelleyebilir.

Sağlık çalışanlarının çoğu çocukları için tüm çocukluk aşılarını kabul ettiğini bildirmiştir (%95,9). Çocuğu olan katılımcıların büyük kısmı rutin aşıları düzenli olarak yaptırmış/yaptırmakta olup, %2’si yaptırmadığını, %13’ü de eksik aşıları olduğunu belirtmiştir. Bu sonuç endişe vericidir ve birçok çalışma, sağlık çalışanlarının aşılar hakkındaki tutum ve bilgilerinin kendilerinin ve çocuklarının aşılanmasını etkilediğini, yanı sıra hastalarına aşı önerme niyetlerini etkileyebileceğini göstermektedir (8,20,26).

Sağlık çalışanlarının aşıları yaptırma konusundaki en önemli endişeleri aşı içeriklerini güvenli bulmamalarıdır. Aşıların içeriğine güven duymama aşı karşıtlığı konusunda bildirilen en yaygın argümanlardan biridir (27-29). Barselona’da yapılan bir çalışmada kamu pediatri uzmanlarının genel aşılama programını destekledikleri, ancak her dört kişiden birinin en az bir aşı hakkında şüphe duydukları ortaya konmuştur. Hükümete ve ilaç endüstrisine olan güvensizlik, aşı içerikleri konusunda bilgi eksikliği ve toplumsal mitlerin bu algıyı etkileyen faktörler olduğu gösterilmiştir (9). Türkiye’de aşılanmama nedenleri çeşitlilik göstermektedir (30). İzmir’de bir hastanede görevli sağlık çalışanları ile yapılan çalışmada, aşı yaptırmama nedenleri arasında aşıların yeteri kadar denenmediğini düşünme (%17,0), yan etkilerden çekinme (%12,9), aşıların içinde zararlı madde olduğunu düşünme (civa, alüminyum, eter) (%6,9) ve

inanç (%0,9) gibi nedenler bildirilmiştir (31). Türkay ve Aytekin’in (32) Antalya’da yaptığı çalışmada, katılımcıların %65’i aşıların yan etkilerine yönelik endişe taşıdığını bildirmiştir. Türk Tabipleri Birliği’nin yayınladığı ‘Türkiye’de Bağışıklık Hizmetlerinin Durumu’ adlı raporda aşı reddi için en sık belirtilen nedenler sırasıyla aşı içeriğine ve aşığı güvenmeme olmuştur (33).

Katılımcıların yaklaşık üçte biri COVID-19 enfeksiyonu geçirmiş, %90,5’i COVID-19 aşısını yaptırmıştır. Aşı olma durumu zorunlu COVID-19 aşığı uygulaması kapsamında yüksek olabilir. Bu çalışmada diğer aşıların yapılması konusunda oranların değiştiği göze çarpmıştır; hepatit, influenza ve tetanoz aşığı yüksek orandayken su çiçeği ve pnömokok aşılarının daha az uygulanması söz konusudur. Hastalık etkeniyle karşılaşma riskinin artması, aşığı özel uygulamayı etkileyen bir faktör olarak düşünülebilir.

Katılımcıların genel bağışıklama hizmetleri kapsamında aşı tereddütü/karşıtlığı ile karşılaşma durumları sorgulandığında neredeyse tamamı çocukluk aşılarında aşı reddi ile karşılaşmıştır. Samsun’da birinci basamak sağlık çalışanlarının %75’i (34); Ankara’da yapılan başka bir çalışmada ise aile hekimlerinin %58’i aşı tereddütü olan bir ebeveyn ile karşılaştığını bildirmiştir (35). Yalçın ve ark. (19)’nın Mersin’de aile sağlığı elemanlarıyla yaptığı çalışmada katılımcıların üçte biri en az bir defa aşı reddi ile karşılaştığını belirtmiştir. Bu veriler değerlendirildiğinde aşı reddi düzeyinin Mardin’de diğer illere göre daha yüksek olduğu söylenebilir. Aşı reddi oranlarının yüksek olması aşılama kapsamının risk altında olduğunu düşündürmektedir. Hekimoğlu ve ark. (36)’ın influenza kapsamını değerlendirdikleri çalışmalarında hastalık morbidite ve mortalitesinin kontrol altına alınmasında aşılama kapsamının iyileştirilmesinin önemine değinilmiştir. Özellikle risk gruplarında aşılama kapsamına ve etkili faktörlere odaklanmaya dikkat çekilmektedir. Türkiye’de çocuklara yönelik aşı uygulamalarında en yüksek sıklıkta görülen aşı reddi nedeni “aşı içeriğinde zararlı maddeler olması”dır. Aşı reddi ile karşılaştığında

%46,3'ü aileleri ikna etmeye çalıştığını, %36,8'i bilimsel açıklamalar yaptığını ve %17'si ise saygı duyarak müdahale etmediğini dile getirmiştir. Niğde ilinde aile sağlığı merkezleri ve sağlık evlerinde görev yapan sağlık çalışanlarının %76'sı aşı yaptırılmadığında ortaya çıkabilecek olumsuz sonuçlarla ilgili bilgi vereceğini, %28'i ikna etmeye çalışacağını, %15'i kararın ebeveynine ait olduğunu belirtmiştir (18). Kamerun'da insan papilloma virüsü (HPV) aşısı ile ilgili bir çalışmada, aşının kabul edilebilirliğini sağlamak için hemşireler arasında dikkate alınan en önemli faktörlerin, aşının etkinliğini ve güvenliğini anlamak olduğu vurgulanmıştır (37). Sağlık çalışanlarının aşılardan içeriğine olan güvensizliklerinin yüksek olması, topluma aşılarda güvenilir bilgi sağlamada ya da aşı tereddütü yaşayanları ikna etmede yetersiz kalmalarına yol açabilir.

Sağlık çalışanlarının %88'i Mardin ilindeki COVID-19 aşı çalışmalarında görev almıştır. Bu süreçte neredeyse tüm sağlık çalışanları aşı reddi ile karşılaşmıştır. Mardin İl Sağlık Müdürlüğü verilerine göre, 2019 yılında aşı reddi sayısı 95 iken bu sayı 2020 yılında 241'e yükselmiştir (38). Karşılaştıkları bildirilen en sık aşı reddi nedeni ise "aşı içeriğine olan güvensizlik"tir. Türkiye'de COVID-19 aşılama oranları bölge ve iller bazında farklılık göstermektedir. Mardin ili COVID-19 aşısı olma yüzdesi bakımından 2021 yılında en düşük iller arasında (%45,3) olup, Sağlık Bakanlığı'nın 2023 verilerine göre benzer şekilde düşük seyretmekle birlikte %67'dir (36,37). Benzer verilere sahip Bitlis ilinde (%68), COVID-19 aşısına yönelik bireylerin görüşlerini değerlendiren nitel bir çalışma aşı kararsızlığının, aşının yeni ve yeterince denenmemiş olmasına ve sosyal medyadan farklı bilgi aktarımının güvensizliğe yol açtığına dikkat çekmiştir (39-41). Aşılama oranları, çeşitli faktörlere bağlı olarak bölge ve il bazında değişebilir. Bu faktörler arasında nüfus yoğunluğu, erişim kolaylığı, bilinçlendirme çalışmalarının etkisi ve aşıya olan talepler etkili olabilir.

Aşıların kabulü, salgınla mücadelede oldukça önemlidir (42). Sağlık çalışanları aşılanan ilk

grup arasında olmasından dolayı aşı kabulünün önündeki engelleri daha iyi ele almak için aşı retleri hakkındaki tutumları dikkate alınmalıdır. Aşı karşıtı olan bireylerde, genellikle aşı karşıtlığı ölçeğinden alınan puanların yüksek olması beklenir(13). Bu, aşıları kabul etme konusunda daha şüpheli, endişeli veya güvensiz bir tutuma sahip olduklarını gösterir. Aşı karşıtlığı ölçeği toplam puanı ve alt boyutları açısından cinsiyete ve mesleki role göre farklılık söz konusudur. Erkeklerde kadınlara göre; hekimlerde ise diğer sağlık çalışanlarına göre aşı karşıtlığı ölçek puanları anlamlı olarak daha yüksektir. Bu konuda yapılan bazı çalışmalar, kadın sağlık çalışanlarının aşı karşıtlığı konusunda daha yüksek bir tutum gösterdiğini öne sürerken bu çalışmada farklı bir sonuç elde edilmiştir. Kadınların genellikle sağlıklı ilgili konulara daha fazla ilgi duyması ve sağlıklı ilgili kararları daha fazla araştırma ve analiz etme eğiliminde olmaları bunu etkilemiş olabilir. Ancak, her bireyin aşı karşıtlığı eğilimi kişisel ve bireysel bir tercih olabilir ve genelleme yapmak doğru olmayabilir. Aşı karşıtlığı konusunda cinsiyet veya meslek bazında genellemeler yapmak yerine, her bireyin endişelerini anlamak, bilimsel bilgi sağlamak ve doğru iletişim stratejileri kullanmak önemlidir. Amerika'da yapılan COVID-19 aşı kabulüyle ilgili bir çalışmada ise kadın sağlık çalışanları erkeklere göre; doğrudan hasta ile ilgilenen sağlık çalışanları (hekim, asistan, tıp öğrencileri ve hemşireler), doğrudan bakım sunmayanlara göre (hasta bakım teknisyeni/paramedik/rehabilitasyon hizmetleri, beslenme uzmanı, sosyal hizmet uzmanı vb.) daha yüksek aşı kabul oranlarına sahiptir (42). Bunun yanı sıra literatürden farklı olarak bu çalışmada çocuk sahibi olan bireylerde olmayanlara kıyasla aşı karşıtlığı alt boyutundan elde edilen puan anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (20,26). Bu durum, çocuk sahibi olan bireylerin, çocuklarının sağlığından ve güvenliğinden daha fazla endişe duyduklarını gösterebilir.

Bu çalışmanın sonuçları, sağlık çalışanları arasında aşı reddinin varlığına dair varsayımı

doğrulamakta ve bunu etkileyen nedenlere ilişkin bir fikir vermektedir. Katılımcıların görüşlerinin genel olarak olumlu olmasına ve aşılarla yüksek oranda güven duymalarına rağmen, aşı içeriğine yönelik endişe ve güvensizlik söz konusudur. Mardin ili birinci basamak hizmetlerde görev alan sağlık çalışanlarının bölgedeki bağışıklama hizmetleri kapsamında yüksek oranda aşı reddi ile karşılaştıkları, dikkate değer bir düzeyde aşı tereddütü yaşıyor oldukları ve bu konuda eğitim alma ihtiyacı duydukları ortaya çıkmıştır. Verilerimiz, aşı karşıtlığını azaltmak ve aşı olmayı teşvik etmek için sağlık çalışanlarına yönelik çabaların özellikle bu bölgede arttırılmasının yararlı olacağını göstermektedir. Ayrıca aşı tereddütü ile ilişkili belirleyicilerin dikkate alınması, gelecekteki aşılama kampanyalarının tasarlanmasında yol

gösterebilir. Bu amaçla, yeni ve geliştirilmiş eğitim programlarının ve bilgilendirme materyallerinin mümkün olan en kısa sürede sağlık profesyonellerine sürekli eğitim şeklinde sunulması önerilmektedir.

Bu çalışmada aşı tereddütleri genel olarak sorgulanmış, aşıya özel tereddüt/karşıtlık değerlendirilmemiştir. Çalışma kapsamına birinci basamakta çalışan tüm sağlık çalışanları katılmış olup, aşı uygulamalarında görevli olanlar ile olmayanların, aşı reddi ile karşılaştıklarındaki yaklaşımları ve ikna etmede kullandıkları yöntemler farklılık gösterebilir. Ayrıca çalışma COVID-19 bağışıklama hizmetlerinin görece daha yoğun olduğu bir dönemde yürütüldüğü için hem aşı kabulü hem de COVID-19 aşılarına karşı tutum değişmiş olabilir.

TEŞEKKÜR

Araştırma verilerinin toplanmasında sağlık çalışanlarına ulaşmada destek sunan Mardin İl Sağlık Müdürlüğü yetkililerine, araştırmaya katılan ve samimi görüşlerini aktaran tüm sağlık çalışanlarına teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:08.07.2021, Karar no: 21-7T/26).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Kaur G, Holliday CD, Mwinnyaa G, Dobo MG, Francis L, Sodha SV, et al. Routine Vaccination Coverage – Worldwide, 2022. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Morbidity and Mortality Weekly Report, 72. 2023; 72 (43):1156-67.
2. Peck M, Gacic-Dobo M, Diallo MS, Nedelec Y, Sodha SS, Wallace AS. Global routine vaccination coverage, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2019; 68(42): 937.
3. Rachlin A, Danovaro-Holliday MC, Murphy P, Sodha SV, Wallace AS. Routine vaccination coverage—worldwide, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2022; 71(44), 1396.
4. Global immunization coverage 2022. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>, [Erişim Tarihi:18.07.2023].
5. Düzgün M, İşler Dalgıç A. Toplum sağlığı için giderek artan tehlike aşı reddi önlenebilir mi? *Güncel Pediatri*, 2019;17(2): 424-34.
6. Tekinel B. Tehlikeli olan hangisi ? Aşı mı, aşı karışıklığı mı ? *Aegean J Med Sci*, 2020; 2(14): 80-2.
7. Gür E. Aşı kararsızlığı-aşı reddi. *Türk Pediatri Arsivi*, 2019;54(1):1-2.
8. Karlsson LC, Lewandowsky S, Antfolk J, Salo P, Lindfelt M, Oksanen T, et al. The association between vaccination confidence, vaccination behavior, and willingness to recommend vaccines among Finnish healthcare workers. *PLoS one*, 2019;14(10): e0224330.
9. Picchio CA, Carrasco MG, Sagué-Vilavella M, Rius C. Knowledge, attitudes and beliefs about vaccination in primary healthcare workers involved in the administration of systematic childhood vaccines, Barcelona, 2016/17. *Euro surveill*, 2019;24(6): 1800117.
10. Filia A, Bella A, D’Ancona F, Fabiani M, Giambi C, Rizzo C, et al. Childhood vaccinations: knowledge, attitudes and practices of paediatricians and factors associated with their confidence in addressing parental concerns, Italy, 2016. *Euro surveill*, 2019; 24(6): 1800275.
11. Han-Yekdeş D, Altunok A, Eskiocak M, Marangoz B. Bir üniversite hastanesindeki hekimlerin bağışıklamayla ilgili tutumları. *Klimik*, 2020;33(3): 255-9.
12. Larson HJ, Jarrett C, Schulz WS, Chaudhuri M, Zhou Y, Dube E, et al. Measuring vaccine hesitancy: The development of a survey tool. *Vaccine*, 2015;33:4165-75.
13. Kılınçarslan MG, Sarıgül B, Toraman Ç, Şahin EM. Development of valid and reliable scale of vaccine hesitancy in Turkish language. *Konuralp Tıp Derg*, 2020;12(3):420-9.
14. Paterson P, Meurice F, Stanberry LR, Glismann S, Rosenthal SL, Larson HJ. Vaccine hesitancy and healthcare providers. *Vaccine*, 2016; 34(52): 6700-6.
15. Uskun E, Uskun SB, Uysalgenc M, Yagız M. Effectiveness of a training intervention on immunization to increase knowledge of primary healthcare workers and vaccination coverage rates. *Public Health*, 2008;122(9): 949-58.
16. Ravlija J, Ivankovic A. Importance of health workers’ communication in immunisation programmes. *HealthMED*, 2012; 6(2): 672-7.
17. Ishola Jr DA, Permalloo N, Cordery RJ, Anderson SR. Midwives’ influenza vaccine uptake and their views on vaccination of pregnant women. *J Public Health*, 2013; 35(4): 570-7.
18. Yakşi N. Aile sağlığı merkezi çalışanlarının aşı reddi konusundaki düşünceleri ve davranışlarının değerlendirilmesi. *Türk J Public Health*, 2020; 18(3): 143-54.
19. Yalçın BNB, Tunç AY, Şaşmaz T. Mersin il merkezinde çalışan aile sağlığı elemanlarının aşı kararsızlığı veya reddi ile karşılaşma durumu ve ilişkili faktörlerin araştırılması. *Türk J Public Health*, 2020; 18(3): 155-70.
20. Güneş H, Semerci V, Kırbaş ZÖ. Hemşirelerin aşı karışıklığı düzeylerinin betirlenmesi. *Mersin Üni Sağlık Bil Derg*, 2023;16(1): 93-102.

21. Larson HJ, Cooper LZ, Eskola J, Katz SL, Ratzan S. Addressing the vaccine confidence gap. *Lancet*, 2011;378(9790):526-35.
22. Savulescu J. Good reasons to vaccinate: mandatory or payment for risk?. *J Med Ethics*, 2021; 47(2): 78-85.
23. Yılmaz Hİ, Turğut B, Çıtlak G, Oğulcan M, Paralı B, Engin M, et al. Türkiye’de insanların COVID-19 aşısına bakışı. *Dicle Tıp Derg*, 2021;48(3): 583-94.
24. Metin S. COVID-19 Bağlamında zorunlu aşı tartışmalarının hukuki boyutu. *Sağlık Bil İleri Araştır Derg*, 2021; 5-6.
25. Yılmaz Akar S, Zeren Öztürk G. Hekimlerin aşı ve aşı karşıtlığı hakkında bilgi, tutum ve davranışlarının değerlendirilmesi. *FLORA*, 2020;25(4):516-26.
26. Elizondo-Alzola UG, Carrasco M, Pino’s L, Picchio CA, Rius C, Diez E. Vaccine hesitancy among paediatric nurses: Prevalence and associated factors. *PLoS ONE*, 2021;16(5): e0251735.
27. Paul E, Steptoe A, Fancourt D. Attitudes towards vaccines and intention to vaccinate against COVID-19: implications for public health communications. *Lancet Reg Health Eur*, 2021;1: 100012.
28. Arda B, Durusoy R, Yamazhan T, Sipahi OR, Taşbakan M, Pullukçu H, et al. Did the pandemic have an impact on influenza vaccination attitude? a survey among health care workers. *BMC Infect Dis*, 2011;11(1): 1-8.
29. Özbalkıç E, Aydın ES, İpek İ, Özen N, Yüceler M, Ateş O, et al. Türkiye’de tıp fakültesi öğrencilerinin aşı, bağışıklama, aşı kararsızlığı ve COVID-19 aşısı hakkındaki bilgi ve düşünceleri. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2021;78(3):317-32.
30. Akbulak MA, Çöl M. 2022. Dünyada ve Türkiye’de aşılama tutumu ve COVID-19. *Estüdam Halk Sağlığı Derg*, 2022; 7(3): 531-40.
31. Arıcan MD. Sağlık çalışanları arasında aşılama genel bakış, aşı kabulü ve reddini etkileyen faktörler. *Uzmanlık Tezi. Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Kliniği*. 2019.
32. Türkay M, Ay EG, Aytekin MR. Antalya ilinde seçilmiş bir grupta aşı karşıtı olma durumu. *Akdeniz Tıp Derg*, 2017;3(2):107-12.
33. Eskiocak M, Marangoz B. Türkiye’de bağışıklama hizmetlerinin durumu. Ankara: Türk Tabipleri Birliği. 2021. https://www.ttb.org.tr/userfiles/files/turkiyede_bagisiklama_hizmetlerinin_durumu.pdf
34. Altuntaş M, Şahin MK. Çocukluk çağı aşı tereddüdü ile karşılaşma sıklığı, nedenleri ve çözüm önerileri: Samsun ili aile sağlığı merkezlerindeki sağlık çalışanlarıyla kesitsel bir çalışma. *Turkish J Fam Med Prim Care*, 2022; 16(4): 761-71.
35. Özden M. Ankara merkez ilçelerde çalışmakta olan aile hekimlerinin çocukluk çağı rutin aşı uygulamaları ve aşı tereddütüne sahip ebeveyn yaklaşımının değerlendirilmesi. *Tıpta Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Halk Sağlığı AD*, 2020.
36. Hekimoğlu CH, Emek M, Avcı E, Topal S, Demiröz M, Ergör G. Seasonal influenza vaccine effectiveness in preventing laboratory confirmed influenza in 2014-2015 Season in Turkey: a test-negative case control study. *Balkan Med J*, 2018;35:77-83.
37. Wamai RG, Ayissi CA, Oduwo GO, Perlman S, Welty E, Welty T, et al. Awareness, knowledge and beliefs about HPV, cervical cancer and HPV vaccines among nurses in Cameroon: an exploratory study. *Int J Nursing Studies*, 2013; 50(10): 1399-406.
38. 2020 aşı reddi verisi. Mardin İl Sağlık Müdürlüğü, [Erişim Tarihi: 21.05.2023].
39. Usul AS. “Gündem Koronavirüs: İki doz koronavirüs aşısı olanların oranı 47 ilde yüzde 65’i geçti”. *Anadolu Ajansı*, 2021. <https://www.aa.com.tr/tr/gundem/iki-doz-koronavirus-asisi-olanlarin-orani-47-ilde-yuzde-65i-gecti/2370328>, [...]. Erişim Tarihi: 21.05.2023.
40. Günlük aşı verileri <https://covid19asi.saglik.gov.tr/>, [...]. Erişim Tarihi: 21.05.2023.
41. Düzel B, Doğan MM. COVID-19 salgını özelinde aşı kararsızlığı: Bitlis örneği. *NOSYON*: 2022; (9): 96-114.
42. Shekhar R, Sheikh AB, Upadhyay S, Singh M, Kottewar S, Mir H, et al. COVID-19 vaccine acceptance among health care workers in the United States. *Vaccines*, 2021; 9(2): 119.

A machine learning approach for predicting familial and sporadic disease cases based on clinical symptoms: introduction of a new dataset

Klinik belirtilere dayalı ailesel ve sporadik hastalık vakalarını tahmin etmek için bir makine öğrenimi yaklaşımı: yeni bir veri kümesinin tanıtımı

Parisa SHARAFİ¹ (ID), Hilal ARSLAN² (ID), Sibel ERSOY EVANS³ (ID), Ali VARAN⁴ (ID), Şükriye AYTER¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a common yet complex neurogenetic disorder characterized by a highly variable clinical presentation, influenced by both genetic and environmental factors. While its genetic basis is well understood, the variability in symptoms among patients presents significant challenges for diagnosis and management. This study focuses on examining the differences in clinical features between sporadic and familial NF1 cases. Additionally, it evaluates the potential of machine learning techniques to predict sporadic NF1 cases based on clinical symptoms, offering insights into how computational approaches can complement traditional diagnostic methods.

Methods: A retrospective analysis was conducted on the medical records of 241 NF1 patients, including 121 sporadic and 120 familial cases. The frequency of various clinical features, such as Lisch nodules, pseudoarthrosis, and hypertension, was compared between the groups. analysis of variance (ANOVA) was used to identify the most important features distinguishing sporadic cases from familial ones. Furthermore, multiple machine

ÖZET

Amaç: Nörofibromatozis tip 1 (NF1), hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenen, oldukça değişken bir klinik sunumla karakterize, yaygın ancak karmaşık bir nörojenetik bozukluktur. Genetik temeli iyi anlaşılmış olsa da, hastalar arasındaki semptomların değişkenliği tanı ve yönetim için önemli zorluklar ortaya koymaktadır. Bu çalışma, sporadik ve ailesel NF1 vakaları arasındaki klinik özelliklerdeki farklılıkları incelemeyi amaçlamıştır. Ayrıca, makine öğrenimi tekniklerinin klinik semptomlara dayalı olarak sporadik NF1 vakalarını tahmin etme potansiyelini değerlendirerek, hesaplamalı yaklaşımların geleneksel tanı yöntemlerini nasıl tamamlayabileceğine dair içgörüler sunulmuştur.

Yöntem: 121 sporadik ve 120 ailesel vaka dahil olmak üzere 241 NF1 hastasının tıbbi kayıtları üzerinde retrospektif bir analiz yapılmıştır. Lisch nodülleri, psödoartroz ve hipertansiyon gibi çeşitli klinik özelliklerin sıklığı gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Sporadik vakaları ailesel olanlardan ayıran en önemli özellikleri belirlemek için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Ayrıca, belirlenen özelliklere dayanarak

¹TOBB University of Economics and Technology, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Ankara, Türkiye
²Yıldırım Beyazıt University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Software Engineering, Ankara, Türkiye
³Hacettepe University, School of Medicine, Department of Dermatology, Ankara, Türkiye
⁴Hacettepe University, School of Medicine, Department of Pediatrics, Pediatric Oncology, Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Parisa SHARAFİ

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Sogutozu Cd. No: 43, Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 14.10.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 29.12.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.06337

Sharafi P, Arslan H, Ersoy Evans S, Varan A, Ayter Ş. A machine learning approach for predicting familial and sporadic disease cases based on clinical symptoms: Introduction of a new dataset. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 99 - 106

learning algorithms, including k-nearest neighbors, artificial neural networks, support vector machines, decision trees, and XGBoost, were employed to predict sporadic cases based on the identified features.

Results: Among the machine learning models tested, the XGBoost algorithm demonstrated the highest predictive accuracy at 62.86%, indicating moderate reliability in identifying sporadic cases. Despite this limitation, the analysis revealed significant differences in clinical manifestations between the two groups. These differences suggest that shared genetic modifiers may play a critical role in shaping the observed genotype-phenotype relationship in NF1.

Conclusion: This study represents the first detailed comparison of a broad spectrum of clinical symptoms between sporadic and familial NF1 cases. While machine learning models showed only moderate success in prediction, the findings provide valuable insights into the phenotypic variability of NF1 and underscore the importance of larger, more diverse datasets for improving predictive accuracy. These results hold significant potential for guiding personalized diagnostic and therapeutic strategies for NF1 patients.

Key Words: Neurofibromatosis type 1, sporadic cases, familial cases, machine learning

sporadik vakaları tahmin etmek için k-en yakın komşular, yapay sinir ağları, destek vektör makineleri, karar ağaçları ve XGBoost dahil olmak üzere çoklu makine öğrenimi algoritmaları kullanılmıştır.

Bulgular: Test edilen makine öğrenimi modelleri arasında XGBoost algoritması %62,86 ile en yüksek tahmin doğruluğunu göstermiş ve sporadik vakaların belirlenmesinde orta düzeyde güvenilirliğe işaret etmiştir. Bu sınırlamaya rağmen, analiz iki grup arasında klinik belirtiler açısından önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Bu farklılıklar, paylaşılan genetik değiştiricilerin NF1'de gözlenen genotip-fenotip ilişkisini şekillendirmede kritik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç: Bu çalışma, sporadik ve ailesel NF1 vakaları arasında geniş bir klinik semptom spektrumunun ilk ayrıntılı karşılaştırmasını temsil etmektedir. Makine öğrenimi modelleri tahminde yalnızca orta düzeyde başarı gösterirken, bulgular NF1'in fenotipik değişkenliği hakkında değerli bilgiler sağlamakta ve tahmin doğruluğunu artırmak için daha büyük, daha çeşitli veri kümelerinin önemini altını çizmektedir. Bu sonuçlar, NF1 hastaları için kişiselleştirilmiş tanı ve tedavi stratejilerine rehberlik etme konusunda önemli bir potansiyele sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Nörofibromatozis tip 1, sporadik vakalar, ailesel vakalar, makine öğrenmesi

INTRODUCTION

Neurofibromatosis type 1 (NF1; OMIM 162200) is the most common neurogenetic disorder, affecting approximately 1 in 3,500 individuals worldwide. It is caused by mutations in the NF1 gene located on chromosome 17q11.2 (1). This gene spans 350 kb of genomic DNA and contains 60 exons, coding for neurofibromin, a cytoplasmic protein that negatively regulates RAS proteins (2). The loss of neurofibromin

leads to the activation of the RAS cascade, resulting in increased cell proliferation, categorizing NF1 as a tumor suppressor gene. The NF1 gene also has one of the highest germline mutation rates reported in humans.

About 50% of NF1 patients have sporadic cases, where de novo germline mutations occur without a family history of the disease (3-5). The clinical presentation of NF1 is highly variable and includes symptoms such as café-au-lait spots (CALs), cutaneous neurofibroma (cNF), plexiform neurofibroma (pNF),

freckling, peripheral nerve sheath tumors (MPNST), malignancies, and juvenile myelomonocytic leukemia (6). Despite its autosomal-dominant inheritance, the expression of clinical symptoms is highly unpredictable, with no clear genotype-phenotype correlations, making diagnosis and management challenging (7). Modifier genes and environmental factors, such as nutrition and lifestyle, may contribute to the observed clinical variability (8).

TOBB University Faculty of Medicine has been at the forefront of NF1 research, establishing a multidisciplinary “NF Study Group” in 2003. This group includes physicians from various clinical departments, as well as researchers from the basic sciences, focusing on the molecular aspects of NF1. When examining the incidence of clinical phenotypes such as IQ expression and learning disability, differences between familial and sporadic cases have been observed (9, 10). Through the evaluation of a national NF1 database, encompassing 241 probands (121 sporadic and 120 familial cases), we aimed to explore the differences in clinical symptom expression between sporadic and familial cases.

In this study, we introduce a novel machine learning-based approach to predict sporadic NF1 cases based on clinical symptoms. Utilizing a range of algorithms, including k-nearest neighbors, artificial neural networks, support vector machines, decision trees, and gradient boosting, we sought to classify patients as sporadic or familial. The coexistence of NF1 symptoms has been previously published (11). This is the first study to employ machine learning in the prediction of sporadic NF1 cases, leveraging detailed clinical data from a well-characterized national cohort.

MATERIAL and METHOD

Dataset

In this study a national NF1 database with 241 probands (121 sporadic and 120 familial cases) was evaluated. DNAs from patients were used for

mutation analysis and various number of known and novel mutations were characterized in our study and published elsewhere (12). The National Institutes of Health NF1 (NIH-NF1) clinical criteria were used for diagnosis of patients with NF1 (1, 13, 14). All participants had filled up the informed consent through a questionnaire with detailed clinical information of patients and completed by a dermatologist, a pediatric neurologist, or a clinical geneticist prospectively. The questionnaire encompassed clinical features of NF1 such as tumors and other neurological problems. The guidance of the Declaration of Helsinki were turned to account for clinical and genetic analyses and the questionnaire approved by the ethical committee of Hacettepe University. Clinical data were saved in our in-house developed database. The data that support the evidence of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. You can access the dataset at “UCI Machine Learning Repository, Neurofibromatosis Type 1; Clinical Symptoms of Familial and Sporadic Cases.”

Machine Learning Methods

We perform k-nearest neighbors, artificial neural networks, support vector machines, decision trees and gradient boosting techniques to predict whether a person has a sporadic or not based on the symptoms. In the next section, we describe these algorithms.

K-Nearest Neighbors (KNN)

The KNN (15) is a supervised machine learning method of the classification of unassigned data to the most ideal class according to the distance with other data in training set. The algorithm classifies new data points based on the comparison of features with the labeled data points in the training set. Since KNN does not need any training data points for model generation, it is a lazy algorithm. It uses all training data in the testing phase.

Artificial Neural Networks (ANN)

Artificial Neural Networks (16) is a machine learning model that makes decisions in a manner

similar to the human brain. Every neural network consists of layers of nodes, or artificial neurons, an input layer, single or multiple hidden layers, and an output layer. Each node connects to others, and is associated with a particular weight and threshold. If the output of any individual node crosses the specified threshold value, then the node is activated and it transmits the data to the next layer in the network. Neural networks learn and improve their accuracy over time by training the data.

Support Vector Machines (SVM)

The SVM (17) used in machine learning is an effective learning algorithm for classification and regression problems. Its main purpose is to classify data points by creating the best hyperplane between two classes. In this process, support vectors are important points that maximize the marginal gap between classes. SVM can also work successfully in high dimensional spaces by using kernel functions. It exhibits strong performance in classification and regression tasks.

Decision Tree (DT)

The DT (18) used in machine learning is a modelling technique used to analyze data sets and extract patterns. This model consists of decision nodes and branches connecting these nodes. Each node represents a particular feature, and the branches represent the values of the features. The tree divides the data set into subgroups and makes predictions for each subgroup. The learning process takes place by routing the instances to the branches of the tree according to their feature values and making decisions at each node. DTs are used in classification and regression tasks; the parameters affect the performance of the model. In machine learning, this model is an effective tool for solving data analytics and classification problems.

Gradient Boosting (XGBoost)

XGBoost is an enhanced variant of gradient boosting, intertwining gradient descent with

boosting techniques. By integrating multiple weak base classifiers into a robust ensemble, the XGBoost algorithm achieves superior classification capabilities. Unlike conventional boosting algorithms, which balance positive and negative samples, XGBoost ensures global convergence by tracking the direction of a negative gradient. This method is elucidated in (19). Furthermore, XGBoost introduces advanced regularization techniques such as L1 regularization (Lasso) and L2 regularization (Ridge), refining model generalization capabilities. Through these regularization methods, XGBoost mitigates overfitting more effectively compared to traditional gradient boosting algorithms, thereby enhancing model performance and robustness.

The study was approved by the Institutional Ethics Committee of Hacettepe University (Date: 08.11.2016 and Number: 16969557-1117).

RESULTS

The medical records of 241 patients diagnosed with NF1, comprising 121 sporadic and 120 familial cases, were retrospectively analyzed. The occurrence rates of various phenotypes across sporadic, familial, and total NF1 patients were assessed. This study also aimed to evaluate the effectiveness of several machine learning techniques in predicting sporadic cases based on clinical symptoms. In the following, we present the experimental setup and the performance metrics used to assess the machine learning models.

Performance Measures

All computational analyses were conducted on a system powered by an Intel Core i7 processor (2.6 GHz) with 16 GB of RAM, running Ubuntu 18.04.03 LTS. The machine learning algorithms were implemented using the Scikit-learn library, a comprehensive open-source toolkit in Python. The dataset was divided into training and validation sets with a 70:30 split, whereby 70% of the data was utilized for training the models and the remaining 30% for validation.

Evaluation Criteria

The machine learning models were evaluated based on four key metrics: precision, recall, F-measure, and accuracy, as detailed in Table 1.

Evaluation of Machine Learning Techniques for Predicting Sporadic Cases Using the Newly Created Dataset

Various machine learning techniques were employed to identify sporadic cases of NF1. The

performance of these models is summarized in the subsequent sections. Initially, we assessed the importance of different features using the analysis of variance (ANOVA) method, with the results presented in Table 2. According to these results, significant features for detecting sporadic cases include Lisch nodules, pseudoarthrosis, hypertension, myelodysplastic syndrome, leukemia, and bone dysplasia. Conversely, scoliosis, maternal age, rhabdomyoma, and mental retardation were among the least important features.

Table 1. Metrics for evaluating machine learning model performance

Measure	Formula
Precision	$(TP) / (TP+FP)$
Recall	$(TP) / (TP+FN)$
F-measure	$(2 \times \text{Precision} \times \text{Recall}) / (\text{Precision} + \text{Recall})$
Accuracy (Acc)	$(TP+TN) / (FN+TP+TN+FP)$

Table 2. Feature importance based on ANOVA F-score

Feature Name	F-Score	Feature Name	F-Score	Feature Name	F-Score
Lisch Nodule	1.95	Ganglioblastoma	1.05	cNF	0.67
Pseudoarthrosis	1.67	MPNST	0.96	CALS	0.54
Hypertension	1.48	Astrocytoma	0.95	pNF	0.41
Myelodysplastic Syndrome	1.36	Hamartoma	0.85	Patient age	0.31
Leukemia	1.36	Tumor	0.80	Sex	0.12
Bone Dysplasia	1.13	Paternal age	0.77	Rhabdomyoma	0.07
Optic Pathway Glioma	1.09	Epilepsy	0.69	Maternal age	0.05
Cranial Involvement	1.06	Axillary freckling	0.68	Scoliosis	0.02

(Café-au-lait spots: CALS, Cutaneous Neurofibroma: cNF, Plexiform Neurofibroma: pNF, Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor: MPNST)

The performance of the machine learning classifiers on the proposed dataset is presented in Table 3. Precision scores ranged from 0.50 to 0.68, recall values varied between 0.38 and 0.56, F-measure values

spanned 0.43 to 0.57, and accuracy scores ranged from 51.43% to 62.86%. The XGBoost method achieved the highest performance, with an accuracy of 62.86%.

Table 3. Performance evaluation of machine learning classifiers on the proposed dataset

Method	Precision	Recall	F-measure	Accuracy (%)
KNN	0.58	0.56	0.57	58.57
ANN	0.61	0.50	0.55	60
SVM	0.59	0.56	0.58	60
DT	0.50	0.38	0.43	51.43
XGBoost	0.68	0.44	0.54	62.86

DISCUSSION

This study evaluated a cohort of NF1 patients from TOBB University, focusing on the differences in clinical symptom frequency between sporadic and familial cases. While the genetic and clinical aspects of NF1 have been extensively studied, there is a notable gap in the literature regarding the specific frequency of symptoms in sporadic versus familial cases.

In this study, machine learning techniques were employed to predict sporadic cases based on clinical symptoms, with the XGBoost algorithm achieving the highest accuracy at 62.86%. While this result demonstrates the potential of machine learning in differentiating between sporadic and familial cases, it also indicates the need for further data collection and feature refinement to improve predictive accuracy. The inclusion of additional clinical features and larger datasets could enhance the model's performance, allowing for more precise identification of sporadic cases.

In machine learning studies, it is recommended to divide the data set into three parts: learning (training), validation and test data sets. However, our dataset

consists of a limited number of samples (121 sporadic and 120 familial cases). Thus, we used for 70% training and 30% testing strategy in this study and we will follow the mentioned strategy in our future studies.

Overall, our findings underscore the complexity of NF1 and the influence of both genetic and environmental factors in its clinical manifestation. Continued research in this area, coupled with advanced analytical techniques, will be essential for developing more accurate diagnostic tools and improving patient outcomes.

In conclusion; this study provides a novel perspective on the phenotypic differences between sporadic and familial NF1 cases, utilizing machine learning to explore these distinctions. While the accuracy of the predictive models was moderate, the findings underscore the complexity of the genotype-phenotype relationship in NF1, suggesting that factors beyond the NF1 gene itself may play a significant role in clinical outcomes. The observed differences in learning disabilities between familial and sporadic cases point to the potential influence of shared genetic or environmental modifiers within families. This research marks a step forward in

understanding the variability of NF1 symptoms and highlights the need for more comprehensive data and advanced analytical approaches to improve diagnostic accuracy. Future studies should focus on expanding datasets and refining predictive

models to better capture the nuanced interactions between genetic factors and clinical manifestations in NF1 patients. Such efforts will be crucial in advancing personalized medicine and improving patient care in neurogenetic disorders like NF1.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Institutional Ethics Committee of Hacettepe University (Date: 08.11.2016 and Number: 16969557-1117).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet*, 1996; 33: 2-17.
2. Rasmussen SA, Friedman JM. NF1 gene and neurofibromatosis 1. *Am J Epidemiol*, 2000; 151: 33-40.
3. Klose A, Peters H, Hoffmeyer S, Buske A, Luder A, Hess D, et al. Two independent mutations in a family with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Am J Med Genet*, 1999; 83: 6-12.
4. Li Y, O'Connell P, Breidenbach HH, Cawthon R, Stevens J, Xu G, et al. Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics*, 1995; 25: 9-18.

5. Upadhyaya M, Majounie E, Thompson P, Han S, Consoli C, Krawczak M, et al. Three different pathological lesions in the NF1 gene originating de novo in a family with neurofibromatosis type 1. *Hum Genet*, 2003; 112: 12-7.
6. Von Deimling A, Krone W, Menon AG. Neurofibromatosis type 1: pathology, clinical features and molecular genetics. *Brain Pathol*, 1995; 5: 153-62.
7. Pasmant E, Vidaud M, Vidaud D, Wolkenstein P. Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *J Med Genet*, 2012; 49: 483-9.
8. Sharafi P, Ayter S. Possible modifier genes in the variation of neurofibromatosis type 1 clinical phenotypes. *J Neurogenet*, 2018; 32: 65-77.
9. Biotteau M, Dejean S, Lelong S, Iannuzzi S, Faure-Marie N, Castelnau P, et al. Sporadic and familial variants in NF1: an explanation of the wide variability in neurocognitive phenotype? *Front Neurol*, 2020; 11: 368.
10. Terzi YK, Oguzkan Balci S, Anlar B, Erdogan Bakar E, Ayter S. Learning disability and oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMGP) gene in neurofibromatosis type 1. *Turk J Pediatr*, 2011; 53: 75-8.
11. Sharafi P, Anlar B, Ersoy Evans S, Varan A, Yilmaz OF, Turan M, et al. The effect of parental age on NF1 patients in Turkey. *J Community Genet*, 2018; 9: 227-32.
12. Terzi YK, Oguzkan Balci S, Anlar B, Varan A, Ersoy Evanse S, Sharafif P, et al. Clinical findings and mutation analysis of NF1 patients in Turkey. *Meta Gene*, 2018; 15: 80-3.
13. DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics*, 2000; 105: 608-14.
14. Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG, et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet*, 2007; 44: 81-8.
15. Deng Z, Zhu X, Cheng D, Zong M, Zhang S. Efficient kNN classification algorithm for big data. *Neurocomputing*, 2016; 195: 143-8.
16. Ebiaredoh-Mienye SA, Esenogho E, Swart TG. Integrating enhanced sparse autoencoder-based artificial neural network technique and softmax regression for medical diagnosis. *Electronics*, 2020; 9: 1963.
17. Burges CJ. A tutorial on support vector machines for pattern recognition. *Data Min Knowl Discov*, 1998; 2:121-67.
18. Breiman L. Random forests. *Mach Learn*, 2001; 45: 5-32.
19. Rao H, Shi X, Rodrigue AK, Feng J, Xia Y, Elhoseny M, et al. Feature selection based on artificial bee colony and gradient boosting decision tree. *Appl Soft Comput*, 2019; 74: 634-42.
20. Terzi YK, Sirin B, Serdaroglu E, Anlar B, Aysun S, Hosgor G, et al. Absence of exon 17 c.2970-2872 del AAT mutation in Turkish NF1 patients with mild phenotype. *Childs Nerv Syst*, 2011; 27: 2113-6.

Clinical quality assessment of coronary artery bypass graft surgery

Koroner arter bypass greft cerrahisi klinik kalitesinin değerlendirilmesi

Zuhal ÇAYIRTEPE¹ (ID), Afsun Ezel ESATOĞLU² (ID), Atilla ARAL³ (ID), Şahin KAVUNCUBAŞI⁴ (ID)

ABSTRACT

Objective: Clinical quality (CQ) describes the technical quality of healthcare services and explains how healthcare system affect patient outcomes. This study aims to assess CQ on the patient scale by using structure, process, and outcome measures in the context of coronary artery bypass graft (CABG) surgery.

Methods: Network Data Envelopment Analysis (NDEA) was used to assess the CQ levels of patients undergoing CABG. The structure, process, and outcome quality measures of CABG surgery which include clinical factors of the patient as well as the medical procedures, costs, inpatient days, and quality of life, are examined simultaneously. These variables are used to assess CQ and to determine the quality improvement points.

Results: According to the results of NDEA three patients had the highest level of CQ. Detailed profiles were generated for CABG surgery and for patients with low-clinical quality levels. This research highlighted areas for quality improvement to maximize resource utilization and clinical efficiency.

ÖZET

Amaç: Sağlık hizmetlerinin teknik kalitesini tanımlayan "klinik kalite (KK)" sağlık sisteminin hasta sonuçlarını nasıl etkilediğini açıklayan bir kavramdır. Bu çalışmada, koroner arter bypass greft (KABG) ameliyatının yapı, süreç ve sonuç ölçütlerini kullanarak hasta bazında KK'nin değerlendirilmesi amaçlandı.

Yöntem: KABG uygulanan hastaların KK düzeylerini değerlendirmek için Network Veri Zarflama Analizi (NVZA) kullanıldı. Hastanın klinik bulgularının yanı sıra tıbbi prosedürler, maliyetler, hasta yatış günleri ve yaşam kalitesini içeren KABG ameliyatının yapı, süreç ve sonuç ölçütleri eş zamanlı analiz edildi. Bu değişkenler KK'yi değerlendirmek ve kalite iyileştirme noktalarını belirlemek için kullanıldı.

Bulgular: NVZA sonuçlarına göre en yüksek KK düzeyinin üç hastada sağlandığı tespit edildi. KABG ameliyatı ve KK düzeyi düşük olan hastalara yönelik ayrıntılı profiller oluşturuldu. Çalışma bulguları ile kaynak kullanımını ve klinik verimliliği en üst düzeye çıkarmak için kalitenin iyileştirilme noktaları belirlendi.

¹Health Institutes of Türkiye (TUSEB), Türkiye Health Care Quality and Accreditation Institute, Ankara, Türkiye

²Ankara University Institute of Health Sciences, Department of Health Management, Ankara, Türkiye

³Ankara University, Faculty of Medicine, Department of Cardiovascular Surgery, Ankara, Türkiye

⁴Başkent University, Faculty of Health Sciences, Department of Health Management, Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Zuhal ÇAYIRTEPE

Sağlık Bakanlığı Bilkent Yerleşkesi Dumlupınar Bulvarı 6001 Cad. No: 9 Çankaya, Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 21.02.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 05.11.2024

Conclusion: As a result of this study, CQ with the NDEA on a patient scale, encompassing the structure, process, and outcome quality measures across the entire healthcare cycle of CABG surgery and the analysis model demonstrated its potential as a useful tool for assessing and improving CQ. The intensive care unit and postoperative length of stay, the duration of cardiopulmonary-bypass and cross-clamp, and the use of fresh frozen plasma were identified as the areas requiring quality improvement. The study recommends creating disease-specific standard data packages including multiple quality measures for CQ assessment, and employing the NDEA method for further quality improvement studies.

Key Words: Coronary artery bypass graft, clinical quality, network data envelopment analysis

Sonuç: Çalışma sonucunda KABG ameliyatı sonrası elde edilen KK hasta bazında değerlendirildi. Yoğun bakım ve ameliyat sonrası hasta yatış günü, kardiyopulmoner bypass ve kros klemp süresi, taze donmuş plazma kullanımı, kalitenin iyileştirilmesi yapılabilecek alanlar olarak belirlendi. NVZA ile oluşturulan modelinin KK'nin değerlendirilmesi ve iyileştirilmesinde yararlı bir araç olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu çalışma ile KK değerlendirmesinde, hastalığa özgü kalite ölçütlerinin içerildiği standart veri paketlerinin oluşturulması, daha ileri kalite iyileştirme çalışmaları için NVZA yönteminin kullanılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Koroner arter bypass greft, klinik kalite, network veri zarflama analizi

INTRODUCTION

Each year, unsafe care imposes a significant economic burden on European Union countries, totaling €21 million, and in the United States, this burden escalates to \$1 trillion annually (1). The prominence of healthcare quality has increased due to unsafe healthcare delivery and financial stress. CQ, representing the technical outcome quality of healthcare, encompasses the tangible outcomes derived from healthcare interventions (2). CQ indicators focus on specific aspects of quality rather than assessing the entire service cycle. Unfortunately, these indicators are rarely specific enough to evaluate the performance of healthcare professionals or a patient's condition. (3) Nonetheless, CQ measurement is anticipated to elucidate the intricate connections between the structure, process, and outcome characteristics of a healthcare service. (4) CQ assessments initiate by prioritizing prevalent health phenomena, considering both their impact and

measurability. (5) Consequently, this study selected CABG surgery, a treatment option for cardiovascular disease—a leading global cause of death affecting 17.9 million individuals in 2019—as the focal point for CQ measurement. (6)

The CABG outcome for each patient is influenced by various factors of the whole healthcare cycle including the severity of the disease, medical interventions, treatment protocols, and duration of postoperative care both in the intensive care unit and in the clinic. (7) This study aims to assess patients' relative CQ levels by employing structure, process, and outcome quality measures in the context of CABG surgery.

MATERIAL and METHOD

This prospective, cross-sectional research was conducted at a tertiary training and research hospital in Ankara. The study included inpatients with a pre-diagnosis of CABG between December 15, 2018, and

March 15, 2019, making up the research population. Data were collected from 139 patients who provided informed consent to participate. Excluded from the study were patients who were discharged without surgery (n=38), and passed away during their hospital stay (n=3). The CQ levels of 98 patients aged 18 and above were assessed using a two-stage NDEA. The measures affecting CABG surgery CQ were identified as follows:

Structure: EuroSCORE risk score (1=Low; 2=Intermediate; 3=High).

Process: Coronary angiography, ECHO cardiography ejection fraction, level of evidence supporting the efficiency and effectiveness of the procedure (LESEEP), comorbidities, cardiopulmonary-bypass (CPB) and aortic cross-clamp (CC) duration, carotid endarterectomy, CABG application on a beating heart, blood product transfusion (erythrocyte suspension, fresh frozen plasma), the use of inotropic agents, intra-aortic balloons, Extracorporeal Membrane Oxygenation(ECMO), number of bypassed vessels, reoperation, length of stay (LOS).

Outcome Measures: Postoperative serum creatinine, urea, AST, ALT, CRP values, quality of life (QoL), and healthcare costs (operation and preoperative, ICU, postoperative period).

Data Collection Process: Data on all variables was gathered. The Carotid Endarterectomy, Intra-aortic Balloon, and ECMO, LESEEP class remained uniform across all patients; hence, these variables were omitted from consideration in the NDEA.

Data were sourced from both written and electronic health records. The hospital invoices were meticulously categorized by the research team into distinct subcategories, including radiology-laboratory, blood products, consumables, medications, and other transaction costs. The QoL evaluated by EQ-5D5L questionnaire. The initial assessments conducted face-to-face before surgery and follow-up assessments conducted via telephone three months post-surgery. The difference between

the two EQ-5D5L scores was defined as the “QoL improvement value.” Furthermore, an Adjusted Functional Health Value was calculated by scoring the results of ECHOcardiography, serum urea, creatinine, AST, ALT, and CRP as positive or negative based on the determined cutoff points established by the researcher (cardiovascular surgeon).

We conducted statistical analyses to examine the relationships among demographic characteristics, structure, process, and outcome measures. In addition to descriptive statistics, we employed the Mann-Whitney U test and two-stage NDEA. p-value of <0.05 was considered statistically significant. In the two-stage Network DEA, each patient was defined as a Decision-Making Unit (DMU). This method was chosen because it accounts for networks with distinct stages and interactions, allowing for the examination of sub-processes as well as sub-inputs and outputs of each process (8). In addition, it can also manage multiple measures simultaneously, highlights improvement points, and is a sensitive method in identifying waste of resources and evaluating performance (8,9).

The scores obtained through NDEA analysis were assessed in terms of efficient and inefficient. The literature revealed that, even when close to the efficiency frontier, subjective cutoff points or quartiles can be employed to identify DMUs whose characteristics might have been overlooked due to their classification as inefficient (10,11). In our analysis, to provide a clearer distinction between efficient and inefficient patients, the NDEA scores were divided into quartiles and categorized as follows: marginally inefficient, most inefficient, above the median, and below the median. Marginally inefficient patients fell within the fourth quartile with efficiency scores ranging from 0.775 to 1 in the Clinical Efficiency Stage (CES) and 0.849 to 1 in the Resource Efficiency Stage (RES). In this research “efficient and marginally inefficient patients were termed “high-CQ patients(efficient)”. Conversely, the most inefficient patients were situated in the first quartile, characterized by efficiency scores ranging

from 0 to 0.513 in the CES and 0 to 0.535 in the RES. Patients identified as being in the “Most Inefficient,” “Above Median,” and “Below Median” categories, indicative of low CQ in the analyses, were collectively

termed “low-CQ patients(inefficient)”.

The study was approved by the Ankara University Health Sciences Sub-Ethics Committee (Date: 06.12.2018 and Number: 218).

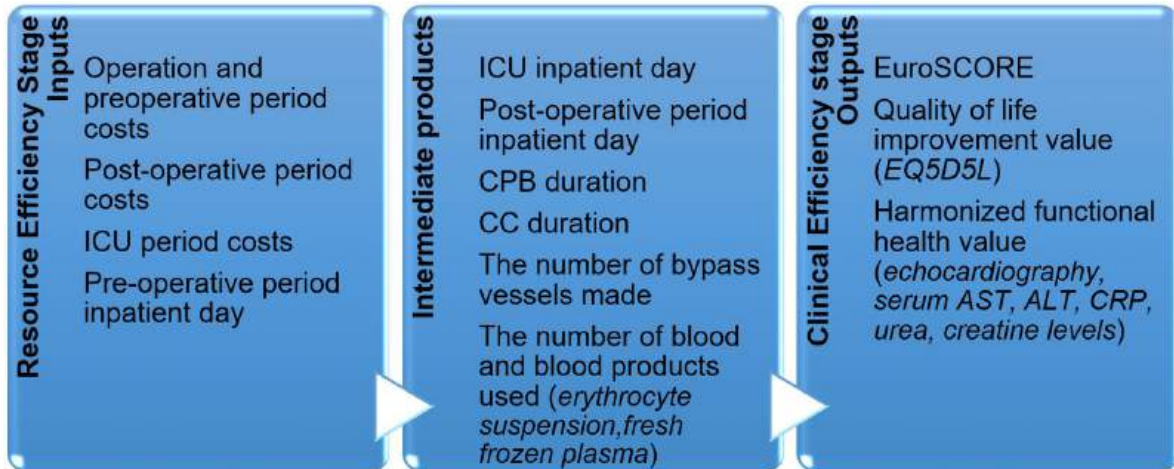


Figure 1. Swo-Stage NDEA Model -CQ Assessment of CABG Surgery

RESULTS

Ninety-eight patients who underwent CABG surgery were enrolled in the study. Descriptive findings for the patients are presented in Table 1. Among the study participants, eighty (81.63%) were male. The distribution of patients based on the EuroSCORE revealed 49 (50%) in the low-risk category, 37 (37.75%) in the moderate-risk category, and 14 (14.28%) in the high-risk category. The most prevalent comorbid condition was diabetes, affecting 42 (41.58%) patients, while 50 patients had no comorbidities. The mean LOS prior to surgery, in the ICU, and during the postoperative period were 6.24 ± 4.48 , 1.8 ± 1.55 , and 5.5 ± 3.02 days, respectively. The average duration of CPB and CC were 106.46 ± 37.25 and 67.24 ± 25.58 minutes, respectively. In terms of QoL assessment, the EQ5D5L score was 0.706 ± 0.227 upon initial evaluation and increased to 0.880 ± 0.181 in the subsequent assessment. The utilization of erythrocyte suspension (ES) amounted to an average of 3 ± 2.89 units, while fresh frozen plasma (FFP) use

averaged 2.27 ± 2.24 units. Researchers determined the adjusted functional health level to be 11.56 ± 2.01 .

The central efficiency score derived from the NDEA analysis indicated that three patients achieved the highest CQ level. The average efficiency score among the 98 patients included in this study's analysis was determined to be 0.43. It was observed that 15 patients had an efficiency score of 0.68 in the RES, and 11 patients also had an efficiency score of 0.68 in the CES. The distribution of patient efficiency scores in both the RES and CES is visually depicted in Figure 2.

It was determined that the patients who were efficient in the CES were not efficient in the RES, except for five patients (Figure 2). It was determined that 20 of 25 patients, which were considered inefficient in RES, were not efficient at the CES and a relatively high-CQ level could not be achieved in these patients. Table 2 provides the mean values and statistical test results for patients categorized as high-CQ and low-CQ in both the RES and CES, with respect to the structure, process, and outcome measures.

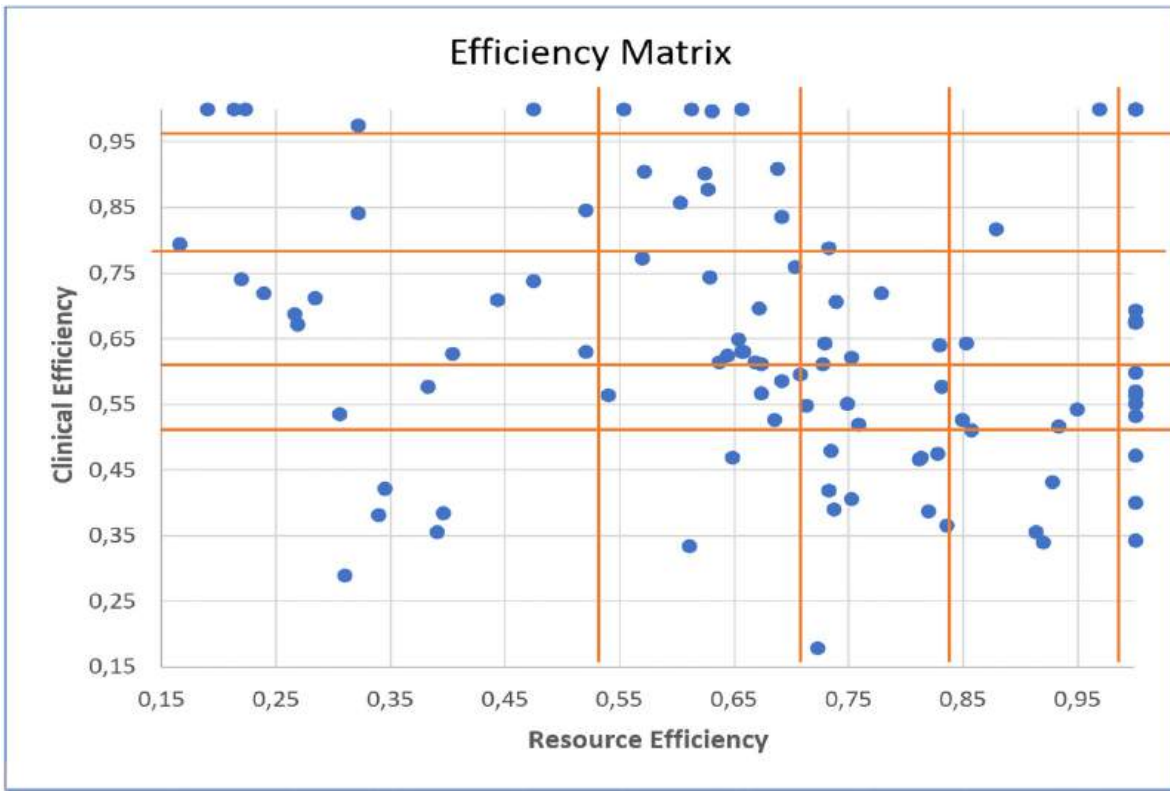


Figure 2. Distribution of the NDEA Result RES and CES Scores

In the RES, although there was no statistically significant difference, the costs were found to be relatively higher in the low-CQ patient group except for preoperative operative and post-operative period costs. The average preoperative and operative period cost was $\$1327.23 \pm 998,43$, whereas radiology laboratory costs amounted to $\$635.87 \pm 907.28$, and post-operative period costs were $\$173.24 \pm 126.96$ for low-CQ patients. It was found that there was a statistically significant difference not only in preoperative costs but also in post-operative costs. There is a statistically significant difference between high-CQ and low-CQ patients especially regarding the radiology and laboratory costs during the preoperative and operative period and ICU medicine costs (Table 2).

In the CES, although there was no statistically

significant difference the costs were found to be relatively higher in the low-CQ patient group except for preoperative other transaction and operative post-operative consumable costs. The average preoperative other transaction cost is $\$380,79 \pm 157,56$, while post-operative consumable costs are $\$10,61 \pm 16,44$ for low-CQ patients (Table 2).

In the RES preoperative period, inpatient days are $3,20 \pm 2,31$ in high-CQ patients while $7,30 \pm 4,57$ days in low-CQ patients, and there is a statistically significant difference between them. Also, ICU inpatient days have statistically significant differences between high-CQ patients ($2,04 \pm 1,02$ days) and low-CQ patients ($1,71 \pm 1,42$ days). There are no significant differences between high-CQ and low-CQ patients in both RES and CES about other inpatient day values (Table 3).

Table 1. The descriptive statistics of patients

Patient characteristics	N=98
	n (%)
Male	80 (81.63)
Female	18 (18.36)
EuroSCORE	
“1” n (%)	49 (50)
“2” n (%)	37 (37.76)
“3” n (%)	12 (12.24)
Comorbidity Situations	
Diabetes	42 (42.85)
Chronic renal failure	2 (2.04)
Other and combined comorbidities	4 (4.08)
Number of patients without comorbid disease	50 (51.02)
LOS	mean. std
preoperative period	6.24 ±4.48
ICU period	1.8±1.55
postoperative period	5.5±3.02
EQ5D5L Quality of Life Survey	
First application	0.706±0.227
Postop 3rd month	0.880±0.181
CPB duration (min)	106.46±37.25
CC time (min)	67.24±25.58
Use of blood and blood products	
Erythrocyte suspension (ES) (unit)	3±2.89
Fresh frozen plasma (FFP) (unit)	2.27±2.24
Harmonized functional health value	11.56 ±2.01

Table 2. Average values of efficient and inefficient DMUs (Patients) according to the NDEA results by stages

Measures	Resource Efficiency Stage		Clinical Efficiency Stage	
	Efficient-marginal inefficient DMU (≥0,84) (n=25)	Inefficient DMU (<0,84) (n=73)	Efficient-marginal inefficient DMU (≥0,77) (n=25)	Inefficient DMU (n=73)
Operation and preoperative period costs (\$)	956,73±623,9*	1327,23±998,43 *	1137,55 ± 734,56	1265,31± 988,96
Radiology laboratory (\$)	348,98±657,57*	635,87±907,28*	559,24 ±730,25	563,50±900,46
Blood and blood products (\$)	16,25±23,92	24,09±31,77	18,21±28,00	23,42±30,78
Other transaction (\$)	329,25±87,69	373,82±157,54	308,91±72,09*	380,79±157,56*
Consumables (\$)	167,35±114,5	190,42± 1330,23	160,46±124,37	195,71±156,86

Table 2 (cont). Average values of efficient and inefficient DMUs (Patients) according to the NDEA results by stages

Measures	Resource Efficiency Stage		Clinical Efficiency Stage	
	Efficient-marginal inefficient DMU (≥ 0.84) (n=25)	Inefficient DMU (< 0.84) (n=73)	Efficient-marginal inefficient DMU (≥ 0.77) (n=25)	Inefficient DMU (n=73)
Medicine (\$)	94.9±46.28	103.03±45.07	99.28±41.15	101.53 ±46.87
ICU period costs (\$)	356.82±269.74	455.83±374.04	354.25±206.34	456.71±387.03
Radiology Laboratory (\$)	32.26±70.98	95.17±166.90	55.90±88.43	87.07±166.44
Blood and Blood Products (\$)	31.72±41.40	36.12±51.98	26.83±34.43	37.79±53.48
Other Transaction (\$)	234.78±207.77	231.59±236.87	200.25±166.06	243.42±246.63
Consumables (\$)	23.60±48.28	17.67±20.97	12.10±14.14	21.61±33.70
Medicine (\$)	34.46±50.48*	75.28±92.29*	59.18±63.68	66.81±91.82
Post-operative period costs (\$)	137.86±126.69*	173.24±126.96*	147.56±101.10	169.92±135.12
Radiology Laboratory (\$)	38.36±55.48	55.71±71.40	42.95±51.58	54.14±72.69
Blood and Blood Products (\$)	26.57±28.71	25.82±27.86	20.62±21.35	27.86±29.76
Other Transaction (\$)	29.99±22.93	33.89±24.10	229.24±19.54	34.15±25.03
Consumables (\$)	9.03±18.97	8.86±13.32	4.26±6.81*	10.61±16.44*
Medicine (\$)	33.90±51.72	44.48±47.14	37.75±50.45	43.16±47.81
Preoperative period inpatient day*	3.20±2.31*	7.30 ± 4.57*	5.96 ± 3.49	6.36 ± 4.78
ICU inpatient day	2.04± 1.02*	1.71 ± 1.42*	1.44 ± 0.77	1.92 ± 1.46
Post-operative period inpatient day	5.68± 4.03	5.73± 2.52	5.44 ± 1.64	5.81 ± 3.29
CPB duration (m)	111.64± 28.92	101.14± 27.95	87.72 ±25.98*	109.33 ± 27.25*
CC duration (m)	68.88± 23.33	64.93± 22.75	54.56 ±17.98*	69.84± 23.13*
Amount of Blood and Blood products used	2.48± 1.58	2.85± 2.20	2.08 ± 1.32	2.99 ± 2.21
ES				
FFP	2.16± 1.60	2.03± 1.50	1.44 1.04*	2.27 ± 1.60*
Harmonized functional health value	11.36± 1.35	11.63± 2.19	11.68 ± 2.43	11.52 ± 1.86
EQ5D5L quality of life improvement value	0.410 ±0.220	0.386 ± 0.225	0.354 0.219	0.406 ± 0.224
Preoperative EQ5D5L	0.643 ± 0.217*	0.738 ± 0.215*	0.543 ±0.254*	0.773 ± 0.170*
EQ5D5L Postoperative 3. month	0.898±0.124	0.910± 0.085	0.914 ± 0.080	0.905±0.101

Note: * Statistically significant p <0,05

Table 3. Distribution of EuroSCORE, comorbidity situations, number of bypassed vessels in resource and clinical efficiency stages and test results

		EuroSCORE		Comorbidity Situations		Number of bypassed vessels	
		Efficient -marginal inefficient	Inefficient	Efficient -marginal inefficient	Inefficient	Efficient -marginal inefficient	Inefficient
Resource Efficiency Stage	Mean and SD	1.44 ± 0.651	1.67 ± 0.708	0.24 ± 0.436	0.53 ± 0.502	3.32 ± 0.988	2.96 ± 1.006
	Rank average	42.90	51.76	38.76	53.18	56.24	47.19
	U	747.500		644.000		744.000	
	z	-1.489		-2.535		-1.437	
	p	0.137		0.011*		0.151	
Clinical Efficiency Stages	Mean and SD	1.96 ± 0.790	1.49 ± 0.626	0.60 ± 0.500	0.41 ± 0.495	2.48 ± 0.872	3.25 ± 0.983
	Rank average	61.46	45.40	56.40	47.14	34.48	56.64
	U	613.500		740.000		537.000	
	z	-2.698		-1.629		-3.203	
	p	0.007*		0.103		0.001*	

It is determined that in the CES variable affecting clinical outcomes such as CPB duration have statistically significant differences between high-CQ patients (87,72±25,98m) and low-CQ patients(109,33±27,25m), and low-CQ patients' duration of CPB is longer. In terms of CC duration, it was determined that this time lasted 69,84±23,13 minutes in low-CQ patients and was statistically significant. While no significant difference was found in both RES and CES in terms of the use of ES, it was found that the use of FFP was statistically significantly overused in patients that were low-CQ at the CES (Table 2).

While the preoperative QoL score had statistically significant differences between high-CQ and low-CQ patients, no significant difference was found in the post-operative QoL 3rd month score and the improvement value in QoL (Table 2).

At the CES, it was found that there was a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the high-CQ

and low-CQ patients in the number of bypassed vessels and the EuroSCORE (Table 3). It was determined that the number of bypassed vessels was high in low-CQ patients. In the RES, there was a significant difference between the two groups in terms of the patient's comorbidity status. More comorbid diseases were found in patients who were found to be low-CQ (Table 3).

A reference group is formed based on the results of the NDEA. The patients in this group are compared with other patients, and improvement points to be intervened are recommended so that the clinical results are close to the best. In this study as a result of the NDEA, 22 patients were accepted as the reference group. The most efficient patient, P6, has been referenced 85 times. P59, referenced 46 times, and P41, referenced 34 times, are the other most efficient patients. The optimal values suggested by the NDEA in intermediate products in the RES and CES stage are provided in Table 4 to increase the CQ of patients determined as low-CQ.

In this study, it has been found that low-CQ patients, tend to have longer durations of CPB and CC, extended stays in the ICU, and prolonged inpatient postoperative days compared to high-CQ patients both in the RES and CES. Additionally, according to the profile created by the NDEA, the patients classified as low-CQ in RES have higher preoperative and postoperative costs compared to high-CQ patients. Notably, the increase in preoperative radiology-laboratory and ICU drug costs is statistically significant for patients considered low-CQ in RES. Patients in this group also exhibit lower preoperative QoL and experience longer durations of preoperative and ICU care. To enhance efficiency, optimizing the length of postoperative hospitalization is crucial. Furthermore, comorbid diseases are more prevalent in this category

of patients, and the duration of CPB and CC is longer.

Similarly, the profile created by the NDEA for low-CQ in CES reveals higher pre-operative other transaction costs, and post-operative consumable costs in these patients in comparison to high-CQ patients. Preoperative QoL in these patients is lower as well. Low-CQ patients require more ICU care, and their postoperative recovery time is prolonged. Statistically significant differences are noted in EuroSCOREs and the number of bypassed vessels in clinically low-CQ patients. Moreover, CPB and CC durations are longer among clinically low-CQ patients, and these patients require a significant quantity of blood products, with a statistically significant amount of FFP being used.

Table 4. Recommended optimal intermediate product values for low-CQ patients

	Average of Proposed Values		Proposed Percentage of Change	
	Resource Efficiency Stage	Clinical Efficiency Stages	Resource Efficiency Stage	Clinical Efficiency Stages
ICU inpatient day	1	1	20%	27%
Postoperative inpatient day	3	3	50%	52%
CPB Time (M)	70	67	32%	37%
CC time (M)	41	40	37%	42%
Amount of blood and blood products (unit)	3	3	45%	49%

DISCUSSION

As a result of the research, we assessed the CQ of CABG surgery for each patient by using the NDEA and considering the entire healthcare service cycle.

The NDEA (two-stage) enabled us to analyze simultaneously all the structure, process, and outcome measures of CABG to assess CQ. Furthermore, the research has delineated, the frontiers of best practices and quality improvement points within the context of CABG surgery. To increase CQ and ensure resource and clinical efficiency, improvement points were identified such as ICU and postoperative

inpatient days, the duration of CPB and CC, as well as the utilization of blood products as key areas for potential enhancement. Obtaining the fact that these results align with findings in the existing CABG surgery literature obtained that NDEA, which is used to assess technical efficiency and productivity in healthcare (12, 13), could also be used in the CQ assessment.

Several previous studies assess CQ with indicators for specific aspects of quality at the institutional scale (14,15). Our results provide a new model by which CQ can be assessed at the patient scale, considering the entire healthcare cycle, and improvement points can be identified.

Literature has consistently demonstrated a notable directly proportionate connection between lower CQ levels and increased resource consumption (like cost and inpatient days etc.) and emphasized CQ can be achieved through the utilization of quality improvement tools (16-19). Our results indicate that the resource use of patients with similar CQ levels is not uniform and could be optimized. Contrary to prevailing literature our study highlights the challenge of simultaneously achieving optimal resource utilization and maintaining high CQ in cardiovascular surgery. These results have been interpreted as potentially stemming from variances in the examination, treatment, and follow-up practices among physicians. The challenge of simultaneously achieving optimal resource utilization and maintaining high-CQ underscores the complex interplay between clinical efficiency and resource allocation, which demands further investigation and strategic considerations for healthcare providers and policymakers.

The impact of disease severity and risk level on clinical outcomes has been well-documented in disease-specific studies. EuroSCORE has been proven as a determinant to be associated with increased mortality after CABG surgery (4,20,21). Our research findings concluded that the EuroSCORE is one of the variables influencing the level of CQ and significantly differs between high and low CQ. And also, there is a statistically significant difference between the high and low CQ in terms of QoL. A high level of CQ was achieved in patients with a low preoperative QoL score and a high EuroSCORE. This result was attributed to the more significant impact of surgical treatment on patients with relatively low QoL and higher disease severity. Studies investigating the QoL in CABG surgery have indicated that CABG surgery positively impacts and improves the patient's QoL (22,23). Our result of an increase in the QoL aligns with these prior studies.

Our CQ assessment results revealed that the presence of comorbidity significantly affects the CQ results negatively. Numerous studies within CABG surgery literature indicate that comorbidities are associated with elevated risks of adverse

health outcomes, complications, and extended inpatient days following CABG surgery (20,24-26).

The findings showed that there was a significant difference between the high-CQ level and low-CQ level patients in the use of the FFP. Particularly, it was noted that low-CQ level patients required more FFP. Several other studies indicate that not applying intraoperative FFP in CABG surgery is safer and cost-effective and the perioperative use of FFP is the major determinant of mortality. Also, the use of blood products has an increasing effect on the risk of developing adverse clinical outcomes after CABG surgery, especially mortality (27,28). Our finding using FFP affects the CQ negatively is in line with the findings of these studies.

The longer duration of CPB and CC in patients with relatively low CQ levels is consistent with the CABG surgery literature. Multiple studies have reported that prolonged CPB and CC duration during CABG surgery are linked to unfavorable clinical outcomes, substantially elevating the risks of mortality and morbidity (26,29). This particular study identified a statistically significant difference in the number of bypassed vessels between patients with low-CQ and high-CQ levels in the RES and CES. Consistent with this research, previous studies in the field of CABG surgery have shown the effect of differences in the number of vessels bypassed on patients' clinical prognosis (29). However, the effects of vessel numbers on CQ need to be examined in more detail to determine CQ improvement points on this issue.

The strength of this study is that the entire healthcare cycle is analyzed simultaneously at the patient scale to assess CQ. This allowed us to determine the relationship between structure, process, and outcome and to identify improvement points to increase CQ. To measure the efficiency of a process using the NDEA method, the variables used in the research should be representative of the service and be influenced by direct action. However, the availability and reliability of data, and the ability to capture variation in application, limit the choice of measures. It was planned to include as an output variable the influence of the surgeon and other staff who performed the operation and their

influence on the operation process. However, the variables related to the characteristics of the surgeon and other staff were accepted as constants and were not included in the study because of the inability to measure direct effects on the patient's level of health and the lack of sufficient data. These data are not available and each patient is operated on by different doctors and teams. DEA models, developed using the results of measurements of the impact of the surgeon and other team members, can be used to evaluate the performance of doctors and health professionals.

In conclusion; this study assessed CQ with the NDEA on a patient scale, encompassing the structure, process, and outcome quality measures across the entire healthcare cycle of CABG surgery.

We determined the CQ improvement points to increase CQ. The NDEA (two-stage) model facilitated the assessment of CQ analyzing multiple measures

simultaneously, and demonstrated its potential as a valuable tool for assessing and enhancing CQ in healthcare contexts. During the research, the patients with the best CQ level were determined, and patient profiles with lower CQ were created.

The ICU and postoperative inpatient day, cardiopulmonary bypass and cross-clamp duration, and use of fresh frozen plasma were determined as the CABG surgery points requiring quality improvement. This study recommends the creation of disease-specific standard data packages that include disease-specific structure, process, and outcome measures, and suggests using multiple measures simultaneously in the evaluation of the CQ. The study also recommends the use of the NDEA as a method for evaluation and conducting further studies on quality improvement points determined from the results of the analysis.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Ankara University Health Sciences Sub-Ethics Committee (Date: 06.12.2018 and Number: 218).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Slawomirski L, Auraaen A, Klazinga NS. The economics of patient safety: strengthening a value-based approach to reducing patient harm at national level. OECD Health Working Papers. No. 96, Paris: https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2017/06/the-economics-of-patient-safety_258f9682/5a9858cd-en.pdf, OECD Publishing, [Accessed Date: 01.09.2023]
2. Hanefeld J, Powell-Jackson T, Balabanova D. Understanding and measuring quality of care: dealing with complexity, Bull World Health Organ, 2017;95:368-74 .
3. Mainz J. Defining and classifying clinical indicators for quality improvement, Int J Qual Health Care, 2003;15(6):523-30.
4. Lane-Fall MB, Neuman MD. Outcomes measures and risk adjustment. Int Anesthesiol Clin, 2013;51(4):10-21.
5. Clinical Quality Measurement and Evaluation Guide, Coronary Heart Disease. Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara. <https://dosyamerkez.saglik.gov.tr/Eklenti/40942/0/kalite-rehber-int-e-rehber-formati-2021pdf.pdf>. [Accessed Date:01.09.2023]

6. Cardiovascular diseases (CVDs), WHO Fact sheets. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) [Accessed Date: 23.12.2023].
7. Bachar BJ, Manna B. Coronary artery bypass graft. Jan-<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507836/>, [Erişim tarihi: 08.08.3023].
8. Kao C. Efficiency decomposition in network data envelopment analysis: A relation model. *EJOR*, 2007;192(3): 949-62.
9. Tavassoli M, Saen FR, Faramarzi GR. Developing network data envelopment analysis model for supply chain performance measurement in the presence of zero data, *Expert Sys: J Knowl Eng*, 2015;32(3):381-91.
10. Ozcan YA. Health care benchmarking and performance evaluation, an assesment using data envelopment analysis (DEA). New York: Springer Science. 2008:129.
11. Kaçak H, Bağcı H. Assessment of service and financial efficiency in health care organizations - an application with data envelopment analysis and BCG matrix. *KOCATEPE İİBF Derg*, 2020;22(2):188-203.
12. Santos Arteaga FJ, Di Caprio D, Cucchiari D, Campistol Jm, Oppenheimer F, Diekmann F, et al. Modeling patients as decision making units: evaluating the efficiency of kidney transplantation through data envelopment analysis. *Health Care Manag Sci*, 2020;24:55-71.
13. Kaçak H. Effects of public health services on health systems performance: An application with dynamic network data envelopment analysis. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2022;79(3): 531-48.
14. Stelfox HT, Straus SE. Measuring quality of care: considering conceptual approaches to quality indicator development and evaluation. *J Clin Epidemiol*, 2013;66(12):1328-37.
15. Guru V, Anderson GM, Fremes SE, O'Connor GT, Grover FL, Tu JV. Canadian CABG surgery quality indicator consensus panel. The identification and development of Canadian coronary artery bypass graft surgery quality indicators. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005;130(5):1257.
16. Homagk L, Jarmuzek T, Homagk N, Hofmann GO. Advantages of clinical pathways in severity-based treatment of spondylodiscitis. *Neurosurg Rev*, 2020;43(1):337.
17. El Baz N, Middel B, van Dijk JP, Boonstra PW, Reijneveld SA. Coronary artery bypass graft (CABG) surgery patients in a clinical pathway gained less in health-related quality of life as compared with patients who undergo CABG in a conventional-care plan. *J Eval Clin Pract*, 2009;15(3):498-505.
18. Aniza I, Saperi S, Zafar A, Aljunid SM, Wan Norlida I, Oteh M, et al. Implementation of clinical pathways in Malaysia: can clinical pathways improve the quality of care? *Int Med J*, 2016;23(1):47-50.
19. Ozcan YA, Jiang HJ, Pai CW. Do primary care physicians or specialists provide more efficient care? *Health Serv Manage Res*, 2000;13(2):90-6.
20. Silverborn M, Nielsen S, Karlsson M. The performance of EuroSCORE II in CABG patients in relation to sex, age, and surgical risk: a nationwide study in 14,118 patients. *J Cardiothorac Surg*, 2023;18:40.
21. Li Xh, Zhang Sy, Xiao F. Clinical outcomes after coronary artery bypass grafting in patients with dialysis-dependent end-stage renal disease and an analysis of the related influencing factors. *Heart Vessels*, 2023;38:1028-34.
22. Peric V, Jovanovic-Markovic S, Peric D, Rasic D, Novakovic T, Dejanovic B, et al. Quality of life in patients of different age groups before and after coronary artery by-pass surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2015;21(5):474-80.
23. Bond MMK, de Oliveira JLR, Farsky PS, Amato VL, Jara AA, Farias E, et al. Use of quality of life in cardiovascular surgery in coronary artery bypass grafting: validation, reproducibility, and quality of life in one year of follow-up. *Ann Thorac Surg*, 2019;108(3):764-69.
24. Li X, Zhang S, Xiao F. Influence of chronic kidney disease on early clinical outcomes after off-pump coronary artery bypass grafting. *J Cardiothorac Surg*, 2020;15:199.
25. Axelsson TA, Adalsteinsson JA, Arnadottir LO, Helgason D, Johannesdottir H, Helgadottir S, et al. Long-term outcomes after coronary artery bypass surgery in patients with diabetes. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2020;30(5):685-90.
26. Hardiman SC, Villan Villan YF, Conway JM, Sheehan KJ, Sobolev B. Factors affecting mortality after coronary bypass surgery: a scoping review. *J Cardiothorac Surg*, 2022;17(1):45.
27. Mikkola R, Heikkinen J, Lahtinen J, Paone R, Juvonen T, Biancari F. Does blood transfusion affect intermediate survival after coronary artery bypass surgery? *Scand J Surg*, 2013;102(2):110-16.
28. Santos CA, Oliveira MA, Brandi AC, Botelho PH, Brandi Jde C, Santos MA, et al. Risk factors for mortality of patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2014;29(4):513-20.
29. Lopes NH, Paulitsch Fda S, Gois AF, Pereira AC, Stolf NA, Dallan LO, et al. Impact of number of vessels disease on outcome of patients with stable coronary artery disease: 5-year follow-up of the Medical, Angioplasty, and bypass Surgery study (MASS). *Eur J Cardiothorac Surg*, 2008;33(3):349-54.

Göz dokusunun farklı fiksatifler ve farklı doku takip yöntemleri kullanılarak histolojik olarak incelenmesi

Histological investigation of the eye tissue using different fixatives and different tissue preparation methods

Ebru ALİMOĞULLARI¹ (ID), Hazal DEMİR¹ (ID), Bahar KARTAL¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Tüm dokuların ışık mikroskop altında incelemesinde fiksasyon ana basamaktır ve sonraki basamakları etkilemektedir. Farklı fiksasyon yöntemleri vardır ve bu amaç için farklı fiksatifler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, göz dokusunun inceleneceği çalışmalarda hangi fiksatifin seçimi ile iyi sonuç elde edilebileceğinin araştırılması planlanmıştır; doku bütünlüğünün korunması açısından, göz dokusunda altı farklı doku takibi yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 12 adet dişi Wistar Albino cinsi ratlardan alınan 24 adet göz dokularına altı farklı doku takip yöntemi farklı dehidrasyon ajanları (aseton ve alkol) ve farklı fiksatifler (%10'luk formalin, Bouin ve %4'lük paraformaldehit) uygulanmıştır. Elde edilen bloklardan alınan kesitler hematoksilin ve eozin boyası ile boyanarak histomorfolojik olarak ışık mikroskop altında incelenmiştir. Uygulanan farklı fiksatiflerin ve dehidrasyon ajanlarının göz dokuları için uygunluğu ve dokularda oluşan farklılıklar belirtilmiştir.

ABSTRACT

Objective: Fixation is the basic step in the investigation of the tissues by light microscopy and affects the following steps. There are different fixation methods and different fixatives are used for this purpose. In this study, it was planned to examine which fixative gives the best result in the examination of the eye tissue. In terms of preserving tissue integrity, the study aimed to examine the effects of six different tissue preparation methods on eye structure.

Methods: Six different tissue processings methods, different dehydrating agent (alcohol and acetone) and different fixatives (10% formaline, Bouin and 4% paraformaldehyde) were applied to 24 eye tissues taken from 12 female Wistar Albino rats. Sections taken from the obtained blocks were stained with hematoxylin and eosin dye and evaluated histomorphologically under the light microscope. The suitability of the different fixatives and dehydration agents applied to eye tissues and the differences that occur in the tissues are indicated.

¹Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Ebru ALİMOĞULLARI

Yıldırım Beyazıt Üni. Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Çankaya / Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 13.01.2025

Kabul Tarihi / Accepted : 02.02.2025

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.59144

Alimoğulları E, Demir H, Kartal B. Göz dokusunun farklı fiksatifler ve farklı doku takip yöntemleri kullanılarak histolojik olarak incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 119 - 130

Bulgular: Göz preparatlarında kornea, sklera, koroid, retina, iris ve siliyer cisimdeki histolojik yapılar ele alınmıştır. Bu doğrultuda, değerlendirilen tüm parametreler grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V ve grup VI'da doku bütünlüğü ve tüm yapılar göz önüne alındığında genel olarak morfolojik açıdan benzer sonuç verdiği gözlenmiştir. Ancak göz dokularının bütünlüğü değerlendirildiğinde göz küresindeki histolojik katmanların bütünlüğünün en iyi şekilde grup IV bouin fiksatifyle asetonlu grupta korunduğu izlenmiştir. Gruplar arasında katmanlar tek tek incelendiğinde ise kornea, sklera, koroid ve retina yapılarının anlamlı derecede farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

Sonuç: En iyi seviyede histomorfolojik incelemeler için, doku takibi dikkat edilmesi gereken önemli bir süreçtir. Bu süreç ne kadar başarılı ise mikroskoptaki görüntü düzeyi de o kadar iyi olacak ve histomorfolojik incelemelere uygun bir zemin oluşturacaktır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere dayanarak göz doku takibi sürecinde fiksatif olarak bouin, dehidratif ajan olarak ise aseton kullanımını önermekteyiz. Bu çalışmanın sonuçlarının genellenebilmesi ve geliştirilebilmesi için daha fazla yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Aseton, dehidrasyon, doku takibi, fiksasyon, göz, histoloji

Results: The histological structure of rat eye samples was investigated in terms of the cornea, sclera, choroid, retina, iris and ciliary body. There was not any important difference among the groups. Accordingly, it was observed that all evaluated parameters generally gave similar results in terms of morphology when tissue integrity and all structures were considered in group I, group II, group III, group IV, group V, and group VI. However, when the integrity of the eye tissues was evaluated, it was observed that the integrity of the histological layers in the eyeball was best preserved in the group IV Bouin fixative and acetone group. When the layers were examined individually between the groups, it was determined that the cornea, sclera, choroid and retina structures did not differ significantly.

Conclusion: For optimal histomorphological examinations, the tissue preparation process is important to follow. The more successful this process is, the better the level of detail in the microscope will be and it will provide a suitable basis for basic histomorphological examinations. According to the findings of our study, we can recommend using Bouin as a fixative and acetone as a dehydrating agent in the eye tissue preparation process. Further studies are needed to generalize and improve the results of this study.

Key Words: Acetone, dehydration, tissue preparation, fixation, eye, histology

GİRİŞ

Dokuların ışık mikroskobu altında incelenebilmesi için hazır hale getirilmesi amacıyla yapılan işlem basamaklarına doku takibi adı verilmektedir. Doku takibi sürecinde fiksasyon (tespit), dehidrasyon, şeffaflandırma, sertleştirme ve gömme aşamaları bulunmaktadır (1).

Doku takinde ilk aşama fiksasyon basamağıdır (2). Fiksasyonun amacı, dokunun özelliklerini

canlı durumundakine en yakın şekliyle sabitlemek, muhafaza etmek ve dış etkenlerden korumaktır (3). Fiksasyon işleminde dokular otolize yol açan bakteriyel ve enzimsel faktörlerden, enfeksiyöz ajanlardan korunmaktadır, hücreler ve hücreler arası komponentler stabilize olmaktadır (4-6). Ayrıca fiksasyon işleminin dokularda sertleşme, şişme, büzüşme ve moleküler kayıplar gibi histokimyasal çalışmaları etkileyebilecek dezavantajları da vardır (4).

Tespiti etkileyen faktörler osmolarite, pH, dokunun boyutu, konsantrasyon, sıcaklık ve tespitin süresidir (7). Kullanılan fiksatif konsantrasyonuna bağlı olarak dokuların boyanmasının da farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Dokunun tespit solüsyonuna maruz kalma süresinde fiksasyonu etkileyen faktörler arasında çok önemli yer tutmaktadır. Dokunun büyüklüğüne bağlı olmakla birlikte genellikle 24-48 saat civarında dokuların yeterince tespit oldukları bilinmektedir. Bu sürenin gerekenden kısa olması yetersiz fiksasyona, uzun olması ise dokuda kırılmalara yol açmaktadır (8).

Tespit için kullanılan solüsyonlara fiksatif adı verilmektedir. Farklı fiksasyon yöntemleri ve bu yöntemlerde kullanılan farklı fiksatifler bulunmaktadır. Tüm dokular için uygun tek bir fiksatifin olmaması nedeniyle bazen fiksatiflerin kombine kullanılması, birinin eksikliğinde karışımında bulunan diğer fiksatif ile kompanse edilmesiyle sorunlara çözüm bulunmaya çalışılmıştır (9). Genellikle yaygın kullanılan fiksatif, formalindir ve aldehit grubu fiksatiflerden biridir. 24 saat sürede %10'luk formalin solüsyonu 2-3 mm'lik doku tespiti ve penetrasyonu sağlar (10). Fiksatifler; aldehidler (formaldehit, glutaraldehit vb.), oksitleyici ajanlar (potasyum dikromat, osmium tetroksit, potasyum permanganat) protein denatürasyonu yapanlar (asetik asit, etil alkol, metil alkol), fiziksel (mikrodalga, ısı) ve diğerleri (pikrik asit, civa klorur, v.b.) olarak belli başlıklar altında toplanırlar (11).

Fiksasyon süreci tamamlanan dokular ikinci basamak olan dehidrasyon aşamasına geçerler. Dokudan suyun uzaklaştırılması olarak bilinen dehidrasyon aşamasında kullanılan ajanların çoğu alkolden oluşur. Dokunun dehidrate olması için dokular dereceli yükselen alkol serilerinden geçirilir ve dokunun içindeki su alkol ile yer değiştirir (10). Dehidrasyon aşaması dokunun parafin vb. sert maddelere gömülebilmesi için gereklidir. Dehidrasyon ajanları içerisinde alkoller (bütanol, denatüre alkol, etil alkol, isopropanol, metanol), glikol-eterler (dioksan, etoksi etanol, polietilen glikol) ve diğer

dehidrasyon ajanları (aseton, tetrahidrofuran, 2,2 dimetoksipropan) yer alır. En yaygın kullanılan dehidrasyon ajanı etil alkoldür. Berrak, renksiz, orta derece organik, kolay alev alabilen ve toksik çözeltiler ile karışabilen bir maddedir. Hızlı etkili ve hidrofilik bir dehidrasyon ajanı olarak bilinmektedir. Dehidrasyon basamağı için artan konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Diğer bir dehidrasyon ajanı ise asetondur. Aseton renksiz, berrak, alev alabilen ve karakteristik kokulu bir dehidrasyon ajanıdır. Aseton hızla dehidrasyon yapmaktadır. Aseton hızlıca buharlaşıp dokuların sertleşmesini sağlamaktadır. Asetonun etanol ve metanol ile karşılaştığında, çözücü etkisinin daha çok olduğu görülmüştür, bu özelliğinden dolayı da yağlı dokuların takibinde kullanılması önerilmektedir (2).

Göz histolojik olarak dıştan içe doğru üç katmandan oluşmaktadır. En dışta kornea ve skleradan oluşan korneaskleral katman bulunur. Ortada vasküler katman (diğer adı uvea) koroid, siliyer cisim ve irisi içermektedir. En içteki üçüncü katman retina kendi içinde dışta retinal pigment epitel (tek katlı prizmatik epitel) ve içte nöral retinadan meydana gelir. Kornea gözün ön 1/6 sını kaplayan konveks biçimli, avasküler transparan yapıdır. Limbus bölgesiyle skleraya geçiş gösterir. Histolojik olarak beş tabakadan oluşur. Dıştan içe doğru sırasıyla bu tabakalar; kornea epitel (keratinizasyon göstermeyen çok katlı yassı epitel), Bowman membranı, kornea stroması, Descemet membranı ve kornea endotelidir şeklinde düzenlenmiştir. Sklera gözün arka 5/6 sını kaplayan beyaz, mat yapıdır. Sıkı fibröz bağ dokusu yapısındadır. Koroid, sklera ile retina arasında bulunan orta tabakadır. Kan damarları ve melanin pigmentinden zengindir ve koyu kahverengi renktedir. Bu vasküler tabaka retina için besin maddelerini sağlar. Skleranın ön bölümünde yer alan siliyer cisim koroidin lens hizasında öne doğru genişlemesiyle oluşan, epitel ve stromadan meydana gelir. İris, lens yüzeyinin ön kısmında bulunan kontraktıl bir diyaframdır. Gözün en iç tabakası olan retina ise ince bir tabakadır. İçte

vitroz humore bakan nöral retina ve dışta koroide bakan retinal pigment epitelinden oluşur. Dış tabakada yer alan retinal pigment epiteli tek katlı kübik epitelden oluşur. İç tabakada yer alan nöral retina ışığa duyarlı reseptör hücreleri ve nöranal ağ içeren kendi içinde dokuz histolojik tabakaya ayrılan katmandır (12).

Bu çalışmanın amacı göz dokusunun inceleneceği çalışmalarda fiksatiflerin tespit özelliklerine göre en ideal kullanımlarını ortaya çıkarmak ve doku tespit işlemindeki etkilerini belirlemektir. %10`luk formalin, Bouin ve %4`lük paraformaldehit çözeltileri olmak üzere üç farklı fiksatif ile hazırlanmıştır. Ayrıca alkol ve aseton dehidrasyon ajanları da karşılaştırılmıştır. Doku bütünlüğünün korunması açısından, göz dokusunda altı farklı doku takibi yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Nesa Deney Hayvanları Üretim ve Uygulama Laboratuvarından temin edilen 12 adet dişi Wistar albino tipi sıçanların 24 adet göz dokuları materyal olarak kullanılmıştır. Göz dokusunun çalışılacağı kısım göz önünde bulundurularak, gruplara ait gözlerin lateral kısımlarından küçük kesiler atılarak vitroz sıvısı çıkarılmıştır. Böylece organın en iç kısımlarına fiksatiflerin nüfuz etmesi ve gözün iç tabakalarının fikse olması sağlanmıştır.

Sıçanlardan alınan dokular farklı fiksatifler ile (formalin, bouin, paraformaldehit) 24 saat süreyle tespit edilmiştir. Tespit basamağının ardından akan su altında yıkanan doku örnekleri, altı farklı doku takip yöntemi ile dereceli alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlanmış ve parafinde gömülüp bloklanmıştır. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan bu kesitlere genel histolojik görünümü değerlendirmek üzere Hematoksilen & Eosin (H&E) boyası uygulanmıştır.

Öncelikle, kesitler H&E boyama için 58 °C etüvde 2 saat inkübe edilmiştir. Sonra, kesitler 30 dakika boyunca ksilen ile muamele edilmiş ve ardından üçer

dakika boyunca dereceli azalan alkol serilerinden geçirilmiştir. Slaytlar musluk suyu altında yıkadıktan sonra, bunları Gill's hematoksilende (Merck, Darmstadt, Almanya) 5 dk bekletilmiştir. Akarsuda yıkamanın ardından eozin (Bio-Optica, Milano, İtalya) ile 1 dk boyanmıştır. Slaytlar dereceli artan alkol serilerinden geçirilmiş ve kapatma öncesi ksilende bekletilmiştir. Daha sonra, slaytlar entellan (107960, Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya) kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır.

Altı farklı doku takip yöntemleri uygulanan gözlere ait slaytlarda gözün tabakalarındaki histolojik yapılar ele alınmıştır. Göz dokusundaki yapıların incelenmesi sağlanarak gruplar arasındaki farkları ortaya çıkarmak amaçlanmıştır. Hazırlanan preparatlar morfolojik özellikleri analiz etmek için ışık mikroskopunda (Olympus BX43, Japonya) incelenmiş ve ilgili kısımlardan fotoğraflar çekilmiştir.

Altı farklı doku takibi işlemi manuel olarak yapılmıştır.

Bu çalışma, Nesa Deney Hayvanları Üretim ve Uygulama Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:03.08.2024, Karar No: 052).

BULGULAR

Çalışmamızda, altı farklı doku takip yöntemi uygulanan gözlere ait preparatlarda kornea, sklera, koroid, retina, iris ve siliyer cisimdeki histolojik yapılar ele alınmıştır. Belirtilen bütün bölgeler için Grup I (formalin fiksatifyle asetonsuz doku takibi) (Şekil 1); Grup II (formalin fiksatifyle asetonlu doku takibi) (Şekil 2); Grup III (bouin fiksatifyle asetonsuz doku takibi) (Şekil 3) ; Gup IV (bouin fiksatifyle asetonlu doku takibi) (Şekil 4); Grup V (paraformaldehit fiksatifyle asetonsuz doku takibi) (Şekil 5); Grup VI (paraformaldehit fiksatifyle asetonlu doku takibi) (Şekil 6) ile hazırlanan göz preparatları incelenmiştir. Ayrıca histolojik doku takibi protokolleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Histolojik doku takibi protokolleri

Grup I: Formalin fiksatifyle asetonsuz doku takip protokolü	Grup II: Formalin fiksatifyle asetonlu doku takip protokolü	Grup III: Bouin fiksatifyle asetonsuz doku takip protokolü	Grup IV: Bouin fiksatifyle asetonlu doku takip protokolü	Grup V: Paraformaldehit fiksatifyle asetonsuz doku takip protokolü	Grup VI: Paraformaldehit fiksatifyle asetonlu doku takip protokolü
Formalin, %10 24 saat	Formalin, %10 24 saat	Bouin 24 saat	Bouin 24 saat	Paraformaldehit, %10 24 saat	Paraformaldehit, %10 24 saat
Akan su altında 2 saat	Akan su altında 2 saat	Akan su altında 2 saat	Akan su altında 2 saat	Akan su altında 2 saat	Akan su altında 2 saat
Alkol, %75 1 saat	Alkol, %75 1 saat	Alkol, %75 1 saat	Alkol, %75 1 saat	Alkol, %75 1 saat	Alkol, %75 1 saat
Alkol, %75 1 gece	Alkol, %75 1 gece	Alkol, %75 1 gece	Alkol, %75 1 gece	Alkol, %75 1 gece	Alkol, %75 1 gece
Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat
Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat
Alkol, %100 1 saat	Aseton 1, 20 dk	Alkol, %100 1 saat	Aseton 1, 20 dk	Alkol, %100 1 saat	Aseton 1, 20 dk
Alkol, %100 1 saat	Aseton 2, 20 dk	Alkol, %100 1 saat	Aseton 2, 20 dk	Alkol, %100 1 saat	Aseton 2, 20 dk
Ksilen 1-5 dk	Aseton 3, 20 dk	Ksilen 1-5 dk	Aseton 3, 20 dk	Ksilen 1-5 dk	Aseton 3, 20 dk
Parafin I'de 1 saat	Ksilen 1-5 dk	Parafin I'de 1 saat	Ksilen 1-5 dk	Parafin I'de 1 saat	Ksilen 1-5 dk
Parafin II'de 1 saat	Parafin I'de 1 saat	Parafin II'de 1 saat	Parafin I'de 1 saat	Parafin II'de 1 saat	Parafin I'de 1 saat
Parafin III'de 1 saat	Parafin II'de 1 saat	Parafin III'de 1 saat	Parafin II'de 1 saat	Parafin III'de 1 saat	Parafin II'de 1 saat
Bloklara gömme	Parafin III'de 1 saat	Bloklara gömme	Parafin III'de 1 saat	Bloklara gömme	Parafin III'de 1 saat
	Bloklara gömme		Bloklara gömme		Bloklara gömme

Uygulanan farklı fiksatiflerin ve dehidrasyon ajanlarının göz dokuları için uygunluğu ve dokularda oluşan farklılıklar Tablo 2'de belirtilmiştir. İlk olarak gruplar arasındaki göz dokularının bütünlüğü değerlendirildiğinde göz küresindeki histolojik katmanların bütünlüğü en iyi şekilde Grup IV bouin fiksatifyle asetonlu grupta gözlenmiştir.

Grup I formalin fiksatifyle asetonsuz grupta, koroid ile retina arasında az miktarda ayrılmalar olduğu ve göz küresinin bütünlüğünün bozulduğu H&E boyanma sonuçlarında tespit edilmiştir (Şekil 1).

Grup II formalin fiksatifyle asetonlu grup incelendiğinde göz dokusunun bütünlüğünü koruduğu

ve yapıların histolojik özelliklerinin normal olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).

Göz dokusunun katmanlarında yer alan yapılar kornea, sklera, koroid ve retina tek tek incelendiğinde formalin asetonlu ve formalin asetonsuz gruplarda yapıların normal histolojik özellikleri taşıdığı gözlenmiştir (Şekil 1,2).

Grup III, bouin fiksatifyle asetonsuz grupta ise göz dokusunun histolojik katmanları arasında özellikle sklera ve retina arasında ayrılmalar olduğu H&E boyanma sonuçlarında gözlenmiştir (Şekil 3). Ancak katmanlar tek tek incelendiğinde kornea, sklera ve retinada herhangi bir hasar tespit edilmemiştir.

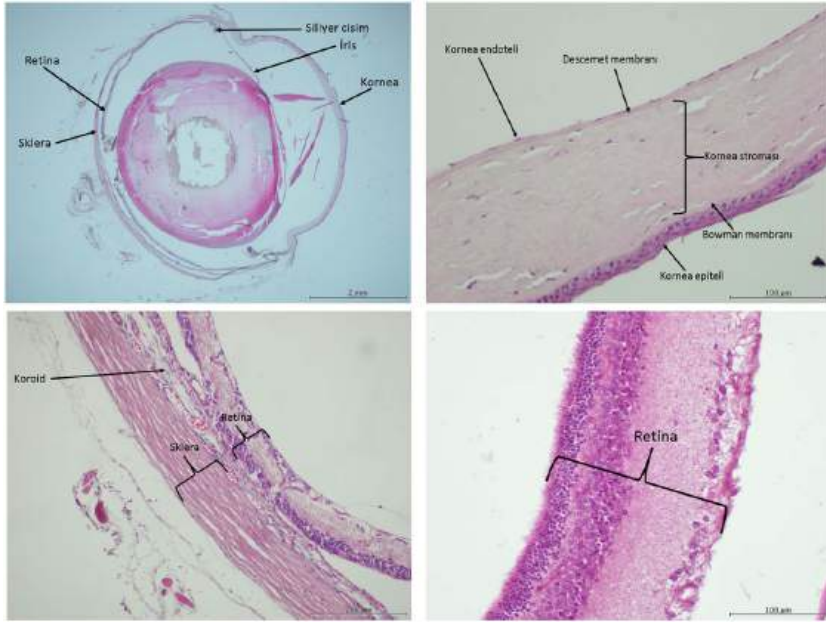
Tablo 2. Farklı fiksatiflerin ve dehidrasyon ajanlarının göz dokuları için uygunluğu ve dokularda oluşan farklılıklar

	Grup I: Formalin fiksatifile asetonsuz doku takip protokolü	Grup II: Formalin fiksatifile asetonlu doku takip protokolü	Grup III: Bouin fiksatifile asetonsuz doku takip protokolü	Grup IV: Bouin fiksatifile asetonlu doku takip protokolü	Grup V: Paraformaldehit fiksatifile asetonsuz doku takip protokolü	Grup VI: Paraformaldehit fiksatifile asetonlu doku takip protokolü
Kornea	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	++++
Sklera	++++	++++	++++	+++++	+++	++
Koroid	++++	++++	++++	+++++	+++	+
Retina	+++	++++	+++	++++	++	+
İris	++	+++	+++	+++++	++	++
Siliyer Cisim	++	++++	+++	+++++	+++	+++

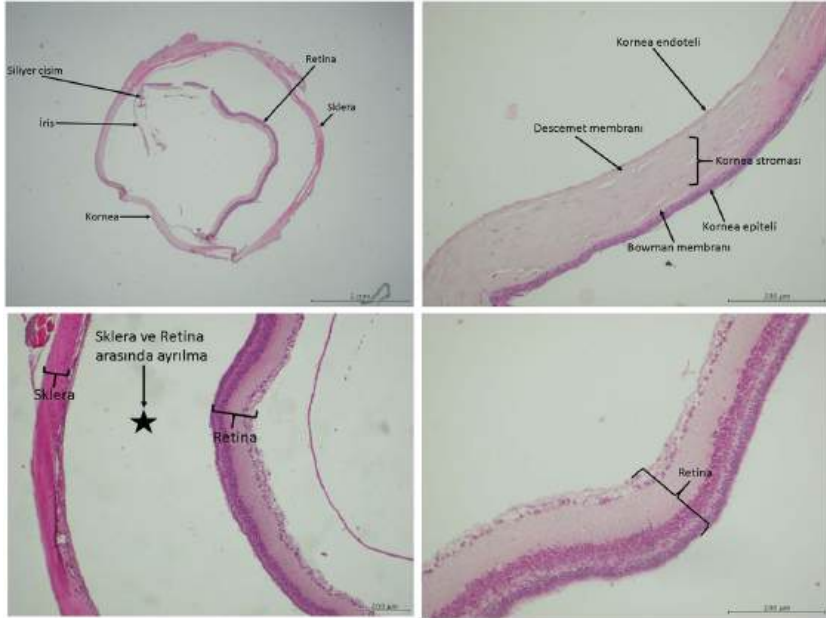
*+++++: Çok iyi; ++++: İyi; +++: Orta; ++: Kötü; +: Çok kötü.



Şekil 1. Grup I: Formalin fiksatifile asetonsuz doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 10X, 20X, 40X).



Şekil 2. Grup II: Formalin fiksatiyle asetonlu doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 20X, 40X).



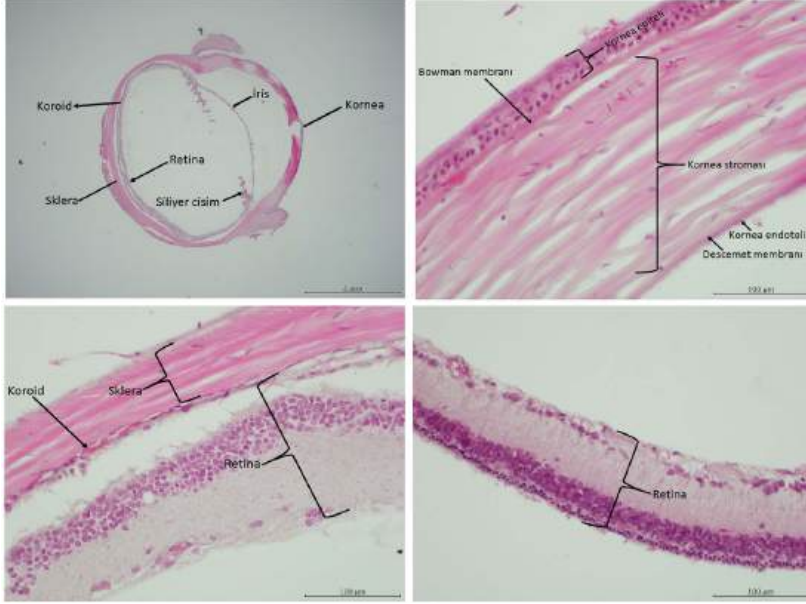
Şekil 3. Grup III: Bouin fiksatiyle asetonsuz doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 10X, 20X).

Grup IV bouin fiksatiyle asetonlu grupta H&E boyanma sonuçlarında korneaskleral katman, vasküler katman ve retina arasında bir bütünlük

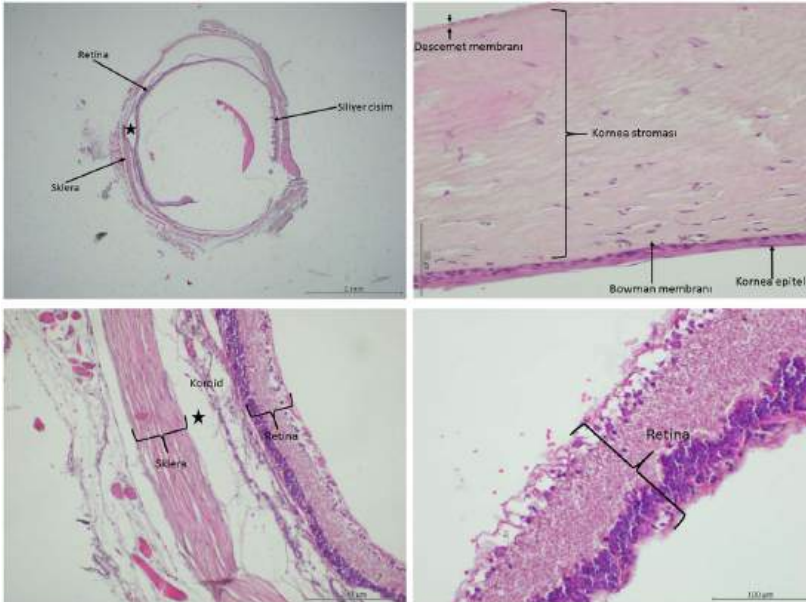
olduğu, kornea ve skleranın, koroid ve retinanın normal histolojik yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4).

Grup V paraformaldehit fiksatifyle asetonsuz (Şekil 5) ve Grup VI paraformaldehit fiksatifyle asetonsuz (Şekil 6) grupların her ikisinde de doku bütünlüğünün bozulduğu, göz küresinin her üç histolojik katmanları arasında ayrılmalar, yer yer

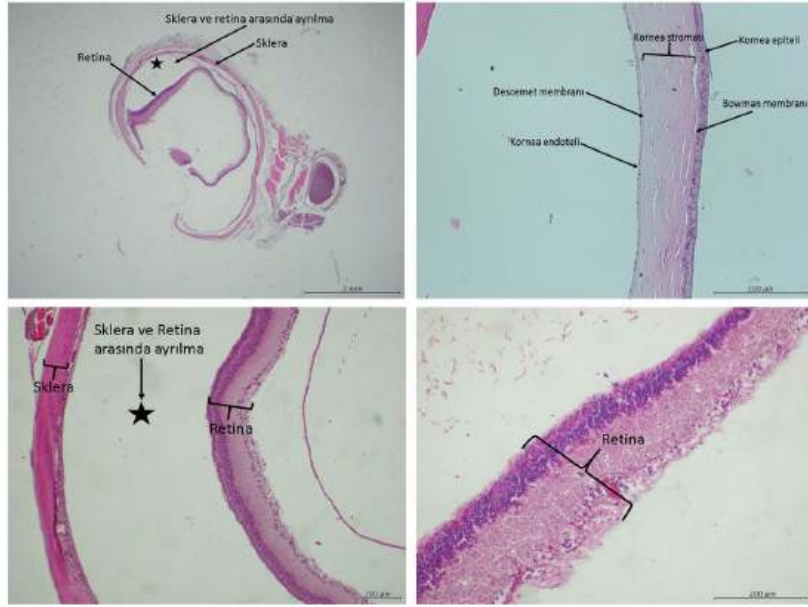
yırtılmalar ve bozulmalar olduğu tespit edilmiştir. Ancak katmanlar tek tek incelendiğinde kornea, sklera, koroid ve retina yapılarının anlamlı derecede hasarlı olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4. Grup IV: Bouin fiksatifyle asetonsuz doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 40X).



Şekil 5. Grup V: Paraformaldehit fiksatifyle asetonsuz doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 20X, 40X).



Şekil 6. Grup VI: Paraformaldehit fiksatifile asetonlu doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 10X, 20X).

TARTIŞMA

Çeşitli fiksasyon methodları ve bu methodlarda kullanılan farklı fiksatifler bulunmaktadır. Tüm farklı dokular için uygun olan tek bir fiksasyon ajanının bulunmaması araştırmacıların farklı fiksasyon ajanları üzerine yoğunlaşmasına yol açmıştır. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, formalin fiksatifinin bir ya da birkaç farklı fiksatifle karşılaştırıldığı gözlenmiştir. Literatürde yer alan farklı çalışmalarda, çeşitli fiksasyon tipleri karaciğer dokusunda (13), ince iğne aspirasyonlarında (14), akciğer (15) ve kolon kanserlerinde (16), normal kolon mukoza örneklerinde (17) ve tiroid dokusunda (18) incelenmiştir. Bu ideal fiksatif arayışlarından dolayı, dehidratif alternatifleri geri planda kalmıştır.

Dehidrasyon ajanları seçiminde dikkat edilmesi gereken hususlar arasında doku takibinde kullanılan diğer solüsyonlar ile uyumlu olması, ekonomik olması ve dokuyu ne kadar küçülttüğü sayılabilir. Dehidrasyonun yeterli olmadığı durumda infiltrasyon ve şeffaflandırma basamakları da güzel olmayacağı

için ortası yumuşak, çamur gibi dokular elde edilebilmektedir. Tam tersine fazla dehidrasyon durumu ise zor kesit alınabilen, kırılğan ve çok sert dokular elde edilmesine yol açar (19).

Diagnostik patolojide, yüz yılı aşkın süredir rutin fiksatif olarak %3.7'lik formaldehit çözeltisi (%10'luk formalin) kullanılmaktadır (20). Bunun en önemli nedeni, formaldehit solüsyonunun kolay uygulanabilmesi, iyi mikroskopik görüntü elde edilebilmesi ve pahalı olmaması gibi avantajları olmasıdır (21).

Yapılan bir çalışmada, farklı fiksatifler kullanılarak hayvanlardan alınan göz ve testis dokuları karşılaştırılmıştır. Geleneksel Davidson fiksatifinden farklı oranlarda alkol, asetik asit ve formalin kullanılarak hazırlanan modifiye edilmiş bir Davidson fiksatifinin, hem immünohistokimyasal boyama hem de detaylı histopatolojik inceleme için Bouin sıvısına benzer ve birçok açıdan daha üstün bir koruma sağladığını gösterilmiştir. Ayrıca, hüresel koruma kalitesi Davidson fiksatifininkinden daha düşük olmasına rağmen, gözler için kabul edilebilir

bir fiksatif sağladığı bildirilmiştir (22). Başka bir çalışmada ise proliferatif vitreoretinopati tavşan modeli kullanılarak, fiksatif seçiminin sonucu önemli ölçüde etkilediği bulunmuştur. %4 formaldehit ile fiksasyonun, fiksasyonla ilişkili retina dekolmanına yol açtığı gösterilmiştir. Bu nedenle, proliferatif vitreoretinopati veya ilaç testi çalışmalarında göz dokularını değerlendirmek için 36-48 saat boyunca %1 tamponlu formaldehitte birlikte %1,25 glutaraldehit kombinasyonu önerilmiştir (23).

Sıçan pankreas dokularında yapılan bir çalışmada iki farklı fiksasyon yöntemi (immersiyon ve perfüzyon), üç farklı fiksatif solüsyonu (%4 paraformaldehit+%7.5 pikrik asit, Bouin sıvısı, nötral formalin) ve değişik fiksasyon süreleri denenmiştir. Oda sıcaklığında 24 saat Bouin fiksatifinde tutmayı ya da oda sıcaklığında 48 saat nötral formalinde tutmayı önermişlerdir. Fiksasyonu hızlı bir şekilde tamamlamak istenilen durumlarda ise; Bouin'in fiksatifini ile 15 dk ıslatma aşamasından sonra 45 sn mikrodalga ışınlama uygulaması önerilmiştir (24). Kedi ovaryumlarında yapılan bir çalışmada ovaryumun cerrahi operasyonları sırasında uygulanan ligasyon sonrasında dokunun uzaklaştırılması arasındaki geçen sürede Bouin ve %10 tamponlu formalin fiksatiflerinin doku korunması ve foliküller üzerine etkilerinin ortaya konulması doğrultusunda uygun fiksatifin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak Bouin fiksatifinin formalin fiksatifine göre belirgin oranda daha iyi bir folikül ve hücre bütünlük göstermekle beraber genel tüm yapının korunumunu sağladığı bildirilmiştir (25).

Farklı fiksatifler kullanılarak yapılan bir çalışmada Zenker, Bouin, Orth, %10'luk formalin, Schaudin, Clark, Carnoy, B5, Regaud, ve alkol-formalin fiksatiflerinin duodenum, karaciğer, mide, dalak, ve böbrek dokularının bazı bölgelerindeki uygunluklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, mide ve böbrekte incelenen tüm bölgeler, duodenumda tunika muskularis, lamina propria, lamina epitelyalis için en uygun olan fiksatifin Clark

olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Bouin solüsyonunun dalak dokusu için ve alkol-formalin solüsyonunun ise karaciğer dokusu için uygun fiksatifler olduğu belirlenmiştir (26).

Bu çalışmada göz dokusunun inceleneceği çalışmalarda hangi fiksatifin ve dehidrasyon ajanının seçilmesi ile iyi sonuç elde edilebileceği araştırılmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak göz dokusuna dehidrasyon ajanları ve fiksatifleri farklı olan altı adet doku takip yöntemi uygulanmıştır. Üç doku takip protokolünde dehidrasyon ajanı olarak alkol diğer üçünde alkol ve aseton kullanılmıştır. Ayrıca farklı fiksatifler (formalin, bouin, paraformaldehit) uygulanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan farklı dehidrasyon ajanları ve farklı doku takipleri ile elde ettiğimiz kesitler, mikroskobik olarak alışılagelmiş morfolojiye benzer ya da daha iyi özellikte sonuçlar vermiştir. Değerlendirilen tüm parametreler Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'da doku bütünlüğü ve tüm yapılar göz önüne alındığında genel olarak, morfolojik açıdan benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Ancak göz dokularının bütünlüğü değerlendirildiğinde göz küresindeki histolojik katmanların bütünlüğünün en iyi şekilde Grup IV bouin fiksatifine asetonlu grupta bulunduğu görülmüştür. Gruplar arasında katmanlar tek tek incelendiğinde ise kornea, sklera, koroid ve retina yapılarının anlamlı derecede farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, rutin histolojik incelemelerde, doku morfolojisinin korunmasındaki en önemli basamak doku takibidir. Bu süreç ne kadar başarılı ise mikroskobtaki ayrıntı düzeyi de o kadar iyi olacak ve temel histomorfolojik incelemeler için en uygun zemin oluşacaktır. Bizde bu çalışmada elde ettiğimiz verilere dayanarak göz doku takibi sürecinde fiksatif olarak bouin, dehidratif ajan olarak ise aseton kullanımını önermekteyiz. Bu çalışmanın çıktılarının genellenmesi ve geliştirilebilmesi için daha fazla yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Nesa Deneysel Hayvanları Üretim ve Uygulama Laboratuvarı Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:03.08.2024, Karar no: 052).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Layton C, Bancroft JD, Suvarno K. Fixation of tissues. In: Suvarno K, Layton C, Bancroft JD, eds. Bancroft's Theory and practice of histological techniques. 8th ed. London: Churchill Livingstone, 2018:43-67.
2. Carson FL. Histotechnology:Histotechnology: A Self-Instructional Text. 2nd ed. Chicago: American Society for Clinical Pathology Press, 1997.
3. Carson FL, Kingsley WB, Race GJ. Drierite as a dehydrant, indicator and marker for paraffin embedded tissues. *Am J Med Tech*, 1970; 36: 283-5.
4. Eltoun I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J Histotechnol*, 2001; 24(3): 173-90.
5. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*, 1985; 33(8): 845-53.
6. Grizzle WE. Models of fixation and tissue processing. *Biotech Histochem*, 2009; 84(5): 185-93.
7. Braet F, Ratinac K. Creating next-generation microscopists: structural and molecular biology at the crossroads. *J Cell Mol Med*, 2007; 11: 759-63.
8. Hopwood D, Coghill G, Ramsay J, Milne G, Kerr M. Microwave fixation: its potential for routine techniques, histochemistry, immunocytochemistry and electron microscopy. *Histochem J*, 1984; 16(11):1171-91.
9. Hopwood D. Fixation and fixatives. In: Bancroft JD, Stevens A, eds. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1996; 20-35.
10. Turner CR, Zuczek S, Knudsen DJ, Wheeldon EB. Microwave fixation of the lung. *Stain Technol*, 1990; 65(2):95-101.
11. Pabuccuoğlu HU. Makroskopik Değerlendirme Ve Tespit (Fiksasyon). https://turkpath.org.tr/files/2_makroskopi_tespit_UP_metin.pdf, [Erişim Tarihi: 10.02.2025].
12. Ross MH, Pawlina W. Histoloji konu anlatımı ve atlas, Baykal B, Çeviri ed. Histology Subject Expression and Atlas, 6. Basım. Ankara: Palme Yayıncılık, 2017.
13. Cox ML, Schray CL, Luster CN, Stewart ZS, Korytko PJ, M Khan KN, et al. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Exp Mol Pathol*, 2006; 80(2):183-91.

14. Gazziero A, Guzzardo V, Aldighieri E, Fassina A. Morphological quality and nucleic acid preservation in cytopathology. *J Clin Pathol*, 2009; 62(5):429-34.
15. Arzt L, Kothmaier H, Quehenberger F, Halbwedl I, Wagner K, Maierhofer T, et al. Evaluation of formalin-free tissue fixation for RNA and microRNA studies. *Exp Mol Pathol*, 2011; 91(2):490-5.
16. Stanta G, Mucelli SP, Petrera F, Bonin S, Bussolati G. A novel fixative improves opportunities of nucleic acids and proteomic analysis in human archive's tissues. *Diagn Mol Pathol*, 2006; 15(2):115-23.
17. Baloglu G, Haholu A, Kucukodaci Z, Yilmaz I, Yildirim S, Baloglu H. The effects of tissue fixation alternatives on DNA content: a study on normal colon tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2008; 16(5):485-92.
18. Lassalle S, Hofman V, Marius I, Gavric-Tanga V, Brest P, Havet K, et al. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid*, 2009; 19(11):1239-48.
19. Çakalağaoğlu F. Doku takibi. *Aegean Pathol J*, 2005; 2: 29-30.
20. Grizzle WE. The use of fixatives in diagnostic pathology. *J Histotechnol*, 2001; 24(3): 151-2.
21. Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. 2nd ed. Clifton: Humana Press, 2006.
22. Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol*, 2002; 30(4):524-33.
23. Nassar K, Lüke J, Lüke M, Kamal M, Soliman MM, Grisanti S, et al. Effect of different fixative solutions on eyes with experimental proliferative vitreoretinopathy. *Int J Exp Pathol*, 2015; 96(2):103-10.
24. Öztürk N, Kahveci Z, Eyigör Ö, Sırmalı Ş Pankreas dokusunun değişik yöntemlerle fiksasyonu. *Uludağ Üni Tıp Fak Derg*, 2002; 28(3): 71-5.
25. Çelikkan FT, Acar DB, Demirel MA, Ekim B, Özkavukçu S, Kanca H, et al. Kedi Ovaryumunun tespitinde zamanlamanın ve kullanılan fiksatiflerin folikül korunması üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması. *J Ankara Univ Fac Med*, 2021; 74(2):156-60.
26. Gün H, Demirbağ E, Çınar K. Farklı fiksatiflerin bazı dokular için uygunluğunun belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üni Fen Bil Enst Derg*, 2014; 15(2):75-9.

Identification and prevalence of *Coenurus cerebralis* in sheep: Diyarbakır example

Koyunlarda *Coenurus cerebralis*'in belirlenmesi ve yaygınlığı: Diyarbakır örneği

Delil Adem ÇİFTÇİ¹ (ID), Banuçiçek YÜCESAN² (ID)

ABSTRACT

Objective: *Taenia multiceps* is a cestode that lives in the small intestines of domestic and wild carnivores such as dogs, foxes and jackals. The larval stage of *T. multiceps*, *Coenurus cerebralis*, develops in the central nervous system. The parasite is usually seen in rural areas; it is the most contagious agent in dog-sheep contact, including foxes and wild ruminants.. It can be transmitted when the farmers open the skulls of sick animals and feed the cysted tissues to dogs. The presence of the cyst results in typical neurological symptoms and, in most cases, leads to the death of the animal. Coenurosis caused by *C. cerebralis* is a parasitic disease that causes high economic losses in small ruminants. In this study; it was aimed to find *C. cerebralis* by molecular methods in nine of the samples found to have coenurosis.

Methods: This study was conducted on 1200 sheep slaughtered in Diyarbakır province between September 2022 and April 2023. Phylogenetic studies were conducted with nine of the 122 sheep considered positive.

Results: Coenurus cysts were observed in 12 out of 122 animals (9.8%). Cysts of nine out of 12 sheep were genetically analyzed and confirmed as *T. multiceps*

ÖZET

Amaç: *Taenia multiceps*, köpek, tilki ve çakal gibi evcil ve vahşi etoburların ince bağırsaklarında yaşayan bir sestoddur. *T. multiceps*'in larva evresi olan *Coenurus cerebralis*, merkezi sinir sisteminde gelişir. Parazit genellikle kırsal alanlarda görülmekte; tilki ve yabani gevş getiren hayvanlar da dahil olmak üzere köpek-koyun temasında en bulaşıcı etkindir. Çiftçiler hasta hayvanların kafataslarını açıp kistli dokuları köpeklere yedirdiğinde bulaşabilir. Kistin varlığı tipik nörolojik semptomlara neden olur ve çoğu durumda hayvanın ölümüne yol açar. *C. cerebralis*'in neden olduğu coenurosis, küçük ruminantlarda yüksek ekonomik kayıplara neden olan paraziter bir hastalıktır. Bu çalışmada; coenurosis olduğu tespit edilen örneklerin dokusunda moleküler yöntemlerle *C. cerebralis* tespiti amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışma, Eylül 2022 ile Nisan 2023 arasında Türkiye'de Diyarbakır ilinde kesilen 1200 koyun üzerinde yürütülmüştür. Filogenetik çalışmalar, pozitif kabul edilen 122 koyundan dokuzu ile yapılmıştır.

Bulgular: 122 hayvandan 12 (%9,8)'sinde coenurus kisti gözlenmiştir. 12 koyundan dokuzunun kistleri genetik olarak analiz edilmiş ve COX1 (sitokrom c oksidazı alt ünitesi 1 gen dizisi analizi ile *T. multiceps*

¹Farmer Veterinary Clinic, Private Veterinarian, Diyarbakır, Türkiye

²Department of Veterinary Parasitology, Postgraduate Education Institute (Health Sciences), Çankırı University, Çankırı, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Banuçiçek YÜCESAN

Çankırı Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü (Sağ. Bil.), Veteriner Parazitoloji AD., Çankırı - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 15.09.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 03.03.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.53077

Çiftçi DA, Yücesan B. Identification and prevalence of *Coenurus cerebralis* in sheep slaughtered in the southeastern anatolia region of Türkiye. Türk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 131 - 138

metacestodes by COX1 (cytochrome c oxidase subunit 1) gene sequence analysis. Accession numbers; OR239756, OR239757, OR239758, OR239759, OR239760, OR239761, OR239762, OR239763, OR239764. Similarities of these data with other strains in NCBI (National Center for Biotechnology Information) were compared.

Conclusion: For a definitive identification of *T. multiceps* in Türkiye, further studies may be required using various molecular protocols on biological characteristics, long sequence genes in the mitochondrial and nuclear genome, other hosts and samples from different geographical regions to improve our understanding of the epidemiological distribution in Türkiye.

Key Words: *Coenurus cerebralis*, sheep, *Taenia multiceps*, Southeast Anatolia, Türkiye

metacestodes olduğu doğrulanmıştır. Erişim numaraları; OR239756, OR239757, OR239758, OR239759, OR239760, OR239761, OR239762, OR239763, OR239764 olarak kaydedilmiştir. Bu verilerin NCBI'daki diğer suşlarla benzerlikleri karşılaştırılmıştır.

Sonuç: Türkiye-Diyarbakır ilindeki bazı koyunlarda *coenurus* kisti belirlenmiştir. *T. multiceps*'in doğru tanımlanması için, Türkiye'deki epidemiyolojik dağılıma göre biyolojik özellikler, mitokondriyal ve nükleer genomdaki uzun dizili genler, diğer konaklar ve farklı coğrafi bölgelerden alınan örnekler üzerinde moleküler protokoller kullanılarak daha fazla çalışma yapılması gerekebilir.

Anahtar Kelimeler: *Coenurus cerebralis*, koyun, *Taenia multiceps*, Güneydoğu Anadolu, Türkiye

INTRODUCTION

Small ruminants play a significant role in animal production systems worldwide (1). Helminth-borne infections are among the most important global diseases affecting sheep and goats productivity (2). *C. cerebralis*, the larva of *T. multiceps*, has been known for more than 300 years to cause coenurosis, a disease that negatively affects the productivity of sheep and goats (3,4).

T. multiceps is a taeniid cestode that lives in the small intestines of dogs and other carnivores in its adult form. Its larvae, *C. cerebralis*, settle in the major nervous systems of domestic and wild ruminants, including their brains and spinal cord.

C. cerebralis, the larva of *T. multiceps*, causes coenurosis, which is a disease that negatively impacts the productivity of sheep and goats. The life cycle of the parasite is generally in rural areas, and dog-sheep contact, including foxes and wild ruminants, is the most contagious area. It can be transmitted when farmers open the skulls of sick animals and feed the cysted tissues to dogs (4). The presence of the cyst results in typical neurological symptoms and,

in most cases, leads to the animal's death. Lambs whose immune systems are not yet fully developed can contract the disease by eating contaminated grass leading to significant economic losses to sheep farms (5-7).

C. cerebralis is a slowly progressing infection and can take a very long time to develop. Symptoms may temporarily resolve on their own. Therefore, clinical symptoms may appear three months after infection (6,8). The clinical picture during this period depends on the number of infected eggs ingested by the host, the immune status of the host, the severity of the inflammatory response and the location of the parasite in the central nervous system (CNS) (9). The acute phase of the disease causes high fever within one to three weeks. Movement disorders, incoordination and abnormal head holding, opisthotonus, circular rotation and teeth grinding may be observed (9,6,5). Single lesions located in sensitive areas in the cerebral hemispheres are more dangerous than multiple lesions. After the acute phase, *C. cerebralis* enters a quiescent phase in which cysts mature and transient symptoms can be observed (5). Diagnosis of *C. cerebralis* can be made by necropsy in the acute

form. In this case, it is difficult to detect localized changes made by the larvae as they migrate along the brain and spinal cord.

The chronic phase is more evident in 9-18 month old sheep (10). In infected animals, udder edema, blindness, agitation, paralysis, abnormal posture, abnormal head holding, nystagmus, lethargy and death may occur (6,8). In sheep, thinning and swelling of the skull indicate progressive infection of the brain (9,11). This thinning is important for the epidemiology of the parasite. Other symptoms are retinal hemorrhage and papillary edema. It has been reported that the most preferred location for *C. cerebralis* is the right frontal lobe of the brain. In symptomatic sheep, *C. cerebralis* has been observed to develop to completely cover the left hemisphere of the brain. Sudden death can occur even in clinically normal animals.

Zoonotic diseases may occur when *T. multiceps* eggs are accidentally ingested by humans along with contaminated food and water (12). The change in demographic and socioeconomic structures due to migration in the last decade increases poverty and poor hygiene conditions. This provides an environment for the development of parasitic, bacterial and vector-borne zoonotic diseases. Today, zoonotic pathogens pose a rapidly increasing threat in Türkiye and European countries (12,13).

Prevalence of coenurosis infections has been reported from countries (14,15). In the Middle East, coenurosis is a significant endemic disease affecting small ruminants, most notably in Türkiye, Egypt, Iraq, and Jordan (16-22).

There has been a significant amount of attention given to the ecological, epidemiological, and taxonomic studies of *T. multiceps*, mainly due to their medical and veterinary importance. While molecular characterization of several species within the Taeniidae family, particularly within the *Echinococcus* genus, has been extensively studied, research on the genetic variability of coenurosis has been scarce. Moreover, there are documented studies

on the genetic variability of *T. multiceps* in Türkiye.

In the present study, the prevalence of *C. cerebralis* in sheep was investigated and molecular characterizations of *T. multiceps* metacystodes from naturally infected sheep are described. DNA sequence variability was investigated within the COX1 mitochondrial genes.

MATERIAL and METHOD

The study was conducted from September 2022 to April 2023 in Diyarbakır province is located in southeast part of Türkiye. The brains of sheep were examined in slaughterhouses in Diyarbakır province and its surroundings, and biosafety rules were followed during sampling and transportation of positive samples, as infected material was used. The study implicated 1200 sheep slaughtered at a local abattoir in Diyarbakır. Throughout the study period of eight months, the abattoir was visited once every week. At the abattoir, 30-50 sheep were examined for coenurosis before slaughter each week, and the heads of coenurosis suspicious animals were purchased.

During each visit, after the slaughtering process, the skulls of each sheep were dissected, and the brain of each sheep was systematically inspected by visual inspection, palpation, and incisions against *C. cerebralis* cysts.

The cysts obtained from the brain tissues were opened with a sterile scalpel, and 20 mg pieces were cut from the cyst walls and taken into sterile 1.5 mL falcon tubes. Genomic DNA isolation was performed using the 'Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit.' Isolation was performed in accordance with the company's recommendations (23).

For molecular analysis, the mitochondrial COX1 gene region was amplified by PCR using primers JB3 (TTTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTTAT) and JB4.5 (TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG) (23). PCR reaction mixtures were adjusted to a total volume of 50 µL containing 10 x PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM

dNTP, 20 pmol of each primer and 2 U Taq DNA polymerase. PCR amplification was performed under conditions of 35 cycles of initial denaturation at 95 °C for 5 min, 94 °C for 50 s, 45 °C for 45 s and 72 °C for 50 s and final extension at 72 °C for 7 min.

The product obtained from the polymerase chain reaction was mixed with 10 µL PCR product and 2 µL loading solution in a 1.4% agarose gel, loaded into the wells of the gel and allowed to react in 1X TAE buffer at 100 volts for 40 minutes. A 100 bp marker was used to determine the molecular weight of the bands and analyzed for the presence of bands with an agarose gel UV transilluminator. In each PCR reaction, *T. multiceps* DNA samples previously obtained from Dicle University Faculty of Veterinary Medicine Parasitology Laboratory were used as positive control, while distilled water was used as negative control.

The isolates obtained both directions using an ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR amplicons were sequenced in Multiple sequence alignments were made with the ClustalW method with MEGA7 genetic software program. Phylogenetic trees and pairwise calculations were obtained by using MEGA 7 software (24). The

sequence results obtained were analyzed in the GenBank database blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and registered in GenBank.

According to Article 8 ([19]-k- 2) of the “Regulation on the Working Principles and Procedures of Animal Experiments Ethics Committees” published in the Official Gazette dated 15.02.2014 and numbered 28914, it is stated that “Procedures performed with dead animals or their tissues, slaughterhouse materials, waste fetuses” are not subject to the permission of the Local Animal Experiments Ethics Committee (HAYDEK).

RESULTS

122 out of 1200 sheep had clinical signs such as depression, moving in a circle, head deviation, ataxia and blindness of ceornorisis. The skulls of these animals were removed opened and their brains examined. 12 out of 122 (9.8%) animals *C. cerebralis* cyst was observed. *C. cerebralis* cysts were found on the cerebellum, right and left cerebral hemisphere. Figure 1 shows *C. cerebralis* obtained from sheep brains. Of all positively detected animals, two were

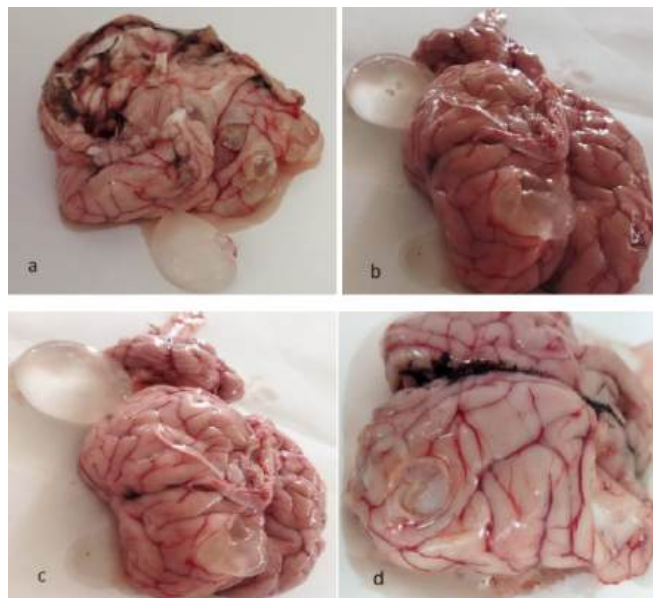


Figure 1. Appearance of *Coenurus cerebralis* cysts of various sizes located in the brain tissue

female (16.7%) and 10 were male (83.3%). Again, all of the positive animals were under 1 year old.

The cysts from nine of infected sheep were genetically analyzed and confirmed to be *T. multiceps* metacestodes by COX1 gene sequence analysis. The sequences were deposited to GenBank with the following accession numbers; OR239756, OR239757, OR239758, OR239759, OR239760, OR239761,

OR239762, OR239763, OR239764. The phylogenetic tree of isolates obtained from sheep is given in Fig 2.

Dyb 2 isolate, OR239757, showed 100% homology with our dyb4, dyb7, dyb8, dyb9 isolate, OR239759, OR239762, OR239763, OR239764, and dyb 1 isolate OR239756, 100% identical dyb5 isolate OR239760 in the present study. Intraspecific divergence is 0.0024 (0.000-0.066).

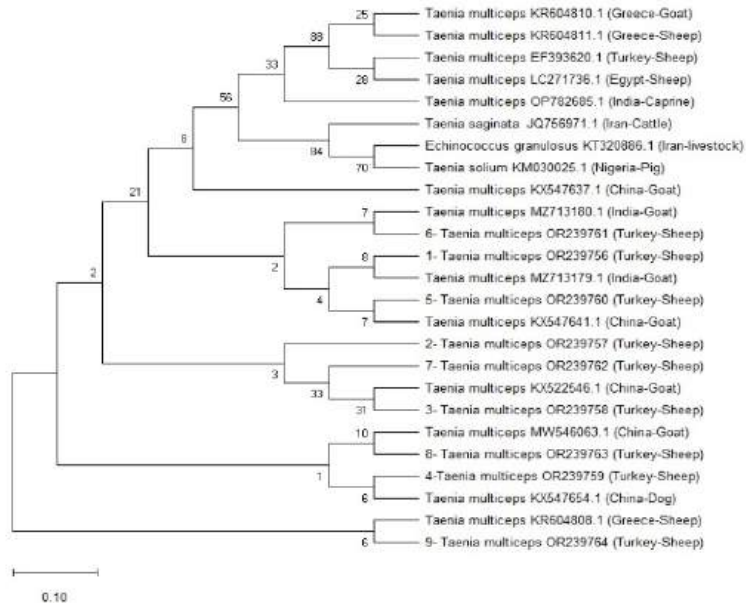


Figure 2. Relationships of *T. multiceps* isolates from sheep of Diyarbakır, Türkiye with some other species of *Taenia* based on COX1 sequence data using the Maximum Likelihood method (ML). The accession numbers of individual sequences determined in the present study are shown in each tree. A scale bar indicates estimated distance. There was concordance in the topology between trees constructed using the ML method

DISCUSSION

The disease is more common in lambs and less common in adult sheep, but adaptive immunity has been reported to play an important role (25). In this study, *C. cerebralis* was observed in the brain tissue of 4-6 month old lambs. In previous studies on this parasite, it was reported that the larvae mainly settled in the cerebral hemispheres (18, 26-28). In this study, as in previous studies, large *C. cerebralis* cysts embedded within the cerebellum were observed

in the cerebellum of sheep. Clinical findings in affected animals vary depending on the location, size and pressure of the cysts in the brain (28,29).

In studies conducted on sheep in different regions of Türkiye, the prevalence of *C. cerebralis* was reported as 16.3% in Konya (18), 15.5% in Kars (27), 12% in Kırıkkale (30) and 64.7% in Van (31). The present study showed occurrence of *C. cerebralis* cysts in 9.8% of sheep examined in Diyarbakır, Türkiye. This rate is lower than infection rates of previously reported in sheep in Türkiye. In

other countries, prevalence of *C. cerebralis* was reported 4.5% in sheep in Ethiopia (32,33), 2.88% in India (34), in 9.8% and 18.65% in sheep in different areas in Iran (34,35), 14.8% in Mozambique (36) and 42.1% in sheep and goats in Tanzania (37). It is thought that the differences in the rates reported in our country and around the world are related to feeding and care conditions, animal population sizes and especially the presence of uncontrolled dogs.

Based on the BLAST analysis, it was found that the COX1 sequence (dyb isolate) of *T. multiceps* (COX1) larval stage had a high percentage identity of 100-98.82% (with a query coverage of 100-96%) with the COX1 sequences of *T. multiceps* isolates in GenBank that were collected from various countries around the world. The 1st group (OR239757, OR239759, OR239762, OR239763, OR239764) was identical to sequences MZ713180 and MZ713179 obtained from *T. multiceps* from goat in Indian, and %99 identical to sequence KR604808 from sheep in Greece. The second group (OR239756, OR239760) was showed 100% homology with China isolate JX507230 from goat, and 99% homology with Greece isolate (KR604808) from sheep. OR239761 showed 99% and 100% identity with isolates from dog of China KX547654, and KX547641, respectively. Phylogenetic relationship among *T. multiceps* isolates from sheep Diyarbakır and the other Taenia isolates as inferred by neighbor-joining analysis of the COX1 sequences are presented in Fig 1.

Mitochondrial DNACO1 gene region cestode species has been successfully used in the differentiation of species (38). There is limited data available on DNA sequence information of *T. multiceps*. An initial

detection of genetic variation in *T. multiceps* was found in a study on Italian sheep. The genetic variants Tm1, Tm2, and Tm3 were identified through analysis of COX1 and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (NAD1). Likewise, analysis of sheep isolates from inner Mongolia and China using COX1 gene sequences revealed three genotypes with variation rates between 0.25% and 0.75%, consistent with findings from Italy (39). Low genetic diversity was observed in Egyptian sheep due to a low number of haplotypes in the COX1 and NAD1 genes of *T. multiceps* (40). Similarly, in our study, *T. multiceps* isolates showed low genetic variation (up to 0.24%) among COX1 gene sequences. In opposite, *T. multiceps* isolates from sheep and goats in Iran exhibited significant genetic heterogeneity. The low genetic diversity detected in our study suggests that new variants and even strains may emerge as a result of new mutations that may occur in the future.

The current study presents findings on the prevalence, localization of cysts, and molecular characterization of *C. cerebralis* (the larval stage of *T. multiceps*) found in the brains of slaughtered sheep in Diyarbakır, Türkiye. We identified genetic differences between isolates of the same species that we submitted to GenBank and other species. To achieve a more precise identification and characterization of *T. multiceps* in Türkiye, further research on biological traits, long sequence genes in the mitochondrial and nuclear genome, from other hosts, and from different geographical areas, using various molecular protocols may be necessary to enhance our understanding of the epidemiological distribution in Türkiye.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Rosen S, Savinetsky A, Plakht Y, Kisseleva N, Khassanov B, Pereladov A, et al. Dung in the desert: preliminary results of the Negev Holocene Ecology Project. *Current Anthropol*, 2005;46(2):317-26.
- Gadahi J, Arshed M, Ali Q, Javaid S, Shah S. Prevalence of gastrointestinal parasites of sheep and goat in and around Rawalpindi and Islamabad, Pakistan. *Vet World*, 2005;2(2):51.
- Özger Ö. Prevalence and molecular characterization of *Coenurus cerebralis* in sheep in Çorum region. Master's thesis, Ondokuz Mayıs University Graduate Education Institute, Samsun, 2020.
- Sabbatani S, Zucchelli M, Calbucci F, Roncaroli F, Chiodo F. A case of cerebral coenurosis. *Infez Med*, 2004;2(3):205-2104.
- Edwards G, Herbert I. Preliminary investigations into the immunization of lambs against infection with *Taenia multiceps* metacestodes. *Vet Parasitol*, 1982; 9(3-4):193-9.
- Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*, Stuttgart. Germany: Enke Verlag, 2005.
- Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Third edition. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2012.
- Schneider T. *Veterinarinmedizinische Parasitologie*. 6. ed. Germany: Parley, 2006.
- Herbert LV, Edwards GT, Willis JM. Some host factors which influence the epidemiology of *Taenia multiceps* in sheep. *Ann Trop Med Par*, 1984;78:243-8.
- Nourani H, Kheirabadi KP. Cerebral coenurosis in a goat: pathological findings and literature review. *Comp Clin Pathol*, 2009;18:85-7.
- Yılmaz K, Can R. A case of coenurosis (*Coenurus cerebralis* Batsch, 1786) in a heifer. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 1986;33:187-92.
- Bıyıkoğlu G, Bağcı O, Öncel T. A coenurosis outbreak of sheep in Istanbul, Turkey. *Pendik Vet Mikrobiol Derg*, 2001;32(1/2):27-30.
- Sharma N, Kumar A, Chaturvedi V, Nayakwadi S, Mishra AK, Singh M, et al. Retro-bulbar cyst of *Coenurus gaigeri* in Barbari goats. *J Parasit Dis*, 2016;41(2):367-70.
- Yoshino T, Momotani E. A case of bovine coenurosis (*Coenurus cerebralis*) in Japan. *Yakugaku Zasshi*, 1988;50(2):433-8.
- Alvi MA, Ohiolei JA, Saqib M, Tayyab MH, Zafar Khan MU, et al. First report on molecular characterization of *Taenia multiceps* isolates from sheep and goats in Faisalabad, Pakistan. *Front Vet Sci*, 2020;7:594599.

16. Abo-Shehada MN, Jebreen E, Arab B, Mukbel R, Torgerson PR. Prevalence of *Taenia multiceps* in sheep in northern Jordan. *Prev Vet Med*, 2002;55(3): 201-7.
17. Ozmen O, Sahinduran S, Haligur M, Sezer K. Clinicopathologic observations on *Coenurus cerebralis* in naturally infected sheep. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 2005;147(3):129-34.
18. Uslu U, Guclu F. Prevalence of *Coenurus cerebralis* in sheep in Turkey. *Medycyna Wet*, 2007; 63(6):678-80.
19. Özkan C, Yildirim S, Kaya A. Clinical coenurosis (*Coenurus cerebralis*) and associated pathological findings in a calf. *Pak Vet J*, 2011; 31(3):263-66.
20. El-Neweshy MS, Khalafalla RE, Ahmed MMS, Mawly A, Hamad J, El-Manakhly ESM. First report of an outbreak of cerebral coenurosis in Dhofari goats in Oman. *Rev Bras Parasitol Vet*, 2019; 28: 479-88.
21. Mohammed NH. Prevalence, morphological and biochemical study of larval stage *Coenurus cerebralis* of *Taenia multiceps* in sheep. *Iraqi J Vet Sci*, 2020; 34(1):159-63.
22. Ajaj EA, Mohammad HA, Gharban HA. First molecular confirmation of *Coenurus cerebralis* in sheep and goats with neurological behaviors in Iraq. *Vet World*, 2021; 14(6): 1420.
23. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*, 1992; 54: 165-74.
24. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 1993; 10(3):512-26.
25. Gemmell MA, Lawson JR, Roberts MG. Population dynamics in echinococcosis and cyticercosis evolution of the biological parameters of *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* and comparison with those of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol*, 1987;94:161-80.
26. Bıyıkoğlu G, Doğanay A. Deneysel olarak enfekte kuzularda *Coenurus cerebralis*'e praziquantel ve albendazolün etkisi. *Türk J Vet Anim Sci*, 1998;22:43-48.
27. Gıcık Y, Kara M, Arslan MO. Prevalence of *Coenurus cerebralis* in sheep in Kars Province, Turkey. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2007;51(3):379.
28. Gül Y, İssi M, Özer S. Clinical and pathological observations of flock of sheep showing epileptoid spasm related to Oestrosis and Coenurosis. *FÜ Sağlık Bil Derg*, 2007; 21:173-7.
29. Sharma DK, Cauhan PPS. Coenurosis status in Afro-Asian region: a review. *Small Rumin Res*, 2006;64:197-202.
30. Gökpınar S, Yıldız K. Klinik bakımdan sağlıklı görünümlü koyunlarda coenurosisin yaygınlığı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012; 18:187-A191.
31. Biçek K, Değer MS, Karakuş S. Van ilinde *Coenurus cerebralis*' in yaygınlığı ve Coenurosis' in teşhisinde yardımcı bir parametre olarak enolaz (NSE) enziminin önemi. *Atatürk Üni Vet Bil Derg*, 2019;14(2):185-92.
32. Acheneff M, Markos T, Feseha G, Hibret A, Tembely S. *Coenurus cerebralis* infection in Ethiopian highland sheep: incidensand observation on pathogenesis and clinical signs. *Trop Anim Health Prod*, 1999;31:15-24.
33. Asmare K, Sibhat B, Abera M, Haile A, Degefu H, Fentie T, et al. Systematic review and meta-analysis of metacestodes prevalence in small ruminants in Ethiopia. *Prev Vet Med*, 2016;129: 99-107.
34. Oryan A, Goorgipour S, Moazeni M, Shirian S. Abattoir prevalence, organ distribution, public health and economic importance of major metacestodes in sheep, goats and cattle in Fars, southern Iran. *Trop Biomed*, 2012;29(3):349-59.
35. Tavassoli M, Malekifard F, Soleimanzadeh A, Tajik H. Prevalence of *Coenurus cerebralis* in sheep in northwest Iran. *In Vet Res forum*, 2011;2:274-6.
36. Afonso SMS, Mukaratirwa S, Hajovska K, Capece BPS, Cristofol C, Arboix, M. et al. Prevalence and morphological characteristics of *Taenia multiceps* cysts (*Coenurus cerebralis*) from abattoir-slaughtered and experimentally infected goats. *J Neuroparasitol*. 2011;2:1-5.
37. Miran MB, Nzalawahe J, Kassuku AA, Swai ES. Prevalence of coenurosis in sheep and goats at three slaughter slabs in Ngorongoro District, Tanzania. *Trop Anim Health Prod*, 2015;47:1591-7.
38. Gasser RB, Zhu X, Mc Manus DP. NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome oxidase subunit I and cytochrome oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda). *Int J Parasitol*, 1999;29(12):1965-70.
39. Li WH, Jia WZ, Qu ZG. Molecular Characterization of *Taenia multiceps* Isolates from Gansu Province China by Sequencing of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit 1. *Korean J Parasitol*, 2013;51:197-201.
40. Amer S, ElKhatam A, Fukuda Y, Bakr LI, Zidan S, Elsify A. Prevalence and identity of *Taenia multiceps* cysts "*Coenurus cerebralis*" in sheep in Egypt. *Acta Trop*, 2017;176:270-6.

Evaluation of O rh-negative blood transfusion practices in emergency cases: A one-year study

Acil durumlarda O rh negatif kan transfüzyonu uygulamalarının değerlendirilmesi: Bir yıllık çalışma

Emine SARCAN¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: In conditions leading to hemorrhagic shock, the transfusion of erythrocyte concentrate (EC) may be necessary. The primary goal of transfusion is to reduce mortality caused by tissue hypoxia. In critically ill patients where time is of the essence, such as those with trauma or gastrointestinal bleeding, the administration of O Rh-negative EC without cross-matching can be life-saving. This study aims to evaluate the effectiveness of emergency O Rh-negative EC transfusion in patients with hemorrhagic shock by analyzing its impact on hemodynamic parameters, the need for surgical intervention, and patient outcomes. Additionally, it seeks to highlight the importance of O Rh-negative EC transfusion in gaining the necessary time for bleeding control.

Methods: This retrospective study was conducted in the Emergency Department of a tertiary hospital between June 1, 2023, and June 1, 2024. The study included 95 patients aged 18 years and older who received O Rh-negative EC transfusion without cross-matching. The patients' vital signs, complete blood count, biochemical and blood gas values, transfusion indications, surgical intervention rates, and 30-day mortality were recorded.

ÖZET

Amaç: Hemorajik şoka neden olan durumlarda eritrosit konsantresi (EK) transfüzyonuna ihtiyaç duyulabilmektedir. Transfüzyonun temel amacı, doku hipoksisi sonucu oluşabilecek mortaliteyi azaltmaktır. Travma veya gastrointestinal kanama gibi zamanla yarışılan kritik hastalarda, cross-match (çapraz karşılaştırma) testi yapılmadan O Rh negatif EK verilmesi hayat kurtarıcı olabilir. Bu çalışma, hemorajik şok gelişen hastalarda acil O Rh-negative EK transfüzyonunun etkinliğini; hemodinamik parametreler, cerrahi müdahale gereksinimi ve hasta sonuçları üzerindeki etkisini analiz ederek değerlendirmeyi amaçladı. Ayrıca, O Rh-negative EK transfüzyonunun kanama kontrolü için gerekli zamanı kazandırmadaki önemini vurgulamayı hedefledi.

Yöntem: Bu retrospektif çalışma; 1 Haziran 2023-1 Haziran 2024 tarihleri arasında üçüncü basamak bir hastanenin Acil Servisinde yürütüldü. Çalışmaya, cross-match yapılmadan O Rh-negatif EK transfüzyonu yapılan, 18 yaş ve üzerindeki 95 hasta dahil edildi. Hastaların vital bulguları, hemogram, biyokimya ve kan gazı değerleri, transfüzyon nedenleri, cerrahi

¹Ministry of Health Ankara Etlik City Hospital, Department of Emergency Medicine, Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Emine SARCAN

Varlık mahallesi, Halil Sezai Erkut caddesi, Yenimahalle, Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : dr.e.sarcan2010@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 24.11.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 06.03.2025

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.88123

Sarcan E. Evaluation of O rh-negative blood transfusion practices in emergency cases: A one-year study. Turk Hij Den Biol Derg, 2025; 82(1): 139 - 150

In my hospital, the preparation of erythrocyte concentrate with a cross-match test takes an average of 60-90 minutes, whereas the preparation of O Rh-negative EC without cross-matching is completed in a significantly shorter time, approximately 5-20 minutes.

Results: Among the patients, 72% (n=68) were male, and the most common indication for transfusion was trauma (69.5%), followed by gastrointestinal bleeding (24.2%). The most frequent trauma-related causes were liver injuries (n=20) and extremity injuries (n=17). Endotracheal intubation was performed in 64% of the patients, 63% underwent emergency surgery, and 82% were admitted to the intensive care unit. The mortality rate in the emergency department was 16%, while the overall mortality rate was found to be 56%. A significant relationship was found between mortality and systolic blood pressure, diastolic blood pressure, Glasgow Coma Scale score, and lactate levels (p=0.022, p=0.001, p<0.001, p<0.001). Additionally, higher International Normalized Ratio (INR) values and lower platelet counts were significantly associated with survival status (p=0.01, p=0.002).

Conclusion: The transfusion of O Rh-negative EC was found to provide critical time before surgical intervention and improve survival in patients with trauma and gastrointestinal bleeding. It is suggested that initiating blood transfusion during the pre-hospital period may further reduce mortality rates. This study is expected to contribute to the establishment of a database for the appropriate and effective use of blood and blood products.

Key Words: Emergency transfusion, O Rh-negative erythrocyte concentrate, hemorrhagic shock, trauma, gastrointestinal bleeding

müdahale oranları ve 30 günlük mortalitesi kayıt edildi. Hastanemde cross-match testi ile EK hazırlanması ortalama 60-90 dakika sürerken, cross-match yapılmadan O Rh-negatif EK hazırlanması 5-20 dakika gibi daha kısa bir sürede gerçekleştirilmektedir.

Bulgular: Hastaların %72'si (n=68) erkek, %28'i (n=27) kadın idi. En sık transfüzyon nedeni travma (%69,5) olup, bunu gastrointestinal kanamalar (%24,2) takip etti. Travmaya bağlı en yaygın nedenler ise karaciğer (n=20) ve ekstremitelere (n=17) yaralanmaları olarak saptandı. Hastaların %64'ü entübe edildi, %63'ü acil cerrahiye alındı ve %82'si yoğun bakıma yatırıldı. Acil serviste ölüm oranı %16, toplam mortalite oranı ise %56 olarak tespit edildi. Sistolik ve diyastolik kan basıncı, Glasgow Koma Skalası skoru ve laktat düzeyleri ile mortalite arasında anlamlı bir ilişki bulundu (p=0,022, p=0,001, p<0,001, p<0,001). Ayrıca, yüksek Uluslararası Normalleştirilmiş Oran (INR) değerleri ve düşük platelet sayıları ile sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (p=0,01, p=0,002).

Sonuç: O Rh-negatif EK transfüzyonunun, travma ve gastrointestinal kanamalı hastalarda cerrahi müdahale öncesinde kritik zaman kazandırdığı ve sağ kalımı artırdığı tespit edildi. Hastane öncesi dönemde başlatılacak kan transfüzyonunun mortalite oranlarını daha da azaltabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın, kan ve kan ürünlerinin doğru ve etkili kullanımına yönelik bir veri tabanı oluşturulmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Acil transfüzyon, O Rh-negatif eritrosit konsantresi, hemorajik şok, travma, gastrointestinal kanama

INTRODUCTION

EC has been a part of anemia treatment strategies for many years. Approximately 40% of critically ill patients receive blood transfusions during hospitalization. Particularly, blood transfusion

due to aging, critical illnesses, trauma, and surgical indications is considered a predictor of poor outcomes (1). In acute hemorrhage, blood loss exceeding 1500 mL typically necessitates transfusion. The primary goal of transfusion is to prevent adverse outcomes associated with tissue hypoxia (2). The

most common indications for emergency transfusion include trauma, gastrointestinal bleeding (GIB), and hemorrhages due to warfarin overdose (3). Trauma is the third leading cause of death, and hemorrhagic shock is a major cause of mortality, particularly in the early hours of trauma (4). In patients who do not respond to fluid resuscitation and have a shock index exceeding 0.9, early blood transfusion should be considered (5). Timely EC transfusion in trauma patients with active bleeding can provide critical time for surgical intervention and improve survival. This period is recommended to be approximately 10 minutes. For every minute of delay in transfusion, the 30-day mortality rate increases by 5% (6). In GIB, another cause of hemorrhagic shock, the hemoglobin threshold for EC transfusion is determined based on the presence of cardiovascular disease (CVD). In patients with CVD, the target hemoglobin (Hgb) level is to increase it to 10 g/dL or above if Hgb is ≤ 8 g/dL. In the absence of CVD, the threshold for EC transfusion is Hgb ≤ 7 g/dL, with the desired hemoglobin range being 7-9 g/dL. However, in unstable patients, a flexible transfusion strategy is applied instead of a fixed threshold value (7). Rational EC transfusion in acute blood loss is of great importance in terms of mortality and morbidity. High-volume blood transfusion has been found to be associated with increased mortality, as well as prolonged hospital and intensive care unit stays. Studies have shown that as the transfusion rate increases, mortality rates also rise (8).

The primary aim of this study is to assess the clinical impact of emergency O Rh-negative EC transfusion in patients with hemorrhagic shock. Specifically, I aimed to evaluate the relationship between transfusion and changes in hemodynamic stability, the need for surgical intervention, intensive care unit admission rates, and short-term mortality. My secondary objective is to highlight the importance of O Rh-negative EC transfusion in gaining the necessary time for surgical interventions and endoscopic procedures required for bleeding control.

MATERIAL and METHOD

This study was designed as a single-center, retrospective study conducted at the Emergency Department of Ankara Etlik City Hospital. Patients aged 18 years and older, both male and female, who received O Rh-negative EC transfusion without cross-matching in the emergency department between June 1, 2023, and June 1, 2024, were included in the study. All patients under 18 years of age, pregnant women, those who had received any blood transfusion within the last month, and patients with insufficient data required for the study were excluded. During the study period, a total of 108 patients received O Rh-negative EC transfusion without cross-matching. However, six patients were excluded after cross-matching confirmed that their actual blood type was O Rh-negative, and seven patients were excluded due to missing parameters. Consequently, a total of 95 patients were included in the study.

All patient data were obtained from the hospital database and patient records. The parameters analyzed in the study included sociodemographic characteristics (age, sex, and comorbidities), vital parameters [systolic and diastolic blood pressure, body temperature, heart rate, respiratory rate, and peripheral oxygen saturation (SpO_2)], and consciousness status assessed by the Glasgow Coma Scale (GCS). Complete blood count (CBC) values, including white blood cell, lymphocyte, neutrophil, monocyte, Hgb, hematocrit (Htc), and platelet count, were recorded. Biochemical parameters such as glucose, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and sodium levels were also analyzed. Blood gas parameters, including pH, SpO_2 , partial oxygen pressure (PaO_2), partial carbon dioxide pressure ($PaCO_2$), bicarbonate (HCO_3), and lactate levels, were evaluated. Additionally, coagulation parameters such as activated partial thromboplastin time (aPTT) and INR were documented. The imaging studies performed, including X-ray, ultrasonography,

and computed tomography (CT), were also recorded. The indications for transfusion (diagnosis and reason), the number of O Rh-negative EC units transfused, hospitalization status, and 30-day mortality were documented.

Recent trauma guidelines recommend avoiding aggressive fluid replacement in the management of hemorrhagic shock. Instead, permissive hypotension is advocated for these patients. Following the administration of 1000 mL of isotonic fluid replacement in the pre-hospital and emergency department settings, EC transfusion is recommended (5). The patients included in the study received 100 to 500 mL of isotonic solution in the pre-hospital period, while the total amount of isotonic fluid administered in the emergency department was limited to 1000 mL.

According to the classification of hemorrhagic shock, Class 1 hemorrhage triggers a mild systemic response and indicates blood loss of less than 15% of total blood volume. Class 2 hemorrhage occurs when blood loss ranges between 15% and 30%, leading to the activation of compensatory mechanisms. Sympathetic activation leads to tachycardia. In Class 3 hemorrhage, at least 30% blood loss occurs, resulting in tissue hypoxia, increased lactate levels, and base excess. Patients experience reduced urine output. When blood loss exceeds 40%, it is classified as Class 4 hemorrhage. At this stage, urine output ceases, severe hypotension and tachycardia develop, ultimately leading to multiple organ failure (9).

The hospital setting, the cross-match test in blood transfusion aims to prevent hemolytic transfusion reactions by detecting alloantibodies in the recipient's red blood cells (against ABO, D and other antigens) that may react with corresponding antigens on donor red blood cells. When no complex serological issues were present, the routine cross-match test typically took between 30 and 60 minutes. Additionally, the process of drawing the patient's blood for cross-matching and transporting it to the blood bank required at least an additional 30 minutes. Considering these

factors, the total preparation time for a compatible transfusion was at least 60 to 90 minutes. In contrast, the preparation and administration of O Rh-negative EC without cross-matching took approximately 5 to 20 minutes.

The analysis of the research data was conducted using the SPSS 22 (Statistical Package for Social Science; SPSS Inc., Chicago, IL) package program, and quantitative data were given as percentages and the qualitative data as mean \pm standard deviation and median. Mann-Whitney U tests were used to compare independent variables. Two-tailed Pearson Correlation test was used to compare mortality between study parameters. The results were expressed as 95% confidence interval and $p < 0.05$ as significant.

The study was approved by the Ankara Etilik City Hospital Scientific Researches Ethics Committee (Date: 25.09.2024 and Number: AESH-BADEK-2024-891).

RESULTS

Of the 95 patients included in the study, 72% ($n=68$) were male, and 28% ($n=27$) were female. The mean age of male patients was 42.3 ± 19.9 years (min-max: 18-88), while the mean age of female patients was 47 ± 20.2 years. No comorbidities were present in 85.3% of male patients and 63% of female patients. CVD was the most common comorbidity in both sexes. The most common indication for emergency O Rh-negative EC transfusion was trauma, accounting for 69.5% ($n=67$) of cases, followed by GIB at 24.2% ($n=22$). Among trauma-related causes, liver injury was the most frequent indication ($n=20$), followed by extremity injury ($n=17$). Other trauma-related transfusion indications included splenic injury ($n=11$), thoracic injury ($n=9$), pelvic injury ($n=8$), and renal injury ($n=2$), respectively. A total of 64.2% of the patients were intubated, and 63.1% underwent emergency surgical intervention. Additionally, 82.1% of the patients were admitted to the intensive care unit (Table 1). Regarding medication use, 82% ($n=78$) of the patients were not on any medications.

Table 1. Bleeding sources distribution of the patients

Variable	n (95)	%
Comorbidities		
None	75	79
Hypertension	2	2.1
Cardiovascular Disease	8	8.45
Cerebrovascular Disease	2	2.1
Liver Disease	2	2.1
Malignancy	3	3.1
Gastritis	2	2.1
Bleeding Diathesis	1	1.05
Emergency Surgery		
Yes	60	63.1
No	35	36.9
Intubation		
Yes	61	64.2
No	34	35.8
Hospitalization		
Ward	2	2.1
Intensive Care	78	82.1
Emergency Death	15	15.8
Bleeding Site		
Gastrointestinal Bleeding	22	24.2
Trauma	67	69.5
Aortic Dissection	4	4.2
Urinary System	1	1.05
Vaginal Bleeding	1	1.05

Acetylsalicylic acid was used by 7% (n=7), warfarin by 3% (n=3), and direct oral anticoagulants by 7% (n=7). In the emergency department, 16% of the patients died, while the overall mortality rate was 56% (n=53). A total of 67% (n=64) of the patients were classified as having Class 3 hemorrhagic shock, whereas 33% (n=31) were in Class 4 hemorrhagic shock. Regarding EC transfusions, 27 patients received 1 unit, 30 patients received 2 units, 12 patients received 3 units, 19 patients received 4 units, and 7 patients received 5 units. Fresh frozen plasma (FFP) transfusion was administered to 57 patients,

with 51 receiving 1 unit and 6 receiving 2 units. A total of 38 patients did not receive FFP transfusion.

The initial blood pressure, pulse rate, blood gas, biochemical, and CBC results of the patients upon arrival at the emergency department are summarized in Table 2. When analyzing the correlation between patients' vital signs, blood values, and mortality, a moderate negative correlation was observed between systolic and diastolic blood pressure and mortality. Similarly, lactate and HCO₃ levels showed a moderate negative correlation with mortality (Table 3).

Table 2. Results of the patients vital signs and blood tests

Variable (n=95)	Mean±SD	Min-Max
Systolic Blood Pressure (mmHg)	82.34±17.11	50-198
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	51.77±12.15	30-98
Pulse (beats per minute)	110.37±26.19	25-145
pH	7.13±0.21	6.2-7.5
Partial Pressure of Carbon (mmHg)	46.80±18.20	19-112
Partial Pressure of Oxygen (mmHg)	41.14±21.80	16-211
Bicarbonate (mmol/L)	14.66±5.34	4.7-31
Lactate (mmol/L)	7.24±3.81	2-21
Glucose (mg/dL)	178.01±85.91	5.4-604
Urea (mg/dL)	48.73±45.77	9.8-227
Creatinine (mg/dL)	1.40±0.73	0.6-5.5
Aspartate Aminotransferase (U/L)	170.25±244.17	5-1310
Alanine Aminotransferase (U/L)	146.63±227.33	5-1457
Sodium (mmol/L)	139.97±5.53	125-159
Potassium (mmol/L)	4.25±0.95	1.2-6.2
aPTT (seconds)	45.55±35.58	21-245
INR	2.58±3.93	0.9-28
Hemoglobin (g/dL)	8.76±2.44	3.3-14
Hematocrit (%)	27.88±7.55	11-47.8
White Blood Cell ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	17.1±8.1	8.7-39.1
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	193.47±90.30	30-45.9

aPTT: Activated Partial Thromboplastin Time, INR: International Normalized Ratio

When examining the relationship between patient parameters and mortality, a significant association was found between systolic blood pressure ($p<0.001$), diastolic blood pressure ($p<0.001$), and GCS score

($p<0.001$). Additionally, lactate levels ($p<0.001$) and Hgb levels ($p=0.033$) were significantly associated with mortality. The relationship between mortality and other patient parameters is summarized in Table 4.

Table 3. Correlation between the patients vital signs, blood parameters and mortality

Variable	Pearson's r*	p
Age (years)	0.179	0.083
Systolic Blood Pressure (mmHg)	-0.235	0.022
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	-0.325	0.001
Pulse (beats/min)	-0.23	0.025
Saturation (%)	-0.239	0.02
Temperature (°C)	-0.057	0.584
Glasgow Coma Scale	-0.475	<0.001
Erythrocyte Suspension (units)	0.19	0.065
Fresh Frozen Plasma (units)	-0.031	0.769
pH	-0.451	<0.001
Partial Pressure of Carbon (mmHg)	0.33	0.001
Partial Pressure of Oxygen (mmHg)	0.102	0.323
Bicarbonate (mmol/L)	-0.402	<0.001
Lactate (mmol/L)	0.403	<0.001
Glucose (mg/dL)	0.026	0.804
Urea (mg/dL)	0.195	0.059
Creatinine (mg/dL)	0.155	0.134
AspartateAminotransferase (U/L)	0.075	0.47
Alanine Aminotransferase (U/L)	0.111	0.283
Sodium (mmol/L)	0.277	0.007
Potassium (mmol/L)	0.39	<0.001
aPTT (seconds)	0.235	0.022
INR	0.035	0.743
Hemoglobin (g/dL)	-0.142	0.171
Hematocrit (%)	-0.155	0.133
White Blood Cell ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.009	0.935
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	-0.306	0.003

* Two-tailed Pearson's Correlations test, aPTT: Activated Partial Thromboplastin Time, INR: International Normalized Ratio

Table 4. Analysis of parameters grouped by mortality

Groups			
Variable	Live (n=53)	Death (n=42)	p*
Age (years)	40.41±18.45	47.59±21.39	0.122
Systolic Blood Pressure (mmHg)	85.90±10.09	77.85±22.48	<0.001
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	55.28±9.70	47.35±13.55	<0.001
Pulse (beats/min)	115.71±15.23	103.64±34.58	0.339
Glasgow Coma Scale	12.83±2.79	9.38±3.65	<0.001
pH	7.22±0.14	7.02±0.24	<0.001
Partial CO ₂ (mmHg)	41.48±12.62	53.51±21.79	0.007
Partial O ₂ (mmHg)	39.16±10.93	43.63±30.44	0.802
Bicarbonate (mmol/L)	16.57±4.72	12.26±5.17	<0.001
Lactate (mmol/L)	5.88±2.55	8.96±4.44	<0.001
Glucose (mg/dL)	176.05±83.39	180.48±89.94	0.961
Urea (mg/dL)	40.85±40.86	58.69±50.03	0.004
Creatinine (mg/dL)	1.30±0.77	1.52±0.65	0.009
Aspartate Aminotransferase (U/L)	154.01±227.84	190.73±264.72	0.078
Alanine Aminotransferase (U/L)	124.20±184.53	174.92±271.71	0.059
Sodium (mmol/L)	138.62±4.52	141.69±6.22	0.018
Potassium (mmol/L)	3.92±0.82	4.67±0.96	<0.001
aPTT (seconds)	38.14±35.51	54.90±33.81	<0.001
INR	2.43±3.28	2.78±4.66	0.01
Hemoglobin (g/dL)	9.19±2.29	8.23±2.54	0.033
Hematocrit (%)	28.92±6.74	26.57±8.36	0.085
White Blood Cell ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	17±8.27	17.2±8.05	0.843
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	21.8±8.57	16.26±8.72	0.002

* Mann Whitnet U tests, aPTT: Activated Partial Thromboplastin Time, INR: International Normalized Ratio

DISCUSSION

This study demonstrated the relationship between vital signs, blood parameters, and mortality in patients who received emergency O Rh-negative EC transfusion after developing hemorrhagic shock. Blood pressure, consciousness level, and blood gas measurements were found to provide significant data in the patient group with fatal outcomes.

Upon analyzing the data from this study, it was observed that the need for O Rh-negative EC transfusion was more common among male patients and those in their fourth decade of life. The majority of patients had no comorbidities and were not on any regular medication. The most frequent indication for transfusion was trauma-related blood loss, followed by GIB as the second most common cause. In this study, the vast majority of patients requiring O Rh-negative EC transfusion belonged to these two groups. While trauma was the most common cause of hemorrhagic shock, GIB was the second most frequent cause. Trauma is one of the leading causes of death worldwide, with approximately half of these patients succumbing to hemorrhage. Additionally, trauma is the most significant cause affecting individuals aged 1 to 44 years. A study has shown that more than 62% of patients who received blood transfusions did so due to trauma (10). These findings are consistent with the results of this study. Hemorrhagic shock is one of the leading preventable causes of death in trauma. The primary approach to managing trauma-related bleeding is achieving hemostasis at the bleeding site. However, to mitigate the adverse effects of hemorrhagic shock and gain time until surgical intervention can be initiated, blood transfusion is recommended (11). In this study, more than half of the patients with hemorrhage underwent emergency surgical intervention. Additionally, a significant number of patients died in the emergency department. To reduce hemorrhage-related mortality in the emergency setting, pre-hospital blood transfusion is increasingly being implemented (12).

Some military units have adopted this approach in combat zones to improve survival rates (13). The absence of pre-hospital blood transfusion in Turkey suggests that it may not effectively prevent the worsening of hemorrhagic shock before hospital admission. All patients included in the study were classified as stage 3 or 4 hemorrhagic shock. Trauma guidelines recommend allowing permissive hypotension and avoiding high-volume fluid therapy for shock management. In patients who do not respond to fluid resuscitation, early initiation of blood transfusion is advised (14). Studies have shown that aggressive fluid replacement disrupts the coagulation cascade, leading to worsening shock. Since it does not reduce mortality, restricted crystalloid fluid administration is recommended (15). GIB is a major cause of mortality and morbidity. Hemorrhagic shock due to GIB is among the common indications for blood transfusion. Currently, a restrictive transfusion strategy is preferred (16). In this study, patients who received blood transfusion due to GIB were consistent with the literature. To reverse hemorrhagic shock and facilitate urgent endoscopy, O Rh-negative EC transfusion was rapidly administered. As blood pressure decreases in hemorrhagic shock, the severity of shock and, consequently, the risk of death increase exponentially. Hypotension leads to reduced organ perfusion, potentially resulting in multiple organ failure and death (17). Studies aimed at mitigating this condition have shown that initiating blood transfusion in the pre-hospital setting can reduce mortality by 10% (18). In this study, a negative relationship between hypotension and mortality was also observed. The administration of emergency O Rh-negative EC transfusion did not sufficiently reduce mortality in the emergency department. The prolonged transport time of patients with acute bleeding and their presentation in stage 3-4 shock upon arrival are considered significant factors contributing to increased emergency department mortality rates. Prehospital fluid replacement and blood transfusion have not demonstrated a clear

difference in preventing organ failure to mitigate this risk. However, mortality was found to be 7% lower in the group that received blood transfusion (19). Deterioration in consciousness may occur earlier than hypotension and tachycardia and is associated with mortality. At this stage, the patient may already be in an advanced phase of shock. Additionally, the metabolic changes induced by shock can contribute to this impairment (20). In this study, a decrease in GCS score was associated with an increase in patient mortality. Additionally, worsening acidosis was found to be linked to higher mortality. Lactic acidosis also demonstrated a positive correlation with mortality. This process develops due to inadequate oxygen delivery to tissues as a result of reduced blood volume. In response to oxygen deficiency, tissues shift to anaerobic metabolism, leading to the development of lactic acidosis (21). The effects of hypoperfusion, heat loss, and acidosis in hemorrhagic shock are collectively known as the lethal triad. This process can subsequently lead to coagulopathy. Prolonged coagulation times have been found to be directly associated with mortality. Although genetic factors are thought to contribute to this condition, hypoperfusion and the activation of the protein C system also play a significant role. While coagulation factors are activated to stop bleeding, an opposing mechanism simultaneously functions to prevent abnormal thrombus formation in intact tissues (17,22). In this study, a significant relationship was found between coagulopathy and mortality in patients. Both an increase in INR and a decrease in platelet count can be explained by the pathophysiology of coagulopathy in hemorrhage. Additionally, the fact that the patients included in the study were in stage 3-4 shock and a pre-arrest state accounts for the observed coagulation and platelet abnormalities. Despite this, rapid O Rh-negative EC transfusion and emergency intubation enabled 63% of the patients to undergo surgery. Similarly, most GIB patients received urgent endoscopic treatment. I believe that these interventions contributed to improved

survival. My emergency department is a major center with rapid access to a blood bank. Emergency radiological imaging, interventional procedures, and surgical teams are always readily available. This management system not only facilitates the care of critically ill patients but also has a positive impact on survival. In this study, a significant relationship was found between decreased hemoglobin levels and mortality. This finding underscores the necessity of rapid EC transfusion. I believe that patients experiencing acute blood loss undergo an average blood loss of 30% or more in the pre-hospital period. The primary reason for this is that our patients presented in stage 3 and 4 hemorrhagic shock. This condition can be explained by the development of hyperlactatemia and coagulopathy in patients who did not survive. Hemoglobin, another indicator of bleeding, may not always exhibit a direct correlation with blood loss. However, a decrease in hemoglobin levels can serve as a crucial indicator of the rate at which fluid is drawn from the tissues (23). Elevated lactate levels are a key indicator of tissue hypoxia. High lactate concentrations reflect impaired oxygen delivery and, consequently, significant blood loss (23, 24). Although massive transfusion was not performed in my study, FFP transfusion was applied to a significant portion of patients. The role of FFP in hemorrhagic shock management has been well-documented, particularly in massive transfusion protocols. However, its use in non-massive transfusion settings remains a subject of debate.

The limitations of my study include its retrospective design and being a single-center study, which restricts the generalizability of the results. However, the strengths of this study include being a large medical center, receiving continuous patient referrals, the high patient volume brought in by the emergency ambulance system, and functioning as a trauma center. Another limitation of this study was the inability to access complete pre-hospital data. The onset time of the event and pre-hospital interventions may have influenced patient outcomes.

I included only patients who received emergency O Rh-negative EC transfusion in my study. Although this reduced the overall study dataset, my primary aim was to evaluate the outcomes of using this critical blood product and to identify the parameters guiding the decision for its administration. The lack of comparison between pre- and post-transfusion values in patients may be considered a limitation. However, this can be explained by several factors: some patients who received emergency EC transfusion required urgent surgical intervention, some experienced cardiac arrest and died in the emergency department, while others had altered transfusion requirements following emergency endoscopic procedures. Additionally, differences in transfusion indications, variations in transfusion volumes, inconsistencies in surgical durations, and diverse treatment regimens would have compromised the homogeneity of the patient group. This issue would have significantly impacted the analysis of pre- and post-transfusion values. Additionally, the lack of a standardized time frame for obtaining post-transfusion control blood values and the uncertainty regarding laboratory processing times were major limitations of the study. Due to these constraints,

comparing pre- and post-transfusion values in a retrospective study was methodologically unfeasible. The strength of this study lies in its comprehensive presentation of emergency department data from patients who received emergency O Rh-negative EC transfusion. The difficulty in collecting data from such patient groups highlights the need for more extensive data in the literature. In this regard, the study contributes to the establishment of a database for the appropriate and effective use of blood and blood products, reflecting one of its key strengths.

In conclusion; this study demonstrated that nearly all patients with stage 3-4 hemorrhagic shock required emergency intubation, surgical intervention, or interventional procedures to control bleeding. However, despite these interventions, slightly more than half of the patients did not survive. I believe that emergency O Rh-negative EC transfusion can provide a significant time advantage for surgical and endoscopic procedures. Thus, i consider that it contributes to improved survival. Furthermore, i assess that initiating transfusion in the pre-hospital setting could further increase survival rates. Vital signs and rapid blood gas analysis provide key indicators for predicting mortality.

ACKNOWLEDGMENT

I would like to express my gratitude to Dr. Ahmet Burak Erdem for his invaluable mentorship and guidance throughout this study.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Ankara Etlik City Hospital Scientific Researches Ethics Committee (Date: 25.09.2024 and Number: AESH-BADEK-2024-891).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Long B, Koyfman A. Red blood cell transfusion in the emergency department. *Emerg Med*, 2016; 51(2): 120-30.
2. Yiğit AB, Bolat M, Altındaş M. Correct indication strategies and patient blood management in transfusion applications. *Turkish Bull Hyg Exp Biol*, 2023;80(3):419-26.
3. Gürbüz H, Zengin Y, Gündüz E, Durgun HM, Dursun R, İçer M, et al. Evaluation of blood and blood products transfusions in Dicle University Faculty of Medicine Research Hospital Emergency Department. *Euroasia J Math Eng Nat Med Sci*, 2021; 8 (16): 36-48.
4. Erdem AB, Çelikel E, Kavak N, Yılmaz MS, Kavalcı G, Güngör İ, et al. The prognostic significance of red cell distribution width in traumatic patients with active hemorrhage: Is serial measurement a new perspective? *Sci Health*, 2021; 23 (3): 69-77.
5. Erdem AB. Travma hastalarında ilk değerlendirme. In: Çiftçi A, ed. *Bütüncül Tıp (Birinci Basamakta ve Aile Hekimliğinde Güncel Tanı-Tedavi)*. 1st ed. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2019: 332-40.
6. Mitra B, Singh B, Mathew J, Stewart C, Koolstra C, Hendel S, et al. Timing and volume of transfusion for adult major trauma patients with hemorrhagic shock: a registry-based cohort study. *Trauma Surg Acute Care Open*, 2024; 9 (1): e001248.
7. Alali AA, Barkun AN. An update on the management of non-variceal upper gastrointestinal bleeding. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2023; 11: goad011.
8. Yang JC, Sun Y, Xu CX, Dang QL, Li L, Xu YG, et al. Correlation between red blood cell transfusion volume and mortality in patients with massive blood transfusion: a large multicenter retrospective study. *Exp Ther Med*, 2015; 9: 137-42.
9. Meza Monge K, Rosa C, Sublette C, Pratap A, Kovacs EJ, Idrovo JP. Navigating hemorrhagic shock: biomarkers, therapies, and challenges in clinical care. *Biomedicines*, 2024;12(12):2864.
10. Hooper N, Armstrong TJ. Hemorrhagic shock. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47038/>, [Accessed Date: November 13, 2024].
11. Braverman MA, Smith A, Pokorny D, Axtman B, Shahan CP, Barry L, et al. Prehospital whole blood reduces early mortality in patients with hemorrhagic shock. *Transfusion*, 2021; 61 (1): 15-21.
12. Rehn M, Weaver A, Brohi K, Eshelby S, Green L, Røislien J, et al. Effect of prehospital red blood cell transfusion on mortality and time of death in civilian trauma patients. *Shock*, 2019; 51: 284-8.
13. Garcia Hejl C, Martinaud C, Macarez R, Sill J, le Golvan A, Dulou R, et al. The implementation of a multinational "walking blood bank" in a combat zone: the experience of a health service team deployed to a medical treatment facility in Afghanistan. *J Trauma Acute Care Surg*, 2015; 78: 949-54.
14. American College of Surgeons Committee on Trauma. *ATLS Student Course Manual*. 10th ed. Chicago: American College of Surgeons, 2018.
15. Hussmann B, Schoeneberg C, Jungbluth P, Heuer M, Lefering R, Maek T, et al. Enhanced prehospital volume therapy does not lead to improved outcomes in severely injured patients with severe traumatic brain injury. *BMC Emerg Med*, 2019; 19 (1): 13.
16. Odutayo A, Desborough MJ, Trivella M, Stanley AJ, Dorée C, Collins GS, et al. Restrictive versus liberal blood transfusion for gastrointestinal bleeding: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Gastro Hepatol*, 2017;2(5): 354-60.
17. Faria I, Thivalapill N, Makin J, Puyana JC, Raykar N. Bleeding, hemorrhagic shock, and the global blood supply. *Crit Care Clin*, 2022; 38 (4): 775-93.
18. Sperry JL, Guyette FX, Brown JB, Yazer MH, Triulzi DJ, Early-Young BJ, et al. Prehospital plasma during air medical transport in trauma patients at risk for hemorrhagic shock. *N Engl J Med*, 2018; 379 (4): 315-26.
19. Crombie N, Doughty HA, Bishop JRB, Desai A, Dixon EF, Hancox JM, et al. Resuscitation with blood products in patients with trauma-related haemorrhagic shock receiving prehospital care (RePHILL): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Haematol*, 2022; 9 (4): e250-61.
20. McGuire D, Gotlib A, King J. Capillary refill time. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557753/>, [Accessed Date: November 23, 2024].
21. Cannon JW. Hemorrhagic shock. *N Engl J Med*, 2018; 378: 1852-3.
22. MacLeod JB, Winkler AM, McCoy CC, Hillyer CD, Shaz BH. Early trauma induced coagulopathy (ETIC): prevalence across the injury spectrum. *Injury*, 2014; 45 (5): 910-5.
23. Trembl B, Kleinsasser A, Knotzer J, Breitkopf R, Velik-Salchner C, Rajsic S. Hemorrhagic shock: blood marker sequencing and pulmonary gas exchange. *Diagnostics (Basel)*, 2023; 13 (4): 639.
24. Hernández G, Cavalcanti AB, Ospina-Tascón G, Dubin A, Hurtado FJ, Damiani LP, et al. Statistical analysis plan for early goal-directed therapy using a physiological holistic view - the andromeda-shock: a randomized controlled trial. *Rev Bras Ter Intensiva*, 2018; 30 (3): 253-63.

Healthcare conflict and job satisfaction: A case of tertiary hospital

Sağlık hizmetlerinde çatışma ve iş tatmini: Üçüncü basamak hastane örneği

Şafak ÇINAR¹ (ID), Uğur UĞRAK¹ (ID), Gül MERSİNLİOĞLU SERİN² (ID)

ABSTRACT

Objective: Healthcare managers spend approximately 20% of their time addressing conflicts, which is common in this labor-intensive sector. While conflict is inevitable in healthcare, ensuring job satisfaction among healthcare workers and enhancing service quality are critical for the success of healthcare systems. Proper conflict management is essential to minimize its adverse effects on job satisfaction and support patients and workers. The study examined the relationship between job satisfaction and healthcare conflict levels among healthcare workers. It also evaluated how sociodemographic characteristics influence job satisfaction and conflict levels.

Methods: This descriptive study was conducted with 276 healthcare workers employed at a tertiary public hospital. Data were collected via an online survey (Google Forms) with three sections: sociodemographic data, Job Satisfaction Scale, and Healthcare Conflict Scale. Exploratory Factor Analysis (EFA) and Confirmatory Factor Analysis (CFA) ensured validity, while Cronbach's alpha assessed reliability. Due to non-

ÖZET

Amaç: Sağlık yöneticileri, zamanlarının yaklaşık %20'sini çatışmalarla ilgilenmeye ayırmakta olup, bu durum emek yoğun bir sektör olan sağlık alanında oldukça yaygındır. Sağlık sektöründe çatışma kaçınılmaz olmakla birlikte, sağlık çalışanlarının iş tatminini sağlamak ve hizmet kalitesini artırmak, sağlık sistemlerinin başarısı için kritik öneme sahiptir. Çatışmanın iş tatmini üzerindeki olumsuz etkilerini en aza indirmek ve hasta ile çalışanları desteklemek için uygun çatışma yönetimi gereklidir. Bu çalışma, sağlık çalışanlarının iş tatmini ile sağlık alanındaki çatışma düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçlamıştır. Ayrıca sosyodemografik özelliklerin iş tatmini ve çatışma düzeyleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Yöntem: Bu tanımlayıcı çalışma, üçüncü basamak bir kamu hastanesinde çalışan 276 sağlık çalışanı ile gerçekleştirilmiştir. Veriler, sosyodemografik bilgiler, İş Tatmini Ölçeği ve Sağlık Hizmetlerinde Çatışma Ölçeği olmak üzere üç bölümden oluşan çevrimiçi anket (Google Forms) aracılığıyla toplanmıştır. Keşifsel Faktör Analizi (EFA) ve Doğrulayıcı Faktör Analizi (CFA) geçerliği sağlarken, Cronbach's alfa katsayısı güvenilirliği

¹Health Sciences University Gülhane Health Vocational School of Health Management, Ankara, Türkiye

²Republic of Türkiye Ministry of Health Directorate General for European Union and Foreign Relations, Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Şafak ÇINAR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : safak.cinar@sbu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 29.11.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 05.03.2025

normal distribution, Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis H tests were used. Structural Equation Modeling (SEM) was performed.

Results: The findings showed no statistically significant differences in job satisfaction based on sociodemographic characteristics ($p>0.05$). However, significant differences in healthcare conflict levels were observed based on age and years of professional experience ($p<0.05$). Weak positive correlation was also identified between job satisfaction and healthcare conflict levels ($r=0.15$, $p=0.019$).

Conclusion: The study reveals weak positive relationship between job satisfaction and healthcare conflict levels. While conflict levels were significantly influenced by age and professional experience, job satisfaction showed no significant sociodemographic variation. These findings highlight the need for further research to understand better the interplay between conflict and satisfaction in healthcare settings and to develop effective conflict management strategies.

Key Words: Health services administration, conflict, job satisfaction, healthcare workers

değerlendirmek için kullanılmıştır. Normallik varsayımı sağlanmadığından, Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis H testleri uygulanmıştır. Ayrıca, Yapısal Eşitlik Modellemesi (SEM) gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Sosyodemografik özelliklere göre iş tatmini açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını göstermektedir ($p>0,05$). Bununla birlikte, yaş ve mesleki deneyim yılına göre sağlık alanındaki çatışma düzeylerinde anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, iş tatmini ile sağlık alanındaki çatışma düzeyleri arasında zayıf pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($r=0,15$, $p=0,019$).

Sonuç: Çalışma, iş tatmini ile sağlık alanındaki çatışma düzeyleri arasında zayıf pozitif ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Çatışma düzeylerinin yaş ve mesleki deneyimden anlamlı bir şekilde etkilendiği, ancak iş tatmininin sosyodemografik açıdan anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, sağlık ortamlarında çatışma ve tatmin arasındaki etkileşimi daha iyi anlamak ve etkili çatışma yönetimi stratejileri geliştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sağlık hizmetleri yönetimi, çatışma, iş tatmini, sağlık çalışanları

INTRODUCTION

Conflict is defined as the confrontation of emotions, thoughts, and beliefs. Another definition describes it as environments that give rise to problems due to conflicting needs, expectations, demands, and interests (1). Conflict can occur at individual, societal, and organizational levels. Organizational conflict refers to a process in which differing perceptions emerge among workers toward organizational goals (2).

The concept of conflict has undergone significant changes in perspective over time. Between the 1930s and 1940s, it was considered a negative phenomenon

to be avoided; during the 1940s to 1970s, it was viewed as a natural occurrence; and today, it is thought to positively impact individual performance (3). Conflict is frequently experienced in healthcare organizations and requires a collaborative approach (3). The parties involved in conflicts may include nurses, doctors, and other healthcare providers or patients and even their relatives (4). Conflict, which can arise at any level, directly or indirectly affects the quality of healthcare provided to patients in institutions. A study on conflict in intensive care units revealed that conflicts stemming from communication breakdowns lead to mistrust among staff and create a burnout-inducing work environment, negatively

impacting patient safety.

The conflict has both positive and negative aspects. On the positive side, conflict provides workers with a platform to express their problems, fosters an environment for self-criticism and change, supports creativity, and stimulates interest and curiosity among workers. In this regard, it is constructive, promotes innovation, and enhances performance. As a result of conflict, changes in leadership models, increased energy for achieving work success, and a boost in motivation may occur. Additionally, workers may become more aware of their strengths (5).

The negative consequences of conflict include stress, deterioration of health, prioritization of personal goals over organizational objectives, disruption of workplace harmony, hostility, aggression, feelings of defeat and humiliation among workers, creation of an insecure environment, waste of time and energy, reduced motivation and satisfaction, and a decline in productivity (5, 6). Unresolved conflicts harm not only workers but also the organizations. Furthermore, workplace conflict is considered a source of stress that undermines an organization's efforts and performance (7).

Job satisfaction refers to individuals' subjective thoughts about how much they enjoy or dislike their work. It also enhances work enthusiasm and success. Moreover, it improves organizational efficiency, motivation, work quality, organizational commitment, and performance. A decrease in job satisfaction leads to alienation from work, reluctance, resignations, dissatisfaction, conflicts, and increased workplace accidents (8).

Several factors influence job satisfaction, including the organization's size, structure, design, and physical conditions; compensation, rewards, and incentives; employee-friendly organizational policies; communication environment; occupational health and safety; organizational culture; leadership style; training programs; career opportunities; working hours; social conditions; and the nature of workers' work (its difficulty or ease), position, benefits,

education level, and personality traits (9, 10).

Job satisfaction and conflicts are considered to be closely related to patient and employee satisfaction as well as performance. High job satisfaction among healthcare staff enhances employee and patient satisfaction (11). Effectively managing workplace conflicts and ensuring job satisfaction are crucial for improving employee performance. Conflicts negatively impact hospital staff's performance and job satisfaction (12). Managers reportedly spend approximately 20% of their time resolving conflicts, which are frequent in healthcare. Unresolved conflicts harm the healthcare system and adversely affect patient safety. An increase in conflicts experienced by physicians in hospital settings reduces the quality of patient care (13).

However, studies indicate that low levels of conflict can lead to productivity gains for both patients and workers. Appropriately managed low- and medium-level conflicts can be essential and beneficial for healthcare organizations. These benefits include improved performance and the fostering of innovative thinking (3).

A study investigating the effects of organizational conflict, job satisfaction, and stress on performance found that job satisfaction was the most influential factor affecting the performance of healthcare staff (14).

Studies investigating the differences in job satisfaction levels of healthcare workers based on sociodemographic characteristics reveal mixed results. Some studies found that job satisfaction levels differed significantly by gender (15, 16), while others reported no significant differences (17-20).

In the literature, a significant relationship between job satisfaction and age has been observed in some studies (16, 21-23), while Ashraf (20) found no such association. Education level has been identified as a significant variable influencing job satisfaction in healthcare workers (21, 24, 25), though Ashraf (20) concluded that job satisfaction was not related to education level.

Additionally, some studies have reported a relationship between job satisfaction and years of work experience (21, 26). However, Ashraf (20) and Yew, et al. (27) found no significant correlation between work experience and job satisfaction.

As seen in the literature, while variables such as gender, age, and education often show significant relationships with job satisfaction, studies presenting differing results also exist. Although most findings indicate no significant relationship between job satisfaction and years of work experience, there are exceptions suggesting otherwise. These conflicting findings highlight the need for further research to clarify these associations.

Studies examining conflict-level differences among healthcare workers based on sociodemographic characteristics reveal mixed findings. Some research indicated a relationship between age and conflict level (28), while others suggested no such relationship (29, 30). Additionally, studies found that variables such as profession, gender, and marital status were associated with exposure to violence resulting from conflict, though the same research indicated no relationship between working hours and exposure to violence (22).

In the literature on the relationship between conflict and job satisfaction, factors such as job stress stressful workplace environments, managerial support, workplace role conflicts, and work-family conflict (31-33) were found to be associated with job satisfaction. For nurses, job satisfaction was identified as a mitigating factor in the relationship between work-family conflict and anxiety. Improving working conditions, minimizing work-family conflicts, and increasing job satisfaction among nurses were considered to reduce the negative effects of work-family conflicts on anxiety (34). Furthermore, work-family conflict was reported to have negatively affected nurses' health and job satisfaction (35). High levels of conflict were noted to impact organizational efficiency and satisfaction adversely, but low levels of conflict might be beneficial particularly

in organizations where tasks beyond routine duties were assigned (36).

The literature shows that conflict is a multidimensional issue with significant implications in healthcare institutions. This study aims to examine the relationship between conflict levels involving patients and their relatives in healthcare from the perspective of healthcare workers and the job satisfaction of healthcare workers. The following alternative hypotheses were proposed to achieve the research objectives: Hypothesis 1: The job satisfaction levels of healthcare workers differ statistically significantly based on sociodemographic characteristics. Hypothesis 2: The healthcare conflict levels experienced by healthcare workers differ statistically significantly based on sociodemographic characteristics. Hypothesis 3: A statistically significant relationship exists between healthcare workers' job satisfaction and healthcare conflict levels.

MATERIAL and METHOD

The population of this descriptive, cross-sectional study consists of 970 healthcare professionals employed at a tertiary hospital in Ankara as of November, 01-30, 2023. The sample size was determined using a known population formula with equal probability sampling, calculated at a 95% confidence level and a 5% margin of error. The resulting sample comprised 275 participants. A convenience sampling method was used for data collection, and 276 analyzable surveys were obtained during the data collection process.

The data for this study were collected with an online survey, Google Forms, a commonly used method for primary data collection. The survey consisted of three sections.

The first section included seven questions related to sociodemographic characteristics, such as age, gender, years of service in healthcare, profession, education level, department, and working style.

The second section utilized the Job Satisfaction

Scale developed by Ekici, et al. (37). This scale consists of five Likert-type items with no reverse-coded items, measuring job satisfaction on a scale ranging from 1 to 5 points, where higher scores indicate higher levels of job satisfaction. The Cronbach's alpha for the original scale was 0.880.

The third section employed the Healthcare Conflict Scale, developed Forbat, et al. (38) and adapted into Turkish by Ercan and Yurdakoş (39). This scale is a three-dimensional measurement tool with five-point Likert-type items. As a single item measured one dimension, construct validity analyses were conducted again for this study to ensure validity during the adaptation process. The Cronbach's alpha for the original scale was 0.750, while the Turkish adaptation achieved a Cronbach's alpha of 0.790.

The ethical approval of the study was obtained from the Clinical Research Ethics Committee of Yıldırım Beyazıt University Yenimahalle Training and Research Hospital on December 27, 2023. After approval of the study, the data collection process was carried out between January 1, 2024, and August 31, 2024.

Since the theoretical structure of the Healthcare Conflict Scale includes a single-item dimension, an exploratory factor analysis (EFA) was conducted. Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) sample adequacy score was 0.862 and Bartlett's Test of Sphericity was 865.969 ($p < 0.001$). The variables clustered under a single factor (Eigenvalue = 4.01) with 57.27% of the total variance. Factor loadings ranged from 0.731 to 0.800. The fit indices of the structural regression model in Figure 1, were found to be at acceptable levels (CMIN/DF = 2.19, NFI = 0.982, RFI = 0.982, GFI = 0.988, AGFI = 0.983, SRMR = 0.051). The standardized regression coefficients for the Healthcare Conflict Scale ranged from 0.642 to 0.772, and for the Job Satisfaction Scale, from 0.781 to 0.875 ($p < 0.05$). Cronbach's alpha values for the Healthcare Conflict Scale and the Job Satisfaction Scale were 0.874 and 0.917, while their Composite Reliability Scores were 0.876 and 0.917. These results confirmed that both scales

possessed structural validity and internal consistency reliability.

The data collected in this study were analyzed using SPSS 26 and AMOS 24 statistical software. Descriptive statistics included frequency, percentage, mean, standard deviation, minimum, maximum, and median values. The normality of data distribution was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test and skewness and kurtosis values.

Since the assumption of normal distribution was not met for the group analyses, non-parametric tests were employed. The Mann-Whitney U test was used for comparisons among three or more groups, while the Kruskal-Wallis H test was applied for comparisons among three or more groups. For post hoc analysis, the Mann-Whitney U test with Bonferroni correction was utilized.

EFA and CFA were conducted for validity analysis. Reliability analysis utilized Cronbach's alpha and composite reliability coefficients.

The relationship between the Healthcare Conflict Scale and the Job Satisfaction Scale, along with CFA, was evaluated using the structural regression model within the framework of a structural equation model. Since the dataset did not meet the multivariate normality assumption (Multi Kurtosis = 38.089, c.r. = 17.104), the Unweighted Least Squares (ULS) estimation method with bootstrap resampling at a 95% confidence interval was employed for analysis. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

The study was approved by the Yıldırım Beyazıt University Scientific Researches Ethics Committee (Date: 27.12.2023 and Number: E-2023-85).

RESULTS

Most participants were female (60.5%, $n = 167$), while males constituted 39.5% ($n = 109$), reflecting the predominance of women in healthcare (Table 1). The mean age of the participants was 36.91 years ($SD = 8.42$), with 30.8% ($n = 85$) aged ≤ 30 years, 29.7% ($n = 82$) aged 31-40 years, and 39.5%

(n = 109) aged ≥ 41 years. In terms of education, the largest group consisted of participants with a bachelor's degree (58.0%, n = 160), followed by those with a postgraduate degree (19.9%, n = 55). The profession most frequently represented was nursing (47.5%, n = 131), followed by health officers/technicians (16.3%, n = 45) and emergency medical technicians/paramedics (14.5%, n = 40). Regarding the departments where participants worked, 21.0% (n = 58) were in clinics, 20.3% (n = 56) in emergency

services, and 19.6% (n = 54) in administrative units. In terms of professional experience, 36.2% (n = 100) had <10 years of experience, 37.3% (n = 103) had 11-20 years, and 26.4% (n = 73) had >20 years. Analysis of work schedules revealed that 51.1% (n = 141) worked rotational shifts (day/night), 46.0% (n = 127) worked exclusively during the day, and 2.9% (n = 8) worked exclusively at night.

This study analyzed job satisfaction levels among healthcare workers based on gender, age, education,

Table 1. Descriptive findings of sociodemographic characteristics of healthcare workers

Characteristics	Subcategory	n	%
Gender	Male	109	39.5
	Female	167	60.5
Age Range: 22-55, Mean \pm SD: (36.91 \pm 8.42) year	Up to 30 years ¹	85	30.8
	31-40 years ²	82	29.7
	41 years and above ³	109	39.5
Education	High School	10	3.6
	Associate degree	51	18.5
	Bachelor's Degree	160	58.0
	Postgraduate Degree	55	19.9
Profession	Emergency Medical Technician/Paramedic	40	14.5
	Physician	19	6.9
	Midwife	10	3.6
	Nurse	131	47.5
	Administrative Personnel	31	11.2
	Health Officer/Technician	45	16.3
Department	Emergency Services	56	20.3
	Operating Room/Interventional Lab	47	17.0
	Administrative Units	54	19.6
	Clinic	58	21.0
	Laboratory	19	6.9
	Outpatient Clinic	20	7.2
	Intensive Care Unit	22	8.0
Years of Experience	Less than 10 years ¹	100	36.2
	11-20 years ²	103	37.3
	More than 21 years ³	73	26.4
Work Schedule	Night Shift Only	8	2.9
	Day Shift Only	127	46.0
	Rotational (Day/Night)	141	51.1
Total		276	100.0

profession, department, years of experience, and work schedule (Table 2). The median job satisfaction score was 16.0 for males and 14.0 for females, with no significant difference ($p = 0.218$). Health workers aged 41 and older had a median score of 16.0, compared to 14.0 for those 30 and younger, but this was not statistically significant ($p = 0.066$). Postgraduate workers scored a median of 17.0, while high school graduates scored 15.0, with no significant difference (p

$= 0.188$). Physicians (median =17.0) and administrative staff (median =16.0) reported higher scores, but post hoc tests found no significant differences between professions ($p = 0.034$). Operating room staff had the highest median score (median =17.0), while intensive care staff scored the lowest (median =11.0), but department differences were not significant ($p = 0.258$). Years of experience and work schedule also showed no significant impact on job satisfaction ($p > 0.05$).

Table 2. Evaluation of job satisfaction levels based on sociodemographic characteristics of healthcare workers

Characteristics	Subcategory	n	Job Satisfaction		p	Post Hoc
			Median	Min-Max		
Gender	Male	109	16.0	5.0 - 25.0	0.218 ^U	-
	Female	167	14.0	5.0 - 25.0		
Age	Up to 30 years ¹	85	14.0	5.0 - 25.0	0.066 ^H	-
	31-40 years ²	82	14.0	5.0 - 24.0		
	41 years and above ³	109	16.0	5.0 - 25.0		
Education	High School	10	15.0	8.0 - 21.0	0.188 ^H	-
	Associate degree	51	14.5	5.0 - 25.0		
	Bachelor's Degree	160	14.0	5.0 - 25.0		
	Postgraduate Degree	55	17.0	5.0 - 25.0		
Profession	Emergency Medical Technician/Paramedic	40	14.5	5.0 - 25.0	0.034 ^H	>0,05
	Physician	19	17.0	5.0 - 25.0		
	Midwife	10	10.0	5.0 - 16.0		
	Nurse	131	14.0	5.0 - 25.0		
	Administrative Personnel	31	16.0	5.0 - 25.0		
	Health Officer/Technician	45	16.0	5.0 - 25.0		
Department	Emergency Services	56	14.0	5.0 - 25.0	0.258 ^H	-
	Operating Room/Interventional Lab	47	17.0	5.0 - 25.0		
	Administrative Units	54	16.0	5.0 - 25.0		
	Clinic	58	14.0	5.0 - 25.0		
	Laboratory	19	11.5	5.0 - 19.0		
	Outpatient Clinic	20	12.5	5.0 - 24.0		
	Intensive Care Unit	22	11.0	5.0 - 21.0		
Years of Experience	Less than 10 years ¹	100	13.0	5.0 - 25.0	0.231 ^H	-
	11-20 years ²	103	15.0	5.0 - 25.0		
	More than 21 years ³	73	16.5	5.0 - 25.0		
Work Schedule	Night Shift Only	8	16.5	9.0 - 20.0	0.184 ^H	-
	Day Shift Only	127	16.0	5.0 - 25.0		
	Rotational (Day/Night)	141	13.0	5.0 - 25.0		

U: Mann Whitney U Test, H: Kruskal Wallis H Test, Post Hoc: Mann Whitney U Test with Bonferroni Correction at 95% Confidence Interval, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

The findings on healthcare conflict levels among workers are as follows: the median conflict score was 18.0 for males and 19.0 for females, with no significant difference by gender ($p = 0.975$) (Table 3). In terms of age, a significant difference was observed ($p = 0.004$). Workers under 30 years had a median score of 17.0, rising to 21.0 in the 31-40 age group,

with the difference being statistically significant ($p < 0.01$). High school graduates had a median score of 16.0, compared to 20.0 for those with postgraduate education, but this difference was not significant ($p = 0.114$). No significant differences were found between professions ($p = 0.350$), although emergency medical technicians and paramedics had the highest

Table 3. Evaluation of healthcare conflict levels based on sociodemographic characteristics of healthcare workers

Characteristics	Subcategory	n	Healthcare conflict		p	Post Hoc
			Median	Min-Max		
Gender	Male	109	18.0	7.0 - 35.0	0.975 ^U	
	Female	167	19.0	7.0 - 33.0		
Age	Up to 30 years ¹	85	17.0	7.0 - 35.0	0.004 ^H	1-2**
	31-40 years ²	82	21.0	7.0 - 35.0		
	41 years and above ³	109	19.0	7.0 - 31.0		
Education	High School	10	16.0	7.0 - 35.0	0.114 ^H	
	Associate degree	51	18.0	7.0 - 32.0		
	Bachelor's Degree	160	19.0	7.0 - 35.0		
	Postgraduate Degree	55	20.0	11.0 - 29.0		
Profession	Emergency Medical Technician/Paramedic	40	21.0	7.0 - 32.0	0.350 ^H	
	Physician	19	20.0	11.0 - 29.0		
	Midwife	10	19.0	7.0 - 25.0		
	Nurse	128	18.0	7.0 - 33.0		
	Administrative Personnel	31	20.0	7.0 - 35.0		
	Health Officer/Technician	45	19.0	7.0 - 35.0		
Department	Emergency Services	56	21.0	7.0 - 32.0	0.885 ^H	
	Operating Room/Interventional Lab	47	19.0	7.0 - 35.0		
	Administrative Units	54	19.5	7.0 - 35.0		
	Clinic	58	18.0	7.0 - 33.0		
	Laboratory	19	20.0	8.0 - 31.0		
	Outpatient Clinic	20	15.5	11.0 - 32.0		
	Intensive Care Unit	22	18.0	12.0 - 28.0		
Years of Experience	Less than 10 years ¹	100	17.0	7.0 - 35.0	0.006 ^H	1-2**
	11-20 years ²	103	21.0	7.0 - 35.0		
	More than 21 years ³	73	18.0	7.0 - 31.0		
Work Schedule	Night Shift Only	8	16.0	7.0 - 25.0	0.269 ^H	
	Day Shift Only	127	20.0	7.0 - 32.0		
	Rotational (Day/Night)	141	18.0	7.0 - 35.0		

U: Mann Whitney U Test, H: Kruskal Wallis H Test, Post Hoc: Mann Whitney U Test with Bonferroni Correction at 95% Confidence Interval, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

score (median =21.0). For departments, workers in emergency services had a median score of 21.0, while those in outpatient clinics scored 15.5, but the differences were not significant ($p = 0.885$). Years of experience showed a significant impact ($p = 0.006$). Workers with less than 10 years of experience scored 17.0, compared to 21.0 for those with 11-20 years, a statistically significant difference ($p < 0.01$). Finally, the median conflict score was 16.0 for night-shift workers and 20.0 for day-shift workers, with no significant differences observed by work schedule ($p = 0.269$).

Figure 1 presents the structural regression model evaluating the relationship between healthcare conflict and job satisfaction levels.

According to the structural equation model depicted in Figure 1, a statistically significant but weak positive relationship was identified between the healthcare conflict and job satisfaction level ($r = 0.185$, $p = 0.019$). It was determined that the level of healthcare conflict explains 0.3% of the variance in job satisfaction.

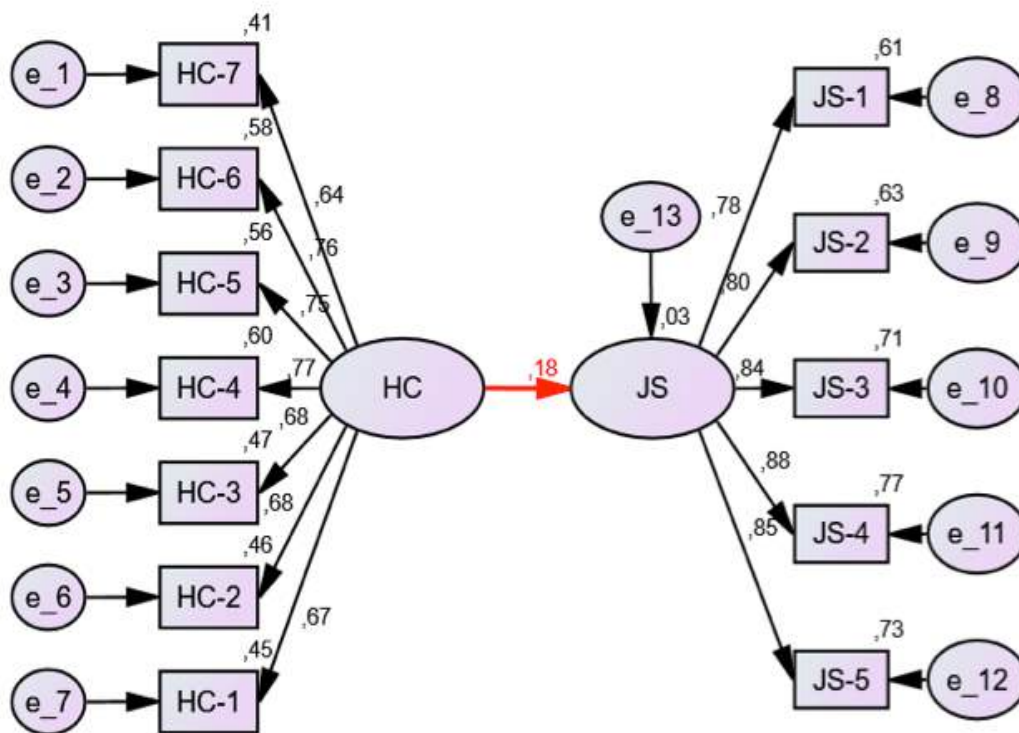


Figure 1. The structural regression model of healthcare conflict and job satisfaction
 CMIN/DF=2.19, NFI=0.982, RFI=0.982, GFI=0.988, AGFI=0.983, SRMR=0.051

DISCUSSION

This study evaluates the relationship between job satisfaction and healthcare conflict levels among healthcare workers. Additionally, the study aims to assess healthcare workers' job satisfaction and conflict levels based on their sociodemographic characteristics. In this context, structural validity analyses were conducted for the Job Satisfaction and Healthcare Conflict Scales used in the study.

The Job Satisfaction Scale's structural validity and internal consistency were demonstrated as consistent with its original theoretical structure (37), confirming its unidimensional structure. The Healthcare Conflict Scale, developed with a three-dimensional structure by Forbat, et al. (38), was adapted in Turkish by Ercan and Yurdakoş (39) without modification. In the three-dimensional structure of the scale, the "Discordant Communication Dimension" is measured with a single item. The limitations of measuring phenomena with a single item were highlighted in several studies (40). Therefore, in this study, the structural validity of the Healthcare Conflict Scale was assessed using EFA and CFA. The findings confirmed the structural validity of its unidimensional structure. Based on these findings, the necessity for further studies to establish the structural validity of the Healthcare Conflict Scale has been emphasized.

According to the findings of this study, no significant relationship was identified between sociodemographic factors such as age, education, profession, and department and job satisfaction. Therefore, Hypothesis 1 was rejected. This finding aligns with several studies in the literature (17-20). However, there are studies in the literature indicating that job satisfaction levels among healthcare workers differ significantly based on gender (15, 16).

The findings of this study support those of (20), which concluded that job satisfaction does not differ significantly based on age and education variables. However, contrary findings exist in the literature, with studies identifying a relationship between age and job

satisfaction among healthcare workers (16, 21-23).

Similarly, other studies reported an association between education level and job satisfaction among healthcare workers (21, 24, 25). The findings of this study align with those of Ashraf (20) and Yew, et al. (27), which found no relationship between healthcare workers' years of experience and job satisfaction. However, other studies, such as those by Yu, et al. (26), reported a relationship between years of experience and job satisfaction among healthcare workers. The discrepancies in the literature regarding the relationship between healthcare workers' job satisfaction levels and sociodemographic characteristics may stem from variations in the study populations.

Hypothesis 2 examined the relationship between healthcare workers' sociodemographic factors and conflict levels. The findings of this study revealed significant differences in conflict levels based on age and years of experience. Specifically, the median conflict score for the group aged under 30 years was 17.0, rising to 21.0 in the 31-40 age group. The difference between these two groups was found to be statistically significant. Similarly, a significant difference was observed in conflict levels based on years of experience, particularly between those with less than ten years and those with 11-20 years of experience. These findings evaluated that middle-aged healthcare workers in their active working period had higher levels of healthcare service conflict. It is considered that healthcare workers with less working experience may have lower conflict levels due to limited experience and authority, while older healthcare workers may exhibit lower conflict levels due to burnout or reduced expectations over time.

While conflict levels increased with higher education levels, this difference was not statistically significant. Additionally, no significant differences were identified in conflict levels based on gender, profession, or work schedule. These findings are consistent with the study by Akman and Yakut (28), which identified a significant relationship between age

and conflict levels. However, they differed from the studies by Meriç (29) and Özdemir and Özdemir (30), which reported no statistically significant differences in conflict levels based on age or years of experience. Furthermore, this study's findings do not support those of Özdamar et al. (22), who found a relationship between factors such as profession and gender and exposure to violence as an outcome of conflict.

The findings of this study indicate a significant difference between years of experience and conflict levels. These results contrast with those of Özdamar et al. (22), which reported no relationship between work hours and exposure to violence. However, in a labor-intensive sector like healthcare, where shift-based services are provided, the relationship between years of experience and conflict levels could be considered an expected outcome.

The study also found a statistically significant but weak positive relationship between healthcare workers' job satisfaction levels and healthcare conflict levels. It was determined that 0.3% of the variance in job satisfaction could be explained by healthcare conflict levels. When comparing these findings with the literature, they align with Jehn (36) conclusion that high levels of conflict in institutional settings negatively affect organizational efficiency and satisfaction, whereas low levels of conflict in institutions assigning tasks beyond routine duties can be beneficial. Additionally, the findings support Bastyr (3), who observed that low levels of conflict have meaningful and positive outcomes on job satisfaction and that conflict can positively influence individual performance. Furthermore, Hussein and Al-Mamary (5) stated that conflict facilitates changes in leadership models, increases energy and motivation for work success, and helps workers recognize their strengths. The findings of this study are consistent with those of Hussein and Al-Mamary (5).

The findings of this study differ from those of other research. For instance, Jungst and Blumberg (6) reported that workplace conflict reduces job satisfaction. Haji Matarsat, et al. (35) stated

that work-family conflict experienced by nurses negatively impacts their health and job satisfaction. Additionally, Monyei, et al. (7) identified workplace conflict as a source of stress that undermines organizational performance, while Bayar and Mete (12) emphasized the negative impact of conflicts on hospital staff's job satisfaction and performance.

This study presents findings contrary to these results, which is significant as it offers a new perspective to the literature. The difference lies in the conflict measured in this study, which specifically focuses on conflicts experienced by healthcare workers with patients and their relatives. This distinct focus provides unique insights into the dynamics of healthcare-related conflicts. High levels of conflict in the workplace reduce the motivation of healthcare workers and negatively impact the quality of patient care. Therefore, conflict is closely related to organizational commitment, job dissatisfaction, and burnout among healthcare workers. While the adverse effects of conflict are well-documented, this study has summarized findings regarding these outcomes.

One significant result of this study is the finding that low levels of conflict can positively affect job satisfaction. Managing workplace conflicts experienced by healthcare workers through effective interventions emerges as a critical necessity at both institutional and individual levels. Creating a healthier work environment that considers the needs and expectations of workers is believed to enhance employee satisfaction and improve service quality in healthcare institutions.

In this study, data were collected using a convenience sampling method from healthcare workers employed at a tertiary hospital in Ankara, limiting the generalizability of the findings. While this study addresses mainly psychosocial factors to explain the relationship between job satisfaction and conflict, it does not extensively examine structural and functional elements related to the work environment and conditions. Future studies should collect data from a larger and more representative

sample across different geographical regions and healthcare institutions. Furthermore, developing more comprehensive models to explain the relationship between job satisfaction and conflict and conducting intervention-focused studies could provide valuable contributions to the literature.

In conclusion; conflicts are a natural occurrence in the healthcare sector due to its labor-intensive nature. However, effectively managing these conflicts is crucial for maintaining efficient and effective healthcare. This study examined the relationship between conflict and job satisfaction in healthcare institutions and the demographic factors influencing this relationship. The findings revealed no significant differences between sociodemographic factors and job satisfaction. However, age and years of experience were associated with conflict levels. The differing results on these findings in the literature highlight the need for further research.

Additionally, a weak positive relationship was identified between healthcare conflict levels and job satisfaction among healthcare workers. This finding suggests that low levels of healthcare conflict might positively influence job satisfaction. The scale used in this study specifically measures how conflicts experienced by patients and their relatives in healthcare are perceived from the perspective of healthcare workers. This relationship carry deeper significance when viewed as a systemic critique by healthcare workers. However, further research is necessary considering the study's limitations and weak statistical relationship.

The study draws attention to the potential of low-level conflicts to enhance job satisfaction. It is recommended that managers develop new strategies for conflict management and that future studies support these findings.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Yıldırım Beyazıt University Scientific Researches Ethics Committee (Date: 27.12.2023 and Number: E-2023-85).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Keskin T, Ergan M, Başkurt F, Başkurt Z. Fizyoterapistlerde çatışma eğilimi ve iş doyumunu ilişkisinin belirlenmesi. *Acıbadem Üni Sağ Bil Derg*, 2021;12(1):67-71.
2. Brinkert R. A literature review of conflict communication causes, costs, benefits and interventions in nursing. *J Nurs Manage*, 2010;18(2):145-56.

3. Bastyr V. *Managing Conflict in Healthcare Organizations: The College of St. Scholastica*; 2019.
4. Kim S, Buttrick E, Bohannon I, Fehr R, Frans E, Shannon SE. Conflict narratives from the health care frontline: A conceptual model. *Conf Res Quart*, 2016;33(3):255-77.
5. Hussein AFF, Al-Mamary YHS. Conflicts: their types, and their negative and positive effects on organizations. *Int J Sci Tech Res*. 2019;8(8):10-3.
6. Jungst M, Blumberg B. Work relationships: counteracting the negative effects of conflict. *Int J Conf Manage*, 2016;27(2):225-48.
7. Monyei FE, Ezinwa PN, Agbaeze EK, Ukpere WI, Ugbam CO, Ndu V. Workplace conflict and the productivity of workers in the healthcare sector: a case study. *Corp Gov Organ Behav Rev*, 2023;7(3):70-9.
8. Bin AS, Shmailan A. The relationship between job satisfaction, job performance and employee engagement: an explorative study. *Issue Busin Manage Econom*, 2015;4(1):1-8.
9. Dziuba ST, Ingaldi M, Zhuravskaya M. Workers' job satisfaction and their work performance as elements influencing work safety. *Syst Saf*, 2020;2(1):18-25.
10. İpşirli M, Namal MK. Main factors that influence job satisfaction. *J Manage Econom Res*, 2023;21(1):205-23.
11. Deriba BK, Sinke SO, Ereso BM, Badacho AS. Health professionals' job satisfaction and associated factors at public health centers in West Ethiopia. *Human Res Health*, 2017;15:1-7.
12. Bayar Z, Mete M. Sağlıkta örgütsel çatışma ve çözüm yolları. *Selçuk Üni Sos Bil Derg*, 2022(14):73-84.
13. Okoli C, Olsen B, Falank C, Denney A, Morse B, Sawhney J. Conflict competence among resident physicians: knowledge and perception. *J Surg Edu*, 2024;81(12):103310.
14. Haryati DS, Erdiansyah R. Effect of conflict, job satisfaction, and stress on medical staff performance (study in the health facilities, West Jakarta). *Tarumanagara International Conference on the Applications of Social Sciences and Humanities (TICASH 2019)*; 2020: Atlantis Press.
15. Taniş V. Sağlık çalışanlarının algıladıkları hizmet kalitesi ile iş tatmini arasındaki ilişkinin incelenmesi: RTE Üniversite Hastanesi örneği. Yüksek Lisans tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/Sosyal Bilimler Enstitüsü, 2019.
16. Atefi N, Lim Abdullah K, Wong LP, Mazlom R. Factors influencing job satisfaction among registered nurses: a questionnaire survey in Mashhad, Iran. *J Nurs Manage*, 2015;23(4):448-58.
17. Iskandarsyah A, Shabrina A, Djunaidi A, Siswadi AGP. Mental health, work satisfaction and, quality of life among healthcare professionals during the COVID-19 pandemic in an Indonesian sample. *Psychol Res Behav Manage*, 2021:1437-46.
18. Demirbaş EZ, Özcan A, Erkasap A, Mert G. A study on demographic characteristics, job satisfaction and organizational commitment of opticians. *J Health Syst Pol*, 2022;4(1):34-57.
19. Savitsky B, Radomislensky I, Hendel T. Nurses' occupational satisfaction during Covid-19 pandemic. *Appl Nurs Res*, 2021;59:151416.
20. Ashraf MA. Demographic factors, compensation, job satisfaction and organizational commitment in private university: an analysis using SEM. *J Global Resp*, 2020;11(4):407-36.
21. Diakos GE, Koupidis S, Dounias G. Measurement of job satisfaction among healthcare workers during the COVID-19 pandemic: A cross-sectional study. *Med Int*, 2022;3(1):2.
22. Özdamar Ünal G, İşcan G, Ünal O. The occurrence and consequences of violence against healthcare workers in Turkey: before and during the COVID-19 pandemic. *Fam Pract*, 2022;39(6):1001-8.

23. Lu Y, Hu XM, Huang XL, Zhuang XD, Guo P, Feng LF, et al. The relationship between job satisfaction, work stress, work-family conflict, and turnover intention among physicians in Guangdong, China: a cross-sectional study. *BMJ Open*, 2017;7(5):e014894.
24. Yu X, Zhao Y, Li Y, Hu C, Xu H, Zhao X, et al. Factors associated with job satisfaction of frontline medical staff fighting against COVID-19: a cross-sectional study in China. *Front Pub Health*, 2020;8(426):1-9.
25. Liao MH, Wu SW, Lee CY, Shieh SH, Tsai Y. Relationship between teamwork climate, job satisfaction and healthcare quality: a cross-sectional study. https://assets-eu.researchsquare.com/files/rs-2938317/v1_covered_53254e91-f035-4b72-a1b1-999cc593a924.pdf?c=1691734944, [Accessed Date: March 30, 2023].
26. Yu X, Zhao Y, Li Y, Hu C, Xu H, Zhao X, et al. Factors associated with job satisfaction of frontline medical staff fighting against COVID-19: a cross-sectional study in China. *Front Pub Health*, 2020;8:426.
27. Yew S-Y, Yong C-C, Tey N-P, Cheong K-C, Ng S-T. Work satisfaction among nurses in a private hospital. *Int J Health Manage*, 2020;13(Sup1):156-63.
28. Akman A, Yakut E. Kişiler arası çatışma yönetimi yaklaşımlarının demografik ve kontrol değişkenleri açısından incelenmesi. *Int J Soc Sci Res*, 2018;7(2):188-210.
29. Meriç F. İşletmelerde çatışma yönetimi: Gaziantep organize sanayi bölgesinde bir uygulama: Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, 2012.
30. Özdemir AY, Özdemir A. Duygusal zeka ve çatışma yönetimi stratejileri arasındaki ilişkilerin incelenmesi: üniversitede çalışan akademik ve idari personel üzerine uygulama. *Selçuk Üni Sos Bil Enst Derg*, 2007(18):393-410.
31. Aloisio LD, Coughlin M, Squires JE. Individual and organizational factors of nurses' job satisfaction in long-term care: a systematic review. *Int J Nurs Stud*, 2021;123:104073.
32. Bruck CS, Allen TD, Spector PE. The relation between work-family conflict and job satisfaction: A finer-grained analysis. *J Voc Behav*, 2002;60(3):336-53.
33. Zaghini F, Biagioli V, Fiorini J, Piredda M, Moons P, Sili A. Work-related stress, job satisfaction, and quality of work life among cardiovascular nurses in Italy: structural equation modeling. *Appl Nurs Res*, 2023;72:151703.
34. Zhao L, Wu J, Ye B, Tarimo CS, Li Q, Ma M, et al. Work-family conflict and anxiety among nurses of the maternal and child health institutions: the mediating role of job satisfaction. *Front Pub Health*, 2023;11:1108384.
35. Haji Matarsat HM, Rahman HA, Abdul-Mumin K. Work-family conflict, health status and job satisfaction among nurses. *Brit J Nurs*, 2021;30(1):54-8.
36. Jehn KA. A multimethod examination of the benefits and detriments of intragroup conflict. *Adm Sci Q*, 1995:256-82.
37. Ekici Z, Buğra E, Kocadağ D. Sağlık çalışanlarının çalışan güvenliği algısının iş tatminine etkisi. *Sağ Akademisyen Derg*, 2017;4(2):115-25.
38. Forbat L, Mnatzaganian G, Barclay S. The Healthcare Conflict Scale: development, validation and reliability testing of a tool for use across clinical settings. *J Interprof Care*, 2019;33(6):680-8.
39. Ercan T, Yurdakoş K. Sağlık hizmeti çatışma ölçeğinin Türkçeye uyarlanması: geçerlilik ve güvenilirlik çalışması. *Cumhuriyet Üni Sağ Bil Enst Derg*, 2023;8(3):393-9.
40. Diamantopoulos A, Sarstedt M, Fuchs C, Wilczynski P, Kaiser S. Guidelines for choosing between multi-item and single-item scales for construct measurement: a predictive validity perspective. *J Academy Market Sci*, 2012;40(3):434-49.

Potential role of efflux pump inhibitors as a death traps in multidrug resistant pathogens and biofilm infections

Çoklu ilaca dirençli patojenler ve biyofilm enfeksiyonlarında eflux pompa inhibitörlerinin ölüm tuzakları olarak potansiyel rolü

Selma SEZGİN¹ (ID)

ABSTRACT

Efflux systems are transport proteins that are crucial for bacteria in maintaining their internal environment and ensuring survival. Efflux pumps extrude a lots of harmful substrate that endogenous and exogenous from bacteria to the environment. These systems have gained considerable attention due to their role in drug resistance mechanisms, which has significant implications of infection disease. This review provides the main characteristics of efflux pumps in bacteria, including the structure of pumps and provides also a perspective to efflux pump inhibitors that nacavt antibiotic resistance. Efflux pump strongly related to biofilm infection and necessary to deliver quorum sensing signal molecules. Understanding the structure and function of efflux systems may provide valuable insights into the development of novel therapeutics for infectious diseases and combating drug resistance in bacteria. The rise of multidrug-resistant bacteria poses a serious threat to global public health. International authorities, such as the World Health Organization (WHO), recognize the urgent need for effective treatments against these resistant strains. With the

ÖZET

Eflux sistemleri, bakteriler için iç ortamlarını korumada ve hayatta kalmalarını sağlamada çok önemli olan taşıma proteinleridir. Eflux pompaları, bakterilerden çevreye endojen ve eksojen birçok zararlı substratı atar. Bu sistemler, enfeksiyon hastalığında önemli etkileri olan ilaç direnci mekanizmalarındaki rolleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Bu derlemede, eflux pompalarının bakterilerdeki temel özelliklerinin, pompaların yapısını ve antibiyotik direncini ortadan kaldıran eflux pompası inhibitörlerine bir bakış açısı sunması amaçlanmıştır. Eflux pompası, biyofilm enfeksiyonu ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve quorum sensing (çevreyi algılama sistemi) moleküllerini iletmek için gereklidir. Eflux sistemlerinin yapısını ve işlevini anlamak, bulaşıcı hastalıklar için yeni terapötiklerin geliştirilmesi ve bakterilerde ilaç direnciyle mücadele konusunda değerli bilgiler sağlayabilir. Yakın zamanda hızla artan çoklu ilaca dirençli bakterilere karşı etkili mevcut antibiyotiklerin yeterli olmayacağı ve bu etkenlerle enfekte hastalara etkili bir tedavi sunulamayabileceği konusu Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) gibi uluslararası otoritelerin de gündeminde bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü beklenmekte olan bu felaketi önlemek adına bir taraftan yeni antibiyotiklerin keşfi

¹T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Halk Sağlığı Laboratuvarı, İzmir, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Selma SEZGİN
Kozagaç Mah. Özmen Cad. No: 147/4, Buca / İzmir - Türkiye
E-posta / E-mail : selma.sezgin1@saglik.gov.tr

Geliş Tarihi / Received : 20.03.2023
Kabul Tarihi / Accepted : 05.04.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.79058

Sezgin S. Potential role of efflux pump inhibitors as a death traps in multidrug resistant pathogens and biofilm infections. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 165 - 180

potential exhaustion of current antibiotics, the WHO is leading multidisciplinary efforts to discover new antibiotics and increase the efficacy of existing ones. Efflux pump inhibitors have emerged as a promising approach to combat resistant bacteria by enhancing the effectiveness of existing antibiotics. While toxicity issues have hindered the clinical use of many efflux pump inhibitors, new strategies such as the discovery of novel agents or the use of bacteriophages show potential to overcome these obstacles. The main is to provide an overview of current approaches in efflux pump inhibitors to provide a solution to the treatment of multidrug resistant bacterial infections.

Anahtar Kelimeler: Efflux-mediated resistance, efflux pump inhibitors, antibiotic resistance, biofilm

konusunda diğer taraftan eldeki antibiyotiklerin etkinliğini arttırmak konusunda çok disiplinli olarak çalışmalar yürütmektedir. Bu bağlamda eflux pompa inhibitörleri mevcut antimikrobiallerin etkinliğini arttırarak çoklu ilaca dirençli bakterilerin tedavisinde yeni yaklaşımlar sunmaktadır. Günümüze kadar tanımlanmış çok sayıda eflux pompa inhibitör adayı toksisite problemleri nedeniyle henüz klinik kullanıma girmese de yeni eflux pompa inhibitörü ajanlarının keşfi veya bakteriyofajların eflux pompa inhibitörü ajanı olarak kullanımı gibi yaklaşımlar gelecekte belki de seçici toksik etkinin sağlanması yoluyla engel teşkil eden toksisite probleminin aşılmasını sağlayabilecektir. Bu derleme çoklu ilaca dirençli bakterileri enfeksiyonlarının tedavisine bir çözüm sunabilmek adına eflux pompa inhibitörlerinde güncel yaklaşımlara bir bakış sunulmaktadır.

Key Words: Eflux pompası aracılı direnç, eflux pompa inhibitörleri, antibiyotik direnci, biyofilm

INTRODUCTION

Multidrug resistant (MDR) bacteria pose a significant challenge to the current healthcare system as they are one of the most pressing threats to public health (1). Typically, MDR bacteria are commonly associated with nosocomial infections, but the emergence of some MDR strains as prevalent causes of community-acquired infections is a crucial development that has significant implications (2). The expansion of MDR bacteria into the community is linked to elevated levels of morbidity, mortality, healthcare costs and antibiotic use, underscoring the urgency of addressing this issue. The rise of antibiotic resistance poses a serious threat to public health globally. There are growing concerns that the efficacy of current antibiotics will diminish rapidly making it

challenging to prevent, treat infections and rendering classical infections one of the leading causes of mortality. Bacteria have evolved a multitude of strategies to evade the effects of antibiotics, which encompass diverse mechanisms such as chemical alterations, enzymatic inactivation of antibiotics, modification of the antibiotic's target site, modulation of intracellular antibiotic concentrations via changes in membrane permeability or upregulation of efflux pumps (EP) (3). EP, which are pump proteins located in the all eukaryotic and prokaryotic cell membrane, are responsible for the excretion of various substances that include exogenous and endogenous out of the cell. Siderophores, quorum sensing (QS) related compounds and toxic metabolites are among the endogenous substances excreted by EP; exogenous substances include antibiotics and pollutants such

as heavy metals and solvents. Efflux pumps can be found in different types of Gram positive (GP) and Gram negative (GN) bacteria. EP, can use a single substance or several different substances as their substrate. This means that bacteria can be protected from the effects of many different chemicals such as disinfectants, dyes, biocides, antiseptic agents, as well as antibiotics, by means of efflux pumps (4). These pumps are mainly chromosomally encoded, exhibiting a highly conserved arrangement (5). To solve the antibiotic resistance problem researchers have explore various approaches, such as the development of antibiotic analogues, the use of adjuvants in combination with antibiotics, the use of multidrug EP inhibitors as alternative therapeutic agents which hold the potential to re-sensitize bacteria to antibiotics. The emergence of antibiotic-resistant bacteria is a complex issue resulting from various factors such as the inappropriate use of antibiotics in humans and animals, the lack of new antibiotics and the failure to implement effective infection control measures. Given the limited options for the development of new antibiotics, it is critical to address this problem urgently by promoting rational use of existing antibiotics and implementing measures to prevent the spread of antibiotic-resistant bacteria (6).

EP Family: Their Structure and Regulation

EP systems are a major contributor to multidrug resistance in microorganisms and cancer cells. These pump systems are broadly categorized into two types: prokaryotic and eukaryotic efflux pumps. Prokaryotic efflux pumps function primarily in bacteria, while eukaryotic efflux pumps are responsible for drug resistance in fungi, protozoa and cancer cells. However, the division between these two categories is not clear-cut, as some pumps mediate resistance in both prokaryotic and eukaryotic cells. It is imperative to understand the mechanisms of EPs to develop effective strategies for combating drug resistance in various organisms (7). Prokaryotic efflux pump proteins

play a critical role in the bacterial cell membrane by regulating the transport of toxic substances from the internal to the external cell environment. These non-specific systems are capable of identifying and expelling diverse compounds, including antibacterial agents and structurally unrelated chemicals, without modifying or degrading the drug. By extruding antimicrobial agents from the cell, efflux pumps reduce the intracellular concentration of antibiotics, which can lead to a decrease in the bactericidal effect of antibiotics and prolonged bacterial survival. This extended survival period can facilitate the accumulation of spontaneous mutations on target proteins, eventually leading to drug resistance. The six superfamilies of efflux pumps are classified based on their structural features and energy requirements, including ATP binding cassette (ABC); small multidrug resistance (SMR); major facilitator superfamily (MFC); multidrug and toxin extrusion (MATE); resistance-nodulation division (RND) and proteobacterial antimicrobial compound efflux (PACE) family (3, 8). The ABC superfamily harnesses the energy from ATP hydrolysis to drive the extrusion of substrates across cellular membranes. Its signature ATP-binding domains and transmembrane regions contribute to a well-defined structure essential for its pump function. In contrast, the SMR superfamily relies on proton motive force for substrate efflux, featuring four transmembrane helices that facilitate substrate transport. The MFS employs a diverse array of substrate-specific transporters, utilizing the electrochemical gradient to facilitate efflux. Another superfamily MATE utilizes ion gradients, particularly protons, for the extrusion of diverse substrates. The RND superfamily, predominantly found in GN bacteria, plays a pivotal role in antibiotic resistance through a tripartite structure involving inner and outer membranes and a periplasmic linker protein. Lastly, the PACE family is recognized for its involvement in resistance to antimicrobial compounds, employing diverse energy sources for efflux. Some antibioticsexcreted by efflux pumps are mentioned in Table 1.

Table 1. Families of EPs in bacteria and their associated drug substrates (9)

The Family of EP		Extruded Drug
Gram positive bacteria	ABC superfamily	Numerous drugs
	MFS family	Acridiflavine, benzalkonium, ceftrimide, chlorhexidine, pentamidine
	MATE family	Aminoglycosides, fluoroquinolones, cationic drugs
	SMR family	Acridiflavine, benzalkonium, ceftrimide
Gram negative bacteria	RND family	Numerous drugs
	ABC superfamily	Numerous drugs
	MFS family	Nalidixic acid, novobiocin

The EPs' substrate specificity is a variable characteristic that ranges from narrow to wide, depending on the pump type. For instance, tetracycline pumps exhibit a limited substrate range, while multidrug resistance efflux pumps can transport a broad range of substrates (9). The regulation of multidrug efflux pumps involves the participation of numerous transcriptional regulators or modulators, which are essential for controlling the expression of these drug EPs through complex pathways (10). It is well-established that mutational changes, exposure to antibiotics, diverse compounds or modulators can significantly alter the expression of efflux pumps, thereby impacting the efficacy of antimicrobial agents (5).

Efflux pumps require energy to transport drugs against the concentration gradient. The transport of substrates against their concentration gradient through efflux pumps necessitates energy expenditure, thus rendering efflux pumps reliant on energy sources. Two broad categories of efflux pumps are recognized based on the energy source utilized in their mechanism. Primary efflux pumps obtain their energy through the active hydrolysis of ATP, whereas secondary efflux pumps utilize the chemical gradient established by protons or ions such as sodium to derive energy (11). Efflux pump proteins are arranged in a way that provides a detailed understanding of the structure and mechanism of substrate transport.

Mutations in the promoter site or regulatory proteins can lead to the overexpression of these pumps, resulting in antibiotic resistance (12). The emergence of drug resistance in GN bacteria primarily has been linked to the cytoplasmic membrane located efflux transporters, which function to expel drugs out of the bacterial cell. The efflux pumps found in GN bacteria exhibit a greater level of complexity due to their multi-layered cell envelop. Specifically, GN bacteria possess both inner and outer membranes that are separated by the periplasmic space, thus forming a tripartite protein channel that facilitates drug efflux. Among the various efflux pumps in GN bacteria, the RND family efflux pumps have a tripartite organization and are recognized as the primary contributors to intrinsic antibiotic resistance (11). Monopart efflux proteins have the ability to transport the antibiotic from the cytoplasm into the periplasmic space. These efflux proteins are characterized by their limited range of substrates they can recognize, making them narrow-spectrum in nature. Otherwise, three-part efflux systems are responsible for transferring the antibiotic from the cytoplasm to the external environment. This type of efflux system is capable of recognizing a broad spectrum of substrates, which in turn, leads to the development of multidrug resistance. Efflux pumps for GN and GP bacteria are shown in Figure 1. In summary, monopart efflux proteins and three-part efflux systems have distinct

modes of action in expelling antibiotics from bacterial cells, with the latter being associated with a higher potential for multidrug resistance.

EPIs can be categorized based on their origin. The first category is plant-derived EPIs, which are further divided into subclasses: plant alkaloids, phenolic diterpenes, flavonoids, and polyphenols. The second category is EPIs of synthetic origin, which are further divided into subclasses: peptidomimetic compounds,

arylpiperidines and arylpiperazine derivatives, pyridopyrimidine and pyranopyridine derivatives, and quinoline derivatives. Finally, the third category is EPIs derived from microorganism. As an example of this category *Streptomyces* spp., with compounds like EA-371 α and EA-371d being recognized as definitive inhibitors of the MexAB-OprM pump in *Pseudomonas aeruginosa* (10).

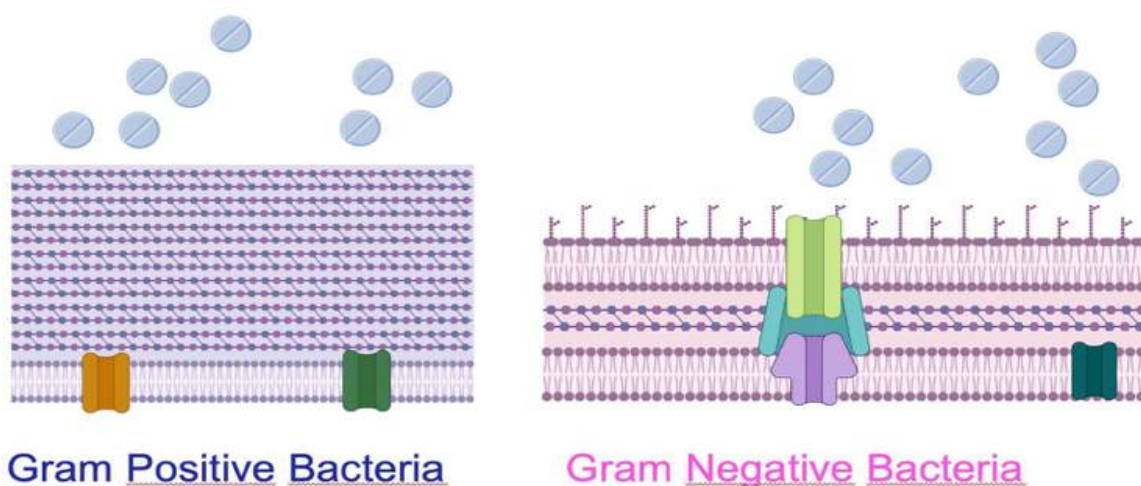


Figure 1. Efflux pump Gram positive and Gram negative bacteria

Antibiotic Resistance and Its Mechanisms

Efflux pumps are an essential component of bacterial physiology, as they facilitate the efflux of various compounds from bacterial cells. These pumps play a crucial role in the development of antibiotic resistance, as they can extrude antibiotics from bacterial cells, making the bacteria resistant to these antibiotics. Overexpressed EP cause acquired resistance in bacteria. This is due to the ability of efflux pumps to expel antibiotics from the bacterial cell, thereby reducing the efficacy of these antimicrobial agents. Efflux pumps play a significant role in both resistance and virulence. Efflux pumps have been shown to enhance the virulence properties

of bacteria directly or indirectly. For example, efflux pumps can facilitate the secretion of toxins and other virulence factors and necessary to form biofilm formation. Efflux pumps present in bacterial pathogens play a crucial role in the development of antibiotic resistance, as they demonstrate a range of functions in intrinsic, acquired, and phenotypic resistance mechanisms (5). The development of potential pump inhibitors has become an interesting research area in the fight against resistance. The use of pump inhibitors in combination with traditional antibiotics has the potential to prevent efflux-induced resistance or to re-sensitize resistant bacteria to the antimicrobial agents (13).

EPIs are a class of compounds that can inhibit the function of efflux pumps, thereby reducing the ability of bacteria to resist antibiotics. EPIs work by binding to efflux pumps and blocking their ability to pump out antibiotics. EPIs allowing antibiotics to remain within bacterial cells and effectively kill the bacteria. Studies have shown that the use of EPIs can enhance the effectiveness of antibiotics against drug-resistant bacterial infections. However, the development of effective EPIs that are safe for

human use remains a significant challenge in the field. Figure 2 presents the re-sensitization of drug-resistant bacteria. After the administration of drug-EPI therapy antimicrobial resistance change from resistant to sensitive. However, this observation is valid if there is only efflux pump resistance except all resistance mechanism. Presence of additional resistance mechanisms may prevent re-sensitization of resistant bacteria.

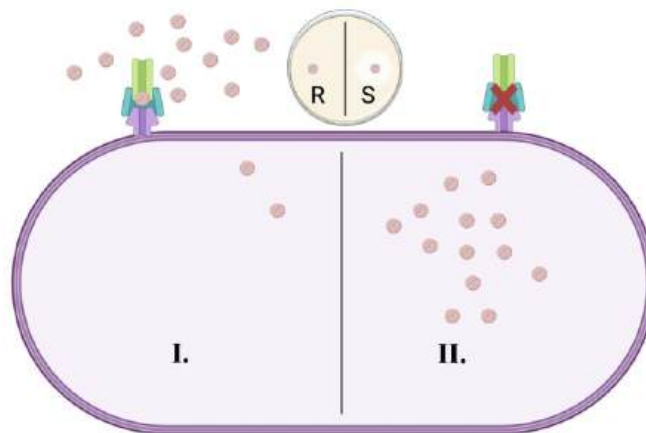


Figure 2. EP and drug resistant bacteria (I), EPI and to re-sensitized bacteria from drug resistant bacteria (II)

Efflux pump-inhibitors (EPI) are a type of antibiotic adjuvant that do not exhibit direct antimicrobial effects on their own, but rather enhance the activity of antibiotics when used in combination. By blocking the function of efflux pumps, EPIs can increase the intracellular concentration of antibiotics, which leads to improved efficacy against multidrug-resistant bacteria. One of the key advantages of using EPIs is their ability to restore the sensitivity of antibiotics that have become ineffective due to the overexpression of efflux pumps (14). Secondly, these pumps are thought to maintain low intracellular antibiotic concentrations, thereby promoting the accumulation of mutations (15). In addition to their ability to enhance antibiotic activity, EPIs can also extend the lifespan of antibiotics by reducing the

development of resistance in bacterial populations. The use of EPIs represents a promising strategy for combating antibiotic resistance, as it provides a means of improving the efficacy of existing antibiotics without requiring the development of new drugs. Thirdly EPI supports the formation of ant-biofilm activity.

Ideal EPIs should be capable of restoring the activity of an antimicrobial against both intrinsic and acquired resistance. Furthermore, they have a broad range of activity against GP and GN bacterial pumps to ensure its effectiveness against a wide range of pathogens. Additionally, to minimize adverse effects, they should not interfere with the physiological efflux pumps, which are essential for the normal functioning of the cell. Thus, efficient

EPIs should meet these criteria to be a promising candidate for combating multidrug-resistant pathogens (7).

Multiple studies have demonstrated that the use of EPI results in a reduction of the minimum inhibitory concentration (MIC) values of antibiotics. The study found that the MIC values of various anti-tuberculosis agents, namely ciprofloxacin; levofloxacin; ofloxacin; moxifloxacin, were decreased when combined with certain antibiotics and EPI such as CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone), reserpine and verapamil (16). The addition of EPI inhibitors to tuberculosis treatment is hypothesized to induce an increase in killing, which is attributed to the inhibition of macrophage calcium transporters. This inhibition results in phagolysosome acidification and activates the hydrolases necessary for the subsequent killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* (17). Verapamil, an EPI, when administered concurrently with tuberculosis treatment, has been observed to enhance both the bactericidal and sterilization effects of standard tuberculosis treatment in an animal model (18).

Antibiotic persistence, a phenomenon in which a small subpopulation of bacterial cells survive lethal antibiotic treatment, has been a topic of interest in the field of microbiology. Recent studies have shown that persisters accumulate fewer antibiotics as a result of increased efflux rates, which is attributed to higher expression of efflux-associated genes. Specifically, high expression of the AcrAB-trimeric outer membrane channel (TolC) gene has been found to be critical in promoting persister formation (19, 20). Persisters are able to survive antibiotic attack by combining active efflux with passive dormancy, allowing them to evade the effects of the antibiotic and subsequently resume growth once the antibiotic is removed. These findings shed light on the mechanisms behind antibiotic persistence and may lead to the development of novel strategies for combating persistent infections (20).

EPIs have demonstrated potential as adjuvants

to conventional antimicrobial agents, effectively reversing multi-drug resistance in pathogenic bacteria. Such a combination therapy has been shown to increase the efficacy of antibiotics against resistant strains, making them susceptible to multiple classes of antibiotic agents. Despite the availability of numerous potential EPIs described in the literature, significant challenges related to their using as therapeutic compounds, such as toxicity and limited efficacy (21).

The EPI as a candidate, must fulfill the subsequent requirements:

- Ability to effectively inhibit efflux pumps: The primary function of an EPI is to inhibit the function of efflux pumps, so a candidate should demonstrate a high level of potency in this regard.
- Synergy with antibiotics: An effective EPI candidate should be able to enhance the activity of one or more antibiotics when used in combination, resulting in a significant improvement in antimicrobial efficacy.
- Low toxicity and side effects: Since EPIs are administered in combination with antibiotics, they should have a low risk of toxicity and side effects when used in humans. The neurotoxicity of certain EPIs, such as reserpine, has been noted at the concentrations employed for bacterial infection management, as will be elucidated subsequently. The toxicity of certain EPIs can be attributed to their serotonin-agonist properties.
- Broad-spectrum activity: The ideal EPI candidate should be effective against a wide range of GP and GN bacteria, as well as against different classes of antibiotics.
- Low potential for resistance development: An EPI should not promote the development of resistance in bacterial populations, as this would undermine its ability to restore antibiotic sensitivity.
- Ability to penetrate bacterial cells: An EPI must be able to effectively penetrate bacterial cells to inhibit the function of efflux pumps and enhance antibiotic activity.

- **Cost-effectiveness:** Ideal EPI should be cost-effective, particularly in resource-limited settings where the burden of antibiotic resistance is high (22).

There exist limitations in the use of multi-drug flow pumps for the administration of antimicrobial agents in combination therapies. The incorporation of EPIs for the management of antibiotic resistance introduces an additional layer of complexity, given their potential for adverse interactions with co-administered antimicrobial agents. A notable example of such limitations is the fatal outcome observed upon co-administration of verapamil and clarithromycin, which resulted in renal dysfunction, hypotension (23).

Over the past two decades, a substantial number of inhibitors have been uncovered and patented. Despite this, the discovery, testing, and commercialization process remains notably sluggish. Among the notable inhibitors are energy decouplers, phenothiazines, analogs of widely used antibiotics, and inhibitors of serotonin re-uptake (24).

The Significance of EPI in Combating Drug-Resistant Pathogens

The emergence of multidrug-resistant bacterial infections has become a major public health concern worldwide. The escalation of antibiotic-resistant bacterial infections has emerged as a critical and pressing issue within contemporary global health contexts. Among these infectious agents, the ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. and *Escherichia coli*) pathogen group has been identified as a primary contributor to this growing concern. Among the various multidrug-resistant pathogens, the ESKAPE group has been identified as the leading cause of these infections. Efflux pump have been found to be one of the most critical mechanisms for the evolution of multidrug resistance in ESKAPE pathogens. In this regard, upregulation of efflux

pump expression represents a major mechanism employed by these pathogens to attain and sustain antibiotic resistance (21).

The WHO classifies pathogens into three priority tiers based on their degree of resistance to drugs. Among these, GN bacteria are of significant concern, given their high incidence of infections that exhibit resistance to multiple antibiotics. Table 2 presented that WHO priority pathogens list. In some cases, these strains demonstrate pan-resistance facilitated by the expression of resistance-nodulation-division (RND) superfamily efflux pumps, which are commonly found in GN bacteria. To counteract the problem of antibiotic resistance, the use of EPIs as adjuvants has emerged as a crucial strategy for restoring the effectiveness of antibiotics against drug-resistant GN bacteria (26).

EPIs assume paramount importance in addressing the antibiotic resistance exhibited by ESKAPE pathogens, as these inhibitors have the potential to enhance the efficacy of existing antibiotics. By selectively targeting and inhibiting efflux pumps, EPIs offer a strategic means to counteract the multidrug resistance mechanisms employed by ESKAPE pathogens, thereby revitalizing the therapeutic potential of antibiotics and mitigating the challenges posed by these elusive and clinically significant pathogens.

Types of Resistance

In the absence of efflux pump expression, susceptibility to antimicrobial agents is generally observed. However, other additional resistance mechanisms may also contribute to resistance in the organism. Therefore, it is important to consider the presence of such mechanisms when evaluating susceptibility to antimicrobial agents in microorganisms. The absence of efflux pump expression alone may not be sufficient to confirm susceptibility if other additional resistance mechanisms are present in the organism. Efflux-mediated antibiotic resistance can be two types:

Tablo 2. WHO priority pathogens list (24)

WHO Priority Pathogens List for Research - Development of New Antibiotics	
Priority 1: Critical	<i>Acinetobacter baumannii</i> , carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , carbapenem-resistant <i>Enterobacteriaceae</i> spp., carbapenem-resistant, ESBL-producing
Priority 2: High	<i>Enterococcus faecium</i> , vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , methicillin-resistant, vancomycin-intermediate and resistant <i>Helicobacter pylori</i> , clarithromycin-resistant <i>Campylobacter</i> spp., fluoroquinolone-resistant <i>Salmonellae</i> spp., fluoroquinolone-resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant
Priority 3: Medium	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , penicillin-non-susceptible <i>Haemophilus influenzae</i> , ampicillin-resistant <i>Shigella</i> spp., fluoroquinolone-resistant

intrinsic and acquired (5). Intrinsic resistance is the inherent ability of an organism to resist the effect of an antibiotic, while acquired resistance is defined as the alteration in the genetic material of an organism. Intrinsic resistance is characterized by the presence of efflux pumps that are expressed at basal levels, such as MexAB-OprN in *Pseudomonas aeruginosa* or TolC in *E. coli*. Acquired resistance is related to increased expression of efflux pump genes, which can be caused by mutations of the regulatory proteins. Phenotypic resistance is another type of acquired resistance where the expression of efflux pumps can be activated by specific inducers. It is possible to downregulate the expression of efflux pump genes by using transcriptional repressors. Understanding the different types of antibiotic resistance is crucial

in developing effective strategies to combat the growing problem of antibiotic resistance (10).

The findings presented in Figure 3 reveal a positive correlation between the level of antibiotic resistance and the degree of efflux pump expression. Efflux pumps play a crucial role in antibiotic resistance through three distinct mechanisms. Firstly, basal expression of efflux pumps such as *P. aeruginosa* MexAB-OprN or *E. coli* AcrAB-TolC, contribute to the inherent antimicrobial resistance of these bacteria. Secondly, acquired resistance that is stable may arise due to mutations in regulatory proteins resulting in the de-repression of efflux pump expression. Lastly, the presence of specific inducers can trigger the expression of efflux pumps, leading to transient phenotypic resistance (5).

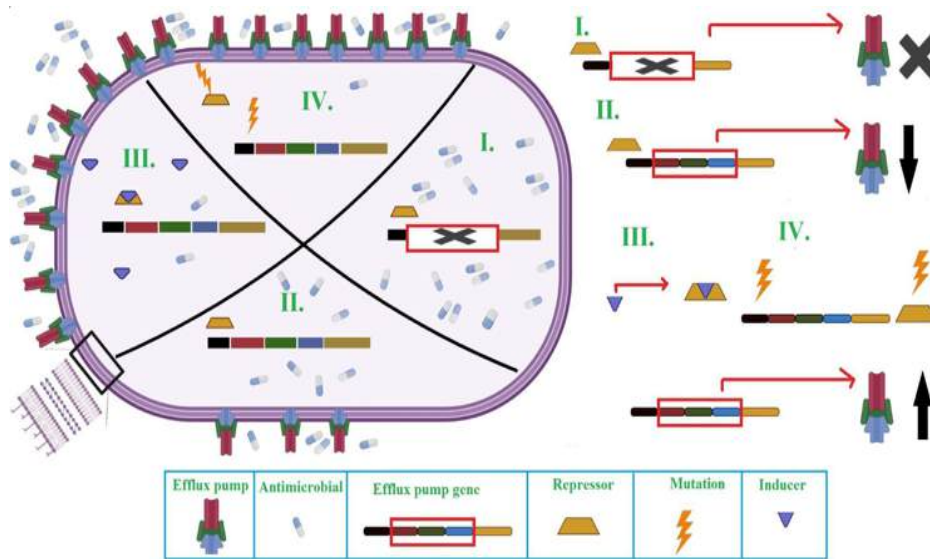


Figure 3. Efflux mediated antibiotic resistance profiles are presented in the figure.

Sensitivity of the bacteria: lack of efflux pump expression (I); intrinsic resistance: efflux pump expression at basal level (II); phenotypic resistance: triggered expression of efflux pump by inducer molecules (III); acquired resistance: de-repression of efflux pump expression as a result of mutations in regulatory proteins (IV).

The Mechanism of Efflux Pump Inhibitors as Novel Therapeutic Agents: Current Developments and Future Prospects

Efflux pump inhibition is considered to be a potentially highly efficacious strategy in combating resistance, which consequently ensures the sustained provision of the therapeutic benefits associated with existing antibiotics in the context of treatment (4). Targeting efflux pumps is a promising strategy for combating antibiotic resistance (28). There are several distinct approaches to achieve the abolishment of efflux pumps, including:

1. Downregulating the expression of efflux pump genes: This can be done by interfering with genetic regulation, for example, by using small interfering RNA (siRNA) or antisense oligonucleotides (ASOs) to target the efflux pump genes and reduce their expression (29). SiRNAs, which are composed of 21-23 base pairs (bp), have demonstrated their effectiveness as exogenous agents in manipulating gene expression in cultured cell- and animal-based

systems experimentally. Additionally, siRNAs exhibit high stability and low toxicity, further enhancing their potential as therapeutic agents. The efficacy of siRNAs was determined in a murine model of chronic *P. aeruginosa* lung infection. Specifically, the research elucidates that MexB-siRNAs effectively downregulated both mRNA expression and activity of *P. aeruginosa* in vitro. In vivo, the siRNA intervention demonstrated significant efficacy in reducing the bacterial load and mitigating the *P. aeruginosa*-induced pathological changes in the chronic lung infection model. These findings suggest that siRNAs targeting MexB could serve as a promising therapeutic approach for chronic *P. aeruginosa* lung infection (30).

2. Redesigning antibiotics that are no longer recognized as substrates: This can be achieved by modifying the chemical structure of antibiotics to make them less susceptible to efflux pumps, which can increase their effectiveness against resistant bacteria. The current understanding regarding efflux pumps is that they exhibit variable sensitivity to agents

within the same antibiotic group and the underlying mechanism remains incompletely elucidated. Notably, the efflux of new generation agents is recognized at lower rates by efflux pumps relative to their older counterparts, thereby facilitating their evasion. For instance, 3rd and 4th generation quinolones are less prone to efflux compared to 1st and 2nd generation quinolones, ketolides relative to macrolides, and glycylicyclines with respect to tetracyclines. These findings suggest that an appreciation of resistance mechanisms should be integrated into the design of novel antibiotics targeting existing groups of antibiotics (31).

3. Inhibiting the assembly of functional efflux pumps: This can be done by targeting the proteins involved in the assembly of efflux pumps, such as chaperones, to prevent the formation of functional pumps.

4. Blocking the Pump: A Strategy for Inhibiting Substrate Binding to the Active Site: This can be

achieved by designing inhibitors that target the efflux pump's active site, preventing the pump from binding to antibiotics and pumping them out of the cell.

5. Collapsing the energy mechanism responsible for energizing these pumps: This can be achieved by targeting the proton motive force that drives the efflux pump, for example, by using inhibitors of the ATP synthase, which can lead to the collapse of the energy mechanism and the inhibition of efflux pump activity (24).

6. Competitive or non-competitive pump inhibitors can effectively hide the antibiotic that possesses the efficacy from the pump. This approach has been proposed as a potential solution to combat antibiotic resistance, which has become a major global health concern. By using pump inhibitors, it may be possible to prevent the efflux of antibiotics from bacterial cells, thereby increasing their concentration and effectiveness (32). Figure 4 presented that some inhibition strategies for efflux pump.

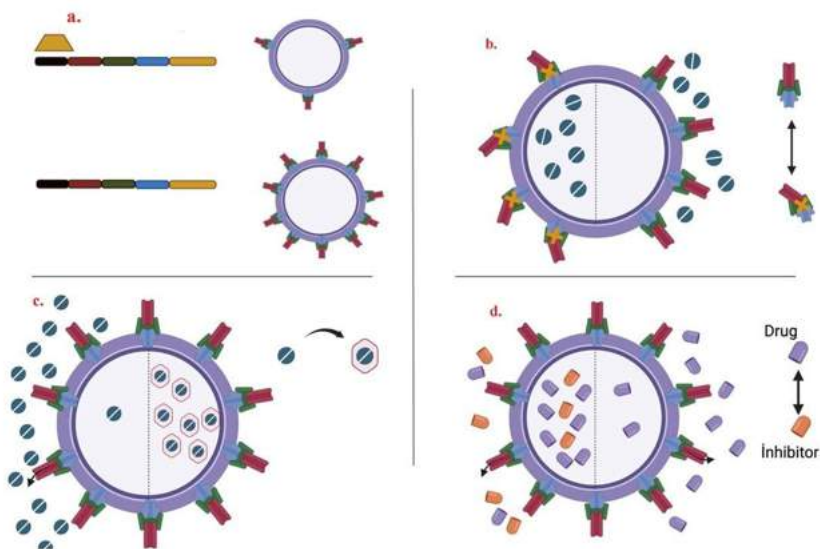


Figure 4. Inhibition strategies for EPs in bacterial cells to combat antimicrobial resistance: (Suppressed EP Gene Expression a), Disruption of Pump Assembly b), Altered Drug Structure c) and the application of competitive and non-competitive inhibitors with drugs.)

Ethidium bromide (EtBr) is a well-established substrate for assessing the activity of efflux pumps. EPIs have been developed as a potential strategy to restore the activity of antimicrobial agents against drug-resistant pathogens. EtBr is a fluorescent dye that is commonly used to estimate the potency of EPIs *in vitro*. EtBr is a substrate of efflux pumps and its accumulation within bacterial cells is inversely proportional to the activity of efflux pumps. In the presence of an EPI, the accumulation of EtBr is expected to increase, resulting in higher fluorescence intensity compared to the control without EPI (33). The potency of an EPI can be estimated by measuring the concentration at which it achieves 50% inhibition of efflux pump activity, known as the half-maximal inhibitory concentration (IC50). The use of EtBr as a marker for efflux pump activity is a well-established method for evaluating the potency of EPIs and is widely used in the field of antimicrobial drug discovery. However, it is important to note that *in vitro* results may not always translate to *in vivo* efficacy and additional studies are needed to validate the activity of EPIs in animal models and clinical trials (34).

The Role of Efflux Systems in Modulating Bacterial Virulence

It is widely believed that a symbiotic connection exists between the expression of efflux pumps and the formation of biofilms (35). Multiple investigations conducted on pathogenic organisms, have revealed a marked rise in the biofilm-producing ability of strains exhibiting specific pump protein genes. Conversely, a decrease in biofilm formation has been noted in mutants that lack the genes responsible for encoding such proteins (36).

According to several investigations, efflux pumps can perform four distinct functions in biofilm formation. First, they can transport extracellular polymeric substances (EPSs) and/or QS molecules to aid in biofilm matrix formation and regulate QS, respectively. Second, they can indirectly regulate

genes involved in biofilm formation. Third, they can expel harmful molecules, such as antibiotics and metabolic intermediates that could potentially damage or inhibit biofilm growth. Finally, efflux pumps can influence aggregation by promoting or preventing adhesion to surfaces and other cells.

The growth of microorganisms in the deep layers of biofilms is markedly inhibited due to their exposure to limited oxygen and nutrient availability, enabling them to evade the effects of antimicrobial agents. Inter-bacterial signaling pathways modulate the biofilm's physiology, facilitating the expression of efflux pumps by bacteria. Persister cells exhibit a dormancy-like state in the presence of antibiotics, whereby they evade cell death, but upon the cessation of drug exposure or stress response, they revert to a proliferative state, forming normal bacterial colonies (37). Due to the recurrence of biofilm infections and the difficulties in their treatment, new treatment approaches for biofilm removal are being investigated. QS signal is a critical step in the process of biofilm formation. The QS signal can upregulate the efflux pumps of the cell. Upregulate efflux pumps are responsible for the effective effect of the QS signal. There is a mutual relationship between efflux pumps and QS that feeds each other. Considering efflux pumps as a door, QS is one of the signaling molecule that can upregulate or downregulate these doors. In this case, EPI acts as a key that locks these open doors. EPIs provide bilateral therapeutic benefit by preventing both antibiotic resistance development and biofilm formation.

Recent studies have demonstrated that certain EPIs have the ability to inhibit biofilm formation due to their anti-biofilm activity. This finding highlights the potential of EPIs as agents that can be used in combination with antibiotics to overcome antibiotic resistance. However, despite the potential of EPIs, only MP-601205, has been tested in clinical trials. The phase 1b trial of MP-601205 in cystic fibrosis patients was eventually discontinued due to toxicity-related issues. The high doses required for EPIs to

be effective are the main reason for their toxicity, thus restricting their systemic use. Nonetheless, EPIs could be locally applied to medical devices such as catheters to prevent biofilm formation and the emergence of antibiotic-resistant pathogens (38).

Future Perspectives

Bacteriophages are viruses that infect bacteria by recognizing specific receptor binding proteins (RBPs) on the bacterial cell surface. These RBPs can include efflux pump proteins, which are capable of expelling a wide range of molecules from the bacterial cell. The recognition of these efflux pump proteins by multiple phages suggests that they may play an important role in bacterial defense against viral infection (39). The process of phage infection is initiated by the binding of viral tail fibers to particular receptors on the bacterial cell wall, such as lipopolysaccharide, teichoic acid, pili, outer membrane proteins, efflux pumps, and polysaccharide, which leads to irreversible attachment. This strict receptor specificity results in the specificity of phages against their bacterial hosts (40). When the phage binds to the EP irreversibly, the EP undergoes modification and loses its residual drug efflux function. The investigation of bacteriophages that are specifically designed to target bacterial efflux systems represents a critical area of research, as it holds considerable potential for the discovery of novel EPIs. To develop new phage therapies and manage bacterial infections, it is necessary to understand how phages recognize their bacterial hosts, including the role of efflux pump protein.

CONCLUSION

Efflux-mediated resistance has become prevalent in clinical settings and is of significant concern, especially for antibiotics that exhibit resistance to specific resistance mechanisms. Efflux-mediated MDR is a major challenge in the development of effective antibacterial agents. One potential strategy to address the challenge of antimicrobial resistance is to employ EPIs in combination with

traditional approaches such as the discovery of novel antimicrobial agents or the modification of existing ones to minimize efflux susceptibility. By targeting EPs, EPIs have the potential to increase the efficacy of existing antibiotics and restore susceptibility to previously resistant bacterial strains. This approach may enhance the efficacy of existing antimicrobials by reducing their expulsion from bacterial cells and increase the likelihood of successful treatment of resistant infections. Therefore, the use of EPIs in conjunction with conventional methods represents a promising avenue for combating antibiotic resistance and improving the efficacy of antibacterial therapies.

Preliminary findings have shown that the EPI approach can bring about multifaceted benefits in combating drug resistance and biofilm infection that related efflux pump. Specifically, the use of EPI is anticipated to reduce intrinsic resistance, broaden the spectrum of activity of antibiotics to previously non-susceptible bacterial species, reverse acquired resistance, and importantly, decrease the incidence of resistant strains emergence.

Most important characteristic of an ideal EPI would be the ability to provide selective toxic effect, targeting bacterial efflux pumps while sparing mammalian efflux pumps. It has been demonstrated that EPIs are capable of inhibiting a broad range of bacterial efflux pumps from different superfamilies, however, it is crucial that their mechanism of action does not lead to any adverse effects on mammalian cells by avoiding targeting mammalian efflux pumps. The utilization of efflux inhibitors is intrinsically linked to a pre-existing medication, given that such inhibitors typically function by augmenting the intracellular concentration of antibiotics rather than directly inhibiting bacterial growth. As a consequence, the combined use of these inhibitors and antibiotics presents a considerable challenge with regards to the compatibility of their pharmacokinetic properties (41).

The development of EPIs requires consideration of multiple factors, such as the physicochemical

structure of efflux pumps, their overexpression in bacteria, their poly-specificity properties, bacterial adaptation to toxic substrates, the mechanisms of

drug transport across bacterial membranes and the energy utilization of efflux pumps.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Schindler BD, Jacinto P, Kaatz GW. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. *Future Microbiol*, 2013;8(4):491-507.
2. Chung PY. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, 2016;363(20).
3. Kumar G, Kiran Tudu A. Tackling multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by natural products and their analogues acting as NorA efflux pump inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2023 15; 80:117187.
4. Temel A, Eraç B. A global threat: *Acinetobacter baumannii* infections, current condition in antimicrobial resistance and alternative treatment approaches. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2020; 77(3): 367-78.
5. Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, et al. Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *microorganisms*, 2016 16;4(1):14.
6. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother*, 2009;64 Suppl 1: i29-36.
7. Ughachukwu P, Unekwe P. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. *Ann Med Health Sci Res*, 2012;2(2):191-8.
8. Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol*, 2018;16(9):523-539.
9. Watkins K, Unnikrishnan M. New strategies and targets for antibacterial discovery In: Kesharwani P, Chopra S, Dasgupta A, eds. *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria*. London. Academic Press, 2020:259-72.
10. Singh T, Dar SA, Das S, Haque S. Importance of efflux pumps in subjugating antibiotic resistance. In: Kesharwani P, Chopra S, Dasgupta A, eds. *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria*. London. Academic Press, 2020: 273-99.

11. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res*, 2019;149(2):129-45.
12. Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2003;51(1):9-11.
13. Mohanty H, Pachpute S, Yadav RP. Mechanism of drug resistance in bacteria: efflux pump modulation for designing of new antibiotic enhancers. *Folia Microbiol (Praha)*, 2021;66(5):727-39.
14. Biot FV, Valade E, Garnotel E, Chevalier J, Villard C, Thibault FM, et al. Involvement of the efflux pumps in chloramphenicol selected strains of *Burkholderia thailandensis*: proteomic and mechanistic evidence. *PLoS One*, 2011 6(2):e16892.
15. Panagiotou AV, Traykovska M, Penchovsky R. Mechanisms of antibacterial drug resistance and approaches to overcome. In: Kesharwani P, Chopra S, Dasgupta A, eds. *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria*. London. Academic Press, 2020:9-37.
16. Valiyeva G, Durupinar B, Coban AY. Efflux pump effects on *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance. *J Chemother*, 2023 30:1-9.
17. Da Silva PEA, Machado D, Ramos D. Efflux pumps in mycobacteria: antimicrobial resistance, physiological functions, and role in pathogenicity. *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications*, 2016:527-59.
18. Gupta S, Tyagi S, Almeida DV, Maiga MC, Ammerman NC, Bishai WR. Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with verapamil as an efflux inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013; 188(5):600-7.
19. Wan Y, Wang M, Chan EWC, Chen S. Membrane transporters of the major facilitator superfamily are essential for long-term maintenance of phenotypic tolerance to multiple antibiotics in *E. coli*. *Microbiol Spectr*, 2021;9(3): e0184621.
20. Pu Y, Zhao Z, Li Y, Zou J, Ma Q, Zhao Y, et al. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. *Mol Cell*, 2016;62(2):284-94.
21. Brooks LE, Ul-Hasan S, Chan BK, Siström MJ. Quantifying the evolutionary conservation of genes encoding multidrug efflux pumps in the ESKAPE pathogens to identify antimicrobial drug targets. *mSystems*, 2018;3(3): e00024-18.
22. Shriram V, Khare T, Bhagwat R, Shukla R, Kumar V. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. *Front Microbiol*, 2018;9:2990.
23. Gandhi S, Fleet JL, Bailey DG, McArthur E, Wald R, Rehman F, et al. Calcium-channel blocker-clarithromycin drug interactions and acute kidney injury. *JAMA*, 2013;310(23):2544-53.
24. Bhardwaj AK, Mohanty P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2012;(1):73-89.
25. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int*, 2016:2475067.
26. Rathi E, Kumar A, Kini SG. Computational approaches in efflux pump inhibitors: current status and prospects. *Drug Discov Today*, 2020;(10):1883-90.
27. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>, [Accessed Dated : 19.03.2023].
28. Venter H, Mowla R, Ohene-Agyei T, Ma S. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Front Microbiol*, 2015;6:377.

29. Chen R, Zhao X, Hu K. Efflux pump inhibition to enhance brain targeting delivery. In: Gao H, Gao X, eds. *Brain Targeted Drug Delivery Systems: A Focus on Nanotechnology and Nanoparticulates*. London. Academic Press, 2019:185-96.
30. Gong FY, Zhang DY, Zhang JG, Wang LL, Zhan WL, Qi JY, et al. siRNA-mediated gene silencing of MexB from the MexA-MexB-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMB Rep*, 2014;47(4):203-8.
31. Aygül A. Antibiyotik direncinde dışa atım sistemlerinin ve dirençle mücadelede dışa atım pompa inhibitörlerinin önemi. *Mikrobiyol Bul*, 2015;49(2):278-91.
32. Pagès JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2009;1794(5):826-33.
33. Martins M, McCusker MP, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Pagès JM, et al. Simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. *Open Microbiol J*, 2013;7:72-82.
34. Kaatz GW, Moudgal VV, Seo SM, Kristiansen JE. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003;47(2):719-26.
35. Reza A, Sutton JM, Rahman KM. Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in Gram-Negative (ESKAPEE) bacteria. *Antibiotics (Basel)*, 2019;8(4):229.
36. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 2013;4(3):223-9.
37. Sezgin S. The Use of Therapeutic Ultrason in Control of Biofilm Infections. *Aurum J Health Sci*, 2020; 2(Supplement 1): 33-6.
38. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*, 2018;73(8):2003-20.
39. Barber OW, Miramontes IM, Jain M, Ozer EA, Hartmann EM. The future of bacteriophage therapy will promote antimicrobial susceptibility. *mSystems*, 2021;6(4).
40. Luong T, Salabarria AC, Roach DR. Phage therapy in the resistance Era: Where do we stand and where are we going? *Clin Ther*, 2020;42(9):1659-80.
41. Verma P, Tiwari M, Tiwari V. Efflux pumps in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: current status and challenges in the discovery of efflux pumps inhibitors. *Microb Pathog*, 2021;152:104766.

Atık su sürveyansı COVID-19 pandemisi izlemi için uygun bir yöntem midir?

Is wastewater surveillance an appropriate method for monitoring the COVID-19 pandemic?

Tülin ÇOBAN¹ (ID), Cavit Işık YAVUZ² (ID)

ÖZET

2020 yılında ilan edilen COVID-19 pandemisi, pandemi yanıtında sürveyans aktivitelerinin önemini gözler önüne sermiştir. Atık su sürveyansı, çeşitli konularda coğrafi ve zamansal eğilimler hakkında gerçek zamanlı verileri izleme potansiyeline sahip, hızla gelişen bir bilimsel disiplindir. Çeşitli ülkelerde başta poliovirus olmak üzere, norovirus, hepatit A, aichivirus, influenza gibi bulaşıcı hastalıkların eliminasyon programlarında, yasadışı ilaç kullanımı takibi ve antimikrobiyal direnç sürveyansında başarılı şekilde kullanılmaktadır. COVID-19 pandemisi sürecinde de atık su izlemi ile enfekte birey sayısı ve hastalık prevalansı bu yolla tahmin edilebilmektedir. Retrospektif tarama veya erken uyarı amacıyla kullanılabilen atık su sürveyansının halk sağlığı müdahaleleri için karar alma ve varyant yayılımını izleme süreçlerine de katkı sunabileceği düşünülmektedir. Atık suda SARS-CoV-2 izlemi çalışmaları pek çok ülkede devam etmektedir. Bu çalışmalar, atık suda tespit edilen viral yük ile vaka sayısı arasında belirgin bir zamansal korelasyon olduğunu ve atık su sürveyansına dayalı vaka sayısı tahminlerinin klinik doğrulanmış vakalara dayalı olarak beklenenden anlamlı düzeyde daha yüksek

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic, declared in 2020, has demonstrated the importance of surveillance activities in the pandemic response. Wastewater surveillance is a rapidly developing scientific discipline with the potential to monitor real-time data on geographic and temporal trends on a variety of subjects. It is successfully used in the elimination programs of infectious diseases such as poliovirus, norovirus, hepatitis A, aichivirus, influenza, illegal drug use follow-up and antimicrobial resistance surveillance in various countries. During the COVID-19 pandemic, the number of infected individuals and the prevalence of disease can be estimated by wastewater monitoring. It is thought that wastewater surveillance, which can be used for retrospective screening or early warning purposes, may also contribute to decision-making for public health interventions and monitoring spread of variants processes. SARS-CoV-2 monitoring studies in wastewater have revealed that there is a marked temporal correlation between the viral load detected in wastewater. However, there are important uncertainties and limitations on the subject due to the complexity of the methods and processes and the unique biological characteristics of SARS-CoV-2.

¹Altındağ İlçe Sağlık Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD., Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Tülin ÇOBAN

Altındağ İlçe Sağlık Müd. Hacettepe mah. Talatpaşa Bulvarı No: 44/A Altındağ / Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : tulincoban87x@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 26.01.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 27.12.2023

olduğunu ortaya koymuştur. Ancak yöntem ve süreçlerin karmaşıklığı ve SARS-CoV-2'nin kendine özgü biyolojik özellikleri nedeniyle konuyla ilgili önemli belirsizlik ve kısıtlılıklar mevcuttur. Enfeksiyonun farklı aşamalarında dışkıyla atılan viral yük ve bunun atık suda saptanan gen sayısı ile ilişkisi, dışkıda viral atılım süresi, viral RNA'nın dış ortamdaki yıkım hızı ve atık suda kalıcılığı gibi pek çok konu hakkında net bilgiler bulunmamaktadır. Potansiyel fekal-oral yolla bulaşma riskine karşı hijyen ve sanitasyon altyapısının geliştirilmesi ve arıtma tesislerinde etkili dezenfeksiyon yapıldığından emin olunması önerilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) de, COVID-19 pandemisi yönetiminde kullanılabilecek olan sürveyans türlerinden biri olan "atık su sürveyansı"nın tüm yararlarına rağmen, klinik sürveyansa "alternatif" olarak değil "tamamlayıcı" olarak kullanılabileceğini belirtmektedir. Bütün bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, ülkemiz için finansal kaynakların ve insan gücünün atık su sürveyansı yerine salgınla mücadelede işe yaradığı epidemiyolojik olarak kesin kanıtlanmış olan önlemler için kullanılmasının daha uygun olacağı düşünülmektedir. Bu derlemede, atık su sürveyansının örnekler üzerinden değerlendirilmesi, olası faydalarının ve konuyla ilgili olası sorun ve kısıtlılıkların ortaya konması ve öneriler sunulması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Halk sağlığı sürveyansı, atık su, lağım, SARS-CoV-2, COVID-19, pandemi

There is no clear information on many subjects such as the viral load excreted in the feces at different stages of the infection and its relationship with the number of genes detected in the wastewater, the viral excretion time in the feces, the degradation rate of the viral RNA in the external environment and its persistence in the wastewater. It is recommended to develop hygiene and sanitation infrastructure and to ensure effective disinfection in treatment facilities against the potential risk of fecal-oral transmission. Also, World Health Organization (WHO) states that despite all the benefits of "wastewater surveillance", which is one of the types of surveillance that can be used in the management of the COVID-19 pandemic, it can be used as a "complementary" rather than an "alternative" to clinical surveillance. When all these findings are evaluated together, it is thought that it would be more appropriate for our country to use financial resources and manpower for measures that have been epidemiologically proven to be effective in the fight against the pandemic, rather than wastewater surveillance. In this review, it is aimed to evaluate wastewater surveillance through examples, to reveal its possible benefits, possible problems and limitations on the subject, and to present recommendations.

Key Words: Public health surveillance, wastewater, sewage, SARS-CoV-2, COVID-19, pandemics

GİRİŞ

Koronavirüsler, soğuk algınlığı gibi toplumda yaygın görülen ve kendi kendini sınırlayan hafif enfeksiyon tablolarından, Orta Doğu Solunum Sendromu (Middle East Respiratory Syndrome, MERS) ve Ağır Akut Solunum Sendromu (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) gibi daha ciddi enfeksiyon tablolarına neden olabilen büyük bir

virüs ailesidir. 7 Ocak 2020'de daha önce insanlarda tespit edilmemiş yeni bir koronavirüs (SARS-CoV-2) tanımlanmıştır. Bu etkenin neden olduğu hastalığın (Yeni Koronavirüs Hastalığı, COVID-19) hızla yayılan bir salgın haline gelmesiyle, DSÖ 30 Ocak 2020'de "uluslararası boyutta halk sağlığı acil durumu", 11 Mart 2020'de ise "pandemi" ilan etmiştir. Türkiye'de ilk COVID-19 vakası da 11 Mart 2020'de görülmüştür (1). Mevcut tüm kanıtlar, SARS-CoV-2'nin zoonotik bir

kaynağı olduğunu düşündürmüştür. İnsandan insana bulaş özelliği kazanması nedeniyle COVID-19 pozitif kişiler de kaynak haline gelmektedir. Hastalık esas olarak damlacık yoluyla bulaşmaktadır. Asemptomatik kişilerin solunum yolu salgılarında da virüs tespit edilebildiğinden bu kişiler de bulaştırıcı olabilmektedir. Solunum yolu örnekleriyle karşılaştırıldığında, dışkı örnekleri daha yüksek viral yüke, daha yüksek pozitiflik yüzdesine ve farklı hastalık seyri ve çeşitli semptomatik duruma göre daha stabil pozitifliğe sahiptir (1,2). Solunum yolu ve dışkı örneklerinde viral yayılmanın, son maruz kalımdan sonra sırasıyla 45 ve 40 güne uzadığı gösterilmiştir (3). Virüsün lağımında üç gün, katı dışkıda 3-4 gün yaşamını devam ettirdiğini, enterositlerde çoğalabildiğini ve vakaların yaklaşık %10'unun gastrointestinal semptomlarla (ishal gibi) ortaya çıktığını gösteren çalışmalar olmakla birlikte çalışmalarda çelişkili bulgular da bulunmaktadır (4,5). Kesin vakaların hem orofaringeal hem de fekal örnekler negatifleştiğinde “negatif” olarak kabul edilmesi gerektiğini ve yanlış negatiflik olasılığından kaçınmak için dışkı örneklerinin de test edilebileceğini savunan görüşler mevcuttur (2).

Salgın boyunca Türkiye'nin yaklaşımı kademeli olarak salgının sınırlandırılması, baskı altına alınması ve zararlarının azaltılması şeklinde ilerlemiştir. Saha ve klinik işbirliği ile salgın eğrisindeki yükselişin yavaşlatılmasına ve COVID-19'a bağlı tıbbi sonuçların (ağır hastalık, yoğun bakım gereksinimi, ölüm, engellilik vb) ağırlaşmasının önüne geçilmeye çalışılmıştır (1). Bu derlemede, salgın yönetimde kullanılabilecek olan sürveyans türlerinden biri olan “atık su sürveyansı”nın örnekler üzerinden değerlendirilmesi, olası faydalarının ve konuyla ilgili olası sorun ve kısıtlılıkların ortaya konması ve öneriler sunulması amaçlanmıştır.

SÜRVEYANS TANIMI VE AMAÇLARI

Halk sağlığı sürveyansı, “halk sağlığı uygulamalarının planlanması, uygulanması ve değerlendirilmesi için gerekli olan sağlıkla ilgili verilerin sürekli, sistematik bir şekilde toplanması,

analizi ve yorumlanması” şeklinde tanımlanmaktadır (6). Etkili bir sürveyans sistemi sağlık olaylarının tespiti ve bildirim, ilgili verilerin toplanması ve birleştirilmesi, vakaların veya salgınların araştırılması ve klinik ve/veya laboratuvar açısından doğrulanması, rutin analiz ve raporların oluşturulması, veriyi sağlayanlara geri bildirim yapılması, verilerin daha merkezi seviyelere ve yönetim mercilerine iletilmesi gibi bileşenleri içermelidir (6).

COVID-19 İZLEMİNDE KULLANILABİLECEK SÜRVEYANS YÖNTEMLERİ

DSÖ ve Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'ne (European Center for Disease Prevention and Control, ECDC) göre COVID-19 küresel sürveyansının amaçları ve bu amaçlara göre COVID-19 izleminde kullanılabilecek sürveyans yöntemleri Tablo-1'de verilmiştir (7, 8).

Çevresel sürveyans, su kaynakları veya atık suyun patojen kanıtı açısından test edilmesidir. Ülkemizde rutin çevresel sürveyans ile takip edilen en önemli hastalıklardan biri Lejyoner hastalığıdır. Lejyoner hastalığında vaka sürveyansı tanı ve bildirim kapsarken çevresel sürveyans kaynağın araştırılması ve hastalığa yol açan kontamine su kaynaklarının belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Temel amaç vakanın bulaş kaynağını bularak bu kaynaktan başkalarına bulaşı engellemektir. Ülkemizde hastalığın klinik özellikleri, tanı ve bildirim, çevresel sürveyans çerçevesi ve kontrol stratejileri mevzuatla belirlenmiştir (9).

ATIK SU SÜRVEYANSI

Çevresel sürveyansın bir alt bileşeni olan “atık su sürveyansı”, çeşitli konularda coğrafi ve zamansal eğilimler hakkında gerçek zamanlı verileri izleme potansiyeline sahip, hızla gelişen bir bilimsel disiplin olarak öne çıkmaktadır. Atık su sürveyansının temel prensibi kanalizasyon yoluyla atılan vücut salgılarında belirli kimyasal ve biyolojik ajanların tespit edilmesidir. Ölçülen konsantrasyon, ajanı atan popülasyonun büyüklüğü hakkında çıkarım yapmak ve topluluk düzeyinde sağlık bilgisi elde etmek için

Tablo 1. Sürveysan amaçlarına göre COVID-19 izleminde kullanılabilir sürveysan yöntemleri (7,8)

Sürveysan Amaçları	Sürveysan Yöntemi
Hastalık yükünü tahmin etmek, eğilimlerin yönünü değerlendirmek ve uygun hafifletme önlemlerini belirlemek amacıyla COVID-19'un toplumdaki yoğunluğunu, coğrafi yayılımını ve şiddetini izlemek	- Kapsamlı sürveysan - Sentinel sendromik sürveysan - Hastane tabanlı SARI* sürveysanı - Mortalite sürveysanı - Telefon hatları aracılı katılımlı sürveysan - Aktif sürveysan - Çevresel sürveysan
İlaç ve aşı gelişimine katkıda bulunmak ve ciddi enfeksiyon belirteçlerini belirlemek için virüsteki değişimleri izlemek	- Virolojik sürveysan - Genomik sürveysan - Çevresel sürveysan
Önleme çabaları için hedefleri daha spesifik hale getirmek için risk gruplarının en çok etkilendiği durumları izlemek	- Hastaneye yatırılan vakaların gelişmiş sürveysanı - Mortalite sürveysanı
Salgın eğrisinin gidişatını tahmin etmek için salgının sağlık sistemi üzerindeki etkisini izlemek ve kaynak tahsisi ve acil durum desteği hakkında bilgi edinmek	- Sağlık hizmetleri sürveysanı - Telefon hatları aracılı katılımlı sürveysan
Önlem seçimini ve zamanlamasını ayarlayabilmeleri için etkilileri bilgilendirmek üzere herhangi bir etki azaltma önleminin etkisini izlemek	- ILI/ARI sürveysanı** - Telefon hatları aracılı katılımlı sürveysan - Toplum tabanlı seroprevalans çalışmaları - Temaslı takibi
Sağlık çalışanlarını ve hastaları korumak için hastane salgınlarını tespit etmek ve kontrol altına almak	- Nozokomiyal salgınların ve uzun süreli bakım tesislerindeki salgınların rutin sürveysanı
Ağır hastalık ve kötü sağlık sonuçları açısından en fazla risk altında olanları korumak için uzun süreli bakım tesislerinde ve diğer kapalı topluluklarda salgınları tespit etmek ve kontrol altına almak	

*SARI: Severe Acute Respiratory Infections (Ağır Akut Solunum Yolu Enfeksiyonları)

**ILI: Influenza-like Illness (Influenza-benzeri Hastalık);

ARI: Acute Respiratory Infections (Akut Solunum Yolu Enfeksiyonları)

kullanılır. İlk olarak 1990'larda sıvı evsel atıkların çevresel etkilerini izlemek için kullanılan yöntem, o zamandan beri çeşitli ülkelerde başta poliovirus olmak üzere, norovirus, hepatit A, aichivirus, influenza gibi bulaşıcı hastalıkların eliminasyon programlarında, yasadışı ilaç kullanımı takibi ve antimikrobiyal direnç sürveysanında başarılı şekilde kullanılmıştır ve

kullanılmaya devam etmektedir (10). Örneğin; 2018 yılında yeni bir norovirus varyantının atık sularda izlenmesi ile ilk vakanın tanı almasından önce virüsün toplumda dolaşımında olduğu saptanmıştır (11).

Özellikle, polio eradikasyonu için altın standart akut flask paralizi (AFP) sürveysanıdır. Ancak enfekte bireylerin (semptomatik olsa da olmasa da) birkaç

haftaya kadar dışkılarında virüs saçtıkları ve virüs partiküllerinin enfeksiyöz özelliklerini değişken sürelerde devam ettirdiği bilinmektedir. Bu nedenle bağışıklama kapsayıcılığı düşük, AFP sürveyansı kısıtlı ve dolaşımda vahşi virüs ya da aşı kaynaklı poliovirus (vaccine-derived poliovirus, VDPV) bulunduğu kanıtlanmış olan ülkelerde atık su sürveyansı da önerilmektedir. İsrail’de 2013 yılında vahşi poliovirus tip-1’in yeniden yayılmaya başlaması hiçbir klinik vaka raporlanmaksızın atık sularda yapılan rutin çevresel sürveyans ile tespit edilmiştir. DSÖ, poliovirus ile mücadelede çevresel sürveyans kullanımında karşılaştırılabilir veri elde edebilmek için yayımladığı rehberlerde analiz protokolünün basamaklarını ayrıntılı olarak açıklamıştır (12). İtalya’da SARS-CoV-2 için yapılan atık su analizinde, bahsedilen DSÖ protokolünden yararlanılmış ve bu protokolün gerekli modifikasyonlardan sonra zarflı virüsler için de uygun olduğu gösterilmiştir (13).

Günümüzde atık su sürveyansının yoğun ve etkili şekilde kullanıldığı alanlardan biri “antimikrobiyal direnç”tir. Atık sudan elde edilen verilerin klinik sürveyans ile korele olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Atık su sürveyansı, hastane dışı toplumdaki, geniş, temsil edici, birleştirilmiş veri sağladığı gibi sadece sıklıkla kültürü yapılanları değil, tüm bakteri türlerini incelemeye olanak sağlar. (14). Atık sular, aynı zamanda uyuşturucu ve endokrin bozucular gibi çeşitli kimyasal atıkları da bulundurmakta ve benzer prensip ile bu kimyasalların da epidemiyolojik izleminde kullanılmaktadır. Bu yönleriyle atık suların içeriği, toplum sağlığı ile ilgili önemli veriler içeren bir bilgi kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Atık su sürveyansı, aynı zamanda ucuz ve kolay bir yöntem olarak kabul edilmektedir (15).

COVID-19’DA “ATIK SU SÜRVEYANSI”

SARS-CoV-2 virüsünün dışkıyla atılımı söz konusu olduğundan salgının takibi ve yönetimi konusunda atık suların elverişli bir araç olup olmadığı tartışılmaktadır. Atık suların enfekte kişi sayısı tahminini sağlayabileceği, salgın dinamiklerini ortaya

koyabileceği, erken uyarı için işe yarayabileceği belirtilmekte; konuyla ilgili çeşitli ülkelerden yapılan araştırma sayısı giderek artmaktadır (16). Çeşitli yöntem ve formüllerle atık sularda SARS-CoV-2 miktarı saptanarak potansiyel olarak enfekte olmuş birey sayısı tahmin edilebilmekte ve COVID-19 prevalansı hesaplanabilmektedir. Model verisi ile klinik sürveyans verisinin karşılaştırılması, beklenen/güncel enfeksiyon hızındaki trendleri anlamaya ve asemptomatik ve/veya presemptomatik vaka sayısını tahmin etmeye yardımcı olmaktadır (17).

COVID-19’DA “ATIK SU SÜRVEYANSI”NIN OLASI FAYDALARI

Önceki deneyimlerden ve yeni çalışmalardan yola çıkılarak COVID-19 için atık su sürveyansının kullanım alanları ve olası faydaları tanımlanmıştır. Salgında tüm topluma test yapmak zor olduğundan hastalığın sıcak noktalarını saptayarak izolasyon ve tedavi çalışmalarını bu noktalardan başlatmanın faydalı olabileceği ve dünyada bulunan yaklaşık 105.600 atık su arıtma tesisinin sürveyans amacıyla kullanılmasıyla milyarlarca insanın sağlık profiline monitörize edilebileceği ifade edilmektedir. Özellikle klinik sürveyans imkanları (sağlık kuruluşlarına ulaşım, test kapasitesi) kısıtlı, sanitasyon olanakları yetersiz olan ve fekal-oral bulaşın olası olduğu toplumlarda işe yarayabileceği düşünülen bir yöntemdir. Erken dolaşımı saptamak için retrospektif tarama amacıyla kullanılabilir, örneğin; İtalya’da atık su örneklerinin analizi SARS-CoV-2 RNA’sının Kuzey İtalya’da Aralık 2019’dan bu yana dolaşımda olduğunu göstermiştir (18). Toplumun temsil etme potansiyeli, bireysel klinik testten daha kolay ve daha ucuz olması bu yöntemin önemli avantajlarıdır (19).

COVID-19 sürveyansı bağlamında “erken uyarı” terimi, salgının erken dönemde sinyal vermesi ve enfekte birey sayısında ivmelenen bir artışın önceden gözlenmesi açısından yorumlanmaktadır. Atık su sürveyansının aktif bir erken uyarı aracı olması için zamanında uygulanması ve bulguların doğru yerlere, doğru zamanda ulaştırılması gereklidir. Prevalansı

yeterince yüksek olduğu ülkelerde nicel bulgular, sağlık kurumlarına hazırlanma süresi sağlar. Bu yönüyle klinik sürveyansa “tamamlayıcı” bir yaklaşım sunar (19). Üç büyük COVID-19 dalganmasını kapsayan 86 haftalık bir sürveyans çalışmasında, Houston şehrindeki SARS-CoV-2 RNA viral yükleri 39 atık su arıtma tesisinde ölçülmüştür. Sonuç olarak atık sudaki pozitiflik sıklığının, hastanelerde COVID-19 ile ilgili genel yatak kullanım sıklığı ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (20).

Atık su sürveyansı; huzurevi, cezaevi, okul ve yurt gibi kurumlarda “birleştirilmiş (pooled) test” yapılabilmesini sağlayarak zaman kazandırmaktadır (21-23). ABD’de 16 eyaletten farklı sosyoekonomik ve politik çeşitlilikteki kırsal ve kentsel ortamları temsil eden 25 üniversitede yapılan bir atık su izlemi çalışmasında; bu yöntemin tüm öğrencileri taramaktan daha ucuz olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada klinik test için öncelik verilecek olan ve enfekte birey tespit edilen alanlarda test yapılana kadar karantinaya alınacak olan öğrencilerin belirlenmesini sağladığı belirlenmiştir. Ancak izolasyon süresini tamamladıktan sonra yatakhaneye dönen öğrencilerin virüsü dışıyla atmaya devam etmesi sonuçları yorumlamayı karmaşıktırmaktadır (22). Arizona Üniversite’sinde öğrenci yatakhaneğinde atık suda SARS-CoV-2 viral genomu saptandıktan sonra 311 öğrencinin tamamına test yapılmış ve iki asemptomatik taşıyıcı tespit edilmiştir. Böylece potansiyel bir salgının önlenmesi sağlanmıştır. Atık su verileri, bireysel veriler ve üniversitenin kendine özgü kurumsal ve sosyal dinamikleri ile birlikte yorumlanarak veri görselleştirme araçları ile öğrencileri bilgilendirmek için kullanılmıştır (23).

Atık su sürveyansının, halk sağlığı müdahaleleri için karar alma ve bu kararların etkisini değerlendirme süreçlerinde de katkı sunabileceği düşünülmektedir (24-26). Fransa’da kapanmanın SARS-CoV-2 dinamikleri üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla Paris’te bulunan üç atık su arıtma tesisinden örnekler alınarak gerekli analizler yapılmıştır. Bu analizler sonucunda kapanmanın beklendiği bir sonucu

olarak yeni COVID-19 vaka sayılarındaki azalmaya paralel şekilde viral genomda daha belirgin bir azalma olduğu dikkat çekmiştir (24). Mart-Temmuz 2020 tarihleri arasında Birleşik Krallık’ta yapılan üç milyonluk nüfusu temsil eden bir çalışmada kapanma önlemlerinin uygulanmasını takiben atık sudaki SARS-CoV-2 virüs yükünde belirgin bir düşüş gözlemlendiği saptanmıştır. Aynı çalışmada klinik vaka sayısı ile viral RNA konsantrasyonu arasındaki ilişkinin vaka sayısının az olduğu bölgelerde zayıf olduğu tespit edilmiştir (25). ABD’ye bağlı Hawaii adalarının Honolulu kentinde dört haftalık bir karantina sürecinde iki atık su arıtma tesisinden gelen atık sudaki SARS-CoV-2 RNA’nın günlük dinamiklerini izleyen bir çalışmada da SARS-CoV-2 RNA konsantrasyonu ile vaka sayıları örnekleme dönemi boyunca benzer günlük dalgalanmalar ve genel düşüş eğilimi sergilemiştir (26).

Atık su sürveyansı, sekanslama ve filogenetik analiz yoluyla varyant yayılımının izlenmesine ve klinik açıdan önemli mutasyonların saptanmasına da imkân vermektedir. Araştırma sonuçları, aşılama döneminde ortaya çıkan aşılama kaçan SARS-CoV-2 mutantlarına yönelik izleme çabaları için son derece önemli olan yeni varyantları tespit etme potansiyelini doğrulamaktadır (27-30). İspanya’da atık su izlemi sayesinde klinik veri tabanlarıyla karşılaştırdıktan sonra altı yeni varyant belirlenmiştir (27). İsviçre’de Temmuz-Aralık 2020 tarihleri arasında üç atık su arıtma tesisinden toplanan 48 ham atık su örneğinde SARS-CoV-2’nin genomik analizi, B.1.1.7 suşunun, İsviçre’den bir hasta örneğinde ilk doğrulamasından iki hafta önce tespit edilebileceğini göstermiştir (28). Örneklerin çoğunluğunun Arizona Maricopa County’yi temsil ettiği ABD’deki 11 eyaletten 91 atık su örneğinin analizinde; atık sudan elde edilen SARS-CoV-2 sekans verileri, örneklenen toplumlarda klinik verilerde temsil edilenden daha fazla suşun dolaştığını göstermektedir (28). ABD’nin Montana eyaletinde yapılan bir çalışmada ise sekanslama ile saptanan genomun GenBank’taki referans genomla %98,5 benzerlik gösterdiği, 11 tane tek-nükleotid varyasyonu bulunduğu ve bu genomun en çok Kaliforniya ve

Victoria’da (Avustralya) saptanan genomla benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (30). İsviçre’nin Basel kentinde atık sudaki SARS-CoV-2 tespiti ile resmi olarak kaydedilen COVID-19 vaka sayıları ve B.1.1.529 Omicron varyantı sıklığı arasındaki korelasyonları saptamak için yapılan bir çalışmada, 01 Temmuz-31 Aralık 2021 tarihleri arasında, 273.075 nüfuslu toplama alanından atık su alan yerel atık su arıtma tesisinin girişinden haftada altı kez atık su örnekleri alınmıştır. Toplama alanındaki günlük vaka sayısı ve medyan yedi günlük SARS-CoV-2 enfeksiyonu insidansı, atık su numunelerindeki SARS-CoV-2 ölçüleriyle yüksek bir korelasyon göstermiştir. Omicron B.1.1.529 varyantı, bir klinikte resmi onayından önce 21 Kasım 2021’de toplanan atık su numunelerinde tespit edilmiştir (29).

COVID-19’DA “ATIK SU SÜRVEYANSI” İLE İLGİLİ ÖRNEKLER

ABD, Kanada, Avustralya, İtalya, İspanya, Fransa, Almanya, Birleşik Krallık, Danimarka, İsveç, Hollanda, İran, Hindistan, Güney Afrika, Bangladeş, Pakistan, Macaristan, Sırbistan, Çin, Türkiye, BAE gibi pek çok ülkede farklı teknikler kullanılarak atık sularda SARS-CoV-2 tespiti ve prevalans tahmini çalışmaları yapılmıştır (32). Avrupa Birliği üye devletleri, SARS-CoV-2 varyantlarının ortaya çıkışı ve yayılmasına odaklanarak, atık su sürveyans sistemleri kurma konusunda desteklemek için ortak yöntemlerin kullanımını teşvik eden bir tavsiye kararı yayımlamıştır (33). Yapılan çalışmalarda, genel olarak vaka sayıları ile atık suda saptanan virüs yükü arasında belirgin bir zamansal korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca atık su sürveyansına dayalı olarak yapılan vaka sayısı tahminlerinin, klinik kesin vakalara dayanarak beklenenden anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptanmıştır (34). Hücre kültürlerinde enfektivite analizi yapılan çalışmalarda, atık su ve yüzey sularında patojenite saptanmadığı belirtilmekle birlikte “ihtiyatlılık ilkesi” doğrultusunda hareket edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (35).

ABD’de yapılan bir çalışmada; Montana’daki atık su arıtma tesisinden 74 gün süresince 17 farklı numune

alınmış, Mart sonu ve Nisan başında SARS-CoV-2 düzeyi tespit limitinin altında saptanırken Mayıs sonunda (toplumdaki COVID-19 vakalarındaki artışla eşzamanlı olarak) atık su analizleri tekrar pozitif çıkmaya başlamıştır. Bu çalışmada, atık su numunelerinin yeni vakanın raporlanmasından 2-4 gün önce pozitifleştiği görülmüştür. Bu şekilde hafif semptomlu/ asemptomatik vakaların da yakalanabilmesinin mümkün olabileceği belirtilmiştir (30). Kanada, Ottawa’da yürütülen araştırmalar üzerinden toplumu COVID-19 ile mücadelede açısından bilgilendirmeye yardımcı olmak için atık sudaki günlük SARS-CoV-2 viral sinyali düzeyleri raporlanmıştır. Bu raporda; Temmuz 2020 ortasında COVID-19 vakalarındaki artıştan üç gün önce atık sudaki viral sinyalde %580’lik artış dikkat çekmiştir (36).

İspanya’da resmi COVID-19 prevalansının düşük olduğu Murcia bölgesinde 12 Mart-14 Nisan 2020 tarihleri arasında altı atık su arıtma tesisinde yapılan çalışmada; atık su sürveyansı verileri resmi vaka verileri ile karşılaştırılarak ilk vakalar raporlanmadan önce SARS-CoV-2’nin toplumda dolaşmakta olduğu tespit edilmiştir (37). Almanya’da yapılan bir çalışmada ise Frankfurt metropol bölgesine hizmet veren iki atık su arıtma tesisi girişinden (Niederrad ve Sindlingen) haftada iki kez sürekli olarak 24 saatlik kompozit numuneler toplanmıştır. COVID-19 vakalarında farklı yerel dinamikler gösteren farklı örnekleme noktalarında farklı zamansal dinamikler gözlenmiştir. Çalışmada, atık su sürveyansı ile SARS-CoV-2 tespitinin yerel gelişmeleri izlemek için umut verici bir yöntem olduğu vurgulanırken bu çalışmada incelenen örneklerin yalnızca kuru hava örneklerini içerdiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, gelecekteki çalışmalarda mevsimsel olayların SARS-CoV-2 virüs yükleri üzerindeki etkisinin daha fazla dikkate alınması gerektiğine dikkat çekilmiştir (38).

Macaristan’da Budapeşte’nin tüm nüfusuna hizmet veren üç atık su arıtma tesisinden haftalık olarak numune alınması yoluyla yürütülen bir çalışmada; kanalizasyonda ilk pozitif sinyali, vaka sayılarındaki artıştan iki hafta önce tespit

edilmiştir. Aynı çalışmada, viral konsantrasyon ile vaka sayısı arasındaki korelasyon salgının yükselen evresinde daha belirgin olarak saptanmış ve atık su sürveyansının Macaristan'daki salgının ikinci dalgasını tahmin etmede etkili olduğu bulunmuştur (39). Güney Afrika'nın Kwazulu-Natal kentinde Temmuz-Ekim 2020 tarihleri arasında yürütülen bir çalışmada da atık suda tespit edilen viral yükün ilgili bölgelerdeki aktif klinik vaka sayısı ile uyumlu olduğu ve kapanma önlemlerinin gevşetilmesiyle atık suda SARS-CoV-2 tespitinin arttığı saptanmıştır. Bu çalışmada, atık su sürveyansının erken uyarı sistemi olmadığı, toplumun sağlık durumunun zamana bağlı nicel bir göstergesi olduğu, aktif vaka sayılarına ait verilerin gerçeği tam olarak yansıtmadığı ve test imkanları yetersiz olan gelişmekte olan ülkelerde mükemmel bir sürveyans aracı olduğu belirtilmiştir (40). Atık suda saptanan viral yük ile gerçek COVID-19 vakaları arasındaki ilişkiyi araştıran farklı bir çalışmada ise Dubai'deki 49 farklı bölgeden gelen 2940 belediye atık su örneğininin %28,6'sı; Dubai Havalimanı'na gelen 198 ticari uçaktan alınan atık su örneklerininin ise %13,6'sı pozitif sonuç vermiştir. Kaydedilen viral yük ile gerçek COVID-19 vakaları arasında doğrudan bir ilişki bulunmuş, ayrıca atık su izlemi klinik nazofaringeal sürüntülerle karşılaştırıldığında daha uygun maliyetli olarak kabul edilmiştir (41).

Japonya'da Ağustos 2020'den Şubat 2021'e kadar 360.000 nüfusa sahip bir kentsel topluluktan gelen atık sudaki SARS-CoV-2 RNA oluşum zaman serisini belgeleyen bir çalışmada, atık sudaki viral RNA'nın oranı COVID-19 salgın olayları sırasında artmıştır. Aynı çalışmada, en yüksek viral RNA konsantrasyonu, çalışma dönemindeki en ciddi salgın olayının ortasında, 2021 Ocak ayının başında kaydedilmiştir (42). İngiltere'de New Hampshire (NH) ve Vermont'ta (VT) dokuz belediye atık su tesisinden toplanan numunelerdeki viral konsantrasyonların beş ay boyunca (2020 Eylül sonu - 2021 Şubat başı arasında) izlendiği bir çalışmada, çalışma süresi boyunca tüm sahalardan toplam 283 atık su numunesi alınmıştır. Bu bölgedeki şehirler ve küçük kasabalar da dahil olmak

üzere test edilen dokuz belediyenin tamamından alınan numunelerde SARS-CoV-2 RNA tespit edilmiş ve bazı bölgelerde aktif vaka sayısı artışlarının erken bir göstergesi olarak atık su pozitifliği gösterilmiştir (43). İkinci ve üçüncü pandemi dalgaları sırasında Kuzeybatı İtalya'daki Piedmont'ta geliştirilen atık su bazlı sürveyans sistemini araştıran bir çalışmada, artılmamış atık sudaki SARS-CoV-2 konsantrasyonu ile salgın gelişimi arasında güçlü bir korelasyon saptanmıştır. Bunun yanı sıra karar vericilerin devam eden salgının etkilerini azaltmak ve önümüzdeki on yıllarda ortaya çıkması kesin olan salgınlar için müdahale planları hazırlamak için etkili politikalar uygulamalarına yönelik öngörü potansiyeli gözlemlenmiştir (44).

Kanada, Alberta'da 12 atık su arıtma tesisinden gelen atık sudaki SARS-CoV-2 RNA seviyeleri ile on topluluğun yeni COVID-19 vakaları arasındaki korelasyonlar 17 ay boyunca incelenmiştir. Sürveyansın analizi, atık sudaki SARS-CoV-2 RNA seviyelerinin her topluluktaki COVID-19 vakalarının zamansal değişiklikleriyle iyi bir korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. En güçlü korelasyon, üçüncü dalga ($r=0,97$) sırasında bulunmuştur (45). ABD, Ohio Eyalet Üniversitesi'nde 2020-2021 akademik yılında bir SARS-CoV-2 atık su sürveyans programı yürütülmüş ve kampüste COVID-19 enfeksiyon yaygınlığını izlemek için üniversite tarafından zorunlu kılınan haftalık COVID-19 tükürük testiyle sonuçları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, atık su sinyalinin, çoğunluğu asemptomatik olan enfekte bireylerin sayısı ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir korelasyonla arttığını göstermektedir (46). COVID-19'un çevresel sürveyansı için altı ay boyunca Yunanistan'ın Attica kentindeki ham atık sudaki SARS-CoV-2 RNA yükü RT-qPCR ile ölçülmüştür. Sonuçlar, ham atık sudaki RNA yükünün, sırasıyla 5, 8 ve 9 gün içinde pozitif COVID-19 vakalarının, yeni hastaneye yatışların ve yoğun bakım ünitelerine yatışların önde gelen göstergesi olduğunu göstermiştir (47).

Ülke çapında sürveyans çalışması yapan ülkeler arasında yer alan Türkiye'de Mayıs-Haziran 2020

tarahleri arasında 81 ilde bulunan 189 su arıtma tesisinin (ATT) giriş, çıkış ve çamur örneklerinde SARS-CoV-2 ölçümleri ile ülke genelinde COVID-19 vakalarının ilişkisi değerlendirilmiştir. Atık suda en yüksek viral yük; İstanbul, Bursa, Konya ve Orta Anadolu'da saptanmıştır (48). Haziran 2020'de 22 şehirde rutin örnekleme başlatılmıştır. İstanbul'dan haftalık, diğer illerden ise iki haftalık periyotlarla alınan atık su numuneleri ile COVID-19 yayılımı rutin şekilde incelenmeye başlamıştır. Rutin atık su sürveyans çalışması sonuçları, rapor edilen vaka sayılarına dayalı olarak ayrıca değerlendirilmiştir (49). Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada, Ekim-Kasım 2020 tarihleri arasında Çorum Kentsel Atıksu Arıtma Tesisi'nden toplanan yedi atık su numunesi incelenmiştir. Rutin yöntemlerden farklı olarak virüsü yakalamak ve konsantre etmek için sorbent torbalar kullanılmıştır. Sonuç olarak yedi arıtılmamış atık su numunesinin üçü SARS-CoV-2 açısından pozitif olarak saptanmıştır (50).

Atık su sürveyans sistemleri, yüksek gelirli bölgelerde COVID-19 salgını izlemenin önemli bir bileşeni haline gelmiştir. Bununla birlikte, düşük gelirli bölgelerde kullanımı iyi çalışılmamıştır. Etiyopya, Addis Ababa'da SARS-CoV-2 RNA'yı izlemek için atık su sürveyans sisteminin faydasını değerlendiren bir çalışmada, dokuz atık su işleme tesisinde numuneler iki ayrı zaman serisinde toplanmıştır. Ulusal COVID-19 vaka yükünün düşük olduğu ilk zaman serilerinde toplanan örneklerin tümü negatif olup aksine, ikinci zaman serisinde toplanan numunelerin tümü pozitif olarak saptanmıştır ve Etiyopya'da günlük bildirilen en yüksek yeni COVID-19 vakalarıyla aynı zamana denk gelmiştir. Çalışma, COVID-19 atık su sürveyansına dayalı epidemiyolojik yaklaşımın diğer düşük gelirli bölgelerde COVID-19 dinamiklerindeki kanıt boşluğunu potansiyel olarak doldurabileceğini göstermiştir (51). Afrika'da SARS-CoV-2 atık su sürveyansının kullanımına ilişkin araştırma kanıtlarını değerlendirmek için yapılan hızlı derlemede sekiz çalışma dahil edilme kriterlerini karşılamıştır. Dahil edilen çalışmalardan elde edilen bulgular, atık suda tespit edilen SARS-

CoV-2 viral RNA miktarının, incelenen alanlardaki yeni vakaların sayısı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Dahil edilen çalışmalar, SARS-CoV-2 atık su sürveyansının epidemiyolojik önemini yanı sıra çevresel risklerini de ortaya çıkarmıştır (52).

COVID-19'DA "ATIK SU SÜRVEYANSI" İLE İLGİLİ BİLİNMEYENLER, OLASI SORUN VE KISITLILIKLAR

Atık su sürveyansının COVID-19 izlemi açısından uygunluğu; biyolojik, epidemiyolojik, teknik ve ekonomik açılardan değerlendirilmelidir. Yöntem ve süreçlerin karmaşıklığı nedeniyle önemli belirsizlikler ve pek çok olası kısıtlılık mevcuttur. Şu anki bilgilerle yapılan tahminler, doğruluğu net olmayan sayı ve varsayımlara dayalı hesaplamalar üzerinden yapılmaktadır. Kişiler arası varyasyon nedeniyle atılım dinamiklerinin daha kolay tahmin edilmesi ve daha iyi şekilde genellenebilmesi için ulaşılabilen verilerin matematiksel bir modelde bir araya getirilmesi tercih edilmektedir. Ancak SARS-CoV-2'nin kendine özgü fekal atılım özellikleri ve farklı biyolojik mekanizmaları olduğu için mevcut varsayımların ve matematiksel modellerin SARS-CoV-2 için uygulanabilir olup olmadığı belirsizdir. Öte yandan atık suda saptanan SARS-CoV-2 RNA düzeyindeki ne kadarlık bir yükselişin anlamlı kabul edilip harekete geçmek için bilgi verici olacağı hakkında da net bilgiler bulunmamaktadır (53,54).

Enfekte bireyin dışkıyla atılan SARS-CoV-2 RNA miktarı; yaş, cinsiyet ve hastalık evresi gibi durumlardan etkilenmektedir. Enfeksiyonun farklı aşamalarında dışkıyla atılan viral yük ve bunun atık suda saptanan gen sayısı ile ilişkisi, dışkılarında viral RNA atan enfekte hasta yüzdesi, dışkıda viral atılım süresi, viral RNA'nın dış ortamdaki yıkım hızı ve atık suda kalıcılığı, atık su tesisine uzaklık, lağım hatlarında viral partikül kaybı, deney prosedürleri sırasında viral RNA kaybı, virüsün canlılığını devam ettirmeye yardımcı etmenler (biyofilm gibi) bulunup bulunmadığı tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca fekal virüs atılım paterninin solunum yoluna göre daha belirsiz ve değişken olması önemli bir kısıtlayıcı

etmemdir. Atılımın uzun sürmesi yeni enfekte olan bireylerin maskelenmesine neden olabilmektedir. Enfekte birey sayısının az olduğu durumlarda ise atık suya yeterli miktarda viral RNA atılamayacağına tanı mümkün olmayacaktır (53,54).

Atık suda bulunan viral yük, günlük atık su akım hızından ve tuvalet boşaltımından etkilenmektedir. Toplumun tuvalet kullanma paternine bağlı olarak gün içinde varyasyonlar görülebilmektedir. Yüksek nüfus hareketliliği (turizm gibi) olan bölgelerde “gerçek” (de facto) nüfusun tam olarak bilinmemesi önemli bir belirsizlik kaynağıdır. Lağımda virüsün yıkılma hızı atık suyun sıcaklığına, pH’sına, organik madde ve çözülmüş oksijen konsantrasyonuna, örneğin alındığı yerin kaynağa uzaklığına (virüsün kanalizasyon içinde katettiği mesafeye) göre değişkenlik göstermektedir. Örnek toplama yöntemi ve örnekleri muhafaza etme stratejisi de izlemi etkilemektedir. Daha doğru sonuç alabilmek için sık ve büyük hacimli örnekler alınması gerekmektedir. Örnek alma sıklığı da işyükü ve verim üzerinden bulguları etkileyebilmektedir (53,54).

Aşırı yağış, sıcaklık ve nem dalgalanmaları gibi çevresel değişiklikler ve uygunsuz artırım SARS-CoV-2 viral genetik materyalinin kantitatif durumunda anlamlı değişikliklere neden olabilmekte; bu durum özellikle yağışlı bahar ve kış mevsimlerinde önemli sorun teşkil edebilmektedir. Alınan örnek laboratuvara ulaştırılana kadar geçen süre ve ısı-ışık maruz kalımı virüs yükünü etkileyebilir. Örneğin alındığı yer de önemlidir; atık su arıtma tesisi, hastane ve izolasyon merkezleri gibi pandeminin sıcak noktaları, artırımın yetersiz olduğu bölgeler, akarsular, yolcu uçakları gibi pek çok farklı yerden örnek alınabilmekte olup bunların temsil edeceği sonuçlar farklı olabilecektir. Bulgular değerlendirilirken atık suyun alındığı bölgede, sağlık kuruluşu olup olmadığı ve buralarda yerinde arıtım uygulanıp uygulanmadığı göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca atık su arıtma tesislerinin farklı bölgelerinden alınan çamur ve tortu numuneleri de atık sudan farklılık oluşturmaktadır. Atık su altyapısının fiziksel yerleşimi ve kanalizasyonun sisteminin haritası, atık suyun kanalizasyonda kat

ettiği mesafe, popülasyon heterojenitesi (örnek alma bölgesine daha yakın yerlerde yaşayanlar tarafından üretilen atık suyun kanalizasyonda geçirdiği süre daha az) önemlidir (53,54).

En önemli zorluklardan biri de, nükleik asitleri değişikliğe uğratmadan virus partiküllerini yıkacak uygun prosedürü seçmektir. Virüs tespiti sırasında kullanılan konstrasyon yöntemlerinin tamamının etkililiği onaylanmış olsa da birbirinden oldukça farklı sonuçlar verebilmektedir. Ayrıca laboratuvarlar arası varyasyon nedeniyle aynı yöntemi kullanan çalışmalarda dahi farklılık görülebilmektedir. Kanalizasyonda, örnek taşınması ve saklanması sırasında gerçekleşen virüs yıkımı ile analiz sürecinde (virüs konsantrasyonu ve RNA (ribonükleik asit) ekstraksiyonu sırasında ve PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) inhibisyonu nedeniyle) gerçekleşen kayıplar atık suda ölçülen SARS-CoV-2 konsantrasyonunu etkilemektedir. Atık su, ayrıca virüsü yıkabilen ve PCR’ı inhibe edebilen bileşenler (kalsiyum iyonları, üre, etanol, bazı proteinler vb.) içermektedir. Bu zorluklar özellikle atık suda düşük konsantrasyonda SARS-CoV-2 bulunması durumunda kritik hâle gelmektedir. Yapılan çalışmaların hemen tamamında geçerlik ve güvenilirliği artırılmış ileri moleküler analiz yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç bulunduğu belirtilmektedir. Özel laboratuvar imkânlarına ve sürdürülebilir finansal kaynaklara gereksinim de önemli dezavantajlar olarak görülmektedir (53,54).

Atıksu sürveyans sistemlerinin kurumsallaştırılması konusundaki zorlukları anlamak için Japonya, Vietnam ve Endonezya’nın karşılaştırdığı bir çalışma yürütülmüştür. Bu üç ülkede merkezi atık su arıtma tesisi (AAT) bulunan, merkezi olmayan/yerinde AAT bulunan ve atık su arıtımının olmadığı bölgelerin oranı farklıdır. Zorluklarına rağmen merkezi olmayan arıtıma sahip olan veya arıtım yapılmayan toplumların atık su sürveyansından elde edeceği kazanımın daha fazla olacağı saptanmıştır (55).

Bu yeni teknolojilerin hem halk sağlığını hem de toplumun sivil özgürlüklerini olumsuz

etkileyebileceğine dair yasal ve etik sorunlar da gündeme gelmektedir. Önemli sorunlar veri gizliliğinin sağlanamaması ve bireysel onam alınmamasıdır. Netlik kazanmamış olan bu etik sorunların yanında sosyal damgalanma gibi problemlerin de gündeme gelmesi olasıdır (56).

ATIK SUDA COVID-19 SAPTANMASININ RİSKLERİ

Atık sudaki SARS-CoV-2'ye maruz kalımın çevresel sürveyans için veri kaynağı olmanın yanında bir sağlık riski oluşturduğuna dair görüşler bulunmakla birlikte; yapılan araştırmalar, rutin dezenfeksiyon işlemlerinin virüsü saptanamayan düzeylere düşürdüğünü göstermektedir. Ancak SARS-CoV-2'nin COVID-19 ile enfekte hastaların dışısında bulunması potansiyel fekal-oral yolla bulaşma riskini gündemde tutmaktadır. Ayrıca 2003 yılında yaşanan SARS salgınında virüsün atık su aerosolizasyonu ile bulaşabildiğinin gösterilmesi bu konuda ihtiyatlı olmayı gerektirmektedir. SARS-CoV-2'nin fekal bulaşmasıyla ilişkili risklerin araştırılması, su, sanitasyon ve hijyen (WASH) ilkelerini her zamankinden daha önemli hâle getirmiştir. Atık su sürveyansını desteklemek, sürdürülebilir kalkınma amaçlarının temel bileşenlerinden biri olan sanitasyon altyapısını geliştirmeyi (SKA-6) içermektedir. İnsan ve çevreye olası ikincil bulaşmayı en aza indirmek için SARS-CoV-2 ile kirlenmiş atık suyun yönetimi için stratejiler geliştirilmelidir. Özellikle düzenlenmiş bir merkezi arıtma tesisinin yokluğunda, tıbbi ünitelerde, karantina merkezlerinde, izolasyon koşullarında, test tesislerinde tek veya çoklu dezenfeksiyon bariyerli merkezi olmayan atık su arıtma ünitelerinin kurulması, atık su bulaşma riskini en aza indirmek için acil görünmektedir (16,57).

Türkiye'de, her tesiste dezenfeksiyon bulunmadığı ve atık su arıtma tesislerinin özellikle sulama amaçlı kullanılan çıkış sularında dezenfeksiyon uygulanması gerektiği bilinmektedir. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'nın Nisan 2020'de yayımladığı raporda; atık suların yeniden kullanımının söz konusu olduğu uygulamaların tarımsal ve peyzaj sulama faaliyetleri olduğu belirtilerek atık su arıtma tesislerindeki

her bir arıtma adımının virüsle ilgili potansiyel risklerin azaltılmasını sağladığı ifade edilmiştir. Arıtma tesislerinin doğru ve projelendirildiği şekilde çalıştırıldığından ve etkili dezenfeksiyon yapıldığından emin olunması, dezenfeksiyon ünitesi bulunmayan tesislerin uygun şekilde revize edilmesi ve çıkış sularının kalitesinin düzenli olarak izlenmesi önerilmiştir (58).

SONUÇ

DSÖ, atık su sürveyansının COVID-19 izleminde standart bir yaklaşım olarak yaygın şekilde önerilmesi için kanıtların yetersiz olduğunu belirtmektedir. Tüm yararlarına rağmen atık su sürveyansı, klinik sürveyansa alternatif olarak değil "tamamlayıcı" olarak kullanılabilir. Atık su sürveyansının uygulanabilir olması için daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Toplum temsil edecek örnekleme stratejisinin yanısıra koşullara ve ihtiyaçlara göre güncellenen ve analiz sürecindeki tüm adımların duyarlılıklarını hesaba katan optimize ve standardize bir protokole ihtiyaç vardır. İzlem stratejisi, temsil edici ve ayrıntılı bilgi verecek şekilde geliştirilmelidir (59). Ülkemiz açısından, sürece ait belirsizlikler de göz önünde bulundurulduğunda, zaten sınırlı olan finansal kaynaklarımızın ve insan gücümüzün salgınla mücadelede işe yaradığı epidemiyolojik olarak kesin kanıtlanmış önlemler (aşılama, el yıkama, maskenin etkili kullanımı, kişisel hijyen önlemleri konularında farkındalık) için kullanılmasının daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Klinik sürveyans verileriyle birlikte değerlendirilerek hangi düzeydeki RNA artışının harekete geçmeyi tetiklemek için bilgi verici olduğu doğru şekilde belirlenmelidir. Nakil yöntemi ve örnek alınan bölge ile laboratuvar arasındaki uzaklıktan kaynaklanan zorlukları bertaraf edebilmek için taşınması kolay olan "yerinde nükleik asit amplifikasyon testlerinin (kâğıt-bazlı hızlı test kitleri)" alternatif olarak kullanılması önerilmektedir. Atık su sürveyansından elde edilen bulgular sonucu verilecek olan nihai karar, klinik raporlar ve modellerden elde

edilen veri ve tahminlerle birlikte değerlendirme sonrası verilmelidir. Mevcut surveyans sistemlerine COVID-19 surveyansının da entegre edilebilmesi için gereken maliyetler tespit edilmeli, prosedürler düşük-orta gelirli ülkeler için uyarlanmalıdır. Suyla bulaşan hastalık tehditleri açısından COVID-19 pandemisi sona erdikten sonra da düzenli atık su izlemine devam edilmelidir. Atık su izlemi yerel bağlamda sürdürülmeli ancak uluslararası ve bölgesel bir ağ aracılığıyla bilgi ve deneyim paylaşımından tüm ülkelerin yarar sağlayacağı unutulmamalıdır. Kamu, sağlık ve çevre yetkilileri, üniversiteler, sivil toplum kuruluşları ve toplum arasında etkili eşgüdüm ve işbirliği sağlanmalıdır. Risk iletişiminde halka verilen mesajlar açık olmalı, gereksiz korkuya yol açacak belirsiz ifadeler kullanılmamalıdır. Ayrıca atık su hizmeti sağlayıcılarla sağlık yetkilileri arasında yakın diyalog kurulması değerlidir (60,61).

Önceki araştırmalar, atık su arıtma tesislerinde çalışan insanlar için standart koruyucu önlemlerin patojenlere karşı yeterli koruma sağladığını

göstermiştir. Bu önlemler aynı zamanda SARS-CoV-2'ye karşı da etkilidir. Konuyla ilgili çalışan önde gelen kuruluşlar artılmamış atık su ile çalışılırken gerekli mühendislik kontrolleri ve yönetsel düzenlemelerin yapılmasını, güvenli çalışma uygulamalarının hayata geçirilmesini ve atık su ile olası teması yol açan tüm faaliyetler sırasında kişisel koruyucu ekipman (koruyucu giysi, eldiven, bot, gözlük, yüz maskesi veya FFP3 solunum maskesi) kullanılmasını önermektedir. Ayrıca atık su ile çalışan kişiler atık su ile doğrudan temastan, atık suyu yutmaktan ve/veya solumaktan, yıkanmamış ellerle göz, burun ve ağza dokunmaktan kaçınmalı ve ellerini sık sık yıkamalıdır (58,59).

İleride yapılacak çalışmalarda ise virüsün atık suda canlılığını devam ettirmesini kolaylaştıran çevresel etmenler ve fekal örnekteki virüs konsantrasyonunu etkileyen faktörler ile ilgili belirsizlikler giderilmeye çalışılmalı, atık suyun tarımda yeniden kullanımının giderek artan bir uygulama olduğu göz önünde bulundurularak bu virüslerin bitkiler ve toprak üzerindeki etkisi araştırılmalıdır (60,61).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. TC Sağlık Bakanlığı. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı. Bilimsel Danışma Kurulu Çalışması. Aralık 2020, Ankara. <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/39551/0/covid-19rehberigenelbilgiler epidemiyolojivetan ipdf.pdf>, (Erişim Tarihi: 27.01.2023).
2. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*, 2021; 19 (3): 141-54.
3. Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020; 5 (5): 434-5.
4. Guo M, Tao W, Flavell RA, Zhu S. Potential intestinal infection and faecal-oral transmission of SARS-CoV-2. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021; 18 (4): 269-83.
5. Liu Y, Li T, Deng Y, Liu S, Zhang D, Li H, et al. Stability of SARS-CoV-2 on environmental surfaces and in human excreta. *J Hosp Infect*, 2021; 107: 105-7.
6. TC Sağlık Bakanlığı. Halk Sağlığı Sürveyansı Araç Kiti: Yoğun Çalışan Görev Yöneticileri İçin Bir Rehber, 2008. <https://ekutuphane.saglik.gov.tr/Yayin/187>, (Erişim Tarihi: 23.01.2023).
7. World Health Organization. Public health surveillance for COVID-19: Interim Guidance, December 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/who-2019-nCoV-surveillanceguidance-2020.8>, (Erişim Tarihi: 15.01.2023).
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Strategies for the surveillance of COVID-19. Stockholm: ECDC, 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/strategies-surveillance-covid-19>, (Erişim Tarihi: 12.01.2023).
9. Yavuz CI. Su kaynaklı bir hastalık olarak lejyoner hastalığı ve çevresel sürveyans. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2018; 48: 211-27.
10. Hellmér M, Paxéus N, Magnus L, Enache L, Arnholm B, Johansson A, et al. Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Appl Environ Microbiol*, 2014; 80 (21): 6771-81.
11. Manor Y, Shulman LM, Kaliner E, Hindiyeh M, Ram D, Sofer D, et al. Intensified environmental surveillance supporting the response to wild poliovirus type 1 silent circulation in Israel, 2013. *Euro Surveill*, 2014; 19 (7): 20708.
12. World Health Organization. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. WHO, 2003. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67854>, (Erişim Tarihi: 27.01.2023).
13. La Rosa G, Iaconelli M, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Bonadonna L, et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Sci Total Environ*, 2020; 736: 139652.
14. Aarestrup FM, Woolhouse MEJ. Using sewage for surveillance of antimicrobial resistance. *Science*, 2020; 367 (6478): 630-2.
15. Huizer M, Ter Laak TL, de Voogt P, van Wezel AP. Wastewater-based epidemiology for illicit drugs: a critical review on global data. *Water Res*, 2021; 207: 117789.
16. Yavuz CI. Yeni koronavirüs hastalığı (COVID-19) ve çevre sağlığı açısından değerlendirmeler. In: Aslan D, eds. Yeni Koronavirüs Hastalığı (COVID-19) Öne Çıkan Konular. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2020: 54-64.
17. Foladori P, Cutrupi F, Segata N, Manara S, Pinto F, Malpei F, et al. SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *Sci Total Environ*, 2020; 743: 140444.
18. La Rosa G, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Iaconelli M, Bonadonna L, et al. SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: Evidence from environmental monitoring. *Sci Total Environ*, 2021; 750: 141711.
19. Zhu Y, Oishi W, Maruo C, Saito M, Chen R, Kitajima M, et al. Early warning of COVID-19 via wastewater-based epidemiology: potential and bottlenecks. *Sci Total Environ*, 2021; 767: 145124.
20. Hopkins L, Persse D, Caton K, Ensor K, Schneider R, McCall C, et al. Citywide wastewater SARS-CoV-2 levels strongly correlated with multiple disease surveillance indicators and outcomes over three COVID-19 waves. *Sci Total Environ*, 2023; 855: 158967.

21. Karthikeyan S, Nguyen A, McDonald D, Zong Y, Ronquillo N, Ren J, et al. Rapid, large-scale wastewater surveillance and automated reporting system enable early detection of nearly 85% of COVID-19 cases on a university campus. *mSystems*, 2021; 6 (4): e0079321.
22. Harris-Lovett S, Nelson KL, Beamer P, Bischel HN, Bivins A, Bruder A, et al. Wastewater surveillance for SARS-CoV-2 on college campuses: initial efforts, lessons learned, and research needs. *Int J Environ Res Public Health*, 2021; 18 (9): 4455.
23. Betancourt WQ, Schmitz BW, Innes GK, Prasek SM, Pogreba Brown KM, Stark ER, et al. COVID-19 containment on a college campus via wastewater-based epidemiology, targeted clinical testing and an intervention. *Sci Total Environ*, 2021; 779: 146408.
24. Wurtzer S, Marechal V, Mouchel JM, Maday Y, Teyssou R, Richard E, et al. Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, Greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020. *Euro Surveill*, 2020; 25 (50): 2000776.
25. Hillary LS, Farkas K, Maher KH, Lucaci A, Thorpe J, Distaso MA, et al. Monitoring SARS-CoV-2 in municipal wastewater to evaluate the success of lockdown measures for controlling COVID-19 in the UK. *Water Res*, 2021; 200: 117214.
26. Li B, Di DYW, Saingam P, Jeon MK, Yan T. Fine-scale temporal dynamics of SARS-CoV-2 RNA abundance in wastewater during A COVID-19 lockdown. *Water Res*, 2021; 197: 117093.
27. Pérez Cataluña A, Chiner-Oms Á, Cuevas Ferrando E, Díaz-Reolid A, Falcó I, Randazzo W, et al. Detection of genomic variants of SARS-CoV-2 circulating in wastewater by high-throughput sequencing. *medRxiv [Preprint]*, 2021: 2021.02.08.21251355.
28. Jahn K, Dreifuss D, Topolsky I, Kull A, Ganesanandamoorthy P, Fernandez-Cassi X, et al. Early detection and surveillance of SARS-CoV-2 genomic variants in wastewater using COJAC. *Nat Microbiol*, 2022; 7 (8): 1151-60.
29. Fontenele RS, Kraberger S, Hadfield J, Driver EM, Bowes D, Holland LA, et al. High-throughput sequencing of SARS-CoV-2 in wastewater provides insights into circulating variants. *Water Res*, 2021; 205: 117710.
30. Nemudryi A, Nemudraia A, Wiegand T, Surya K, Buyukyoruk M, Vanderwood KK, et al. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. *medRxiv [Preprint]*, 2020:2020.04.15.20066746.
31. Bagutti C, Alt Hug M, Heim P, Maurer Pekerman L, Ilg Hampe E, Hübner P, et al. Wastewater monitoring of SARS-CoV-2 shows high correlation with COVID-19 case numbers and allowed early detection of the first confirmed B. 1.1. 529 infection in Switzerland: results of an observational surveillance study. *Swiss Medical Weekly*, 2022: 152; w30202.
32. Rapid expert consultation on environmental surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater. Summary report. Virtual meeting, 23 July 2020. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334305/WHO-EURO-2020%20-1093-40839-55199-eng.pdf>, (Erişim Tarihi: 20.01.2023)
33. Commission Recommendation (EU) 2021/472 of 17 March 2021 on a common approach to establish a systematic surveillance of SARS-CoV-2 and its variants in wastewaters in the EU (OJ L 98 19.03.2021, p.3.) <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/05b46cb0-8855-11eb-ac4c-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF>, (Erişim Tarihi: 25.01.2023).
34. Amahmid O, El Guamri Y, Rakibi Y, Ouizat S, Yazidi M, Razoki B, et al. Occurrence of SARS-CoV-2 in excreta, sewage, and environment: epidemiological significance and potential risks. *Int J Environ Health Res*, 2022;32(8):1686-706.
35. Lahrhich S, Laghrib F, Farahi A, Bakasse M, Saqrane S, El Mhammedi MA. Review on the contamination of wastewater by COVID-19 virus: Impact and treatment. *Sci Total Environ*, 2021; 751: 142325.
36. Ottawa COVID-19 wastewater surveillance. <https://613covid.ca/wastewater/>, (Erişim Tarihi: 27.01.2023).
37. Randazzo W, Truchado P, Cuevas-Ferrando E, Simón P, Allende A, Sánchez G. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res*, 2020; 181: 115942.

38. Agrawal S, Orschler L, Lackner S. Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in Southern Germany. *Sci Rep*, 2021; 11 (1): 5372.
39. Róka E, Khayer B, Kis Z, Kovács LB, Schuler E, Magyar N, et al. Ahead of the second wave: early warning for COVID-19 by wastewater surveillance in Hungary. *Sci Total Environ*, 2021; 786: 147398.
40. Pillay L, Amoah ID, Deepnarain N, Pillay K, Awolusi OO, Kumari S, et al. Monitoring changes in COVID-19 infection using wastewater-based epidemiology: a South African perspective. *Sci Total Environ*, 2021; 786: 147273.
41. Albastaki A, Naji M, Lootah R, Almeheiri R, Almulla H, Almarri I, et al. First confirmed detection of SARS-COV-2 in untreated municipal and aircraft wastewater in Dubai, UAE: The use of wastewater based epidemiology as an early warning tool to monitor the prevalence of COVID-19. *Sci Total Environ*, 2021; 760: 143350.
42. Zhu Y, Oishi W, Maruo C, Bandara S, Lin M, Saito M, et al. COVID-19 case prediction via wastewater surveillance in a low-prevalence urban community: a modeling approach. *J Water Health*, 20(2), 459-70.
43. Toledo DM, Robbins AA, Gallagher TL, Hershberger KC, Barney RE, Salmela SM, et al. Wastewater-based SARS-CoV-2 surveillance in northern New England. *Microbiol Spect*, 10(2), e02207-21.
44. Robotto A, Lembo D, Quaglino P, Brizio E, Polato D, Civra A, et al. Wastewater-based SARS-CoV-2 environmental monitoring for Piedmont, Italy. *Environmen Res*, 203, 111901.
45. Pang X, Gao T, Ellehoj E, Li Q, Qju Y, Maal-Bared, R, et al. Wastewater-based surveillance is an effective tool for trending COVID-19 prevalence in communities: a study of 10 major communities for 17 months in Alberta. *ACS Es&t Water*, 2(11), 2243-54.
46. Lu E, Ai Y, Davis A, Straathof J, Halloran K, Hull N, et al. Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in dormitories as a part of comprehensive university campus COVID-19 monitoring. *Environment Res*, 212, 113580.
47. Galani A, Aalizadeh R, Kostakis M, Markou A, Alygizakis N, Lytras T, et al. SARS-CoV-2 wastewater surveillance data can predict hospitalizations and ICU admissions. *Sci Total Environ*, 804, 150151.
48. Alpaslan Kocamemi B, Kurt H, Sait A, Kadi H, Sarac F, Aydın İ, et al. Routine SARS-CoV-2 wastewater surveillance results in Turkey to follow Covid-19 outbreak. *medRxiv [Preprint]*, 2020: 2020.12.21.20248586.
49. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı. Türkiye Genelinde COVID-19 Yayılımının Atık Sularda SARS-CoV-2 Analizleri ile Takibi. <https://covid19.tarimorman.gov.tr/Sayfa/Detay/1447>, (Erişim Tarihi: 27.01.2023).
50. Aydoğdu S, Karasartova D, Savcı Ü, Güreser AS, Arslan Akveran G, Aktı M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with a simple concentration method in wastewater in Turkey: A pilot study in Çorum. *Flora*, 2021; 26 (4): 620-7.
51. Ali S, Gudina EK, Gize A, Aliy A, Adankie BT, Tsegaye W, et al. Community wastewater-based surveillance can be a cost-effective approach to track COVID-19 outbreak in low-resource settings: feasibility assessment for Ethiopia context. *Int J Environ Res Public Health*, 2022; 19: 8515.
52. Dzinamarira T, Murewanhema G, Iradukunda PG, Madziva R, Herrera H, Cuadros D, et al. Utilization of SARS-CoV-2 wastewater surveillance in Africa—a rapid review. *Int J Environ Res Public Health*, 2022; 19(2): 969.
53. Li X, Zhang S, Shi J, Luby SP, Jiang G. Uncertainties in estimating SARS-CoV-2 prevalence by wastewater-based epidemiology. *Chem Eng J*, 2021; 415: 129039.
54. Hopkins L, Persse D, Caton K, Ensor K, Schneider R, McCall C, et al. Citywide wastewater SARS-CoV-2 levels strongly correlated with multiple disease surveillance indicators and outcomes over three COVID-19 waves. *Sci Total Environ*, 2023; 855: 158967.
55. Takeda T, Kitajima M, Huong NTT, Setiyawan AS, Setiadi T, Hung DT, et al. Institutionalising wastewater surveillance systems to minimise the impact of COVID-19: cases of Indonesia, Japan and Viet Nam. *Water Sci Technol*, 2021; 83 (2): 251-6.

56. Gable L, Ram N, Ram JL. Legal and ethical implications of wastewater monitoring of SARS-CoV-2 for COVID-19 surveillance. *J Law Biosci*, 2020; 7 (1): lsa039.
57. Tiwari SB, Gahlot P, Tyagi VK, Zhang L, Zhou Y, Kazmi AA, et al. Surveillance of wastewater for early epidemic prediction (SWEEP): environmental and health security perspectives in the post COVID-19 anthropocene. *Environ Res*, 2021; 195: 110831.
58. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı. Su Yönetimi Genel Müdürlüğü. COVID-19 (SARS-CoV-2) Virüsünün Bulaşma Riskinin Kullanılmış Suların Yeniden Kullanılması Perspektifinden Değerlendirilmesi. Nisan 2020, Ankara. https://www.tarimorman.gov.tr/SYGM/Belgeler/covid%20-19%20arde%20duyuru/KS_Covid_19_Raporu.pdf, (Erişim Tarihi: 27.01.2023).
59. World Health Organization. Status of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus, August 2020. <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/status-of-environmental-surveillance-for-sars-cov-2-virus>, (Erişim Tarihi: 27.01.2023).
60. Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba CP, Hamilton KA, et al. SARS-CoV-2 in wastewater: state of the knowledge and research needs. *Sci Total Environ*, 2020; 739: 139076.
61. Hamouda M, Mustafa F, Maraqa M, Rizvi T, Aly Hassan A. Wastewater surveillance for SARS-CoV-2: lessons learnt from recent studies to define future applications. *Sci Total Environ*, 2021; 759: 143493.

Antimikobakteriyel ilaçların moleküler direnç mekanizmalarına genel bir bakış

An overview of the molecular resistance mechanisms of antimycobacterial drugs

Elif ÇİFTÇİ¹ (ID), Dilek SATANA¹ (ID)

ÖZET

Bulaşıcı ve öldürücü bir hastalık olan tüberküloz dünyada en önemli sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Hali hazırda uygun dozda ve kombinler ile uygulanan tedaviye cevap söz konusudur; ancak düşük doz, yanlış kombinasyon ve hastanın tedaviyi terk etmesi gibi nedenlerle ilaca karşı direnç gelişebilmektedir. Bunun sonucunda tek ilaca direnç oluşabildiği gibi birden fazla ilaca dirençli suşlar da ortaya çıkabilmektedir. Bakterilerde direnç gen aktarımı yoluyla gerçekleşmektedir. Ancak mikobakterilerde direnç gen aktarım yoluyla değil spontan nokta mutasyonuyla oluşmaktadır. Bilinen ilaçların mikobakteri üzerindeki etki bölgesinin bilinmesi, tedavide ilaç birlikteliği ve uyumu açısından önem taşımaktadır. Mikobakteri duyarlılık testlerinin uzun sürede sonuçlanması hem hastanın tedaviye başlama süresini hem de direnç varlığının belirlenmesini geciktirmektedir. Bu problemin çözülmesi amacıyla hızlı moleküler duyarlılık testleri geliştirilmiştir. Moleküler ilaç duyarlılık testleri kısa sürede direnci belirleyebilen, ilgili gen bölgesinde mutasyonların varlığı ya da yokluğunu saptayan ve direnç mekanizmasını ortaya koyabilen hızlı yöntemlerdir.

ABSTRACT

Tuberculosis, a contagious and lethal disease, continues to be one of the most significant health problems worldwide. Currently, treatment with appropriate doses and combinations is effective; however, resistance to medication can develop due to factors such as low dosage, incorrect combinations, and patient abandoning treatment. As a result, resistance to a single drug may occur, as well as strains resistant to more than one drug. Resistance in bacteria occurs through gene transfer. However, mycobacteria develop resistance through spontaneous point mutations rather than gene transfer. Understanding the effect area of known drugs on mycobacteria is crucial for determining drug combinations and compatibility in treatment. The long duration of mycobacterial susceptibility tests delays both the initiation of treatment and the identification of resistance. Rapid molecular susceptibility tests have been developed to address this issue. Molecular drug susceptibility tests are rapid methods that can determine resistance quickly, detect the presence or absence of mutations in the relevant gene region, and exposes the resistance

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., İstanbul, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Elif ÇİFTÇİ

İstanbul Tıp Fakültesi Temel Bilimler Tıbbi Mikrobiyoloji AD., İstanbul - Türkiye

E-posta / E-mail : eliffciftci@outlook.com

Geliş Tarihi / Received : 06.05.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 28.07.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.15045

Çiftçi E, Satana D. Antimikobakteriyel ilaçların moleküler direnç mekanizmalarına genel bir bakış. Turk Hij Den Biol Derg, 2025; 82(1): 197 - 206

Moleküler testler tüm bu olumlu yönlerinin dışında, bazen genotipik olarak dirençli gibi görülen, ancak fenotipik olarak bu direncin yansımadığı durumlara neden olabilmektedir. Bazen de moleküler testler ile duyarlı olduğu belirlenen ancak fenotipik olarak dirençli olan suşlara da rastlanmaktadır. Tüberküloz tedavi sürecinin uzun sürmesi, hastanın tedaviyi terk etmesi, hastalığın yeniden nüksetmesi gibi olası sorunlar dikkate alındığında moleküler testlerin kullanımı klinisyenlere büyük yarar sağlamaktadır. Ancak elde edilen sonuçların mutlaka klasik antibiyotik duyarlılık deneyleri ile doğrulanması gerektiği unutulmamalıdır. Sonuç olarak; yeni teknolojilerin varlığı ve klasik ilaç duyarlılık deneylerinin birlikte kullanımıyla, ilaç etkisi-direnç mekanizmasının anlaşılabilmesi, tüberküloz tedavisinde yeni nesil ilaçların da gelişimini etkileyebileceği ve yeni ilaçlara karşı direnç gelişiminin en aza indirilmesini olanaklı hale getireceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz, ilaç direnci, mikobakteri, duyarlılık

mechanism. However, molecular tests may sometimes result in cases where phenotypic resistance is not reflected despite genotypic resistance appearing to be present. Additionally, strains that are determined to be susceptible by molecular tests may exhibit phenotypic resistance. Given the potential challenges such as the long duration of tuberculosis treatment, patient abandonment, and disease relapse, the use of molecular tests provides significant benefits to clinicians. However, it is essential to verify the obtained results with classical antibiotic susceptibility tests. In conclusion, it is believed that the existence of new technologies and the use of classical drug susceptibility tests will allow for the understanding of drug effect-resistance mechanisms, influence the development of next-generation drugs in tuberculosis treatment, and enable the minimization of resistance development against new drugs.

Key Words: Tuberculosis, drug resistance, mycobacteria, susceptibility

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), tüm dünyada yaygın olarak görülen, insan sağlığını tehdit eden bulaşıcı ve öldürücü bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2022 yılına ait TB raporu incelendiğinde 2020 yılı Mart ayında ilan edilen COVID-19 pandemisi ile birlikte TB teşhisi konan ve TB vakası bildirilen kişi sayısı ve hasta yükü (mortalite ve insidans) üzerindeki etkilerini belirtmişlerdir. 2020 yılında yeni TB teşhisi konan bildirimlerde düşüş olduğu belirtilmiş olup bu dönemdeki TB vakalarının tespitinde azalmaları yansıttığı ve TB hizmetlerindeki aksaklıkların hastalığın yükü üzerinde büyük bir etkisi olduğu belirtilmiştir. 2021 yılında dünya genelinde TB ile hastalanan kişilerin 10,6 milyon olduğu bu vakaların %6.7'si insan bağışıklık yetmezliği virüsü

(HIV) ile enfekte olduğu ifade edilmiştir. Son yirmi yılda yaklaşık %2 oranındaki düşüşün ardından 2020-2021 yılları arasında %3,6 ile arttığı belirtilmiştir. TB mortalite oranına bakıldığında; 2005-2019 yılları arasındaki düşüşün, 2020 ve 2021 de tersine döndüğü, HIV negatif insanlar arasındaki tahmini ölümün 1.4 milyon olduğu gösterilmiştir. Bitirme Stratejisi'ne (End TB) göre belirlenen %35'lik azalma hedefi 2015-2021 yılları arasında sadece %5,9 olarak kayıt edilmiştir. Çok ilaca dirençli (ÇİD)- TB vakaları 2020 yılına kıyasla %3,1 oranlık artış ile 2021'de tahmini 450.000 olarak kayıtlara geçtiği, bu artışın COVID-19 pandemisinin TB tespiti üzerindeki etkisinin bir sonucu olarak meydana geldiği tahmin edilmektedir. Pandemi dönemindeki TB insidans artışının, ÇİD- TB nedeniyle 191.000 ölüm meydana gelmesine neden olduğu belirtilmiştir (1).

Dünya genelinde yaşanan ve tüm insanlığı olumsuz yönde etkileyen COVID-19 pandemisinin TB üzerindeki etkisi, uzun yıllar üzerinde çalışılan tespit ve tedavi stratejilerine olan negatif yöndeki eğilimi, End TB stratejisinin 2030 yılı için belirlenen hedefe olan farkın toparlanabilmesi ülkelerin belirlenen tespit, tedavi ve takibin iş birliği ile yapılması ile mümkün olacaktır. Bu süreçte belirlenen ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak var olan direncin belirlenmesi, buna yönelik stratejilerin yürütülmesi önem arz etmektedir. TB tedavisi için belirlenen yeni nesil ilaçların direnç profillerinin belirlenmesi, ülke ve dünya genelinde yaygınlığının saptanması ve tedavideki kullanımlarının göz önüne alınması gibi araştırmaların yapılması hedefe yönelik çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Mikobakteri ve Antimikobakteriyel Direnç

TB hastalığının sorumlusu %97-99 oranında *Mycobacterium tuberculosis* bakterisidir. Mikobakteriler hücre duvarlarında buldukları uzun zincirli yağ asiti olan mikolik asit sebebiyle aside direnç özelliği göstermektedir. Yavaş üreme gösteren ve hücre içi bir basil olan hastalık etkeni, Gram negatif ve Gram pozitif sınıflandırmaya dahil edilmezler (2). Hastalığın ana sorumlu etkeni *M. tuberculosis*'le birlikte kompleks grup altında yer alan *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, ve *M. caprae* türleri yer almaktadır. Son genom dizilim çalışmaları ile *M. orygis* ve *M. mungi* türleride kompleks grubuna dahil edilmiştir (3).

M. tuberculosis yaklaşık 4.000 gen kodlayan genoma sahiptir ve % 61-71 oranında guanin ve sitozin içermektedir. *M. tuberculosis* diğer bakteri gruplarından yüksek oranda gen kodlama kapasitesine sahip olması ve çeşitli enzimleri üretilebilmesi ile ayrılmaktadır (4). Mikobakterilerin antibiyotiklere direnç gösterme özellikleri, kompleks hücre duvar yapılarına sahip olmaları ve B- laktamaz gibi yıkıcı enzimleri üretmesi ile bağlantılıdır. TB tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direncin gelişiminden gen mutasyonları sorumludur. Yerleri ve mekanizmaları birbirinden bağımsız olan bu spontan mutasyonlar ilacın

hedef noktasında değişikliklere neden olmaktadır (5). Bu özellikleri nedeniyle ilaç direncinden sorumlu genler moleküler yöntemler ile tanımlanabilmektedir. TB'nin tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen ilaçlara *M. tuberculosis* suşunun geliştireceği mutasyon bu noktada önemli bir sorun olarak görülmektedir. Tüm genom analizleme (Whole Genom Sequencing (WGS)) gibi son teknoloji sistemler ile bu mutasyonların saptanabilmesi mümkündür (6).

Dünyada TB tedavisinde kullanıma girmiş yeni nesil ilaçların ülkemizde antimikrobiyal etkinliklerinin araştırılarak Türkiye'de de kullanımının başlanması ile söz konusu dirençli olguların oranlarında düşüşe ve tedavi rejiminin daha etkin kullanımına olanak sağlaması düşünülmektedir. Bu derlemede, hali hazırda kullanımı devam eden standart ilaçlar ile yeni nesil ilaçların etki mekanizmaları ve gen bölgelerinde hangi mutasyonlarla direncin ortaya çıktığı konusu ele alınması amaçlanmıştır.

İzoniyazid

Mikobakterilerde izoniyazid (INH) direncinin meydana gelmesine neden olan en sık gen mutasyonu katG mutasyonlarıdır (7). *KatG* mutasyonu katalaz/peroksidaz enzim aktivitesini düşürmekte; ancak sınırlamamaktadır. INH ilacına direnç gösteren klinik izolatlarda mutasyonun %50-95 oranında S315 mutasyonu olduğu belirtilmektedir (8). Serin aminoasidinin yerine treonin aminoasidinin yer aldığı S315 mutasyonunda peroksidaz enzim aktivitesi yarılanmakta, katalaz aktivitesi ise altı kat azalmaktadır. *M. bovis* izolatlarının birçoğunda 463. kodondaki arjinin yerine lösinin yer aldığı *katG* mutasyonu görülmektedir. Bu durumda *M. bovis* INH'a karşı *M. tuberculosis*'e göre daha az duyarlıdır. *M. bovis*'in 463. kodonunda meydana gelen bu mutasyon katalaz-peroksidaz enzim aktivitesini değiştirmemektedir (9). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, INH dirençli suşlarda gen mutasyon bölgesi ve minimal inhibisyon konsantrasyonları (MİK) arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmada INH'a karşı en yüksek MİK değerine sahip olan izolatlarda saptanan mutasyon *katG* S315T kodonunda görülmüştür (10).

INH dirençli 949 *M. tuberculosis* izolatının değerlendirildiği bir meta-analiz çalışmasında, 909 (%95,8) suşta gen mutasyonları saptanmış, bu mutasyonların %95,8'inin *katG* 315, %5,9'unun *inhA* promotör bölgesinde olduğu belirlenmiştir. Suşlarda *katGMUT1*(S315T1) prevalansının %89,2, *inhAMUT1*(C15T) yaygınlığının ise %77,5 olduğu ifade edilmiştir (11).

INH direnci gösteren izolatlarda *katG* mutasyonlarından sonra %15-35 oranında *inhA* mutasyonları saptanmaktadır (7). Bu mutasyon ile *inhA* protein ekspresyonunun artması söz konusu olmakta ve buna bağlı olarak INH açısından hedeflerin çoğalması gerçekleşmektedir. Bu durum da bir seri hızlı mekanizma ile INH direnci oluşmaktadır. *InhA* protein ürününün NAD'ın bağlandığı yerdeki aminoasit yapısında değişikliğe neden olmasıyla INH direnci meydana gelebilmektedir (9). Ayrıca *katG* bölgesinde meydana gelen mutasyonlar yüksek düzeyde INH direncine neden olurken, *inhA* mutasyonları daha düşük düzeyde dirence neden olmaktadır (7).

Rifampin

Rifampin (RIF) RNA polimeraz enzimini inhibe ederek mikobakteriler üzerinde bakterisidal etki göstermektedir. Mikobakterilerde RIF ilacına gelişen direnç diğer bakteri grupları ile karşılaştırıldığında daha yavaş seyretmektedir. INH, pirazinamid, etambutol ve diğer ilaçlardan biriyle beraber kullanımı direnç gelişimini önlemektedir. RIF'in tek başına kullanılması, INH'a göre yan etkilerinin daha az ve bakteri üzerindeki etkisinin INH'a yakın olması, diğer ilaçlara karşı gelişen direnç durumunda da etkinliğini göstermesi gibi nedenlerden dolayı oldukça önemli bir ilaç olmaya devam etmektedir (12).

M. tuberculosis suşlarının RIF direnci, RNA polimeraz enziminin β -alt ünitesini kodlayan *rpoB* genindeki 507-533 kodonlar arasında delesyonlar, insersiyonlar veya yanlış anlamlı mutasyonlar aracılığıyla gelişmektedir. Tek bir kodonda bir nükleotidin değişmesi ile mutasyon olabileceği gibi birden fazla nükleotidin değişmesiyle de dirence

neden olan mutasyonlar gelişebilmektedir (13). RIF dirençli 847 suşun dahil edildiği bir meta-analiz çalışmasında, suşların %90,8'inde *rpoB* mutasyonları olduğu bildirilmiştir. Bu mutasyonun %74,2'si *rpoBMUT3* (S531L) bölgesinde olduğu ifade edilmiştir (11). RIF direncinde *rpoB* geninin RIF direncini belirleyen bölge (RRDR) de en sık görülen mutasyonlar 531, 526 ve 516. kodonlarda gerçekleşmektedir (14).

Pirazinamid

M. tuberculosis' te pirazinamid (PZA) direncinin ana mekanizması *pncA* genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu gen bölgesinden üretilen pirazinamidaz (PZAz) ile aktif olan PZA, pirazinoik aside dönüşerek etkisini göstermektedir. PZA dirençli *M. tuberculosis* suşlarında PZAz aktivitesi bulunmamaktadır (15). PZA'ya dirençli *M. tuberculosis* suşlarının %85'inde *pncA* gen bölgesinde mutasyon saptanırken, bazı suşlarda mutasyon bulunmadığı bildirilmiştir (16).

PZA'nın *M. tuberculosis* üzerinde; membran enerji üretiminin engellenmesi, trans-translasyonda ribosomal protein S1 (*rpsA*), patotenik ve co-enzim A sentezini (*panD*) inhibe etmesi şeklinde sıralanan birçok etkisi vardır (17).

Ülkemizde 46 PZA dirençli *M. tuberculosis* izolatının yer aldığı bir çalışmada; %73,9 oranında direnç ile ilişkili gen mutasyonları saptanmıştır. İzolatların %71,7'sinde *pncA*, %28,2'sinde *rpsA* ve %4,3'ünde *panD* mutasyonları bildirilmiştir. Mutasyonlu izolatların 12'sinde *pncA/rpsA* gen mutasyonları ve iki'sinde *pncA/panD* gen mutasyonlarının birlikteliği belirlenmiştir (18).

Ethambutol

Ethambutol (EMB), hücre duvarındaki arabinogalaktanın biyosentezini inhibe ederek mikolik asitlerin birikmesine ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Primer ilaçlar arasında yer almakta olup 1966 yılında TB tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır (19).

M. tuberculosis'in *embB* geninin 306. kodonundaki

mutasyonlar, tüm EMB'ye dirençli klinik izolatların %30 ila 68'inde bulunmaktadır. *EmmB306* mutantlarının TB tedavisi süresince birden fazla birinci basamak ilaca karşı antibiyotik duyarlılığını etkileyebileceği ileri sürülmüştür (20).

Bir çalışmada, EMB dirençli 44 izolatın %68,2'sinde *embCAB* operonunda genomik mutasyonlar saptanmıştır. Bu izolatların 29'unda *embB* gen bölgesi 306. kodon pozisyonunda en yaygın mutasyon olduğu belirlenmiştir (21).

Hücre duvarı sentezinde yer alan decaprenylphosphate 5-phosphoribosyltransferase (DPPR) sentezini kodlayan *ubiA* geninin (Rv3806c), *M. tuberculosis*'de etambutol direnci ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. *M. tuberculosis*'deki *ubiA* geninin aşırı eksprese edilmesinin EMB'ye orta/ yüksek düzeyde direnç sağladığı bildirilmiştir. Bazı XDR-TB izolatlarında da *embB* mutasyonu olmaksızın *ubiA* gen bölgesinde mutasyonun varlığı ifade edilmiştir (22).

Streptomisin

Streptomisin (SM)'in bakteri üzerinde direnç gösterdiği asıl yer *rrs* geninin kodlandığı 16SrRNA ve *rpsL* geninin kodlandığı ribozomal S12 proteindir. SM direncinin %60-70'inden bu genlerde gerçekleşen mutasyonlar sorumludur (23).

SM dirençli çalışmalarda *rpsL* gen bölgesindeki 43. ve 88. kodonda mutasyon varlığı gösterilmiştir. SM direnci ile ilişkili olan *rpsL*, *rrs* ve *gidB* genlerinde mutasyon olmaksızın da bazı izolatlarda düşük seviyeli direnç gelişiminin görüldüğü bildirilmiştir. Bu direncin gelişiminde effluks pompalarının etkili olduğu gösterilmiştir (24). Aynı zamanda SM direnci ile bir 16S rRNA metiltransferaz olan *gidB*'deki bir mutasyon arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. *M. tuberculosis*'de *gidB*'nin duyarlı bir suşa göre MİK'te 16 kat artışla düşük seviyeli SM'ye dirençli bir fenotipik özellik kazandırdığı belirtilmiştir (25).

Florokinolon

Florokinolonlar bakteriler için önemli olan DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe

etmektedir. *M. tuberculosis*'te topoizomeraz IV bulunmadığından, florokinolonların asıl hedefi DNA giraz enzimidir (26).

DNA giraz, sırasıyla *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan iki A ve iki B alt biriminden oluşmaktadır. Kinolon direncini belirleyen bölge (QRDR) *M. tuberculosis*'in de dahil olduğu çoğu bakteri türünde *gyrA* ve *gyrB* gen bölgelerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (27).

Florokinolona dirençli 1220 izolatın %64'ünde QRDR bölgesinde *gyrA* da mutasyon söz konusu iken, %0,6'sında bu bölgenin dışında mutasyona sahip olduğu, dirençli suşların %37'sinde *gyrA*'daki 94. kodonda çeşitli mutasyonların var olduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada; florokinolon direncine sahip izolatlarda 90., 91. ve 94. kodonda, *gyrB* gen bölgesine ait mutasyon oranı ise %17 olarak rapor edilmiştir (28).

Kanamisin, Amikasin, Kapreomisin, Viomisin

TB tedavisinde ikinci basamak ilaçlar olarak kullanılan bu dört ilaç protein sentezini inhibe ederek etkisini göstermektedir. Kanamisin (KM) ve amikasin (AMK), 16S rRNA seviyesinde değişiklik yaparak protein sentezini inhibe etmektedir (29).

On sekizden fazla ülkenin yer aldığı meta-analiz değerlendirmesinde; *rrs*, *tlyA*, *eis* promoteri ve *gidB* genlerindeki mutasyonlar AMK, KM ve/veya kapreomisine (KAP) karşı TB direnci ile ilişkilendirilmiştir (30). KM ve AMK'sine dirençli olan izolatlarda *rrs* 1400 gen bölgesinde adenin yerine guanin gelmesi sonucu meydana gelen mutasyon varlığı gösterilmiştir. ÇİD TB Estonya izolatlarının 43'ünde (%54) KM direnci ve AMK duyarlılığı görülmüş; *M. tuberculosis*'te aminoglikozit ilaçlardan KM ve AMK arasında çapraz direnç olduğu düşünüldüğünde her iki ilaca karşı dirençlerin test edilmesi gerekliliği gösterilmiştir (31). Yine KM dirençli izolatların %93,1'inde *rrs* gen bölgesinin 1401 pozisyonundaki mutasyon varlığı bildirilmiştir (32).

Kanamisine karşı direncin gelişmesine sebep olan bir diğer mutasyon aminoglikozit

asetiltransferazı kodlayan *eis* geni promotör bölgesinde gerçekleşmektedir. *Eis* promotörünün 35. ve 10. pozisyonlarındaki mutasyonlar, proteinin aşırı ekspresyonuna sebep olarak AMK yerine KM'ye karşı düşük düzeyde direnç yol açabilmektedir. Klinik izolatların %80'inde görülen bu mutasyonlar, KM'ye düşük seviyede direnç geliştirmektedir (33).

Kapreomisin ve viomisin (VİO) ribozomdaki büyük ve küçük alt birimlerin ara yüzüne bağlanarak etkisini göstermektedir (12). Bir çalışmada, *rrs* genindeki üç farklı mutasyonun (A1401G; C1402T; G1484T) KM, KAP ve VİO direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İlgili gen bölgesinde birden fazla bulunabilecek mutasyonun ilaçlar arasında çapraz direnç sebep olabileceği bildirilmiştir (34).

Yirmi iki araştırmanın değerlendirildiği bir sistemik derleme çalışmasında; KM, AMK, KAP'a dirençli *M. tuberculosis* suşlarında *rrs* genindeki A1401G mutasyonunun olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada dirençli suşlarda *tlyA* ve *eis* promotör bölgelerinde de bazı mutasyonların var olduğu belirtilmiştir (30). Çin'de dirençli izolatlarla yapılan bir çalışmada en sık gözlemlenen mutasyonun *rrs* geninde A1401G olduğu, *tly* ve *eis* promotör bölgesindeki mutasyonun KAP'a karşı düşük seviyeli dirençten sorumluluğu olduğu bildirilmiştir (35). İkinci nesil ilaçlara dirençli izolatlarda *rrs* ve *tlyA* genlerinde mutasyona rastlanmayıp *eis* promotör bölgede mutasyonun varlığı da gösterilmiştir (36).

Etionamid

Yapısal olarak izoniyazide benzeyen etionamid *ethA* gen bölgesindeki mutasyon ile direnç göstermektedir. Etionamid enoil-ACP redüktaz enzimini inhibe eden NAD ile eklenti oluşturarak mikolik asit sentezini inhibe etmektedir (37). INH direnci ile ilgili olan *inhA* geninde ortaya çıkan mutasyon, etionamide karşı direnç oluşumundan da sorumludur (38). İzoniyazid ve etionamid direncin *katG*, *ethA*, *ethR*, *mshA* ve *inhA* genlerindeki mutasyonlardan kaynaklandığını gösteren çalışmalar mevcuttur (39).

Para-Amino Salisilik Asit

Bakteriyostatik özellikte olan para-amino salisilik asit (PAS) folik asit yolağını inhibe ederek etkisini göstermektedir. *folC* geninde meydana gelen mutasyon PAS'a dirençten sorumlu tutulmuştur. Çok ilaca dirençli suşların kullanıldığı bir çalışmada, *thyA* geni ve *dfrA* kodlama bölgesindeki mutasyonlar tanımlanmıştır. PAS asit direnç mekanizmalarının ilacın konsantrasyonu ile de ilişkili olduğunu belirtilmiştir (40). PAS direnci mutasyonunun tanımlanabilmesi için tam genom dizilimi yapılan klinik izolatlarda, *thyA* ve *folC* gen bölgesi ile *dfrA* kodlama bölgesinde mutasyon varlığı gösterilmiştir (41).

Sikloserin

Sikloserin geniş spektrumlu bir antibiyotik olup D-alanin analogudur. İkincil basamak ilaçlar arasında yer alan sikloserin, bakteriyostatik özellik göstermektedir (19).

M. tuberculosis suşunun tüm genom diziliminin yapıldığı bir çalışmada, *ald* gen bölgesindeki mutasyonun sikloserin direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (42). Sanger dizi analizi ile doğrulama yapılan bir başka çalışmada ise sikloserine dirençli suşlarda *alr* gen bölgesindeki mutasyonun varlığı belirtilmiş, diğer gen bölgelerinin (*ddl*, *cyCA*, *ald*) ise bu çalışmadaki mutant suşlarda tespit edilmediği belirtilmiştir (43).

Yeni nesil antitüberküloz ilaçlar

Bedakulin

Bedakulin (BDQ), diğer antitüberküloz ilaçlardan farklı olarak, etkisini ATP sentezini inhibe ederek göstermektedir. Bedakulin, ATP sentezinin gerçekleşmesi için mikobakteriyel ATP sentaz kompleksinin dönüşümünden sorumlu olan membran bağımlı C halkasını hedeflemektedir (44). Bedakulinin ÇİD-TB hastalarında kullanımıyla hastalarda balgam kültürünün negatife dönüşümünü kısalttığı ve negatif kültür oranını arttırdığı (%9'dan %48'e) bildirilmiştir. Bununla birlikte ilacın kullanımının umut verici olduğu görülmüş ve 2012 de ABD Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration-FDA) onayı almıştır (45).

Bedakulin direnci ile ilişkili olan gen bölgeleri *atpE*, *pepQ* ve *RV0678*'dir. Bu gen bölgelerinde bir veya birkaçının mutasyona sahip olduğu ifade edilmişse de (46) dirence sahip olup bu mutasyonlardan herhangi birini barındırmayan mikobakteri suşlarının varlığı da gösterilmiştir (47).

Delamanid

DSÖ'nün 2014 yılında onayladığı nitroimidazol sınıfı bir ilaçtır. Mikobakteriler üzerindeki etki mekanizmasını mikolik asit sentezini inhibe etme yoluyla gerçekleştirmektedir (48). Delamanid (DLM) mikobakteri cinsi için spesifiktir. Diğer bakteri türlerine karşı *in vitro* aktiviteye sahip değildir (49). Delamanid direnci F420 sinyal yolundaki genlerin mutasyonları ile ortaya çıkabilmektedir. *M. tuberculosis*'de bilinen gen bölgeleri *dnn*, *fgd1*, *fbiA*, *fbiB*, *fbiC* ve *FbiD* olarak sıralanmaktadır (50). Delamanid kullanımı ile XDR-TB hastalarında olumlu tıbbi sonuçlara ulaşıldığı bildirilmiştir (51).

Fenotipik olarak DLM dirençli *M. tuberculosis* kompleks (MTBC) suşlarında *ddn* veya *fbiA* gen bölgelerindeki mutasyonun varlığı gösterilmiştir (52). Delamanid ilacının BDQ ile kombine kullanımının tedavi stratejisindeki başarılı sonuçların elde edildiği çalışmalarda var olup (53), maliyet etkin olması nedeniyle de tercih edilmektedir (54).

Tedizolid, Linezolid

Tedizolid, yeni bir oksazolidinon grubu antimikrobiyaldir. Ribozomun 50S alt ünitesine bağlanarak 70S başlangıç kompleksinin oluşumunu bozmakta ve böylece protein sentezini inhibe ederek etkisini göstermektedir. Tedizolid, linezolid benzeri etki mekanizmasıyla dirençli Gram pozitif mikroorganizmalar ve *M. tuberculosis*'e karşı güçlü bir aktivite göstermektedir (55). Anti-tüberküloz ilaçlar ile çapraz direnç göstermemesi, MTBC'ye karşı güçlü aktivite göstermesi ile ÇİD-TB hastalarının tedavi rejimlerinde yerini almaktadır (56).

Linezolid FDA tarafından onaylanan, TB ve TDM infeksiyonlarının tedavi rejimlerinde yer alan ilk oksazolidinon grubu antimikrobiyaldir (57). *M.*

tuberculosis klinik izolatlarının linezolid direnci ile ilişkili genlerindeki (*rplC*, *rplD* ve 23S rRNA) mutasyonlar çalışmalarda yerini almıştır (58).

Antitüberküloz İlaçlara Karşı Direnç

TB basiline görülen ilaç direnci genetik mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Çoğu bakteride görülen aksine *M. tuberculosis*'de plazmid ve transpozonlar aracılığı ile direnç görülmemektedir. Direncin ortaya çıkması, nokta mutasyonu sonucu kromozomal DNA'nın değişikliğe uğraması şeklinde gerçekleşmektedir (59).

Antitüberküloz ilaçlara direnç primer ve sekonder ilaç direnci olmak üzere iki şekilde görülmektedir. Daha önce TB ilacı kullanmamış ya da bir aydan kısa bir süre kullanmış hastalarda görülen direnç primer ilaç direncidir. Sekonder ilaç direnci, geçmişte TB tedavisi almış hastalarda ortaya çıkan en yaygın direnç türüdür. İlaç direnci TB tedavisinde kullanılan antitüberküloz ilaçlardan herhangi birine ya da birkaçına karşı ortaya çıkabilmektedir (60).

Moleküler ilaç duyarlılık testleri kısa sürede direnci belirleyebilen, ilgili gen bölgesinde mutasyonların varlığı ya da yokluğunu saptayan ve direnç mekanizmasını ortaya koyabilen hızlı yöntemlerdir. Moleküler testler tüm bu olumlu yönlerinin dışında, bazen genotipik olarak dirençli gibi görülen, ancak fenotipik olarak bu direncin yansımadığı durumlara neden olabilmektedir. Bazen de moleküler testler ile duyarlı olduğu belirlenen ancak fenotipik olarak dirençli olan suşlara da rastlanılmaktadır. TB tedavi sürecinin uzun sürmesi, hastanın tedaviyi terk etmesi, hastalığın yeniden nüksetmesi gibi olası sorunlar dikkate alındığında moleküler testlerin kullanımı klinisyenlere büyük yarar sağlamaktadır. Ancak elde edilen sonuçların mutlaka klasik antibiyotik duyarlılık deneyleri ile doğrulanması gerektiği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak; yeni teknolojilerin varlığı ve klasik ilaç duyarlılık deneylerinin birlikte kullanımıyla, ilaç etkisi-direnç mekanizmasının anlaşılabilceği, TB tedavisinde yeni nesil ilaçların da gelişimini etkileyebileceği ve yeni ilaçlara karşı direnç gelişiminin en aza indirilmesini olanaklı hale getireceği düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/tb-disease-burden> , Erişim Tarihi: (17.08.2023).
2. Levinson W, Chin-Hong P, Joyce EA, Nussbaum J, Schwartz B, Esen B, Şener B, çeviri eds. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. On altıncı baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 2018.
3. Bektöre B, Haznedaroğlu T, Baylan O, Ozyurt M, Ozkütük N, Satana D, ve ark. Çok ilaca dirençli tüberküloz izolatlarında yaygın ilaç direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2013;47(1):59-70.
4. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother, 2011;55(1):355-60.
5. Mitchison DA. Controversial issues in tuberculosis: Drug resistance in tuberculosis. Eur Respir J, 2005;25:376-9.
6. Bentley SD, Comas I, Bryant JM, Walker D, Smith NH, Harris SR, et al. The genome of Mycobacterium africanum West African 2 reveals a lineage-specific locus and genome erosion common to the M. tuberculosis complex. PLoS Negl Trop Dis, 2012;6(2):e1552.
7. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: update 2015. Int J Tuberc Lung Dis, 2015;19(11):1276-89.
8. Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA. Isoniazid-resistance conferring mutations in Mycobacterium tuberculosis KatG: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. Protein Sci, 2010;19(3):458-74.
9. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuber Lung Dis, 1998;79(1):3-29.
10. Yıldırım E, Uzun M. İsoniazide dirençli Mycobacterium tuberculosis izolatlarında minimal inhibitör konsantrasyonun ve gen mutasyonlarının belirlenmesi. Mikrobiyol Bul, 2017;51(4):305-16.
11. Reta MA, Alemnew B, Abate BB, Fourie PB. Prevalence of drug resistance-conferring mutations associated with isoniazid- and rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. J Glob Antimicrob Resist, 2021;26:207-18.
12. Campbell EA, Korzheva N, MustaeV A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. Cell, 2001;104(6):901-12.
13. Çavuşoğlu C. Mycobacterium tuberculosis'de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 11-14 Haziran, Samsun-Türkiye. 2003.
14. Thirumurugana R, Kathirvelb M, Vallayachari K, Surendar K, Samrota AV, Muthaiah M. Molecular analysis of rpoB gene mutations in rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by multiple allele specific polymerase chainreaction in Puducherry, South India. J Infect Public Health, 2015;8:619-25.
15. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med, 1996;2(6):662-7.
16. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM. Mutations associated with pyrazinamide resistance in pncA of Mycobacterium tuberculosis complex organisms. Antimicrob Agents Chemother, 1997;41:636-40.
17. Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. Emerg Microbes Infect, 2013;2(6):e34.
18. Özgür D, Tezcan Ülger S, Kayar MB, Biçmen C, Aslantürk A, Ülger M, et al. Pirazinamid dirençli Mycobacterium tuberculosis izolatlarında direnç ile ilişkili pncA, rpsA ve panD Gen mutasyonları ve spoligotiplerin araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2022;56(2):191-205.
19. Takayama K, Kilburn JO. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis. Antimicrob Agents Chemother, 1989;33(9):1493-9.

20. Munir S, Mahmood N, Shahid S, Khan MI. Molecular detection of isoniazid, rifampin and ethambutol resistance to *M. tuberculosis* and *M. bovis* in multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) patients in Pakistan. *Microb Pathog*, 2017;110:262-74.
21. Kurnaz N, Tezcan Ülger S, Ülger M, Arslantürk A, Aslan G, Köksal F. Etambutole dirençli ve duyarlı *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarında embA, embB ve embC gen bölgesi mutasyonları. *Mikrobiyol Bul*, 2023;57(1):45-59.
22. He L, Wang X, Cui P, Jin J, Chen J, Zhang W, et al. ubiA (Rv3806c) encoding DPPR synthase involved in cell wall synthesis is associated with ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 2015;95(2):149-54.
23. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002;46(2):267-74.
24. Spies FS, da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008;52(8):2947-9.
25. Wong SY, Lee JS, Kwak HK, Via LE, Boshoff HIM, Barry CE. Mutations in gidB confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011;55(6):2515-22.
26. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998;393(6685):537-44.
27. Mdluli K, Ma Z. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infect Disord Drug Targets*, 2007;7(2):159-68.
28. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother*, 2012;67(4):819-31.
29. Alangaden GJ, Kreiswirth BN, Aouad A, Khetarpal M, Igno FR, Moghazeh SL, et al. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998;42(5):1295-7.
30. Georghiou SB, Magana M, Garfein RS, Catanzaro DG, Catanzaro A, Rodwell TC. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PLoS One*, 2012;7(3):e33275.
31. Krüüner A, Jureen P, Levina K, Ghebremichael S, Hoffner S. Discordant resistance to kanamycin and amikacin in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003;47(9):2971-3.
32. Kumari R, Banerjee T, Anupurba S. Molecular detection of drug resistance to ofloxacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis* by using multiplex allele-specific PCR. *J Infect Public Health*, 2018;11(1):54-8.
33. Zaunbrecher MA, Sikes RD Jr, Metchock B, Shinnick TM, Posey JE. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009;106(47):20004-9.
34. Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005;49(8):3192-7.
35. Zhang Z, Liu M, Wang Y, Pang Y, Kam KM, Zhao Y. Molecular and phenotypic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to kanamycin, amikacin, and capreomycin in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014;33(11):1959-66.
36. Oudghiri A, Karimi H, Chetioui F, Zakhm F, Bourkadi JE, Elmessaoudi MD, et al. Molecular characterization of mutations associated with resistance to second-line tuberculosis drug among multidrug-resistant tuberculosis patients from high prevalence tuberculosis city in Morocco. *BMC Infect Dis*, 2018;18(1):98.
37. Carette X, Blondiaux N, Willery E, Hoos S, Lecat-Guillet N, Lens Z, et al. Structural activation of the transcriptional repressor EthR from *Mycobacterium tuberculosis* by single amino acid change mimicking natural and synthetic ligands. *Nucleic Acids Res*, 2012;40(7):3018-30.
38. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 1994;263(5144):227-30.

39. Rueda J, Realpe T, Mejia GI, Zapata E, Rozo JC, Ferro BE, et al. Genotypic analysis of genes associated with independent resistance and cross-resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015;59(12):7805-10.
40. Mathys V, Wintjens R, Lefevre P, Bertout J, Singhal A, Kiass M, et al. Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009;53(5):2100-9.
41. Wang W, Li S, Ge Q, Guo H, Shang Y, Ren W, et al. Determination of critical concentration for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against para-aminosalicylic acid with clinical isolates with thyA, folC and dfrA mutations. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2022;21(1):48.
42. Desjardins CA, Cohen KA, Munsamy V, Abeel T, Maharaj K, Walker BJ, et al. Genomic and functional analyses of *Mycobacterium tuberculosis* strains implicate ald in D-cycloserine resistance. *Nat Genet*, 2016;48(5):544-51.
43. Chen J, Zhang S, Cui P, Shi W, Zhang W, Zhang Y. Identification of novel mutations associated with cycloserine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, 2017;72(12):3272-6.
44. Preiss L, Langer JD, Yildiz Ö, Eckhardt-Strelau L, Guillemont JE, Koul A, et al. Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline. *Sci Adv*, 2015;1(4):e1500106.
45. Branco FS, Pinto AC, Boechat N. An update on the chemistry and medicinal chemistry of novel antimycobacterial compounds. *Curr Top Med Chem*, 2013;13(22):2808-49.
46. Wu SH, Chan HH, Hsiao HC, Jou R. Primary bedaquiline resistance among cases of drug-resistant tuberculosis in Taiwan. *Front Microbiol*, 2021;12:754249.
47. Degiacomi G, Sammartino JC, Sinigiani V, Marra P, Urbani A, Pasca MR. In vitro Study of Bedaquiline Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Multi-Drug Resistant Clinical Isolates. *Front Microbiol*, 2020;11:559469.
48. Bahuguna A, Rawat DS, An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets. *Med Res Rev*, 2020;40(1):263-92.
49. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/deltyba-epar-product-information_en.pdf, Erşim tarihi: (23.03.2024).
50. Reichmuth ML, Hömke R, Zürcher K, Sander P, Avihingsanon A, Collantes J, et al. Natural polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* conferring resistance to delamanid in drug-naive patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020;64(11):e00513-20.
51. Skripconoka V, Danilovits M, Pehme L, Tomson T, Skenders G, Kummik T, et al. Delamanid improves outcomes and reduces mortality in multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J*, 2013;41(6):1393-400.
52. Wen S, Jing W, Zhang T, Zong Z, Xue Y, Shang Y, et al. Comparison of in vitro activity of the nitroimidazoles delamanid and pretomanid against multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019;38(7):1293-6.
53. Pieterman ED, Keutzer L, van der Meijden A, van den Berg S, Wang H, Zimmerman MD, et al. Superior efficacy of a bedaquiline, delamanid, and linezolid combination regimen in a mouse tuberculosis model. *J Infect Dis*, 2021;224(6):1039-47.
54. Diel R, Hittel N, Schaberg T. Cost effectiveness of treating multi-drug resistant tuberculosis by adding Deltyba™ to background regimens in Germany. *Respir Med*, 2015;109(5):632-41.
55. Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. In vitro susceptibility testing of tedizolid against nontuberculous mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 2017;55(6):1747-54.
56. Wen S, Gao X, Zhao W, Huo F, Jiang G, Dong L, et al. Comparison of the in vitro activity of linezolid, tedizolid, sutezolid, and delpazolid against rapidly growing mycobacteria isolated in Beijing, China. *Int J Infect Dis*, 2021;109:253-60.
57. Marfil E, Ruiz P, Martínez-Martínez L, Causse M. Comparative study of in vitro activity of tedizolid and linezolid against *Mycobacterium avium* complex. *J Glob Antimicrob Resist*, 2022;30:395-8.
58. Wang C, Wang G, Huo F, Xue Y, Jia J, Dong L, et al. Novel oxazolidinones harbor potent in vitro activity against the clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China. *Front Med (Lausanne)*, 2022;9:1067516.
59. Zhang Y, Young D. Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, 1994;34(3):313-9.
60. Albay A, Albayrak N, Arslantürk A, Aslan G, Baylan O, Biçmen C, ve ark. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi, Yayın No:935. Ankara: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Sağlık Bakanlığı, 2014.

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

