



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 78 ■ Sayı/Number 3 ■ Yıl/Year 2021

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. Fatih KARA, Genel Müdür (General Director)

EDİTÖR

EDITOR IN CHIEF

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

EDİTÖR YARDIMCILARI

DEPUTY EDITORS

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

Doç. Dr. Demet CANSARAN-DUMAN (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enst.)

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

Dr. Öğrt. Üye. Pınar KAYNAR (Hitit Üniversitesi Alaca Avni Çelik MYO)

YAYIN KURULU

EDITORIAL BOARD

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

Doç. 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)

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

İSTATİSTİK EDİTÖRLERİ

STATISTICAL EDITORS

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

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

İNGİLİZCE DİL EDİTÖRÜ

ENGLISH LANGUAGE EDITOR

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

TEKNİK KURUL

TECHNICAL BOARD

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

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

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

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

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

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

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

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

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

Eylül - 2021 / September - 2021

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

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Afyonkarahisar

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Cemile SÖNMEZ, Ankara

Çağatay GÜLER, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

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

Hanefi ÖZBEK, İzmir

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Hasan IRMAK, Ankara	Orhan BAYLAN, İstanbul
Hasan TEZER, Ankara	Orhan YILMAZ, Ankara
Hayrettin AKDENİZ, Bolu	Özlem KURT AZAP, Ankara
Hilal ÖZDAĞ, Ankara	Pınar KAYNAR, Çorum
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, Kırıkkale	Selçuk KAYA, Trabzon
Mestan EMEK, Antalya	Selçuk KILIÇ, Ankara
Metin KORKMAZ, İzmir	Selim KILIÇ, Ankara
Mithat ŞAHİN, Kars	Selin NAR ÖTGÜN, Ankara
Muhsin AKBABA, Adana	Sema BURGAZ, Ankara
Murat DİZBAY, Ankara	Semra Ayşe GÜREŞER, Çorum
Mustafa AKSOY, Ankara	Sercan ULUSOY, İzmir
Mustafa ERTEK, Ankara	Sultan ESER, İzmir
Mustafa Necmi İLHAN, Ankara	Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa
Mustafa Kasım KARAHOCAGİL, Kırşehir	Sümer ARAS, Ankara
Mustafa Kemal BAŞARALI, Ankara	Şule SENSES ERGÜL, Ankara
Mustafa KAVUTÇU, Ankara	Tayfur Ata SÖKMEN, Hatay
Mükerrem KAYA, Erzurum	Tevfik PINAR, Kırıkkale
Nazan YARDIM, Ankara	Turan BUZGAN, Ankara
Nazime MERCAN, Denizli	Yeşim ÖZBAŞ, Ankara
Nazmi ÖZER, Ankara	Yunus Emre BEYHAN, Van
Nilay ÇÖPLÜ, Ankara	Zafer ECEVİT, Ankara
Nur AKSAKAL, Ankara	Zafer KARAER, Ankara
Nur Münevver PINAR, Ankara	Zati VATANSEVER, Kars
Nuran ESEN, İzmir	Zeynep GÜLAY, İzmir
Oğuz GÜRSOY, Denizli	

I) YAYIN İLKELERİ

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 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.

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 Türkçe ve İngilizce olarak yayımlanır.

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

Dergi Yayın Kurulu tarafından uygun görülen yazılar, konu ile ilgili en az iki Bilimsel Danışma Kurulu 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, yazımın içeriğini değiştirmeyen her türlü düzeltme ve kısaltmaları yapma yetkileri vardır.

Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.

Dergide yayımlanan yazıların yayın hakkı Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne aittir. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

II) 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 onaylarını alındığını gösterir beyan "Gereç ve Yöntem" kısmında bulunmalıdır. Olgu sunumlarında ve araştırma makalelerinde hasta kimliğini içeren herhangi bir doküman kullanılmamalıdır. Hasta kimliğini tanıttak fotoğraf kullanıldığında, hastanın yazılı onayı gönderilmelidir.

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar için de gereken izinler alınmalı; yazıda deneklere ağır, 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.

III) 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 özellikle 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), yazışma işini üstlenen yazarın açık adresi, telefon numaraları (sabit ve cep), elektronik posta adresi belirtilmelidir.

a. Yazımın 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 şirketle 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 kısaltılmamalıdır.

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 atfı 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 sözcüklerini yazı 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 atfı yapılmasına özen gösterilmelidir.

- **Sürekli 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.

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

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

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAYIN İLKELERİ YAZIM KURALLARI

- **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. Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic Physiol ogy: Mechanism of Disease. Phidelphia. 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 sunumlarında** 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.

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 İçin Etik İlkeler (son güncelleme: Ekim 2013, Fortaleza, Brezilya)], "Tüm araştırma çalışmaları için laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanımı kılavuzu (8. baskı, 2011) "ve / veya" Hayvanları İçeren 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 verilmaz. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'nin çift kör gözden geçirme ilkeleri nedeniyle, yazarların ve hakemlerin isimleri diğer kişilerce bilinmemektedir.

YAYIN POLİTİKASI ve 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 yayını ilkelerinde belirtilen konularda yazılan makaleleri kapsamaktadır. Sadece çevrimiçi (online) başvurular kabul edilmektedir. Dergiye kabul edilme sürecindeki değerlendirilmelerde aranan temel özellikler özgünlük ve bilim literatürüne katkıdır.

Makalelerin tıbbi ve etik sorumluluğu yazarlara ve telif hakları THDBD'ye 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.

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.

THDBD, bireysel kullanıcıları ve kurumların ücretsiz kullanımını mümkün kılan açık erişimli bir dergidir. Kullanıcıların makalelerin tam metinlerine, yayıncı veya yazardan izin almadan erişim sağlayarak, okuma amaçlı yüklemeye, kopyalama, dağıtma, çıktı alma, arama yapma işlemlerini gerçekleştirmelerine olanak verir. Bu sistem açık erişimli BOAI[1] tanımlaması ile uyumludur.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

Telefon : (0312) 565 55 79

Faks : (0312) 565 55 91

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

I) PUBLISHING POLICY

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology 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.

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 are published in Turkish and English.

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

Articles approved by the Scientific Committee and Editorial Board are eligible to be released after receiving at least two positive opinions from the Scientific Committee members. 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.

The copyright of the article published in the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology belongs to the Journal. Copyright fee is not paid to the authors.

II) 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 photos are used which shows his/her ID, a written informed consent of the patient on the use of the photos 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.

III) 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 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

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

“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 Parazitoloj Derg*, 2001; 25 (3): 234-5.

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

- **Example of journal supplement:** Frumin AM, Nussbaum J, Eposito 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.

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (Turk Hij Den Biyol Derg) 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.

The authors are responsible for the scientific and ethical liability of the manuscripts and the copyright of the manuscripts belongs to the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology. 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.

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.

This is an open access journal which means that all content is freely available without charge to the user or his/her institution. Users are allowed to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of the articles in this journal without asking prior permission from the publisher or the author. This is in accordance with the BOAI[1] definition of open access.

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 79

Fax : +90 312 565 55 91

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

YAYIN İLKELERİ

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

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

EDITORIAL POLICY

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

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne
www.turkhijyen.org adresinden online olarak makale gönderilebilir
Submissions can be made online at the address www.turkhijyen.org
to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

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 - ULAKBİM 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 - ULAKBİM Türk Tıp Dizini.

TUBITAK
ULAKBİM

TÜRK MEDLINE

TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

GENAMICS™
...research from your desktop

medoanet
Mediterranean Open Access Network

Open
J-Gate

İLETİŞİM

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

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

Tel: 0312 565 55 79

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

CORRESPONDENCE

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

Faks: 0312 565 55 91

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

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. **COVID-19 küresel salgınının toplumsal etkileri**
The social effects of COVID-19 pandemic
 Kemal ATAMAN, Veysel BOZKURT, Erol GÖKA, Mustafa Necmi İLHAN, Nuran YILDIRIM, Esra ÇİFTÇİ, Ufuk LİMAN, Berkay VURAN
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.83357 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

2. **Brucella Coombs gel testi: Can it replace other serological methods as a rapid test in serological diagnosis of brucellosis?**
Brucella Coombs jel testi: Brusellozun serolojik tanısında hızlı bir test olarak diğer serolojik yöntemlerin yerini alabilir mi?
 Begüm NALÇA ERDİN, Mehmet PARLAK, Ayşe GÜVEN AYDINLI, Feyza DEMİR
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.83584 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

3. **El yıkama alışkanlıklarının eldeki aerob mikroorganizma yükü ile ilişkisi**
The relationship of hand washing habits with aerobic microorganism load on hand
 Yasemin ÖZ, Nilgün KAŞİFOĞLU, Tuğçe Nur ÖZTÜRK, Betül KARADENİZ, Ahmet İshak ÖZDEMİR, Berk PALAZOĞLU, Fatma Betül KARAL, Mohammed V. SHERIFF
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.14892 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

4. **İdrar kültürlerinden izole edilen enterokok türlerinin dağılımı ve antibiyotik direnç profillerinin değerlendirilmesi**
Evaluation of the distribution and antibiotic resistance profiles of enterococcus species isolated from urine cultures
 Melek BİLGİN, Selim GÖRGÜN, Hacer İŞLER, Eşe BAŞBULUT
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.54938 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

5. **Melanoma hücrelerinde epoksomisinindüklediği apoptozis sürecinde gerçekleşen erken spektral değişikliklerin belirlenmesi**
Determination of early spectral changes in melanoma cells during epoxomicin-induced apoptotic process
 Ertan KÜÇÜKSAYAN, Aşlınur SIRCAN KÜÇÜKSAYAN
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.63496 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

6. **Transition from CLSI to EUCAST: How our antibiotic susceptibility tests will be affected**
CLSI'den EUCAST'a geçiş: Antibiyotik duyarlılık testlerimiz nasıl etkilenecek
 Gülşen HAZIROLAN
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.25428 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

7. **Association between T3, T4, and TSH hormones proportion and Toxoplasma gondii anti-IgG seroprevalence in patients suffering from clinical and drug-controlled thyroid dysfunctions in southeastern Iran**
Güneydoğu İran'da klinik ve ilaç kontrollü tiroid fonksiyon bozukluğu olan hastalarda T3, T4 ve TSH hormonları oranı ile Toxoplasma gondii anti-IgG seroprevalansı arasındaki ilişki
 Vahid RAİSSİ, Asma İBRAHİM, Fatemeh BAYAT, Elham AKHLAĞHI, Muhammad GETSO, Omid RAİESİ, Ali ABDOLLAHI, Gita ALIZADEH, Sakineh AKBARI, Zahra NAVI, Soudabeh ETEMADI
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.95825 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

8. **GC-MS-based metabolic profiling of Escherichia coli exposed to subinhibitory concentration of enoxacin**
Enoksasin subinhibitör konsantrasyonu maruziyeti altında Escherichia coli'nin GC-MS bazlı metabolomik profillemesi
 Engin KOÇAK, Ceren ÖZKUL
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.00008 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

9. **Türkiye'de tıp fakültesi öğrencilerinin aşı, bağışıklama, aşı kararsızlığı ve COVID-19 aşısı hakkındaki bilgi ve düşünceleri**
The knowledge and opinions of the faculty of medicine students about vaccination, immunization, vaccine hesitation and COVID-19 vaccine in Turkey
 Efsa ÖZBALIKÇI, Elif Sude AYDIN, İlayda İPEK, Nalan ÖZEN, Merve YÜCELER, Onur ATEŞ, Hasan Sadık MAYDA, Muhammed Yasir KARTANCI, Sedanur GÜÇLÜ, Şevval AKDOĞAN, Tuğçe EFE, Elif Cansel KARASU, Murat TOPBAŞ
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.39205 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

10. **A study of nutrient and cost analysis of gluten-free packaged products from Turkey**
Türkiye'de paketlenmiş glutensiz ürünlerin besin ögesi ve fiyat analizleri üzerine bir çalışma
 Mahmut BODÜR, Esra TUNÇER, Alev KESER
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.97344 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

235 - 248



249 - 254



255 - 264



265 - 272



273 - 286



287 - 298



299 - 306



307 - 316



317 - 332



333 - 342



11. The first discovery of Chaphamaparvovirus in sheep with encephalitis and anemia
Ensefalitli ve anemili koyunda Chaphamaparvovirüs'ün ilk keşfi
Eda ALTAN, Gilberto SABINO-SANTOS JR, Patricia PESAVENTO, Eric DELWART
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.07348 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
12. Gıda çalışanlarından izole edilen Enterobacterales suşlarında antimikrobiyal direnç ve GSBL/ KARBAPENEMAZ varlığının araştırılması
Investigation of antimicrobial resistance and ESBL/Carbapenemase presence in Enterobacterales strains isolated from food workers
Nesrin ÇAKICI, Yasemin NUMANOĞLU ÇEVİK, Serap SÜZÜK YILDIZ, Alper AKÇALI, Nükhet Nilüfer DEMİREL ZORBA
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.89814 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
13. Investigation of biofilm formation of *Enterococcus* species isolated from blood by phenotypic and genotypic methods
Kandan izole edilen *Enterococcus* türlerinde biyofilm oluşumunun fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması
Zeynep ÖZKÖK, Kemal BİLGİN, Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI, Asuman BİRİNCİ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.02328 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
14. Influenza and SARS-CoV-2 coinfection during the COVID-19 pandemic
COVID-19 pandemisinde SARS-CoV-2 ve Influenza koinfeksiyonu
Mehmet Sami İSLAMOĞLU, Betül BORKU UYSAL
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.92489 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
15. Düşük doz fraksiyone olmayan heparin ve düşük moleküler ağırlıklı heparinin farelerde subaraknoid kanama sonrası erken beyin hasarı üzerindeki etkileri
Effects of low-dose unfractionated heparin and low molecular weight heparin on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice
Orhan ALTAY
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.83798 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- **Derleme / Review**
16. Birinci Dünya Savaşı'nda Kafkas Cephesi'nde sağlık hizmetleri ve Erzurum'da ilk tifüs aşısı uygulamaları
Health services on the Caucasia Front in the First World War and the first typhus vaccine applications in Erzurum
Figen KAYSERİLİ ORHAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.70973 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

343 - 350



351 - 362



363 - 372



373 - 378



379 - 388



389 - 398



COVID-19 küresel salgınının toplumsal etkileri

The social effects of COVID-19 pandemic

Kemal ATAMAN¹ (ID), Veysel BOZKURT² (ID), Erol GÖKA³ (ID), Mustafa Necmi İLHAN⁴ (ID),
Nuran YILDIRIM⁵ (ID), Esra ÇİFTÇİ⁶ (ID), Ufuk LİMAN⁶ (ID), Berkay VURAN⁶ (ID)

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, ülkemizdeki COVID-19 küresel salgını sürecinde kişilerin algı, tutum ve davranışlarını ölçmek; salgına yönelik toplumsal eğilimleri incelemek ve bulgulardan hareketle politika yapıcılar için öneriler geliştirmektir.

Yöntem: Araştırmanın evreni Türkiye genelinde sağlık hizmeti alan vatandaşlardan oluşmaktadır. Basit rastgele örnekleme yöntemi kullanılarak örneklem büyüklüğü 4.275 olarak belirlenmiştir. Bilgisayar destekli telefon anketi (CATI-Computer Assisted Telephone Interviewing) yöntemiyle rastgele olarak seçilen vatandaşlara anket uygulanmıştır.

Bulgular: Anketi cevaplayanların %40'ı ölüm kaygım arttı, %51'i virüs kapma kaygım arttı ve %79'u da sevdiklerimi kaybetme kaygım arttı cevabını vermiştir. Güçlü sosyal bağlar, insanların kaygılarının giderilmesinde etkili bir faktördür. Anketi cevaplayanların %66'sı "Gelecekte maddi açıdan temel ihtiyaçlarımı karşılayamama korkusu yaşıyorum", %58'i de salgın sonrasında gelirim azaldı yanıtı vermiş; sadece %14,80'i insanları genelde güvenilir bulduğunu ifade etmiştir. Yaş, gelir ve eğitim düzeyi geriledikçe güven

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study is to measure people's perceptions, attitudes, and behavior regarding the New Coronavirus Pandemic and the process itself in our country, to examine social tendencies towards the pandemic, and to develop recommendations for policymakers based on the findings.

Methods: According to the survey, 40 percent of the participants said their anxiety about death and dying has increased. In comparison, 51 percent reported that their anxiety about getting the virus has increased, and 79 percent stated that their anxiety about losing their loved ones has increased. Especially the existential anxiety of women, those in the lowest income group working in jobs that require close contact, is much higher than men. Strong social ties are an influential factor in alleviating people's anxiety.

Results: Sixty-six percent of the respondents stated they feared that they will not be able to meet their basic needs in the future, and 58 percent reported that their income has decreased after the pandemic; only 14.80 percent stated that they find people to be generally trustworthy. As the variables of age, income,

¹Marmara Üniversitesi İlahiyat Fakültesi Felsefe ve Din Bilimleri Bölümü, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi İktisat Fakültesi İktisat Sosyolojisi Anabilim Dalı, İstanbul

³Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı, Ankara

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara

⁵Bezmîâlem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı, İstanbul

⁶T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Geliştirilmesi Genel Müdürlüğü, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Berkay VURAN

Bilkent Yerleşkesi, Üni. Mah. Dumlupınar Bulvarı 6001. Cad. No: 9 Çankaya / Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 08.05.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 13.08.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.83357

Ataman K, Bozkurt V, Göka E, İlhan MN, Yıldırım N, Çiftçi E, Liman U, Vuran B. COVID-19 küresel salgınının toplumsal etkileri. Türk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 235 - 248

de gerilemektedir. “COVID-19 küresel salgını büyük güçlerin komplosu” olarak görenlerin oranı %56,5’tir. Katılımcıların %27’si “COVID-19 küresel salgını sonrası çevremde sözel şiddet arttı”, %17’si “COVID-19 küresel salgını sonrası çevremde fiziksel şiddet arttı” cevabını vermiştir. Buna karşılık %11’i bu dönemde kendilerine yönelik sözel şiddet, %4’ü ise kendilerine yönelik fiziksel şiddetin arttığını ifade etmişlerdir.

Sonuç: Salgının süresi uzadıkça toplumda varoluşsal kaygıların arttığı görülmüştür. Geçen süre içinde insanlar yorulmuşlardır. Bazılarında bıkkınlık, umursamazlık ve inkâr artmış; ne olacaksa bir an önce olsun ve şu belirsizlikten kurtulayım ruh hali hissedilmeye başlanmıştır. Görece güçlü toplumsal bağları (güven düzeyi yüksek) olanlar ve devlet kurumlarına güvenenler salgının getirdiği belirsizlik ve kaygı ile daha kolay başa çıkmaktadır. Devletin izleyeceği sosyal politikalar, toplumun ekonomik ve psiko-sosyal sorunlarının azaltılmasında hayati önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, pandemi, küresel salgın, ekonomik kaygılar, güven ve komplo teorileri, şiddet, toplumsal dayanışma

and education level decrease, so does trust. The findings reveal that the level of trust is lower among women than men. The percentage of those who see coronavirus as “a conspiracy of the great powers” is 56.5 percent in Turkey. Twenty-seven percent of the respondents reported that verbal violence, and 17 percent said physical violence has increased around them after the coronavirus. On the other hand, 11 percent stated that verbal violence, while 4 percent stated that physical violence against them has increased during the same period.

Conclusion: This research shows that existential anxiety in society increases as the duration of the pandemic increases. Over time the people have become tired. The pandemic has triggered some negative attitudes such as indifference, weariness, and denial, resulting in developing a type of come-what-may mood in some people. Those who have relatively strong social ties (high level of trust) and those who rely on state institutions cope more easily with the uncertainty and anxiety posed by the pandemic. Social policies to be followed by the state are of vital importance to reduce the economic and psycho-social problems of the society.

Key Words: COVID-19, pandemic, economic concerns, trust, conspiracy theories, domestic violence, social solidarity

GİRİŞ

Yeni Koronavirüs Hastalığı (COVID-19), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 11.03.2020 tarihinde küresel salgın (pandemi) olarak ilan edilmiştir (1). Ülkemizde ilk COVID-19 vakası aynı tarihte (11 Mart 2020’de) tespit edilmiş ve tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de virüsün ortaya çıktığı tarihten itibaren başta sağlık olmak üzere birçok alanda virüsle mücadeleye yönelik önlemler alınmış ve yeni düzenlemeler getirilmiştir. COVID-19 salgınının daha etkin yönetilebilmesi için toplumun sürece ve izlenen politikalara ilişkin algılarının ve

tutumlarının ölçülmesi büyük önem taşımaktadır. Salgın diğer toplumlarda olduğu gibi bizde de psiko-sosyal açıdan derin etkiler yapmıştır. Ancak henüz konuya ilişkin literatürde yeterince kapsamlı araştırma yayımlanmamıştır.

Virüsün yaygınlaşması sonrasında, salgının yayılmasını engellemek amacıyla bireylerden ilk talep edilen uygulama maske kullanımı ve mesafeye özen gösterilmesi olmuştur. Ancak ülkelerin büyük bir bölümünde “yeni normal” olarak adlandırılan bu sürece uyum konusunda ciddi sorunlar yaşanmıştır.

Nitekim Osmanlı İmparatorluğu döneminde de “karantina istemezük” diyenler olmuştur (2). COVID-19 küresel salgını sonrasında da bazı ülkelerde beklenmedik bir biçimde maske ve mesafe uygulaması tartışmalı hale gelmiş ve hatta siyasallaşmıştır. Özellikle kadınlar, riskten kaçınanlar, eğitilmiş orta ve üst sınıflar, belirli bir yaşın üzerinde olanlar, virüse yakalanırlarsa kolay atlatamayacağını düşünenler maske ve mesafe kurallarına diğerlerine göre daha fazla uyma eğiliminde olmuşlardır (3-5).

COVID-19 sınıf farkı gözetmeksizin herkesi tehdit etmektedir. Ancak virüs ekonomik açıdan bütün toplumsal grupları aynı şekilde etkilememiştir. Özellikle yoksullar, gençler, öğrenciler, kadınlar, işleri dijital çalışmaya uygun olmayanlar salgından çok daha olumsuz etkilenmiştir (6). Nitekim Nisan 2020’de yapılan geniş kapsamlı ankete cevap verenlerin %40’ı temel ihtiyaçlarını karşılayamama kaygısı yaşadığını ifade etmiştir (7-10).

Ekonomik kaygıların yanı sıra salgın dönemlerinde depresyonun ve stresin arttığı gözlemlenmiştir. İnsanların virüs kapma, sevdiklerini kaybetme ve ölüm gibi konularda varoluşsal kaygıları da artmıştır. Salgının süresi uzadıkça, yorgunluk, bıkkınlık ve artan depresyon belirtileri en önemli sorunlar haline gelmiştir (11-13). Öyle ki korku ve kaygı beklenenin çok ötesinde bir artış göstermiştir (14). Yapılan araştırmaların sonuçları da kaygı ve depresyon belirtilerinin arttığını ortaya koymuştur. Nitekim bir araştırmada katılımcıların %65’i huzursuzluğum arttı, %53’ü uyku kalitem bozuldu, %31’i hayatım üzerinde kontrol duygumu kaybettim ve %41’i ise sürekli virüs kapma korkusu yaşıyorum cevabını vermiştir. Başlangıçta özellikle küresel bir şehir olan İstanbul salgının etkilerini daha derinden hissetmiştir (15).

Bilindiği gibi pandemiler öncelikle toplumların güven duygusunu sarsmaktadır (16). Pandemi döneminde toplumun yöneticilerine güveni özel bir önem taşır. Devlete ve kurumlara güven bireylerin zorluklara dayanma gücünü artırırken, toplumun güvenini kazanmış liderlerin de daha zor kararları

uygulaması kolaylaşır. Nitekim farklı ülkeleri karşılaştıran bir araştırma, hükümete güven arttıkça risk algısının gerilediğini ortaya koymaktadır (17). Bir başka çalışma da güven düzeyi yüksek bölgelerin, hükümetlerin insani hareketliliği azaltma önerilerine daha fazla uyduğunu ortaya koymaktadır (18, 19).

Diğer taraftan artan kaygı ve belirsizliği azaltma ihtiyacı, insanları komplo teorilerine daha kolay inanır hale getirmiştir. Komplo teorileri hem ABD gibi ülkelerde hem de Türkiye’de genelde çok ilgi görmüştür. Salgın dönemlerinde komplo teorilerine ilgi artarak devam etmiştir. Nitekim Arap ülkelerine yönelik yapılan bir araştırmada anketi cevaplayanlarının %46’sı COVID-19’u büyük güçlerin bir komplosu olarak gördüğünü ifade etmiştir (20). Türkiye’de yapılan araştırmalarda da COVID-19’u büyük güçlerin komplosu olarak görenlerin oranları istikrarlı biçimde artmıştır. Komplo teorileri konusunda oldukça yüksek bir çeşitlilik gözlenmektedir (21). Araştırmalar COVID-19 bağlamında komplo teorilerinin ciddi toplumsal etkilerinin vurgulamaktadır (22). Komplo teorilerine inanç arttıkça uzmanlara ve otoritelere güven azalmakta, başta aş (23) olmak üzere pandemi önlemlerine uyma eğilimi de gerilemektedir.

Salgın döneminde insanlar, alıştıkları normların dışına çıkmışlardır. Yukarıda da ifade edildiği şekilde virüs kapma, ölüm ve sevdiklerini kaybetme korkusu ile yaşar hale gelmişlerdir. Hareket alanları ve gelir imkânları daralmış ve sevdiklerine sarılmaktan korkar hale gelmişlerdir. Dolayısıyla salgın döneminde yaşam memnuniyetinin gerilediği gözlenmektedir (24). COVID-19 sonrasında 26 ülkede küresel bir anket çalışmasında ölüm oranları en yüksek ülkeler aynı zamanda yaşam memnuniyeti en çok gerileyen ülkeler olmuştur.

Pandemilerle ilişkili korku ve belirsizlik, çeşitli şiddet biçimlerini artırabilir veya uygun bir ortam sağlayabilir (25). Nitekim COVID-19 aileleri de derinden etkilemiştir. Karantina döneminde aileler çok daha uzun bir süreyi birlikte geçirmişlerdir. Daralan gelir imkânları aile dayanışmasına her

zamankinden daha çok ihtiyaç hissettirmiştir. Bazı ailelerde bağlar güçlenirken, bazılarında da iletişim sorunları artmıştır. Bazı araştırmalar duygusal/ finansal ve fiziksel yeterlilikler arttıkça aile içi iletişimin de arttığı sonucuna ulaşmışlardır (26). Salgın sürecinde özellikle gençlerin, işsizlerin ve yoksulların aile-içi iletişim sorunları artarken, orta ve üst gelir gruplarında görece aile dayanışmasının daha fazla arttığı gözlenmiştir (9, 27, 28).

Kısaca ifade etmek gerekirse bu kesitsel araştırmanın amacı ülkemizdeki COVID-19 salgını sürecinde kişilerin sürece ilişkin algı, tutum ve davranışlarını ölçmek ve salgına yönelik toplumsal eğilimleri incelemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmanın evreni Türkiye genelinde sağlık hizmeti alan vatandaşlardan oluşmaktadır. Türkiye geneli minimum örneklem büyüklüğü 4275 olarak hesaplanmış, il bazlı nüfus ve cinsiyet dağılımına göre oransal olarak dağıtım yapılmıştır. Bilgisayar destekli telefon anketi (CATI-Computer Assisted Telephone Interviewing) yöntemiyle anketler uygulanmıştır. Araştırma için Gazi Üniversitesi Etik Komisyonu tarafından 07.05.2021 tarihli ve E-77082166-604.01.02-87852 sayılı etik kurul onayı alınmıştır.

Çalışmada Toplum Bilimleri Kurulu tarafından geliştirilen ve 63 maddeden oluşan COVID-19 Barometresi anket formu kullanılmıştır. Çalışma öncesinde anket formunun anlaşılabilirliğini ve uygulanabilirliğini test etmek amacıyla 23 Ekim Cuma 2020 tarihinde pilot çalışma gerçekleştirilmiştir.

Pilot çalışma öncesinde anketörlere anket formu ve uygulama esasları hakkında eğitim verilmiştir. Anket formuna son hali verildikten sonra da eğitimler tekrarlanarak, anketörlere son hali verilen soru formu ve uygulama esasları hakkında bilgi verilmiştir. Çalışma, 5 Kasım - 9 Kasım 2020 tarihleri arasında 50 anketörün katılımıyla gerçekleştirilmiştir.

Raporlandırma aşamasında veri seti MSSQL

ilişkisel veri tabanı üzerinde işlenmiştir. Çalışma kapsamında hedeflenen anket sayısına ulaşmak için 29.790 çağrı gerçekleştirilmiş, %14,35 cevaplanma oranıyla 4.275 başarılı anket uygulanmıştır. Telefona cevap vermeme, müsait olmama, numaranın meşgul olması, hattın kesilmesi, telefonun kapalı olması, anket yapılmasını reddetme vb. nedenlerle 25.512 anket tamamlanamamıştır.

Elde edilen verilerin frekans, yüzde ve ortalama değerleri hesaplanmıştır. İstatistiksel analizde Ki-kare testleri yapılmış ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Katılımcıların %50,13 ($n=2.143$)'ü erkek, %49,87 ($n=2.132$)'si kadındır. Yaş ortalaması $38,64 \pm 13,40$ yıl olarak hesaplanmıştır. Ortalama anket süresi 13 dakika 19 saniye olarak ölçülmüştür. Demografik değişkenlere ilişkin bulgular Tablo 1'de sunulmuştur:

Katılımcıların %73,68'i evli ve %72,19'unun çocuğu vardır. Anaokulu ya da ilköğretim çağında çocuğu olanların oranı %59,11'dir. Katılımcıların okulların açılması hakkındaki görüşlerinin çoğunluğu %43,58 ile salgın kontrol altına alınmadan okulların açılmaması yönündedir. Anketi cevaplayanların %50,15'i büyükşehirde ve %58,83'ü apartman dairesinde yaşamaktadır. Çalışmaya katılan kişilerin %23,08'i işçi, %20,42'si ev hanımıdır. Katılımcıların %57,36'sı pandemi döneminde hane gelirinde azalma olduğunu belirtmiştir. Pandemi döneminde insanların %65,36'sı toplu taşıma aracı kullanmadığını belirtmiştir. Toplu taşımayı kullanan kişiler de arada bir ya da çok nadir kullandıklarını belirtmişlerdir.

İnsanları genel olarak güvenilir bulma, COVID-19 haberlerini takip etmek için kullanılan haber kaynağı ve COVID-19'un ortaya çıkış sebebine ilişkin fikir dağılımı Tablo 2'de sunulmuştur.

COVID-19 ile ilgili genel sorulara ilişkin bulgular Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo 1. Demografik değişkenlere ilişkin bulgular

Madde	Boyut	%
Yaşanılan Yer	Büyükşehir	50,15
	Şehir	31,51
	Kasaba	10,48
	Köy	7,46
	Belirtmek İstemedi	0,40
Medeni Durum	Evli	73,68
	Bekar	23,42
	Boşanmış	1,61
	Eşi Vefat Etmış	0,87
	Diğer	0,05
	Belirtmek İstemedi	0,37
Öğrenim Durumu	Lise ve Dengi Okul Mezunu	28,89
	Üniversite Mezunu	26,25
	İlkokul Mezunu	25,31
	Ortaokul ve Dengi Okul Mezunu	14,80
	Lisansüstü Eğitim Mezunu	2,74
	Okuma Yazma Biliyor	0,98
	Okuma Yazma Bilmiyor	0,75
	Belirtmek İstemedi	0,28
Çocuk Durumu	Çocuğu Var	72,19
	Çocuğu Yok	27,11
	Belirtmek İstemedi	0,70
Pandemide Gelir Değişimi	Azaldı	57,36
	Değişmedi	39,39
	Arttı	2,01
	Belirtmek İstemedi	1,24

Tablo 2. İnsanları genel olarak güvenilir bulma, COVID-19 haberlerini takip etmek için kullanılan haber kaynağı ve COVID-19'un ortaya çıkış sebebine ilişkin fikir dağılımı

Madde	Boyut	%
İnsanları Genel Olarak Güvenilir Bulma	Hayır Güvenilir Değildir	79,46
	Evet Güvenlidir	14,76
	Belirtmek İstemedi	5,78
COVID-19 Haber Kaynağı	Geleneksel Medya	52,51
	Sosyal Medya	38,85
	Takip Etmiyor	7,91
	Belirtmek İstemedi	0,73
COVID-19 Ortaya Çıkış Sebebi	Laboratuvar Ortamında	43,51
	Bilmiyor	36,14
	Doğal Yollarla	17,82
	Belirtmek İstemedi	2,53

Tablo 3. COVID-19'a dair genel sorulara ilişkin bulgular

	Hayır (%)	Evet (%)	Belirtmek istemedi (%)
Genelde mutlu bir insan olduğunuz söylenebilir mi?	12,47	79,13	8,40
Toplu taşımayla seyahat etmek zorunda kalan aile bireyiniz var mı?	50,92	41,64	7,44
Maske temin etmekte zorlanıyor musunuz?	77,08	15,46	7,46
Kronik bir sağlık probleminiz/hastalığınız var mı?	67,39	25,19	7,42
Koronavirüsün büyük güçlerin bir komplosu olduğu iddiasına katılıyor musunuz?	34,90	45,26	19,84
Kalabalık mekânlarda maskeyi her zaman kullanıyor musunuz?	1,80	89,94	8,26
Diğer insanlarla sosyal (fiziksel) mesafeyi korumaya her zaman dikkat ediyor musunuz?	3,79	88,12	8,09
Koronavirüsten korunmak için temizlik kurallarına dikkat ediyor musunuz? (ellerinizi sabunlu suyla yıkamak vb.)	0,59	91,53	7,88
Yakın çevrenizde Koronavirüse yakalanan oldu mu?	29,59	62,20	8,21
Dışarıda maske takmanın yasal zorunluluk haline getirilmesinin doğru olduğunu düşünüyor musunuz?	4,82	86,32	8,86
Koronavirüse yakalanabileceğinizi düşünüyor musunuz?	9,22	78,04	12,74
Yakalanmanız halinde, Koronavirüsü kolayca atlatabileceğinizi düşünüyor musunuz?	23,93	48,44	27,63
Gelecekte maddi açıdan temel ihtiyaçlarınızı karşılayamama korkusu yaşıyor musunuz?	30,24	59,56	10,20

COVID-19 haberlerini geleneksel medya ile takip edenlerin %62,81'i, sosyal medya/internet aracılığıyla takip edenlerin %62,37'si, haberleri takip etmemeyi tercih edenlerin ise %50'si resmi kaynaklardan yapılan tavsiye ve uyarılara sıkı sıkıya uymaya çalıştığını belirtmiştir. Örneklemin neredeyse tamamı resmi kaynaklardan yapılan tavsiye ve uyarılara genelde uymaya çalıştığını ve sıkı sıkıya uymaya çalıştığını belirtmişlerdir. Kronik rahatsızlığı olan kişilerin olmayanlara göre tavsiye ve uyarılara daha sıkı sıkıya uymaya çalıştığı görülmüştür (%65,74).

Katılımcıların büyük çoğunluğu (%79,46) insanları genel olarak güvenilir bulmamaktadır. 65 yaş ve

üzerindeki bireylerin insanlara güven düzeyi %23,68 ile diğer yaş gruplarına göre daha yüksektir. COVID-19 sonrasında kurum ve kişilere güven düzeyi sorulmuştur. Örneklemin %85,17'si T.C. Sağlık Bakanına ve %79,98'i T.C. Sağlık Bakanlığına güvendiğini belirtmişlerdir. Ayrıca doktorlara/uzmanlara güven %78,46; devlete güven %76,7; COVID-19 Bilim Kuruluna güven ise %71,83'dür.

Kasaba ve köylerde yaşayan katılımcılar çevrelerinde yaşayan insanların şehir ve büyükşehirlerde yaşayanlardan daha yüksek oranda sosyal (fiziksel) mesafe kurallarına uyduğunu belirtmişlerdir. Katılımcıların büyük çoğunluğu

(%91,53) COVID-19'dan korunmak için temizlik kurallarına dikkat ettiğini belirtmiştir. Kronik rahatsızlığı olanların ise %99,07'si temizlik kurallarına dikkat ettiklerini belirtmişlerdir.

Katılımcıların %86,32'si dışarıda maske takmanın yasal zorunluluk haline getirilmesini doğru olarak değerlendirmektedir. Şehirde yaşayan insanların %89,68'i, köyde yaşayan insanların %87,46'sı, kasabada yaşayan insanların %84,60'ı ve büyükşehirde yaşayan insanların %84,51'i dışarıda maske takmanın yasal zorunluluk haline getirilmesini doğru olarak değerlendirmektedir.

Katılımcılar incelendiğinde en çok %84,21 ile 65 yaş ve üzerindeki kişilerin ve %81,17 ile 35-44 yaş aralığındaki kişilerin COVID-19'a yakalanabileceğini düşündüğü görülmüştür. 18-24 yaş aralığındaki kişilerin %12,45'i COVID-19'a yakalanabileceğini düşünmemektedir. Ayrıca büyükşehir ve şehirlerde yaşayan kişiler köy ve kasabalarda yaşayan kişilere göre daha fazla oranda COVID-19'a yakalanabileceğini düşünmektedirler, en düşük oranda COVID-19'a yakalanabileceğini düşünenler ise %70,53 ile köylerde yaşayan katılımcılardır. Üniversite ve üstü düzeyde öğrenim durumuna sahip kişilerin COVID-19'a yakalanacağını düşünme oranı diğer öğrenim durumlarına göre daha yüksektir.

Yakın çevresinde COVID-19 vakası olanların %88,34'ü, fiziksel yakınlık gerektiren işlerde çalışan aile ferdi olan katılımcıların %87,67'si COVID-19'a yakalanabileceğini düşünmektedir. Yakın çevresinde COVID-19'a yakalananların olduğu katılımcıların olmayanlara göre ve fiziksel yakınlık gerektiren işlerde çalışan aile ferdi olanların olmayanlara göre daha yüksek oranda COVID-19'a yakalanacağını düşündüğü görülmüştür.

Toplu taşımayı hemen hemen her gün kullanan katılımcılar %81,35 ile diğer düzeylere göre daha yüksek oranda COVID-19'a yakalanabileceğini düşünmektedir. Ancak toplu taşımayı kullanım ve kullanım sıklığının katılımcının COVID-19'a yakalanılması halinde kolay atlatılabileceğini düşünmesine anlamlı etkisi

bulunmamıştır. COVID-19'a yakalanması halinde en kolay atlatılabileceğini düşünen grup %56,68 ile 18-24 yaş aralığındadır. Kronik rahatsızlığı olanların %33,05'i COVID-19'u kolayca atlatılabileceğini düşünürken, kronik rahatsızlığı olmayanların %59,49'u kolayca atlatılabileceğini düşünmektedir.

Pandemi döneminde komşuluk ilişkileri incelendiğinde katılımcıların yaklaşık %80'i ilişkilerin azaldığını belirtmişlerdir. Ancak katılımcıların yaşadığı yer ve oturduğu ev tipine göre komşuluk ilişkilerinin değerlendirilmesi açısından anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Çevresinde sözel şiddetin arttığını belirtenlerin oranı %25,45, fiziksel şiddetin arttığını belirtenlerin oranı da %15,65'dir. Pandemi döneminde kişinin kendisine yönelik sözel ve fiziksel şiddet değişimi incelendiğinde yaş, cinsiyet ve medeni durum değişkenlerine göre anlamlı fark olmadığı, kişinin yaşadığı yer ve öğrenim durumu açısından anlamlı fark olduğu görülmüştür.

Katılımcıların %43,51'i COVID-19'un laboratuvarda üretilerek ortaya çıktığını, %17,82'si ise doğal yollarla ortaya çıktığını düşünmektedir. COVID-19'un büyük güçlerin bir komplosu olduğunu düşünenlerin oranı %45,26'dır.

T.C. Sağlık Bakanlığının COVID-19'la mücadele çalışmalarından memnuniyet %73,52'dir (10'lu ölçekte 6-10 arası verilen cevapların yüzdeleri toplanmıştır). Katılımcılar diğer ülkelerle karşılaştırıldığında Türkiye'nin devlet olarak salgınla mücadelesini %67,79 oranında daha başarılı olarak değerlendirmektedir.

Üniversite ve üstü düzeyde mezun olanların iş hayatı ile ilgili kaygım yok şeklinde cevap verme oranı diğer öğrenim durumlarına göre daha yüksek olmakla beraber %40'ın üzerindedir. Memurların yaklaşık dörtte üçü iş konusunda kaygısı olmadığını belirtirken, kaygılıym cevabını en yüksek oranda %25,29 ile esnaf ve %21,07 ile işçiler vermiştir. Ayrıca yevmiyeli çalışanların yarısından fazlası (%53,70) bu süreçte işsiz kaldığını belirtmiştir.

18-24 yaş aralığındaki gençlerin %65,76'sı gelecekte maddî açıdan temel ihtiyaçlarını karşılayamama korkusu yaşamaktadır. Bütün yaş gruplarının yarısından fazlası gelecekte maddî açıdan temel ihtiyaçlarını karşılayamama korkusu yaşadığını belirtmiştir. Öğrenim durumu açısından ise üniversite ve üstü düzeyde mezun olanların gelecekte maddî açıdan temel ihtiyaçlarını karşılayamama korkusu diğer gruplara göre daha düşüktür. Hane geliri 2.000 TL ve altı olan katılımcıların %73,50'si gelecekte maddî açıdan temel ihtiyaçları karşılayamama korkusu yaşamaktadır.

Katılımcıların %53,38'i başkalarıyla fiziksel yakınlık gerektiren bir iş yapmaktan çok huzursuz olduklarını belirtmiştir. Kronik rahatsızlığı olan katılımcılarda bu oran %60,91'dir. Başkalarıyla fiziksel yakınlık gerektiren bir yerde bulunmaktan katılımcıların %58,25'i çok huzursuz olduğunu belirtmiştir. Bu oran kronik rahatsızlığı olan katılımcılarda %64,16; çevresinde COVID-19'a yakalanan kişi olanlarda ise %64,76'dır. Örneklemin %51,88'i başkalarıyla fiziksel yakınlık gerektiren bir işte çalışan biriyle karşılaştığında, %51,37'si başkalarıyla fiziksel yakınlık gerektiren bir yerde bulunan biriyle karşılaştığında huzursuz olmaktadır.

Anketi cevaplayanların yaklaşık %70'i sevdiklerini kaybetmekten korktuklarını belirtmiştir. Bu oran kronik rahatsızlığı olanlarda %75,76, çevresinde COVID-19'a yakalanan kişi olanlarda ise %76,24'dür. Fiziksel yakınlık gerektiren işlerde çalışan aile ferdi olanların %81,16'sı sevdiklerini kaybetme korkusu yaşamaktadır.

Katılımcıların %34,95'i ölüm korkusunun arttığını belirtirken, kronik hastalığı olanların %43,55'i, yakın çevresinde COVID-19'a yakalanan kişi olanların %37,99'u ölüm korkusunun arttığını belirtmiştir. Bu oran fiziksel yakınlık gerektiren işlerde çalışan aile ferdi olanlarda %42,29'dur.

Sürekli virüs kapma korkusu yaşayan katılımcıların oranı %44,28'dir. Şehirlerde yaşayanların %47,21'i, kasabalarda yaşayanların %46,87'si sürekli virüs kapma

korkusu yaşadığını belirtmiştir. Büyükşehirlerde yaşayanlar diğer gruplara göre %41,93 ile daha düşük seviyede virüs kapma korkusu yaşadıklarını belirtmişlerdir. Haberleri geleneksel medyadan takip edenlerin %46,01'i, sosyal medyadan takip edenlerin %43,16'sı takip etmeyenlerin ise daha düşük seviyede %37,87'si sürekli virüs kapma korkusu yaşadığını belirtmişlerdir. Fiziksel yakınlık gerektiren işlerde çalışan aile ferdi olanlarda ise bu oran %52,33'dür.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Toplumun COVID-19 salgını döneminde nabzını tutmayı amaçlayan bu araştırma bize şunu göstermiştir. Salgının süresi uzadıkça toplumda varoluşsal kaygılar artmıştır. Nitekim anketi cevaplayanların %40'ı ölüm kaygım arttı, %51'i virüs kapma kaygım arttı ve %79'u da sevdiklerimi kaybetme kaygım arttı cevabını vermiştir. Daha önce yapılan başka araştırmaların sonuçları ile karşılaştırdığımızda, bu oranlar Nisan 2020'nin hayli üzerindedir (15). Aradan geçen süre içinde insanlar yorulmuşlardır. Bazılarında bıkkınlık ve umursamazlık artmış; ne olursa bir an önce olsun ve şu belirsizlikten kurtulayım ruh hali hissedilmeye başlanmıştır. Özellikle kadınların varoluşsal kaygıları erkeklere göre çok daha yüksektir. Bağışıklık sistemleri nispeten daha güçlü olan gençler arasında ise sevdiklerini kaybetme kaygısının öne geçtiğini görüyoruz. Özellikle yakın temas gerektiren işlerde çalışan en alt gelir grubunda ölüm ve virüs kapma korkusu diğerlerinden daha fazla artmıştır.

Güven bir sosyal sermayedir. Başka insanları ne ölçüde bencillikten uzak ve güvenilir kişiler olarak değerlendiriyorsak, o ölçüde sağlam toplumsal ilişkiler kurabiliyoruz. Güçlü sosyal bağlar, insanların kaygılarının giderilmesinde etkili bir faktördür. Nitekim genelde insanları güvenilir bulanların varoluşsal kaygıları diğerlerinden çok daha düşüktür. Benzer durum devlete güven konusunda da geçerlidir. Devlete güven arttıkça da varoluşsal kaygılar büyük ölçüde gerilemektedir.

Salgın bütün insanları sınıf farkı gözetmeksizin tehdit etmesine rağmen, herkes bu salgından aynı oranda etkilenmemiştir. Yoksulların, işsizlerin, eğitim düzeyi düşük olanların, kadınların salgından etkilenmeleri, diğerlerinden farklı olmuştur. Bu süreçte kadınların ve dezavantajlı grupların yaşadığı sıkıntılar, diğerlerinden daha ağırdır (8). Salgın toplumun önemli bir bölümünü çalışamaz hale getirmiştir. Bu sebeple geçimini temin etmek geniş bir kesim için önemli sorunlardan birisi haline geldi. Anketi cevaplayanların %66'sı "Gelecekte maddi açıdan temel ihtiyaçlarımızı karşılayamama korkusu yaşıyorum", %58'i de salgın sonrasında gelirim azaldı diyor. Yine anketi cevaplayanların %19,70'i salgın sonrasında işsiz kaldım derken, %13,3'ü zaten işsizdim, %13,4'ü ise gelecekte işimi kaybetme kaygısı yaşıyorum cevabını vermiştir. Anketi cevaplayanların sadece %33,1'i iş konusunda kaygı duymamaktadır. Bunlar da çoğunluk itibarıyla memurlar ve emeklilerdir. Özellikle kadınlar, eğitim düzeyi düşük gruplar, işsizler, yevmiyeli çalışan işçiler, öğrenciler ve gençler arasında temel ihtiyaçları karşılayamama korkusu diğerlerinden daha fazladır. Bu konuda görece rahat olanlar memurlar ve emeklilerdir. Devlete güven de arttıkça varoluş kaygılarında olduğu gibi ekonomik kaygılarda da önemli ölçüde gerileme söz konusudur.

Türkiye'de insanlar genelde yakın çevresine güvenirliler. Yakın çevrenin dışında kalanlara güven genelde düşüktür. Oysa güven toplumda iş birliği için son derece kıymetlidir. Ekonomik faaliyetlerde işlem maliyetini, toplumda ise kutuplaşmayı azaltır. Sosyal bilimciler, güveni ölçmek için 1950'li yıllardan beri ilki insanların genellikle güvenilir olmadığını ve dikkatli olunması gerektiğini, ikincisi ise insanların genelde güvenilir olduğunu ifade eden 2 seçenekten oluşan bir soru kullanırlar. 1989 yılından itibaren Türkiye'de de uygulanmaya başlanan Dünya Değerler Araştırmasına göre Türkiye'de genelde diğer insanları güvenilir bulanların oranı %20'lere düşmüştür. Ancak salgının yarattığı belirsizlik insanların güven duygularını derinden sarsmıştır (16). Zaten düşük olan güven düzeyi çok daha gerilemiştir. Nitekim anketi cevaplayanların

sadece %14,80'i insanları genelde güvenilir bulduğunu ifade etmiştir. Yaş, gelir ve eğitim düzeyi geriledikçe güven de gerilemektedir. Kadınlar arasında güven erkeklere göre daha azdır. Kurumlara güven ile genelde insanlara güven arasında pozitif yönlü anlamlı bir korelasyon vardır. Hayata dair varoluşsal kaygıların artışı insanların serinkanlı/analitik düşünme becerilerini zayıflatır. Güven duygusuyla insanların komplo teorilerine inanmaları arasında da güçlü bir ilişki vardır.

Güven düzeyi düşük toplumlarda komplo teorileri daha kolay yayılır. Bir ülkede toplumu birbirine bağlayan güven duygusu ne kadar zayıfsa, o ülkede komplo teorilerine ilgi o kadar yüksek olur. Komplo teorilerinin en çok ilgi gördüğü ülkelerden birisi de ABD'dir. PEW Research'ın araştırmasına göre bu ülkede Cumhuriyetçiler salgını komplo ile diğerlerine göre daha fazla ilişkilendirmektedir. Buna karşılık komplo teorilerine biraz daha mesafeli duran Demokratlar, COVID-19 tedbirlerine daha fazla uyum gösterme eğilimindedirler.

Ülkemizde "COVID-19'u büyük güçlerin komplosu" olarak görenlerin oranı %45,26'tır. Bu oran komplo teorilerinin görece yaygın olduğu Arap ülkelerini bile geride bırakmıştır (20). Oysa geleneksel olarak komplocu düşüncenin hayli yaygın olmasına karşın bu oran Nisan 2020'de %34'tü. Bunun yanında yine anketi cevaplayanların %43,51'i COVID-19'un laboratuvarda üretildiğine inanmaktadır. Özellikle sosyal medya olmak üzere bazı iletişim kanallarında virüsün yalan olduğuna veya insanlara çip takmak için üretildiğine dair etkili bir dezenformasyon söz konusudur. Yukarıda da ifade edildiği üzere salgın sonrasında insanların temel güvenlik duyguları sarsılmıştır. Belirsizlik ne kadar uzarsa, endişe o ölçüde artar ve insanların analitik düşünme becerileri zayıflar. Böyle bir durum insanların akıl dışı senaryolara inanmalarını kolaylaştırır. Her insan belirsizlikten korkar. Cevabını aradığı sorulara verilen anlaşılır ve basitleştirilmiş net cevaplar, bireylerin zihnindeki belirsizliği ve bunun yarattığı kaygıları azaltır. Komplo

teorisyenleri belirsizlikten tedirgin olan insanların bu zaafını istismar etmektedir. İçinde yaşadığımız dünya insan aklının kavrayabileceğinin çok ötesinde karmaşıktır. Bilim insanları bu karmaşık dünyada bizim sorunlarımıza çözüm aramaktadır. Dolayısıyla uzmanların bilgileri (veya bilimsel araştırmalar) ne kadar sadeleştirilse de komplo teorilerinin basitliğine ve kesin ifade biçimine ulaşamayacaktır. Ancak basitleştirilmiş yorumların, güvenilirliği olmayan deliller olmaksızın kesin bir dille ifade edilmesi onların doğru olduğu anlamına gelmez. Komplo teorilerinden ve bilgi kirliliğinden toplumu koruyabilmek için ilgili konuda uzman olanların dinlenmesinin önemi insanlara anlatılmalıdır.

COVID-19'u büyük güçlerin komplosu olarak görenler T.C. Sağlık Bakanına ve Bilim Kurullarına daha az güvenmektedirler. Politik görüş olarak kendilerini sağda konumlandıranlar arasında virüsü büyük güçlerin komplosu olarak görenlerin oranı, solda konumlandıranların iki katından fazladır.

Salgın, insanlığın yaşam memnuniyetini derinden etkilemiştir. Kendilerinin ve sevdiklerin yaşamlarını tehdit altında hisseden insanlar arasında kaygı düzeyi yükselirken, yaşam memnuniyetleri gerilemiştir. Nitekim geçmişte SARS salgını sonrasında insanların önemli bir bölümü psikolojik rahatsızlıklar yaşadığını ifade etmişlerdir (29). Salgın dönemlerinde depresyonun ve stresin arttığı gözlemlenmiştir (13, 11, 12). Özellikle işsiz erkeklerin yaşam memnuniyetleri, işsiz kadınlardan daha düşük olmuştur.

COVID-19 araştırması kapsamında genelde hayatından memnun olduğunu söyleyenlerin oranının %50'nin biraz altında olduğu görülmektedir. Bu beklenen bir sonuçtur ve farklı ülkelerin deneyimleri ile benzerdir (29). Diğer taraftan "Genelde mutlu bir insan olduğunuz söylenebilir mi?" sorusuna ise, anketi cevaplayanların %86'sı mutluyum şeklinde cevap vermiştir.

Buna karşılık "Küresel salgın sonrası yaşadığınız hayattan ne kadar memnunsunuz?" sorusunda yaş arttıkça yaşam memnuniyetinin de istikrarlı biçimde

arttığı gözlenmektedir. Yaşam memnuniyeti kişinin sosyoekonomik durumu ile yakından ilişkilidir. Bu sebeple yaşam memnuniyetinde gelir önemli bir göstergedir. Gelir arttıkça yaşamından memnun ve mutlu olduğunu söyleyenlerin oranları istikrarlı biçimde artmaktadır. Nitekim "Gelecekte maddi açıdan temel ihtiyaçlarımı karşılayamama korkusu yaşıyorum" diyenler arasında yaşam memnuniyeti belirgin olarak gerilemektedir. COVID-19 salgını bütün dünyada yoksulların yanında en çok gençleri etkilemiş görülmektedir. Bu durumun ortaya çıkmasında dünya genelinde daralan istihdam alanlarının önemli rol oynadığı söylenebilir.

Anketi cevaplayanların %16,70'i maske temin etmekte zorlandığını ifade etmektedir. Kadınlar, düşük gelirliler, 25 yaş altı gençler, kalabalık aileler, işsizler, ev hanımları, yevmiyeli çalışanlar ortalamasının hayli üzerinde maske temininde zorlandığını ifade etmektedir. Yine beklenildiği şekilde bu grubun yaşam memnuniyeti, devlete ve Bakanlık faaliyetlerine güvenleri daha düşük ve varoluşsal kaygıları daha yüksektir. Maske temininde sıkıntı yaşayanların salgın süresince maske ihtiyacının karşılanması önem arz etmektedir.

Yüz yüze, çevrimiçi veya CATI (telefon) anketlerinin tümüne katılım gönüllülük esasına bağlıdır. Dolayısıyla anketlere genelde sorumluluk düzeyi yüksek insanlar cevap vermektedir. Bencilik eğilimi yüksek insanlar kolayca hayır diyebilmektedir. Bu gerekçeyle anketlerde salgın kurallarına uyum oldukça yüksek çıkmaktadır. Nitekim ankete katılanların %98'i maske, %96'sı mesafe, %99'u temizlik kuralına uyduğunu söylemektedir. Anketi cevaplayanların ezici bir çoğunluğu (%95) dışarıda maske takmanın yasal zorunluluk haline getirilmesinin doğru olacağını düşünmektedir. Mesafe kuralına kadınlar erkeklerden, yetişkinler gençlerden biraz daha fazla uyduklarını ifade etmektedirler.

Zor zamanlar insanları birbirine yakınlaştırır. Benzer ihtiyaçlar ve değerler, toplumsal dayanışmayı güçlendirir. Durkheim'ı izleyerek ifade edersek

modern toplumun gelişiyle bireyselleşme ve toplumsal farklılaşma artar. Benzerliklerden kaynaklanan dayanışmanın yerini iş bölümünden kaynaklanan dayanışma alır (30, 31). Türk toplumunda hızlı toplumsal hareketliliğin de etkisiyle, geleneksel bağlar büyük ölçüde zayıflamış ancak modern toplumun getirdiği değerler ve normlar konusunda kafa karışıklığı (kısmi anomie) devam etmektedir. Biraz da bunun neticesinde anketi cevaplayanların %64'ü COVID-19 salgını sonrası akrabalar arasında dayanışmanın, %79'u komşuluk ilişkilerinin, %61'i de genel olarak toplumsal dayanışmanın zayıfladığı düşüncesindedir. Özellikle eğitim ile gelir azaldıkça ve yaş ilerledikçe dayanışmanın zayıfladığına inanç daha yaygınlaşmaktadır. Toplumsal dayanışmanın azaldığı kanaati yevmiyeli çalışanlar, işsizler, emekliler ve çiftçiler arasında daha yaygındır. Özellikle temel ihtiyaçlarını karşılama konusunda kaygısı olanlar toplumsal dayanışmanın gerilediğini düşünmektedirler (9, 27, 28). Bir diğer ifade ile toplumsal dayanışmaya ihtiyacı olan handikaplı gruplar, çevrelerinden daha fazla destek beklentisi içindedirler. Anketi cevaplayanların %58'i salgın sonrasında gelirim azaldı, %66'sı ise gelecekte maddi açıdan temel ihtiyaçlarımı karşılayamama korkusu yaşıyorum demektedir. Hal böyle olunca geniş bir kitlenin destek ihtiyacı ve beklentisi artmıştır.

Birçok ülkede salgın sonrasında bazı suçlar (örneğin hırsızlık) azalırken, bazılarının (ör. dijital suçlar) arttığı dile getirilmiştir. Özellikle de dünya genelinde ev içi şiddetin artışı en önemli toplumsal sorunlardan birisi olmuştur. Polis kayıtları da ev içi şiddetin artışını destekler niteliktedir. Çünkü insanlar uzun süre evlerine kapalı kalmışlardır. Virüs kapma, ölüm veya sevdiklerini kaybetme korkusu birçok kişiyi çok daha huzursuz hale getirmiştir. Geçmişte yapılan bir çalışmada anketi cevaplayanların %17'si aile içi iletişim sorunlarını arttı diyordu. Özellikle 24 yaş altı gençler, geçim sıkıntısı çekenler ve işsizler arasında iletişim sorunları daha yaygındır. Ayrıca kendini hapsedilmiş gibi hisseden (%52) ve daha sinirli ve çabuk öfkelenir hale geldim diyen (%37) bir kitle de

söz konusudur.

Nitekim anketi cevaplayanların %27'si "COVID-19 sonrası çevremde sözel şiddet (bağırma, hakaret vb.) arttı", %17'si "COVID-19 sonrası çevremde fiziksel şiddet arttı" cevabını vermiştir. Buna karşılık %11'i bu dönemde kendilerine yönelik sözel şiddet, %4'ü ise kendilerine yönelik fiziksel şiddetin arttığını ifade etmişlerdir. Salgının yarattığı ekonomik sorunlar, varoluşsal kaygıları ve engellenmiş duygusu şiddet için uygun bir iklim oluşturmuştur. Nitekim daha sinirli/çabuk öfkelenir hale geldim diyenler arasında aile içi iletişim sorunlarının büyük ölçüde arttığını görüyoruz.

Gelir ve eğitim arttıkça şiddetin arttığını söyleyenlerin oranları da artmaktadır. Şiddet artışı konusunda en düşük oran yevmiyeli çalışanlardır. Bunun sebebi de eğitilmiş orta sınıf ve üzerinin şiddet olarak gördüğü eylemlerin bu kesimde gündelik hayatın rutini olarak algılanmasından kaynaklanıyor olabilir. Yaşadıkları yerleşim alanlarına göre karşılaştığımızda şiddet artışının en fazla büyük şehirlerde, en az köylerde olduğunu görüyoruz.

Bütün bu bulgulardan hareketle izlenebilecek POLİTİKA ÖNERİLERİ şu şekilde sıralanabilir:

- Anketi cevaplayanların üçte ikisi "Gelecekte maddi açıdan temel ihtiyaçlarımızı karşılayamama korkusu yaşıyorum", %58'i de salgın sonrasında gelirim azaldı diyor. Bu sebeple devletin işsiz kalan veya gelir kaybı yaşayan kitleye imkânları ölçüsünde doğrudan gelir desteği sağlaması önem taşımaktadır. Gerekirse vatandaşlık maaşının uygulamaya konulması gündeme alınmalıdır. Bu konu doğrudan T.C. Sağlık Bakanlığının ilgi alanına girmese de sorunun büyük ölçüde salgından kaynaklanması ve T.C. Sağlık Bakanlığının hükümetin bir parçası olması, hükümet nezdinde bu sorunların dile getirilmesine aracılık edebilir.

- Sosyal politika uzmanlarına göre, işten çıkarma yasağının kalkması sonrasında, hızlanması muhtemel işsizlik oranına karşı gerekli tedbirler şimdiden alınmalıdır. Örneğin işsizlik sigortasının kapsamı ve süresi genişletilebilir. Ayrıca yararlanma şartları

hafifletilebilir. İşsizlik sigortası dışında kalan gruplar için de şimdiden alternatif destek araçları tasarlanabilir.

- Sanat ve eğlence sektörü çalışanlarının durumu bütün dünyada olduğu gibi bizde de çok sıkıntılıdır. Bu sektörde çalışan müzisyenlerin/sanatçıların çoğu sosyal güvenlik vs. koruma imkânlarına sahip değildir. Müzisyenler ve özel tiyatro oyuncuları başta olmak üzere bu sektörde kalabalık bir kitle zor durumdadır. Bunları da hesaba katacak şekilde salgın destekleri düşünülebilir.

- Küçük işyerlerinin ve esnafın çökmesinin toplumda sarsıntılara yol açabileceği sıkça dile getirilmektedir. Zor durumda olan esnafın borçlarının ertelenmesi, vergi indirimleri ve nakit desteği yapılması salgının esnaf üzerindeki yükünü hafifletecektir.

- Yine devletin, dezavantajlı kesimlere temel gıda temini hususunda yardımcı olması salgının yoksullar üzerindeki olumsuz sosyal ve ekonomik etkilerini azaltabilir.

- Kadınlar, gençler, yoksullar, işsizlere yönelik özel çalışmalar yapılmalıdır. Maske temininde zorlananlar için ücretsiz maske temin edilmedi.

- COVID-19 Barometresinin sonuçları daha önceki benzer araştırmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında toplumun varoluşsal kaygılarında belirgin bir artışın; yaşam memnuniyetinde ise ciddi anlamda bir gerilemenin olduğu görülmektedir. Toplumun sarsılan güven duygusunu onaracak kampanyalar ve çalışmalar yapılmalıdır.

-Toplumda dayanışmayı ve biz duygusu geliştirmeye yönelik bir dilin inşa edilmesi, toplumda farklı toplumsal katmanlar arasında güven duygusunu güçlendirecek ve pandemi yönetimini kolaylaştıracaktır.

- Bugüne kadar devlet salgınla mücadeleyi sağlık çalışanlarımızın olağanüstü fedakârlıklarıyla tek başına yürüttü. Sivil toplum kuruluşlarında da salgınla mücadele konusunda inisiyatif alanların sayısı yok denecek kadar azdı. Oysa milyonlarca üyesi olan

meslek örgütleri ve sivil toplum örgütlerinden bu süreçte faydalanılabildi. Salgın bitmiş ve bu fırsat kaçmış değil. Bu amaçla toplumun kanaat önderlerinin ve STK'ların düzenlenecek olan kampanyaya katılımı sağlanabilir.

- Özellikle hastalığı ağır atlatana ve bu süreçte depresyona girenlere yönelik psikolojik destek programları hazırlanabilir.

- Televizyonlara stresi ve korkuyu azaltılacak dizi ve programlara destek verilebilir.

- Aşı iletişiminin sağlıklı yürütülmesi hem toplumun aşya ikna edilmesine yardımcı olabilir, hem de bu salgını atlatacağımız konusunda topluma umut ve güven verecektir.

- Aşyla ilgili bilgilendirici kısa filmler yapılabilir.

- Toplumla iletişimde belirsizliği en aza indirecek şekilde yürütülmesi, muğlak ve birbiri ile çelişen ifadelerden kaçınılması önemlidir.

- Salgının ve aşının yönetiminde açıklık ve bilgi paylaşımı son derece önemlidir. Araştırmada Türk toplumunun sadece %15'inden azının genelde insanları güvenilir bulduğunu akılda tutmakta fayda vardır. Bu kadar güven duygusu düşük bir toplumda, iletişimde açıklık, süreklilik ve bütünlük önem taşımaktadır. Aksi takdirde güven hızla yok olmaktadır. Salgınla mücadelede bütün toplumsal grupların desteğini almak önem taşımaktadır.

- Salgınla mücadeleyi zorlaştıran unsurlardan birisi infodemi (bilgi kirliliği) ve özellikle komplo teorileridir. Salgının başlangıcından bugüne toplumda komplo teorilerine inananların oranı hızla artmaktadır. Bazı TV kanalları ve sosyal medya toplumda kafa karışıklığına neden olmaktadır. Bu konuda yapılacak faaliyetlerle vatandaşların farkındalığı artırılabilir.

- Toplumun önemli bir kısmı dayanışmanın zavıfladığını düşünmektedir. Toplumsal dayanışmayı ve bağları güçlendirmeye yönelik kampanyalar hazırlanabilir. Toplumsal dayanışmayı teşvik için TBMM'deki vekiller 1 aylık maaşlarını salgınla mücadele için bağışlayabilir. Bu hareket, topluma

güçlü bir moral verecektir. Camilerde salgına destek bağışı toplanabilir. Ancak bu bağışlar yerelde kullanılmalıdır.

- Salgın toplumun önemli bir bölümünde huzursuzluğu artırmıştır. Bu durum iletişim

sorunlarını ve aile-içi şiddeti teşvik eden uygun bir ortam oluşturmaktadır. Şiddeti durdurmaya yönelik çalışmalara ağırlık verilmesi, pandeminin psiko-sosyal hasarını azaltmaya katkı sağlayacaktır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Etik Komisyonu, Ölçme Değerlendirme Etik Alt Çalışma Grubu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 14.07.2020 ve Karar No: E-77082166-604.01.02-87852).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Dikmen AU, Kına MH, Özkan S, İlhan MN. COVID-19 epidemiyolojisi: Pandemiden ne öğrendik? J Biotechnol and Strategic Health Res, 2020; 4; 29-36.
2. Yıldırım N. Osmanlı coğrafyasında karantina uygulamalarına isyanlar: Karantina istemezük. Toplumsal Tarih, 2006; 150; 18-27.
3. Xu, Cheng. Individual differences in social distancing and mask-wearing in the pandemic of COVID-19: The role of need for cognition, self-control and risk attitude. Pers Individ Differ, 2021; 175; 110706.
4. Haischer MH et al. Who is wearing a mask? Gender-, age-, and location-related differences during the COVID-19 pandemic. PLoS ONE, 2020; 15 (10).
5. Chan DKC, Zhang CQ, Josefsson KW. Why people failed to adhere to COVID-19 preventive behaviors? Perspectives from an integrated behavior change model. Infect Control Hosp Epidemiol, 2021; 42 (3); 375-376.
6. İpekoğlu HY. Karantina günlükleri: Üniversite öğrencileri gözünden Koronavirüs (COVID-19) pandemisi ve karantina süreci. Motif Akademi Halkbilimi Derg, 2021; 14; (33); 162-183.
7. Bayhan V. Küresel salgının sosyolojisi ve yeni normal dönemde paradigma dönüşümü. In: Şeker M, Özer A, Korkut C, eds. Küresel Salgının Anatomisi: İnsan ve Toplumun Geleceği. Ankara: TÜBA Yayınları, 2020.
8. Bozkurt V. Pandemi döneminde çalışma: Ekonomik kaygılar, dijitalleşme ve verimlilik. In: Demirbaş D, Bozkurt V, Yorğun S, eds. COVID-19 Pandemisinin Ekonomik, Toplumsal ve Siyasal Etkileri. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınevi, 2021: 115-136.

9. Barış İ, Taylan HH. Küresel salgın sürecinde Türkiye’de aile içi sorunlar. NOSYON: Uluslararası Toplum ve Kültür Çalışmaları Derg, 2020; 5; 13-32.
10. Koçak O, Koçak ÖE, Younis MZ. The psychological consequences of COVID-19 fear and moderator effects of individuals’ underlying illness and witnessing infected friends and family. Int J Environ Res Public Health, 2021; 18 (4); 1-15.
11. Sayar K. Kaygı Çağı: Salgın Zamanlarında Ruh Sağlığı. İstanbul: Kapı Yayınları, 2020.
12. Türkçapar MH. Kovid-19 kaygısı ve travması. In: Sayar K, ed. Kaygı Çağı: Salgın Zamanlarında Ruh Sağlığı. İstanbul: Kapı Yayınları, 2020.
13. Göka E. Psikolojimize protez bir ilave ve yeni normal. In: Şeker M, Özer A, Korkut C, eds. Küresel Salgının Anatomisi: İnsan ve Toplumun Geleceği. Ankara: 2020.
14. Göka E. Yepyeni bir dünyada yaşarken gezegenimize pandemi çarptı. In: Sayar K, ed. Kaygı Çağı: Salgın Zamanlarında Ruh Sağlığı. İstanbul: Kapı Yayınları, 2020.
15. Sayın Ö, Bozkurt V. Pandemide küresel kentte yaşamak: İstanbul’un COVID-19 deneyimi. In: Demirbaş D, Bozkurt V, Yorğun S, eds. COVID-19 Pandemisinin Ekonomik, Toplumsal ve Siyasal Etkileri. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınevi, 2021: 115-136.
16. Alkan H. COVID-19 sonrasında yönetsel kapasite: Demokrasi bağlamında devletlerin geleceği. In: Şeker M, Özer A, Korkut C, eds. Küresel Salgının Anatomisi: İnsan ve Toplumun Geleceği. Ankara: TÜBA Yayınları, 2020.
17. Dryhurst S et al. Risk perceptions of COVID-19 around the world. J Risk Res, 2020; 23; 994-1006.
18. Bargain O, Aminjonov U. Trust and compliance to public health policies in times of COVID-19. J Public Econ, 2020; 192.
19. Brodeur A, Grigoryeva I, Kattan L. Stay-at-home orders, social distancing and trust. J Popul Econ, 2021; 34 (4), 1321-1354.
20. Gülerce H, Bozkurt V, Cebeci A. Arap dünyasında COVID-19 pandemisinin sosyoekonomik etkileri. ORSAM Yayını, 2021.
21. Acar M. Korona sonrası dünya: Ekonomik, sosyal ve akademik hayatta ne değişecek, ne değişmeyecek? In: Şeker M, Özer A, Korkut C, eds. Küresel Salgının Anatomisi: İnsan ve Toplumun Geleceği. Ankara: TÜBA Yayınları, 2020.
22. Pummerer L, Böhm R, Lilleholt L, Winter K, Zettler I, Sassenberg K. Conspiracy theories and their societal effects during the COVID-19 pandemic. PsyArXiv, 2020.
23. Jolley D, Douglas KM. The effects of anti-vaccine conspiracy theories on vaccination intentions. PLoS One, 2014; 9 (2) e89177.
24. Li S, Wang Y, Xue J, Zhao N, Zhu T. The impact of COVID-19 epidemic declaration on psychological consequences: A study on active weibo users. Int J Environ Res Public Health, 2020; 17 (6); 2032.
25. Usher K, Bhullar N, Durkin J, Gyamfi N, Jackson D. Family violence and COVID-19: Increased vulnerability and reduced options for support. Int J Ment Health Nurs, 2020; 29 (4); 549-552.
26. Ergül B, Yılmaz V. COVID-19 salgını süresince aile içi ilişkilerin doğrulayıcı faktör analizi ile incelenmesi. IBAD Sosyal Bilimler Derg, 2020; 38-51.
27. Prime H, Browne DT, Wade M. Risk and resilience in family well-being during the COVID-19 pandemic. Am Psychol, 2020; 75 (5), 631-643.
28. Zhang H. The influence of the ongoing COVID-19 pandemic on family violence in China. J Fam Violence, 2020; 1-11.
29. <https://www.imperial.ac.uk/media/imperial-college/institute-of-global-health-innovation/public/Global-insights-on-life-satisfaction---COVID-19-behaviour-tracker.pdf> (erişim tarihi: 01.04.2021).
30. Durkheim, E. The Division of Labour in Society, The Macmillan Press Ltd., 1984.
31. Durkheim, E. İntihar, Çeviren: Z. İlgelen, Ankara: Pozitif Yayınevi, 2013.

Brucella Coombs gel test: Can it replace other serological methods as a rapid test in serological diagnosis of brucellosis?

Brucella Coombs jel testi: Brusellozun serolojik tanısında hızlı bir test olarak diğer serolojik yöntemlerin yerini alabilir mi?

Begüm Nalça ERDİN¹ (ID), Mehmet PARLAK² (ID), Ayşe GÜVEN AYDINLI³ (ID), Feyza DEMİR² (ID)

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was to compare the results of Brucella Coombs gel test (BCGT) with Standart tube agglutination test (STA), Coombs anti-Brucella test (CAB), Brucellacapt test (CAPT) for the serological diagnosis of brucellosis.

Methods: A total of 180 blood samples, were included in the study and were simultaneously tested with STA, CAB, CAPT and BCGT. Results of the tests were evaluated in terms of diagnostic performance and Kappa coefficient.

Results: When the tests were compared to CAB test, which is a reference method in the serological diagnosis of the brucellosis, in terms of diagnostic performance; the highest sensitivity (98.1%) and accuracy (98.9%) was found with BCGT. When tests were evaluated in terms of Kappa coefficient, BCGT had the highest value (0.796) and substantial agreement with CAB.

Conclusion: In conclusion, when compared with CAB, BCGT showed substantial agreement and highest sensitivity and accuracy. In addition, reduction of the period for test results and elimination of the need for experienced staff makes this test superior to other methods. Although BCGT seems to replace other tests in the serological diagnosis of brucellosis, its sensitivity and specificity should be put forward in culture-confirmed

ÖZET

Amaç: Çalışmada brusellozun serolojik tanısında kullanılan Standart tüp aglütinasyon testi (STA), Coombs anti-Brucella testi (CAB) ve Brucellacapt testi (CAPT) ile Brucella Coombs jel testinin (BCGT) sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 180 kan örneği çalışmaya dâhil edilmiş ve eş zamanlı olarak STA, CAB, CAPT ve BCGT çalışılmıştır. Testlerin sonuçları tanısıl performans ve kappa uyumu açısından değerlendirilmiştir.

Bulgular: Testler tanısıl performans açısından brusellozun serolojik tanısında referans bir yöntem olan CAB testiyle karşılaştırıldığında, en yüksek duyarlılık (%98,1) ve doğruluk (%98,9) BCGT testinde bulunmuştur. Testler Kappa analizi ile değerlendirilip yöntemler arası uyuma bakıldığında, yine BCGT'nin en yüksek değere (0.796) ve CAB ile önemli derecede uyuma sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç: Sonuç olarak, CAB ile karşılaştırıldığında, testler arasında BCGT'nin en yüksek duyarlılık ve doğruluğu gösterdiği ve CAB ile istatistiksel olarak anlamlı ve önemli düzeyde bir uyuma sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, test sonuçları için sürenin kısalması ve deneyimli personele duyulan ihtiyacı ortadan kaldırılması, bu testi diğer yöntemlerden üstün kılmaktadır. Her ne kadar BCGT, brusellozun serolojik tanısında diğer testlerin yerini alabilecek gibi görünse de kültür ile doğrulanmış vaka

¹Tuzla Public Hospital, Microbiology Laboratory, İstanbul

²Van Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Van

³Bursa Public Health Laboratory, Bursa



İletişim / Corresponding Author : Mehmet PARLAK

İçmeler Mahallesi Piri Reis Caddesi No: 74 Tuzla - İstanbul - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 05.03.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 02.07.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.83584

Erdin BN, Parlak M, Güven Aydınli A, Demir F. Brucella Coombs gel test: Can it replace other serological methods as a rapid test in serological diagnosis of brucellosis? Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 249 - 254

cases and controls with a comprehensive study.

Key Words: Brucella, brucella coombs gel test, standart tube agglutination, coombs, brucellacapt

ve kontrolleri içeren kapsamlı bir çalışma ile BCGT'nin duyarlılığı ve özgülüğü ortaya konmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Brusella, brucella coombs jel testi, standart tüp aglutinasyon, coombs, brucellacapt

INTRODUCTION

Brucellosis is a zoonotic infection that causes severe morbidity and, rarely, mortality in humans. Brucella species are intracellular, aerobic, small, gram-negative coccobacilli (1). Disease is transmitted to humans who have direct contact with ill animals or with those who consume contaminated meat and milk (2). Symptoms of brucellosis are usually nonspecific, such as fever, malaise, lack of appetite, and joint and back pain, and the disease can be acute, subacute, or chronic (1,3). Each year 500,000 new Brucella cases are reported worldwide and according to the Public Health Agency of Turkey data, in 2016, the number of cases of brucellosis in our country is 514; morbidity rate is 6.45 in 100,000 (4,5). Therefore, brucellosis is still hyperendemic and maintains its importance in Turkey.

Isolation of the Brucella spp. in blood and/or bone marrow culture is the gold standard for diagnosis, but isolation of the slow-growing bacterium is time consuming and requires experience, the success rate is low and laboratory-acquired infections may occur. Therefore serological tests are widely used for diagnosis. Standart tube agglutination test (STA), Coombs anti Brucella test (CAB), Brucellacapt test (CAPT) and ELISA are widely used serological tests. Rose Bengal test is often used as a screening test in brucellosis, but because of its high false-positive rate, it is not enough alone for the diagnosis (6). Although STA is a commonly used reference test, it is inadequate in the presence of blocking antibodies, and this may lead to false-negative results, especially in chronic cases and relapses (7,8). In these situations CAB or CAPT should be studied for laboratory diagnosis of the disease (9). Various studies have shown that

the specificity and sensitivity of CAB and Brucellacapt tests are close to each other (10,11). But all of these serological methods are labor-intensive, time-consuming, and require experienced personnel to be evaluated.

A new Brucella Coombs gel test (BCGT) (Odak Brucella Coombs gel test, Toprak Medikal, Turkey), which is not affected by the blocking antibodies, was developed in Turkey. This test is performed in vials that contain gel matrix with Coombs antibodies. The test can be used both for screening and titration, and results can be given in about 2 hours (12). The test is available in Turkey and it is reported that the results are similar with CAPT and CAB (13). The aim of this study is to compare the results of the BCGT with STA, CAB, and CAPT.

MATERIAL and METHOD

Study design

A total of 180 blood samples, which were sent to the microbiology laboratory of Van Regional Research Hospital with suspicion of brucellosis from various clinics between 01.09.2014-31.12.2014, were consecutively included in the study. Of these samples, 92 (51%) were obtained from females and 88 (49%) from males (F/M: 1.05). The mean age of the female patients was 37.8 ± 16.7 . The mean age of the male patients was 41.3 ± 28.7 .

According to the instructions 180 samples, were simultaneously tested with STA, BCGT (Odak Brucella Coombs gel test, Toprak Medikal, Turkey), CAB, and CAPT (Vircell, Spain). For STA anti-B.abortus serum (S99, Refik Saydam Hıfzısıhha Center, Ankara); for CAB goat anti-

bovine whole serum (Seromed, İstanbul) was used.

Serum samples were serially diluted to 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, and 1/1280 titers. For the diagnosis of the brucellosis 1/160 and above, titers were considered to be significant.

Standard Tube Agglutination Test

Serum samples were serially diluted to 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, and 1/1280 titers. Later standard anti-B.abortus serum (B.abortus S99, Refik Saydam Hfzissih Center, Ankara) was added to each sample and incubated at 37°C for 24 hours.

Coombs anti Brucella test

After STA, the tubes in which agglutination was not observed were centrifuged and washed three times with saline. The supernatant of each well was replaced with 25 µl of saline, and 25 µl of goat anti-bovine whole serum was added and incubated at 37°C for 24 hours.

Brucellacapt test

Test was performed in the plates according to the manufacturer's instructions and the plate was incubated for 18-24 hours at 37°C. The wells which contain Brucella antibody negative serum samples, were found to appear as blue dot at the bottom of the plate because the antigens sink to the bottom of the well without binding the wall. Brucella antibody-containing samples, which form a light-blue uniform appearance, have been assessed as positive.

Brucella Coombs gel test

Diluent in the amount of 100 µl to the first well and 50 µl to the other wells was put in the dilution plate. 5

µl of serum sample was added to the first well, which was then mixed. From the first well, 50 µl was added to the second well. By using this method, serial dilutions were made up to 1/1280, and 50 µl was removed from the last well. All wells were mixed by adding 50 µl of Brucella antigen suspension. After mixing the plate thoroughly, 50 µl of suspension from the corresponding well was pipetted into the corresponding well in the Brucella Gel Matrix. The Brucella Gel Matrix was centrifuged for 20 minutes and the observed results were evaluated. If the pink Brucella antigens were seen at the bottom of the tube, these wells were evaluated as negative. If the Brucella antibodies were present in the serum sample, antigen-antibody complexes were seen as pink layers on the upper part of the gel. Titrations of 1/160 and above were considered positive for brucellosis (Figure 1, 2).

Statistical analysis

Although descriptive statistics are given as mean and standard deviations for continuous variables, categorical variables and descriptive statistics are given in numbers and percentages. For these categories, the Kappa coefficient was calculated to determine the concordance between the methods (14). Kappa coefficient was interpreted as follows: values ≤ 0 as indicating no agreement and 0.01-0.20 as none to slight, 0.21-0.40 as fair, 0.41- 0.60 as moderate, 0.61-0.80 as substantial, and 0.81-1.00 as almost perfect agreement. For statistical calculations, 0.05 was accepted as significant. The Minitab (version 14) statistical software package was used for calculations.

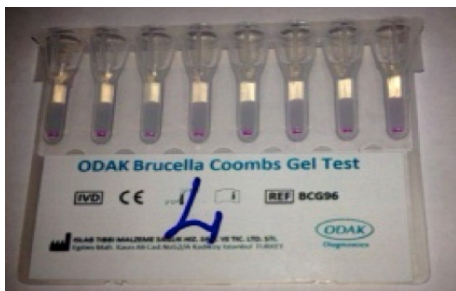


Figure 1. Brucella Coombs gel test negative



Figure 2. Brucella Coombs gel test positive with 1/640 titration (two fold dilutions were made starting from the 1/40 dilution in the first well.)

RESULTS

The number of samples above 1/160 titer for STA, CAB, and CAPT were as follows respectively: 41 (22.8%), 52 (28.9%), and 57 (31.7%). In BCGT, the performance of which was compared with other tests, the titration of 52 samples (28.9%) was 1/160 and above. BCGT had similar positive results with the CAB, which is a reference test in the diagnosis of brucellosis (Table 1).

When tests are evaluated in terms of kappa coefficient, BCGT has been found to have the highest concordance with CAB, which is the standard

method for brucellosis, (Kappa coefficient: 0,796). This is an substantial agreement and was found to be statistically significant . STA (Kappa coefficient: 0.646) and CAPT (kappa coefficient: 0.603) also has substantial agreement with CAB (Table 2).

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), accuracy of STA, BCGT nad CAPT are also compared with CAB test and can be seen in detail in Table 3. The highest sensitivity (98.1%) and accuracy (98.9%) was found with BCGT. The highest specificity (100%) was found with STA (Table 3).

Table 1. Comparison of BCGT, STA and CAPT results with CAB

Other Tests		CAB						Total	
		Negative	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640		1/1280
BCGT	Negative	79	3	2	0	0	0	0	84
	1/40	3	16	4	0	0	0	0	23
	1/80	0	2	18	1	0	0	0	21
	1/160	0	0	1	12	3	0	0	16
	1/320	0	0	0	0	6	2	1	9
	1/640	0	0	0	0	2	5	3	10
	1/1280	0	0	0	0	0	0	17	17
STA	Negative	82	7	7	2	0	0	0	98
	1/40	0	14	7	2	0	0	2	25
	1/80	0	0	11	3	2	0	0	16
	1/160	0	0	0	6	3	1	3	13
	1/320	0	0	0	0	6	2	3	11
	1/640	0	0	0	0	0	4	1	5
	1/1280	0	0	0	0	0	0	12	12
CAPT	Negative	69	1	2	0	0	0	0	72
	1/40	6	13	2	0	0	0	1	22
	1/80	6	6	15	1	1	0	0	29
	1/160	1	1	5	5	2	0	2	16
	1/320	0	0	1	6	5	1	4	17
	1/640	0	0	0	0	2	5	0	7
	1/1280	0	0	0	1	1	1	14	17
Total		82	21	25	13	11	7	21	180

CAB, Coombs anti Brucella test; BCGT, Brucella Coombs gel test; STA, Standart tube agglutination test; CAPT, Brucellacapt test

Table 2. Kappa coefficient between tests STA, BCGT, CAPT and CAB tests

Compared Tests	Kappa Coefficient ± Std. Error	p	%95 Confident Interval
CAB- STA	0.646	0.001	0.564 - 0.728
CAB - CAPT	0.603	0.001	0.521 - 0.685
CAB - BCGT	0.796	0.001	0.727 - 0.865

CAB, Coombs anti Brucella test; BCGT, Brucella Coombs gel test; STA, Standart tube agglutination test; CAPT, Brucellacapt test

Table 3. Sensitivity, specifity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), accuracy of tests

Compared Tests	Sensitivity	Specifity	PPV	NPV	Accuracy
BCGT	98.1	99.2	98.1	99.2	98.9
STA	78.8	100	100	92.1	93.9
CAPT 1/160	94.2	93.8	86	97.6	93.9
CAPT 1/320	76.9	99.2	97.6	91.4	92.8

CAB, Coombs anti Brucella test; BCGT, Brucella Coombs gel test; STA, Standart tube agglutination test; CAPT, Brucellacapt test

DISCUSSION and CONCLUSION

Although isolation of the bacteria is gold standard for the diagnosis of the brucellosis, because of the slow growth of *Brucella* spp, the low rate of isolation and special requirements for biosafety conditions, serological tests are widely used.

STA is accepted as the most commonly used standard method in the diagnosis of brucellosis all over the world. The STA test detects the total S-LPS antibodies (IgM, IgA, IgG) against the bacteria surface. However, in chronic infection or relapse, when blocking antibodies (incomplete) occur, false-negative results or low titers may be detected. To eliminate this situation, CAB or CAPT should be done (8,9). However, since CAB is laborious and time consuming and CAPT is expensive, they cannot be used routinely in laboratories where large numbers of samples are analysed (6,8).

BCGT is performed in wells that contain gel matrix with Coombs antibodies. In BCGT, STA and CAB are performed together, and both screening and titration can be done. Furthermore, besides IgG antibodies against *Brucella*, IgM and IgA antibodies can be detected. With this test, the 24-48 hour period

required for the test results with STA, CAPT and CAB is reduced to a very short time of about two hours. In addition, it eliminates the need for experienced staff for laboratory work and evaluation. For this reason, various studies have been carried out in different places in our country since BCGT was introduced, comparing the test with other serological methods. Irvem et al. (13) from Istanbul and Köroğlu et al. (15) from Sakarya reported that BCGT has perfect agreement with both CAB and CAPT. Turhanoglu et al. (16) from Konya and Borsa et al. (17) from Igdir region reported that the performance of the BCGT is similar with CAB. Again, Borsa and his colleagues stated that BCGT is the only rapid serological test which has similarsensitivity with CAPT.

In our study, when tests were evaluated in terms of kappa coefficient, BCGT showed the highest concordance with CAB, which is the standard method for brucellosis, (kappa coefficient: 0,796). This is an substantial agreement according to Kappa interpretation and is statistically significant (Table 2). When the tests were compared to CAB test in terms of diagnostic performance; the highest sensitivity (98.1%) and accuracy (98.9%) was found with BCGT

(Table 3). These results also support other studies conducted in our country.

As a result, compared with CAB, which is accepted as a reference test within three methods, BCGT has the highest diagnostic performance and highest Kappa concordance. In addition, reduction of the period for test results and elimination of the need for

experienced staff makes this test superior to other methods. In the light of these data, we can propose that BCGT can replace other serological tests for the diagnosis of Brucellosis. But despite our results and all of the studies done, BCGT still needs to be evaluated with culture confirmed cases and controls in a comprehensive study.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Young EJ. Brucella species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia, Pa, USA: Churchill Livingstone; 2005. pp. 2669-74.
2. Galińska EM, Zagórski J. Brucellosis in humans- etiology, diagnostics, clinical forms. Ann Agric Environ Med, 2013; 20(2): 233-8.
3. Aypak C, Altunsoy A, Kutta Çelik A. Epidemiological and clinical aspects of human brucellosis in eastern Anatolia. J Nippon Med Sch, 2012; 79(5): 343-8.
4. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. N Engl J Med, 2005; 355(22): 2325-36.
5. Atay E, Metintaş S. Economic burden of brucellosis. ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi 2018;3(3):71-84 .
6. Alişkan H. The value of culture and serological methods in the diagnosis of human brucellosis. Mikrobiyol Bul, 2008; 42(1): 185-95.
7. Sargüzel FM, Kayman T, Çelik İ, Koç N. Comparison of standard tube agglutination, Coombs' and Brucellacapt Tests in the diagnosis of brucellosis. New J Med, 2011; 28(2): 113-5.
8. Alişkan H, Colakoğlu S, Turunç T, Demiroğlu YZ, Yazıcı AC, Arslan H. Evaluation of diagnostic value of Brucellacapt test in brucellosis. Mikrobiyol Bul, 2007; 41(4): 591-5.
9. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. Int J Antimicrob Agents, 2010; 36 Suppl 1:S12-7.
10. Orduña A, Almaraz A, Prado A, Gutierrez MP, Garcia-Pascual A, Duenas A. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol, 2000; 38(11): 4000-5.
11. Gomez MC, Nieto JA, Rosa C, Geijo P, Escribano MA, Munoz A. Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. Clin Vaccine Immunol 2008; 15(6): 1031-3.
12. ODAK Brucella Coombs Gel Test. <http://www.toprakmedikal.com>
13. İrvem A, Yücel FM, Aksaray S, Bor E. Comparison of a new and rapid method, *Brucella* Coombs gel test with the other methods in the serological diagnosis of brucellosis. Mikrobiyol Bul, 2015; 49(2): 181-7.
14. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33(1): 159-74.
15. Koroglu M, Aydemir AO, Demiray T, Erkorkmaz U, Ozbek A, Altindis M. Comparative evaluation of the Brucella Coombs gel test in laboratory diagnosis of human brucellosis. Biotechnol Biotechnol Equip, 2016; 30 (5): 970-5.
16. Turhanoğlu MN, Vural DG. The comparison of *Brucella* gel agglutination test with other *Brucella* tests. Dicle Tip Derg, 2015; 42(4):422-6.
17. Borsa BA, Aldag ME, Yılmaz M, Dalar ZG, Ozalp VC. Comparison of a Novel Test (ODAK Brucella Coombs Gel Test) with commonly used serological tests in human brucellosis. Clin Lab, 2016; 62(9):1671-4.

El yıkama alışkanlıklarının eldeki aerob mikroorganizma yükü ile ilişkisi

The relationship of hand washing habits with aerobic microorganism load on hand

Yasemin ÖZ¹ (ID), Nilgün KAŞİFOĞLU¹ (ID), Tuğçe Nur ÖZTÜRK² (ID), Betül KARADENİZ² (ID), Ahmet İshak ÖZDEMİR² (ID), Berk PALAZOĞLU² (ID), Fatma Betül KARAL² (ID), Mohammed V. SHERİFF² (ID)

ÖZET

Amaç: El yıkama, sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonların engellenmesinde en basit universal yöntem olmasının yanı sıra, genel halk sağlığının korunması ve geliştirilmesi açısından da son derece önemlidir. Bu çalışmada sağlık personeli ve sağlık personeli olmayan katılımcıların el yıkama alışkanlıklarının ve ellerinde bulunan mikroorganizma yoğunluğunun araştırılması ve böylece el hijyeni açısından farkındalık oluşturulması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışma grubu, 18 yaşından büyük hasta ve yakınları, sağlık personeli ve tıp fakültesi öğrencilerinden oluşmuştur. Tüm katılımcılara kişisel özellikleri ve el yıkama alışkanlıklarına dair 17 sorudan oluşan bir anket uygulanmıştır. Katılımcıların baskın olarak kullandıkları ellerinin dört farklı bölgesinden, 1 cm²'lik alanlardan steril eküvyonla sürüntü örnekleri alınmış, kanlı agar plaklarına inoküle edilmiş ve 48 saatlik inkübasyon ardından değerlendirilmiştir.

Bulgular: Yetmiş yedi hasta ve hasta yakını, 85 sağlık personeli ve 32 tıp fakültesi öğrencisi olmak üzere toplam 194 katılımcıya ulaşılmıştır. Katılımcıların 135'i kadınlardan, 59'u erkeklerden oluşmaktaydı. Normal cilt flora üyesi bakteriler (koagülaz negatif stafilokoklar, viridans streptokoklar,

ABSTRACT

Objective: Hand washing is not only the simplest universal method to prevent healthcare related infections, it is also very important for the protection and development of general public health. In this study, it was aimed to investigate the hand washing habits and load of microorganisms in the hands of healthcare professionals and non-healthcare participants, so to raise the awareness in terms of hand hygiene.

Methods: The study group consisted of patients and their relatives over 18 years of age, medical staff and medical school students. A questionnaire consisting of 17 questions regarding their personal characteristics and hand washing habits were applied to all participants. Swab samples were taken by sterile swabs from 1 cm² areas of four different regions of the hands that were predominantly used by the participants, and were inoculated on blood agar plates and evaluated after 48 hours of incubation.

Results: A total of 194 participants were reached, including 77 patients and patient relatives, 85 medical staff and 32 medical school students. A hundred and thirty-five of the participants were women and 59 were men. Bacteria that are members of normal skin flora (coagulase negative staphylococci, viridans streptococci, coryneform bacteria, micrococci) were isolated from almost all samples

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir
²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2. Sınıf Öğrencileri, Eskişehir



İletişim / Corresponding Author : Yasemin ÖZ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD Eskişehir - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 20.05.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 10.08.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.14892

Öz Y, Kaşifoğlu N, Öztürk TN, Karadeniz B, Palazoğlu B, Karal FB, Sheriff MV. El yıkama alışkanlıklarının eldeki aerob mikroorganizma yükü ile ilişkisi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 255 - 264

korineform bakteriler, mikrokoklar), örneklerin hemen tamamından izole edildi ve 53 katılımcıda 100 CFU'dan fazla bakteri yükü saptandı. Katılımcıların 59 (%30.4)'undan normal cilt florasında yer almayan mikroorganizmalar (Gram negatif enterik bakteriler, *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp, *Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, küf ve maya mantarları) izole edilmiştir. Bunların oranı hasta ve hasta yakınlarında %23, sağlık personelinde %33 ve öğrencilerde %41 olarak hesaplandı ($p>0.05$). Kadınlar erkeklerden, 40-49 yaş grubu 60 yaş üstü katılımcılardan ve yoğun bakım personeli hasta/hasta yakını ve yoğun bakım dışı sağlık personeli katılımcılardan anlamlı oranda daha düşük bakteri yüküne sahipti. Katılımcıların bazı el yıkama alışkanlıkları puanlandırılarak değerlendirildi; yemekten önce 2, yemekten sonra 1, tuvalet öncesi 1, tuvalet sonrası 2, para temasından sonra 2, dışarıdan eve girince 2 puan. El yıkama puanı arttıkça ellerdeki bakteri yükü azalmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sigara, tırnak uzatma, sıvı/katı sabun, kâğıt/kumaş havlu, hayvan besleme gibi faktörlerin ellerdeki mikroorganizma yüküne etkisi olmadığı saptandı. Herhangi bir açık yara/lezyon bulunması, el yıkama sonrası geçen sürenin uzaması ve nemlendirici kullanımı bakteri yükü artışıyla ilişkili bulundu.

Sonuç: Toplumda ve özellikle sağlık çalışanları arasında el hijyeninin öneminin anlaşılması, el yıkama pratiklerinin doğru şekilde uygulanması açısından son derece önemlidir. Bu çalışmada, hastane ilişkili bir grup katılımcının el yıkama alışkanlıkları ile birlikte ellerindeki mikroorganizma yükünün gösterilmesiyle el yıkamanın önemi vurgulanmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: El yıkama, el hijyeni, deri florası, mikroorganizma yükü

and more than 100 CFU bacterial load was detected in 53 participants. In 59 (30.4%) participants, microorganisms not included in normal skin flora (Gram negative enteric bacteria, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, mold and yeast fungi) were isolated. The proportion of these was calculated as 23% in patient/patient relatives, 33% in medical staff and 41% in students ($p> 0.05$). Women had a significantly lower bacterial load than men, 40-49 age group had a significantly lower bacterial load than participants over 60, and intensive care unit staff had a significantly lower bacterial load than patient/patient relatives and medical staff other than intensive care unit. Some hand washing habits of the participants were evaluated by scoring; 2 points before eating, 1 after eating, 1 before restroom, 2 after restroom, 2 after money contact, 2 when entering home from outside. As the hand washing score increased, the bacterial load on the hands decreased, but it was not statistically significant. It was observed that factors such as smoking, long nails, liquid/solid soap, paper/fabric towel, having a pet did not affect the microorganism load on the hands. The presence of any wound/lesion, prolonged time after hand washing and use of moisturizer were found associated with increased load.

Conclusion: Being aware of the importance of hand hygiene in the community and especially among healthcare professionals is extremely important for the correct application of hand washing practices. In this study, it was aimed to emphasize the importance of hand washing by demonstrating the microorganism load on hands with the hand washing habits in a group of hospital related participants.

Key Words: Hand washing, hand hygiene, skin flora, microorganism load

GİRİŞ

Vücudumuzun en büyük organı olan deri, geçici ve kalıcı (sabit) flora üyelerinden oluşan çok sayıda mikroorganizma içermektedir (1). Cildin farklı

bölgelerine göre mikroorganizma yükü değişiklik göstermekle birlikte, dış ortamla teması en yüksek düzeyde olan el derisi, diğer bölgelerin birçoğuna göre

daha fazla mikroorganizma yüküne sahiptir ve sağlık çalışanlarının ellerindeki bakteri sayısının 3.9×10^4 - 4.6×10^6 CFU/cm² olduğu bildirilmektedir (1, 2). Günlük yaşamın sıradan bir eylemi olan el hijyeninin önemi ilk kez, 1840'lı yıllarda Ignaz Semmelweis'in puerperal sepsise bağlı ölümlerin, ellerin uygun şekilde yıkanması ile belirgin oranda azaldığını göstermesi ile anlaşılmıştır. Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlar (SBE)'la ilişkili olan ve genellikle sağlık çalışanlarının hastalarla veya hastanın çevresindeki kontamine yüzeylerle teması sırasında edinilen geçici flora, cildin yüzeysel katmanlarını kolonize eder ve rutin el yıkama işlemleriyle kolaylıkla uzaklaştırılabilir (1).

Tüm dünyada yaygın görülen (%7-10) ve ülkelerin sağlık sistemine ciddi bir ekonomik yük getiren SBE'nin önemli bir kısmının bulaşma ve yayılmasından sağlık çalışanlarının kirliliğinin sorumlu olduğu ve bu enfeksiyonların neredeyse yarısının el hijyeni ile engellenebileceği bildirilmektedir (3). El hijyeninin SBE'ın yayılmasının engellenmesinde en önemli tedbirlerden biri olduğunun bilinmesi ve el hijyeninin enfeksiyon oranlarının azaltılmasındaki önemli rolünün kabul edilmesine rağmen, sağlık çalışanları arasındaki uyum oranları hala düşüktür. Sanayileşmiş ülkeleri içeren 96 çalışmanın değerlendirildiği bir raporda, sağlık çalışanlarının el hijyeni uyum oranının ortalama %40 civarında olduğu bildirilmektedir (4). Ülkemizdeki bir üniversite hastanesinde sağlık personelinin el hijyeni gerektiren beş endikasyon kuralına uyum oranlarının incelendiği bir çalışmada, toplam 3.690 el hijyeni endikasyon durumu gözlenmiş ve sağlık personelinin el hijyeni uyum oranı %58 olarak bulunmuştur (5). Meslek gruplarına göre değerlendirildiğinde ise, hemşirelerde el hijyeni uyum oranının (%69), hekimlerden (%45) daha yüksek olduğu ve en düşük oranın (%36) yardımcı sağlık personelinde gözlendiği bildirilmiştir. Benzer bir başka gözlemsel çalışmada ise sağlık çalışanlarının el hijyeni uyum oranı %75 olarak bulunmuştur (hemşirelerde %78, hekimlerde %70, destek personelinde %74) (6). Önceden belirlenmiş el yıkama endikasyonlarında,

hemşirelerin el yıkama uygulamalarının habersiz olarak değerlendirildiği yeni bir çalışmada, oldukça düşük el hijyeni uyum oranları (%0-2.3) belirlenmiş, el yıkama gerektiren durumların %39.3'ünde el yıkama işleminin gerçekleştirildiği ve bunlardan sadece %2.2'sinde doğru tekniğin uygulandığı gözlenmiştir (7).

Enfeksiyon etkenlerinin çapraz geçişinde en temel yol eller olduğundan, doğru şekilde uygulandığında el yıkama, SBE'ın engellenmesinde en basit universal yöntem olmasının yanı sıra, genel halk sağlığının korunması ve geliştirilmesi açısından da son derece önemlidir. Bu çalışmada hasta, hasta yakını ve sağlık personellerinin el yıkama alışkanlıklarının ve ellerinde bulunan mikroorganizma yoğunluğunun yarı-kantitatif olarak araştırılması ve böylece el hijyeni açısından farkındalık oluşturulması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ocak - Nisan 2019 tarihlerinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi polikliniklerine başvuran ayakta hastalar ve hasta yakınları ile hastanede görev yapmakta olan sağlık personeli ve tıp fakültesi öğrencileri dahil edilmiştir. Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (25.12.2018/18).

Katılımcıların belirlenmesinde herhangi bir kriter kullanılmamış, 18 yaşından büyük hasta ve yakınları ile sağlık personeli ve öğrencilerden çalışmaya katılmak konusunda gönüllü olanlar rastgele dahil edilmiştir. Çalışmanın amacı ve uygulanacak işlemler konusunda bilgilendirilen katılımcılar, onayları alındıktan sonra "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" imzalatılmıştır. Öncelikle tüm katılımcılara yaş, cinsiyet, eğitim durumu, meslek gibi kişisel özelliklerin yanı sıra, el yıkama alışkanlıklarına dair 17 sorudan oluşan bir anket uygulanmıştır. Katılımcıların bazı durumlarda el yıkama alışkanlıkları, ellerin kontamine olma olasılığının ve/veya el hijyeni gerekliliğinin fazla olduğu durumlarda daha yüksek olacak şekilde,

puanlandırılarak değerlendirilmiştir; yemekten önce 2 puan, yemekten sonra 1 puan, tuvalet öncesi 1 puan, tuvalet sonrası 2 puan, para temasından sonra 2 puan, dışarıdan eve girince 2 puan.

Mikrobiyolojik örnekler katılımcıların baskın olarak kullandıkları ellerden, steril serum fizyolojik ile nemlendirilmiş steril eküvyonlar kullanılarak transport besiyerine (Amies Transport Medium, Fıratmed, Ankara, Türkiye) alınmış ve bekletilmeden laboratuvara ulaştırılarak işleme alınmıştır (8). Örneklemede standardizasyonun sağlanması amacıyla, sırasıyla, avuç içi, ikinci ve üçüncü parmak arası, başparmak ve işaret parmağının uç kısımları olmak üzere elin dört farklı bölgesindeki 1 cm²'lik alanlarda eküvyonun üç kez yuvarlanması ile örnekler toplanmıştır. Tüm örnekler Mikrobiyoloji Laboratuvarında %5 koyun kanlı agar (BBL Blood Agar, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) plaklarına (90 mm) inoküle edilerek, 35 °C'de 48 saatlik inkübasyonun ardından değerlendirilmiştir. Eküvyonla toplanan örneklerin plaklara aktarılmasında, eküvyon ucunun, plaktaki ilk ekim alanının 3 cm²'lik bölümünde 5 kez yuvarlanması ve ardından steril bir öze ile dört ekim alanı olacak şekilde tüm plağa yayılmasıyla standardizasyon sağlanmaya çalışılmıştır. Üreyen mikroorganizmalar, besiyerindeki koloni morfolojileri ve manuel geleneksel testler (Gram boyama, katalaz, koagülaz, oksidaz, PYR, indol v.b.) kullanılarak tanımlanmıştır. Plak üzerinde oluşan kolonilerin tümü sayılarak her bir örnekteki bakteri yükü elde edilmiştir.

Verilerin analizi için SPSS istatistik programı (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0 Armonk, NY) kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren değişkenler için bağımsız örneklem t-testi, normal dağılımdan farklılıklar olduğunda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İki'den fazla değişkenin olduğu durumlarda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi uygulanmış, gruplar arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde çoklu karşılaştırma testleri (Tukey post-hoc analysis) yapılmıştır. Anlamlılık saptanan parametreler arasındaki ilişki Chi-Square

testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Yetmiş yedi hasta/hasta yakını, 85 sağlık personeli ve 32 tıp fakültesi öğrencisi olmak üzere toplam 194 katılımcıya ulaşıldı. Katılımcılar 18-75 yaş aralığında yer almaktaydı ve 135'i yaş ortalaması 37.1 olan kadınlardan, 59'u yaş ortalaması 38.2 olan erkeklerden oluşmaktaydı. Katılımcıların hemen hemen tamamında normal cilt florası üyesi bakteriler izole edildi ve 53 katılımcıda 100 CFU'dan fazla bakteri yükü saptandı. Bu bakteriler koagülaz negatif stafilokoklar, viridans streptokoklar, korineform bakteriler ve mikrokoklardan oluşmaktaydı. Katılımcıların 59 (%30.4)'undan normal cilt florasında yer almayan mikroorganizmalar izole edilmiştir. Bunların oranı hasta/hasta yakınlarında %23, sağlık personellerinde %33 ve öğrencilerde %41 olarak hesaplandı ($p>0.05$). Bu mikroorganizmalar sıklık sırasına göre Gram negatif enterik basiller ($n=23$), *Bacillus* spp ($n=22$), *Pseudomonas* spp ($n=6$), *Enterococcus* spp ($n=3$) ve *Staphylococcus aureus* ($n=2$) gibi bakterilerin yanı sıra küf ($n=8$) ve maya ($n=1$) mantarlarından oluşmaktaydı.

Katılımcıların ellerindeki mikroorganizma yükü ortalaması 10⁷ CFU bulunmuştur. Ellerde üreyen mikroorganizma yoğunluğunun katılımcıların özelliklerine göre değerlendirilmesi Tablo 1'de sunulmuştur. Buna göre, kadınların ellerindeki mikroorganizma yükü erkeklerden anlamlı oranda daha düşüktü. Yaş gruplarına göre ellerdeki bakteri yükleri ortalaması belirgin şekilde farklılık göstermekle birlikte, istatistiksel olarak anlamlı fark sadece 40-49 yaş grubu ile 60 yaş üstü katılımcılar arasında saptandı ($p=0.017$). Katılımcı grupları arasında en düşük bakteri yükü yoğun bakım çalışanı sağlık personellerinde saptandı ve bu fark, hasta yakını ve yoğun bakım dışı sağlık personeli katılımcılarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.037$, 0.048). Eğitim düzeyi ilköğretim olan katılımcılarda

Tablo 1. Ellerdeki mikroorganizma yüküne göre katılımcı özelliklerinin değerlendirilmesi (Osmangazi Üni. Tıp Fak. Hast.; Ocak-Nisan 2019)

Katılımcı özellikleri		Sayı	Mikroorganizma yükü ortalaması	p
Cinsiyet	Kadın	135	96,00 (0 - 450)	0.007
	Erkek	59	131,00 (4 - 510)	
Yaş	20-29	75	99.50	>0.05
	30-39	39	112.25	
	40-49	35	67.40	
	50-59	27	122.25	
	60+	18	179.11	
Grup	Hasta	35	115.86	>0.05
	Hasta yakını	42	130.55	
	Sağlık personeli	60	121.63	
	Tıp öğrencisi	32	85.94	
	Yoğun bakım personeli	25	45.60	
Eğitim düzeyi	İlköğretim	41	149.98	>0.05
	Lise	43	96.42	
	Üniversite	110	94.83	
Flora dışı üreme	Yok	135	101.27	>0.05
	Var	59	119.56	
Ellerde açık yara / lezyon	Yok	175	99.02	0.040
	Var	19	178.84	
Sigara kullanımı	Yok	129	105.22	>0.05
	1-10 adet /gün	32	130.47	
	1 paket ve + /gün	33	90.24	
Tırnak uzatma alışkanlığı	Yok	155	101.88	>0.05
	Var	39	126.51	
El yıkama süresi	1-10 sn	62	94.10	0.031
	10-20 sn	89	88.33	
	20+ sn	43	163.51	
El yıkama sonrası kurulama	Hayır	5	62.40	>0.05
	Kağıt havlu	102	108.83	
	Kumaş havlu	87	107.05	
Sabun kullanımı	Yok	1		>0.05
	Sıvı sabun	157	109.24	
	Katı sabun	36	93.17	
Hayvan besleme	Hayır	162	102.60	>0.05
	Evet	32	128.25	

Tablo 1 (devamı). Ellerdeki mikroorganizma yüküne göre katılımcı özelliklerinin değerlendirilmesi (Osmangazi Üni. Tıp Fak. Hast.; Ocak-Nisan 2019)

Katılımcı özellikleri		Sayı	Mikroorganizma yükü ortalaması	p
Kaç dakika önce yıkadı	0-30	73	66.32	0.023
	31-60	64	134.31	
	61-120	35	151.34	
	120+	22	90.55	
Ellerini en son nasıl temizledi	Sabun ve su	184	102.80	>0.05
	Antibakteriyel solüsyon	6	211.50	
	Islak mendil	4	135.50	
Ellerde krem/nemlendirici/vb	Yok	166	95.48	0.016
	Var	28	174.18	
El yıkama puanı	1-4	8	150.38	>0.05
	5-7	79	113.20	
	8-10	107	98.88	

mikroorganizma yükü daha yüksek olmakla birlikte, bu farklılık istatistiksel olarak gösterilemedi. Ellerde flora dışı mikroorganizma varlığı, sigara kullanımı, tırnak uzatma alışkanlığı, kâğıt ya da kumaş havlu ile kurulama tercihi, sıvı ya da katı sabun kullanımı, hayvan besleme gibi faktörlerin ellerdeki mikroorganizma yüküne etkisinin olmadığı saptandı. Ellerde deri bütünlüğünün bozulmasına neden olan herhangi bir açık yara/lezyonu bulunan katılımcılarda mikroorganizma yükü anlamlı oranda daha yüksekti. İlginç olarak, ellerini 20 saniyeden uzun süre yıkadığını ifade eden katılımcıların ellerindeki mikroorganizma yükü, daha kısa süre yıkadığını ifade edenlere göre anlamlı oranda daha yüksekti ($p=0.047$, 0.031). El yıkama işlemini 30 dakika önce uygulayan katılımcılarda mikroorganizma yükü, daha önceden yıkayanlara göre belirgin şekilde daha düşük bulunurken, ellerini en son ne ile temizlediğinin etkisi gözlenmedi. Yıkama sonrası krem ya da nemlendirici kullanan katılımcıların ellerindeki mikroorganizma yükü anlamlı oranda daha yüksek bulundu. Nemlendirici kullanımı kadın katılımcılarda anlamlı oranda daha yüksek ($p=0.04$) olmakla birlikte, bu durumun

kadınlardaki mikroorganizma yükü üzerine etkili olmadığı saptandı.

Katılımcıların bazı durumlarda el yıkama alışkanlıkları puanlandırılarak değerlendirildi (Tablo 2). Buna göre, kadınlarda, 30-49 yaş grubunda ($p=0.01$) ve flora dışı mikroorganizma üremesi olmayan katılımcılarda el yıkama puanı daha yüksek bulundu. Katılımcıların eğitim düzeyi ile el yıkama puanları arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. Katılımcı grupları arasında tıp fakültesi öğrencilerinin el yıkama puan ortalamaları diğer tüm gruplardan anlamlı oranda düşük bulundu ($p=0.001$). Katılımcıların el yıkama puanı arttıkça ellerindeki bakteri yükünün azaldığı belirlendi, ancak bu istatistiksel olarak kanıtlanmadı (Tablo 1).

TARTIŞMA ve SONUÇ

SBE patojenlerinin çapraz bulaşmasında en yaygın araç sağlık çalışanlarının kontamine elleri olduğundan, el hijyeni SBE'lerin önlenmesinde temel bir strateji olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu durumu sağlık çalışanları ve SBE'ler ile sınırlandırmak

Tablo 2. Katılımcıların puanlandırılmış el yıkama alışkanlıklarının değerlendirilmesi

Katılımcı özellikleri		Sayı	Ey yıkama puan ortalaması	P
Cinsiyet	Kadın	135	7.99	0.001
	Erkek	59	7.05	
Yaş	20-29	75	7.11	>0.05
Yaş	30-39	39	8.10	0.019
	40-49	35	8.37	0.002
	50-59	27	7.78	>0.05
	60+	18	7.89	>0.05
Grup	Hasta	35	8.37	>0.05
Grup	Hasta yakını	42	7.55	>0.05
	Sağlık personeli	60	9.13	
	Tıp öğrencisi	32	6.16	
	Yoğun bakım personeli	25	7.96	
Eğitim düzeyi	İlköğretim	41	7.78	0.17
Eğitim düzeyi	Lise	43	8.14	0.17
	Üniversite	110	7.51	
Flora dışı üreme	Yok	135	7.99	0.001
Flora dışı üreme	Var	59	7.03	0.001
Mikroorganizma yükü	0-10	48	8.15	0.144
Mikroorganizma yükü	11-25	36	7.75	0.144
	26-50	31	7.13	
	51-100	26	7.77	
	101-200	23	7.96	
	201-400	5	7.40	
	401+	25	7.24	

doğru bir yaklaşım olmaz. Çünkü birçok toplum kaynaklı enfeksiyonun bulaşı ve yayılımında da kontamine eller önemli bir role sahiptir ve günümüzde olduğu gibi, özellikle salgın durumlarında tüm toplum için el yıkamanın önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Bu çalışmada, hastanemiz bünyesinde ulaşılabilecek katılımcılar dâhil edilerek, el yıkama alışkanlıklarının sorgulanması, ellerdeki mikroorganizma yoğunluğunun araştırılması ve böylece el yıkamanın öneminin tekrar vurgulanması hedeflenmiştir.

Beklendiği gibi, tüm katılımcıların ellerinden normal flora üyesi bakteriler izole edilmiş olmakla birlikte, %30.4'ünde normal cilt florasında yer almayan mikroorganizmaların geçici kolonizasyonu saptanmıştır. Bunların oranı, hasta/hasta yakını katılımcılara göre sağlık personeli ve öğrencilerde daha yüksek bulunmuştur. Hastaneye ziyaret amacıyla gelen katılımcıların ziyaret öncesi ve sonrası ellerinden alınan sürüntü örneklerinin değerlendirildiği bir çalışmada, katılımcıların tümünde normal flora üyesi

aerob bakteriler izole edilirken, %24'ünden normal cilt florasında yer almayan mikroorganizmaların saptandığı bildirilmiştir (9). Çalışmamızda da hasta/ hasta yakını katılımcılarda bu oran %23 bulunmuştur. Geçici flora mikroorganizmaları, aynı zamanda SBE'nin da muhtemel etkenleri olduğundan, sağlık bakımı ilişkili katılımcılarda oranının yüksek saptanmış olması önemli bir bulgudur ve bu durum hastanelerde ve sağlık ilişkili eğitim kurumlarında, el yıkama eğitimlerine ve denetimlerine daha fazla önem verilmesi gerektiğini düşündürmüştür. Alkol bazlı el dezenfektanlarına ulaşımın kolaylaştırılmasının yanı sıra, personele verilen el hijyeni eğitimlerinin ve bu eğitimlere katılan personel sayısının artırılmasıyla, el hijyeni uyum oranlarının tüm personel için %29.3'ten %37.2'ye yükseldiği bildirilmiştir (10)

Çalışmamızda, kadın katılımcılarda mikroorganizma yükü belirgin oranda daha düşük bulunmuştur. El yıkama ile ilgili yapılan birçok çalışma, el yıkama konusunda kadınların erkeklere göre daha duyarlı olduklarını göstermiştir (11-15). Genellikle bu çalışmalar, katılımcıların el yıkama alışkanlıklarına yönelik uygulanan anket sonuçlarına dayanmaktadır. Çalışmamızda, katılımcı anketine dayalı el yıkama alışkanlıklarının puanlandırıldığı değerlendirmeye göre de kadınlar erkeklere göre daha başarılı bulunmuştur ve bu sonuç mikroorganizma yükü değerlendirmesiyle de doğrulanmıştır. Kadın cinsiyetteki bu olumlu fark, toplumda kadına yüklenen ev hanımlığı, açıcılık, annelik gibi rolleri nedeniyle, kadınların hijyen ve el yıkama konusunda daha duyarlı olduklarını düşündürmüştür.

Yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde, ellerdeki mikroorganizma yükü açısından en belirgin fark 40-49 yaş grubu ile 60 yaş üstü katılımcılar arasındaydı ve bu farklılık 40-49 yaş grubunun el yıkama puanı değerlendirmesinde de ortaya çıktı. Bir sağlık ocağına başvuran 18 yaş ve üzerindeki kişilerin dahil edildiği ankete dayalı bir çalışmada, katılımcıların yaşı (37 yaş ve altı ile 38 yaş ve üzeri) ile bilgi puanı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadığı bildirilmekle birlikte (15), yaşla ilişkili olarak el yıkama alışkanlıklarında anlamlı farklılıkların

olduğu Sağlık Bakanlığı tarafından yürütülen "Türkiye el yıkama araştırması"nda da gösterilmiştir (11). Yaşla birlikte fiziksel aktivitede yavaşlama, öz bakımda yetersizlik, hafıza değişiklikleri gibi nedenlerle el hijyeni azalırken, 40-49 yaş grubu, insanların fiziksel olarak oldukça aktif ve hijyen açısından daha bilinçli oldukları dönem olarak düşünülebilir. Bu nedenle, yaşlılara yönelik bakım ve destek planlamalarına, temizlik ve hijyeni iyileştirmeyi hedefleyen uygulamaların da eklenmesi düşünülmelidir.

Katılımcı profiline göre, yoğun bakım ünitelerinde çalışan sağlık personellerin en düşük mikroorganizma yüküne sahip oldukları gözlemlendi. Yoğun bakım ünitelerinin hastanelerin diğer kliniklerine göre, hem hastalar hem de hizmet veren personel için daha izole alanlar olması, enfeksiyon kontrol önlemlerine uyum ve enfeksiyon kontrol eğitimlerinin sürekliliği, katı hijyen kuralları ve alkol bazlı el dezenfektanlarının daha yaygın kullanılması nedeniyle, bu beklenen ve sevindirici bir sonuçtu. Bir örnek olarak, yoğun bakım ünitelerinde uygulanmakta olan kuralların ve el hijyeni uygulamalarının diğer tüm kliniklere ve personellere yaygınlaştırılabilirliği tartışılmalıdır. Katılımcı beyanı ile oluşturulan ankete dayalı el yıkama puanı sonuçları bu bulguyu desteklemedi, ancak mikroorganizma yükü değerlendirmesi objektif sonuçlar verdiğinden daha güvenilir değerlendirmeler sağladığı kanısındayız.

Olumlu davranış ve alışkanlıkların geliştirilmesinde eğitim kaçınılmazdır ve el yıkama alışkanlıklarının edinilmesinde de eğitimin etkisi daha önce gösterilmiştir (11). Çalışmamızda da eğitim düzeyi artışıyla ellerdeki mikroorganizma sayısının azaldığı gözlemlendi (bu farklılık istatistiksel olarak kanıtlanamadı). Katılımcıların sosyal el yıkama konusundaki bilgi ve tutumlarını değerlendirmeye yönelik iki ayrı anketin uygulandığı bir çalışmada, ilkökul mezunu olanların hem olumlu tutum puanı ortalamasının hem de bilgi puanı ortalamasının yüksekokul/üniversite mezunlarının puan ortalamalarından daha düşük olduğu saptanmış, öğrenim durumu arttıkça bilgi puan ortalamalarının artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (15). Bu nedenle ülkemizdeki tüm eğitim düzeylerinde el yıkama ve hijyen alışkanlıklarının geliştirilmesine

yönelik eğitim ve uygulamalara ağırlık verilmeli ve bunlara süreklilik kazandırılmalıdır.

Cilt, doğal savunma mekanizmasında yer alan ve enfeksiyon etkenlerinin girişini engelleyen önemli bir bariyerdir. Cilt bütünlüğünün bozulmasıyla önce kontaminasyon ardından da kolonizasyon gelişeceğinden, katılımcılarımızdan ellerinde cilt bütünlüğü bozulmuş olanlarda mikroorganizma sayısının daha fazla olması öngörülebilen bir sonuçtu. Sık yıkama ve eldiven kullanımının ellerinde tahrişe neden olduğu sağlık personellerinde, elleri sağlıklı olanlara göre mikroorganizma sayısının daha fazla olduğu ve el florasının da değiştiği bildirilmiştir (16). Bu nedenle, açık yara ya da lezyon varlığında el hijyeni hassasiyetinin artırılması, uygun yara bakımı ve hijyen ürünlerinin kullanımı, özellikle sağlık personellerinde mümkünse kapatılması ve direkt temastan kaçınılması sürekli eldiven kullanımı önerilmelidir.

Ellerdeki mikroorganizma yükü üzerine anlamlı etkisi olan diğer faktörler, eller yıkandıktan sonra geçen süre ve yıkama sonrası krem ya da nemlendirici kullanımıydı. El yıkama ile uzaklaştırılan ve ciltteki miktarı azalan mikroorganizmalar, dakikalar içerisinde tekrar yerleşerek, geçen süre ile doğru orantılı olacak şekilde sayısal olarak artış göstermektedir. Bu durum, sık el yıkamanın önemini vurgulamaktadır. Yıkama sonrası nemlendirici kullanımı ise, hem ciltteki nemi koruyarak hem de besinsel olarak daha zengin bir ortam hazırlayarak, ciltte mikroorganizma yükü artışı ile sonuçlanmıştır. Cilt kuruluğu, ciltte minimal çatlaklara ve cilt bütünlüğünün bozulmasına neden olabileceğinden, el yıkama sonrası nemlendirici kullanımının engellenmesi söz konusu olamaz. Bu nedenle, özellikle sağlık personellerinin, nemlendirici kullanımı durumunda ellerinde daha fazla mikroorganizma olabileceğinin bilincinde olmaları gerekmektedir. Nemlendirici kullanma alışkanlığı olan, özellikle sağlık bakımı ilişkili bireylere el yıkama süresi ve sıklığını artırılması önerilebilir.

Bu çalışmanın benzerlerinden en önemli farkı, katılımcıların el yıkama alışkanlıklarının sadece kendi ifadelerine dayanan anket sonuçlarına göre değil,

aynı zamanda ellerinde üreyen mikroorganizma sayısına göre objektif olarak da değerlendirilmiş olmasıdır. Katılımcı ifadelerine dayanan bazı günlük el yıkama alışkanlıkları puanlandırılarak elde edilen el yıkama puanı ile ellerindeki mikroorganizma yükü karşılaştırılmasında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamış olmakla birlikte, el yıkama puanı yükseldikçe ellerdeki mikroorganizma sayısının azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, katılımcı ifadelerinin büyük oranda gerçeği yansıttığının kanıtı olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, el yıkama süresine göre, ellerini 20 saniyeden uzun süre yıkadığını ifade eden katılımcıların ellerindeki mikroorganizma yükünün daha kısa süre yıkadıklarını ifade edenlere göre yüksek olması, katılımcıların zamanı tam olarak değerlendirememeleri nedeniyle gerçekçi olmayan ifadeleri yanı sıra, ellerdeki mikroorganizma yükünü olumsuz etkileyen diğer faktörlerin de varlığıyla açıklanabilir. Ancak, ellerini 20 saniyeden uzun yıkadığını ifade eden katılımcıların %58'i kadın, %51'i sağlık personeli ve %60'ı üniversite mezunuydu. Bu katılımcıların sık ve uzun süreli el yıkamalarına bağlı olarak oluşan cilt tahrişi ve buna bağlı mikroorganizma sayısında artış da söz konusu olabilir. Bu durumda uygun hijyen ürünlerinin kullanımı ve cilt bakımı önerilebilir. El yıkama süresi uzadıkça ciltten uzaklaştırılan mikroorganizma sayısı artacağından, uzun el yıkama süresi varlığında mikroorganizma yükünün artması kabul edilebilir bir sonuç olmayacaktır.

Sonuç olarak, kadın cinsiyet, 40-49 yaş grubu ve yoğun bakımda çalışan sağlık personeli katılımcıların el hijyeni açısından diğer katılımcılardan daha başarılı olduğu, ellerde tahriş ya da lezyon varlığının ve nemlendirici kullanımının ise el hijyenini olumsuz etkilediği gözlenmiştir. Enfeksiyon hastalıklarından korunma ve kontrolde en önemli önlemlerden biri el yıkamadır. Toplumda ve özellikle sağlık çalışanları arasında el hijyeninin önemini anlaşılması, el yıkama pratiklerinin doğru şekilde uygulanması açısından son derece önemlidir. Bu çalışmada, hastane ilişkili bir grup katılımcının el yıkama alışkanlıkları ellerindeki mikroorganizma yükü ile birlikte değerlendirilerek el yıkamanın önemi vurgulanmaya çalışılmıştır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 25.12.2018 ve Karar no: 18).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Boyce JM, Pittet D, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the ICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Society for Healthcare Epidemiology of America/ Association for Professionals in Infection Control/ Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep*, 2002; 51 (RR-16): 1-45.
2. Bolon MK. Hand hygiene: An update. *Infect Dis Clin North Am*, 2016; 30 (3): 591-607.
3. Günaydın M. Hastane İnfeksiyonları ve El Hijyeni. 24. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon (DAS) Eğitim Semineri. 15 Haziran, Karamanoğlu Mehmet bey Üniversitesi, Karaman-Türkiye, 2013.
4. Fouad M, Eltaher S. Hand hygiene initiative: comparative study of pre- and postintervention outcomes. *East Mediterr Health J*, 2020; 26 (2): 198-205.
5. Koşucu SN, Baltacı Göktaş S, Yıldız T. Sağlık personelinin el hijyeni uyum oranı. *MÜSBED*, 2015; 5 (2): 105-8.
6. Şen S, Sönmezoğlu M, Akbal E, Uğur E, Afacan S. Bir üniversite hastanesinde sağlık personelinin el hijyeninde beş indikasyona uyumu. *Klinik Dergisi*, 2013; 26 (1): 17-20.
7. Karaoğlu MK, Akın S. Hemşirelerin el yıkama alışkanlıklarına ilişkin görüşleri ve el hijyeni Uyum oranlarının değerlendirilmesi. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*, 2019; 16 (1): 33-40.
8. Wistrand C, Söderquist B, Falk-Brynildsen K, Nilsson U. Exploring bacterial growth and recolonization after preoperative hand disinfection and surgery between operating room nurses and non-health care workers: a pilot study. *BMC Infect Dis*, 2018; 18 (1): 466.
9. Hancı H, Ayyıldız A, Çelebi D. Hasta ziyaretleri için hastaneye gelen kişilerin ziyaret öncesi ve sonrası el floralarının karşılaştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 2012; 7 (2): 113-21.
10. Güçlü E, Tuna N, Yahyaoğlu M, Çalıcı Utku A, Özcan Ö, Ceylan S ve ark. Eğitimin ve alkol bazlı el antiseptiklerinin hastanede yaygınlaştırılmasının el hijyeni uyumuna etkisi. *Flora*, 2012; 17 (2): 118-25.
11. T.C Sağlık Bakanlığı, Sağlıkın Geliştirilmesi Genel Müdürlüğü, Türkiye El Yıkama Araştırması. 893, 2012, Ankara.
12. Garbutt C, Simmons G, Patrick D, Miller T. The public hand hygiene practices of New Zealanders: a national survey. *N Z Med J*, 2007; 120 (1265): U2810.
13. Jeong JS, Choi JK, Jeong IS, Paek KR, In HK, Park KD. A nationwide survey on the hand washing behavior and awareness. *J Prev Med Public Health*, 2007; 40 (3): 197-204.
14. Johnson HD, Sholcosky D, Gabello K, Ragni R, Ogonosky N. Sex differences in public restroom handwashing behavior associated with visual behavior prompts. *Percept Mot Skills*, 2003; 97 (3 Pt 1): 805-10.
15. Üner S, Sevcen F, Başaran E, Balcı C, Bilaloğlu B. Bir sağlık ocağına başvuran kişilerin sosyal el yıkama ile ilgili bazı bilgi ve tutumların saptanması. *TAF Prev Med Bull*, 2009; 8 (3): 207-16.
16. Rocha LA, Ferreira de Almeida E Borges L, Gontijo Filho PP. Changes in hands microbiota associated with skin damage because of hand hygiene procedures on the health care workers. *Am J Infect Control*, 2009; 37 (2): 155-9.

İdrar kültürlerinden izole edilen enterokok türlerinin dağılımı ve antibiyotik direnç profillerinin değerlendirilmesi

Evaluation of the distribution and antibiotic resistance profiles of enterococcus species isolated from urine cultures

Melek BİLGİN¹ (ID), Selim GÖRGÜN¹ (ID), Hacer İŞLER¹ (ID), Eşe BAŞBULUT¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Enterokoklar toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir etkenidir. İdrar yolu enfeksiyonları enterokok enfeksiyonlarının en sık rastlanan şeklidir. Enterokoklarda birçok antimikrobiyal ajana karşı doğal ve kazanılmış tipte direnç gözlenmesi bu bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlara yol açmaktadır. Çalışmamızda, bir yıl içinde idrar örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranlarını belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Yöntem: Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Ocak - Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli servis ve polikliniklerden gönderilen idrar örneklerinden izole edilen 300 enterokok suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Bakterilerin tanımlaması ve antibiyotik duyarlılıkları VITEK 2 sistemi (BioMérieux, Fransa) ve klasik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Vankomisin direnci saptanan izolatların minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) E-test (BioMérieux, Fransa) kullanılarak belirlenmiştir. Duyarlılık sonuçları; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterleri esas alınarak belirlenmiştir.

ABSTRACT

Objective: Enterococci are one of the most commonly detected agents in community and hospital-acquired infections. Urinary tract infections are the most common form of enterococcal infections. Because enterococci are characterized by natural and acquired resistance to numerous antibiotics, there are serious problems in the treatment of infections caused by these bacteria. In our study, it was aimed to determine the resistance rates of enterococcal strains isolated from urine samples to various antibiotics within one year.

Methods: 300 enterococci strains isolated from urine samples sent to Samsun Training and Research Hospital Microbiology Laboratory between January and December 2018 from various services and polyclinics were included in the study. The identification of bacteria and their antibiotic susceptibility were made by using the VITEK 2 system (BioMérieux, France) and conventional methods. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of isolates with vancomycin resistance were determined by using the E-test (BioMérieux, France). Sensitivity results were determined based on European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria.

* 34. ANKEM Akılcı Antibiyotik Kullanımı Kongresi'nde sunulmuştur. Poster No.12-43 (01 - 05 Mayıs 2019 Kongre Merkezi - Marmaris)

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Samsun



İletişim / Corresponding Author : Melek BİLGİN

Bariş Bulvarı Kıranköy Mahallesi No: 199 İlkadım / Samsun - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 09.05.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 30.12.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.54938

Bilgin M, Görgün S, İşler H, Başbulut E. İdrar kültürlerinden izole edilen enterokok türlerinin dağılımı ve antibiyotik direnç profillerinin değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 265 - 272

Bulgular: İzole edilen 300 suşun 185 (%61.6)'i *Enterococcus faecalis*, 80 (%26.6)'i *Enterococcus faecium*, 30 (%10.0)'u *Enterococcus* spp., dördü (%1.3) *Enterococcus gallinarum*, biri (%0.3) *Enterococcus raffinosus* olarak tanımlanmıştır. Suşlarının izole edildiği 300 hastanın 174 (%58)'ü kadın, 126 (%42)'si erkektir. Yatan hastalardan izole edilen 238 izolatin %40'ı yoğun bakım ünitesinden, %28'i cerrahi klinikler, %14'ü dahili klinikler ve %18'i de palyatif kliniğinde yatan hastalardan izole edilmiştir. Poliklinik hastalarından izole edilen suşların ise; %13'ü acil, %16'sı dahiliye, %67'si cerrahi polikliniklere gelen hastalardan izole edilmiştir. Antibiyotiklere direnç oranları; *E. faecalis* ve *E. faecium* için sırasıyla; ampisiline %8.1 ve %95, siprofloksasine %44.8 ve %93.7, vankomisine %0.5 ve %18.7, teikoplanine %0.5 ve %18.7, linezolidde %0 ve %2.5, tigesikline %0 ve %1.25 ve yüksek düzey gentamisine %35.6 ve %60 olarak belirlenmiştir. Klasik yöntemlerle *Enterococcus* spp olarak tanımlanan 30 izolatin antibiyotik direnç oranları; ampisilin %33.8, siprofloksasin %73.3, vankomisin %10, teikoplanin %10, yüksek düzey gentamisin için %40 olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Hastanemizde izole edilen enterokoklarda, özellikle siprofloksasin, vankomisin ve teikoplanin direncinin yüksek olması, bu antibiyotiklerin kullanımını kısıtlamaktadır. Uygun olmayan antibiyotik kullanımı, vankomisine dirençli enterokok kolonizasyonunu artırarak hastane enfeksiyonlarına neden olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Enterokoklar, idrar yolu enfeksiyonu, enterokok antibiyotik duyarlılığı

Results: Of isolated 300 strains, 185 (61.6%) were identified as *Enterococcus faecalis*, 80 (26.6%) were *Enterococcus faecium*, 30 (10.0%) were *Enterococcus* spp., 4 (1.3%) were *Enterococcus gallinarum* and 1 (0.3%) was *Enterococcus raffinosus*. 174 (58%) of the 300 patients whose strains were isolated were female and 126 (42%) were male. Of the 238 isolates isolated from inpatients, 40% were isolated from the intensive care unit, 28% from surgical clinics, 14% from internal clinics, and 18% from the palliative clinic. For strains isolated from polyclinic patients, the rates are as follows: 13% from emergency clinics, 16% from internal diseases, and 67% from surgical polyclinics. Antibiotic resistance rates of *E. faecalis* and *E. faecium* is determined as 8.1% and 95% for ampicillin, 44.8% and 93.7% for ciprofloxacin, 0.5% and 18.7% for vancomycin, 0.5% and 18.7% for teicoplanin, 0% and 2.5% for linezolid, 0% and 1.25% for tigecycline, and 35.6% and 60% for high-level gentamicin respectively. Antibiotic resistance rates of 30 isolates defined as *Enterococcus* spp using conventional methods were determined as 33.8% for ampicillin, 73.3% for ciprofloxacin, 10% for vancomycin, 10% for teicoplanin, and 40% for high-level gentamicin.

Conclusion: High resistance to ciprofloxacin, vancomycin and teicoplanin in enterococci isolated in our hospital limits the use of these antibiotics. Inappropriate use of antibiotics may increase vancomycin-resistant enterococcal colonization, leading to nosocomial infections.

Key Words: Enterococci, urinary tract infections, enterococci antibiotic susceptibility

GİRİŞ

İnsanlarda, gastrointestinal kanalda, genitoüriner sistem ve oral kavitede normal flora elemanı olarak bulunan enterokoklar, sıklıkla idrar yolu enfeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkabilmektedir. Enterokokların dış ortam koşullarına dayanıklı

olmaları ve bazı antibiyotiklere dirençli olmaları nedeniyle, yıllar içerisinde gittikçe artan oranlarda, çeşitli enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadırlar. (1,2).

Nozokomiyal enfeksiyonların önde gelen etkenlerinden biri olan enterokoklar, hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarında ikinci sıklıkta izole edilen etken olarak bildirilmektedir (3,4). Daha çok altta yatan önemli bir hastalığı olan yaşlılarda, uzun süreli hastanede yatan, tedavilerinde invaziv geçişler kullanılan, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanıldığı ve bağışık yetmezlikli hastalarda enfeksiyonlara neden olmaktadır (5,6).

Hastane kaynaklı enterokok enfeksiyonlarının artışı, sık kullanılan antibiyotiklere karşı artan dirençle paralellik göstermektedir (7). Son yıllarda kazanılmış direnç; özellikle yüksek düzey aminoglikozid direnci (YDAD), beta-laktamlar ve glikopeptidlere direnç artan oranlarda bildirilmekte olup kombinasyon tedavilerinin etkinliğini yok edeceğinden ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle antibiyotik direncinin periyodik olarak tespit edilmesi tedavi stratejilerinin belirlenmesinde yardımcı olacaktır (6,7). Çalışmamızda, Hastanemizde Ocak-Aralık 2018 tarihleri arasında, idrar örneklerinden izole edilen enterokok izolatlarının; ampisilin, gentamisin, siprofloksasin, vankomisin, teikoplanin, linezolid ve tigesiklin gibi antibiyotiklere direnç oranlarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak-Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli servis ve polikliniklerden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiş idrar örneklerinden izole edilen 300 enterokok suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Kültürü yapılmak üzere gönderilen idrar örnekleri %5 koyun

kanlı agara (RTA, Türkiye) ve Eosin Methylene Blue (EMB) agara (RTA, Türkiye) ekilmiştir. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonunda, uygun koloni morfolojisine sahip, katalaz testi negatif, pirolidonil arilamidaz (PYR) testi pozitif, gram pozitif kokların identifikasyonu ve antibiyogramları; tam otomatize bakteri tanımlama sistemi VITEK 2 (BioMérieux, Fransa) ile çalışılmıştır. VITEK-2 ile vankomisin dirençli saptanan izolatların E-test (BioMérieux, Fransa) ile MİK değerleri tekrar çalışılmıştır. Duyarlılık sonuçları; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterleri esas alınarak belirlenmiştir. Yüksek düzey aminoglikozid (YDAD) direnci; VITEK 2 ile tarama testi şeklinde çalışılmıştır, EUCAST kriterleri esas alınarak ise YDAD pozitif / negatif olarak belirlenmiştir (8). Kalite kontrol için *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 standart suşu kullanılmıştır.

Veriler retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Hastaların tekrarlayan örnekleri çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışma için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıpta Uzmanlık Eğitim Kurulu'nun 12.03.2019 tarihinde verdiği TUEK 28-2019 BADK/6-48 sayılı izin alınmıştır.

BULGULAR

Suşların izole edildiği 300 hastanın 174'ü (%58) kadın, 126'sı (%42) erkektir. İzole edilen 300 suşun 238'i (%79.3) yatan hastalardan, 62'si (%20.7) poliklinik hastalarından izole edilmiştir. Ayaktan ve yatan hastalardan izole edilen 300 suşun tür düzeyinde dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Samsun Eğ. ve Ar. Hast. servis ve poliklinik hastalarından izole edilen 300 enterokok suşunun tür düzeyinde dağılımı (Ocak-Aralık 2018)

	<i>E. faecalis</i> n (%)	<i>E. faecium</i> n (%)	<i>Enterococcus spp.</i> n (%)	<i>E. gallinarum</i> n (%)	<i>E. raffinosus</i> n (%)
Yatan	137 (74)	78 (97.5)	18 (60)	4 (100)	1 (100)
Ayaktan	48 (36)	2 (2.5)	12 (40)	0	0
Toplam	185	80	30	4	1

İzole edilen *E. faecalis* suşlarının %74'ü, *E. faecium* suşlarının %97.5'i yatan hastalardan izole edilmiştir. *E. faecalis* için yatan ve ayaktan hastalarda antibiyotik direnç oranları sırasıyla; ampisilin için %9, %7; siprofloksasin için %46, %41; YDAD için %34, %30 olarak saptanmıştır. Vankomisin ve teikoplanin direnci sadece bir yatan hastada tespit edilmiştir

Yatan hastalardan izole edilen 238 izolatin; 95 (%40)'i yoğun bakım ünitesinden, ayaktan hastalardan izole edilen 62 izolatin ise 42 (%67.7)'si cerrahi polikliniklerden (35/42 üroloji) izole edilmiştir. İzole edilen 300 suşun üreme saptandığı klinikler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Enterokoklarda vankomisin direnci VITEK 2 ve E-test yöntemleriyle araştırılmış, iki yöntem %100 uyumlu bulunmuştur. İzole edilen enterokok türlerinin Vitek-2 ile tespit edilen ve EUCAST kriterleri esas alınarak belirlenen antibiyotiklere direnç oranları Tablo 3'de gösterilmiştir. *E. faecalis* için en yüksek direnç %45 ile siprofloksasine ve *E. faecium* için en yüksek direnç ise %95 ile ampisiline karşı tespit edilmiştir. Klasik yöntemlerle *Enterococcus* spp olarak tanımlanan 30 izolatin antibiyotik direnç oranları ampisilin %36, siprofloksasin %73, vankomisin %10, teikoplanin %10 ve YDAD için %40 olarak belirlenmiştir.

Tablo 2. Enterokok suşlarının üreme saptandığı klinikler

Örneğin Gönderildiği Klinik	Yatan n (%)	Ayaktan n (%)
Yoğun Bakım Ünitesi	95 (40,0)	-
Cerrahi Birimler	68 (28.5)	42 (67.7)
Dahili Birimler	32 (13.5)	12 (19.3)
Palyatif Bakım Ünitesi	43 (18,0)	-
Acil	-	8 (13,0)
Toplam	238 (100,0)	62 (100,0)

Tablo 3. Enterokok türlerinin antibiyotiklere direnç oranları

Antibiyotik	<i>E. faecalis</i> n (185) %	<i>E. faecium</i> n (80) %	<i>Enterococcus spp.</i> n (30) %
Ampisilin	15 8.1	76 95	10 33.3
YDAD*	66 35.6	48 60	12 40
Siprofloksasin	83 44.8	75 93.7	22 73.3
Vankomisin	1 0.5	15 18.7	3 10
Teikoplanin	1 0.5	15 18.7	3 10
Linezolid	0 0	2 2.5	0 0
Tigesiklin	0 0	1 1.25	0 0

*YDAD: Yüksek düzey aminoglikozid direnci

TARTIŞMA ve SONUÇ

Enterokoklar; toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir etkenidir (9). Özellikle son 20 yılda önemli hastane patojenlerinden biri olmuştur (10). İdrar yolu enfeksiyonları enterokok enfeksiyonlarının en sık rastlanan şeklidir. Enterokoklar tahminen tüm idrar yolu enfeksiyonlarının %10'undan, hastane kaynaklı olanların ise %16'sından sorumlu tutulmaktadır (7-11).

Enterokokların en önemli özelliği, gram pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan birçok antimikrobik ajana karşı direnç göstermeleridir. Bu yüzden izole edilecek enterokokların tür düzeyinde adlandırılıp, antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi, uygun tedavinin seçilebilmesi için önemlidir (10).

İnsanlarda enterokoklar toplum ve hastane kökenli enfeksiyonlar yapabilirler. *Enterococcus* cinsi içinde yaklaşık olarak 20 tür yer almaktadır. Bunlardan *E. faecalis* ve *E. faecium* insanlarda en sık saptanan türlerdir (3,12). Ülkemizden bildirilen çeşitli çalışmalarda, enterokok tür dağılımı incelendiğinde, Cömert ve ark. çalışmalarında %67.3'ünün *E. faecalis*, %26.9'unun *E. faecium*; Özseven ve ark. ise %52'sinin *E. faecalis*, %48'inin *E. faecium* olduğunu belirtmişlerdir (3, 13). Gülcan ve ark. nın yaptıkları çalışmada ayakta hastalarda %91.6 *E. faecalis*, yatan hastalarda % 59.3 *E. faecium* daha yüksek oranlarda izole edilmiştir (11). Çalışmamızda benzer şekilde izolatların %61.6'sı *E. faecalis*, % 26.6'sı *E. faecium* olarak tespit edilmiştir ancak ayakta ve yatan hastalarda sırasıyla %77 ve %57 olarak *E. faecalis* daha yüksek oranda izole edilmiştir.

Ödemiş ve ark. çalışmaya aldıkları hastaların %57'sinin yoğun bakım ünitesinde, %18'inin dahili birimlerde, %23'ünün cerrahi birimlerde yatmakta olan hastalar olduğunu bildirmişlerdir (4). Çalışmamızda da benzer şekilde yatan hastalardan izole edilen 238 izolatın %40'ı yoğun bakımlardan, %13.5 dahili birimlerden, %28.5'i cerrahi birimlerden, %18'i ise palyatif servisindeki hastalardan izole edilmiştir.

Ampisilin enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde duyarlılık saptanması halinde öncelikle tercih edilmesi gereken antimikrobiyal ajanlardan birisidir ancak artan direnç oranı nedeniyle ampirik tedavide kullanımında tedavi başarısızlıkları görülebilmektedir. Ülkemizden yapılan bildirimlerde enterokoklarda ampisilin direncinin *E. faecalis* için %3-74, *E. faecium* için %89-96 arasında dağılım gösterdiği gözlenmektedir (7, 10). *E. faecalis*'de ampisilin direnci çalışmalarda izolatların toplum kaynaklı ya da hastane kaynaklı olmasına göre değişmektedir. Ödemiş ve ark. çalışmalarında; sadece yatan hastalardan izole edilen suşları değerlendirdikleri için hem *E. faecalis* (%50) hem de *E. faecium* (%94) için ampisilin suşların en dirençli olduğu antibiyotik olarak saptamışlardır (4). Çin'de Jia ve ark.'nın yaptığı çalışmada *E. faecalis* için %5, *E. faecium* için %82 ampisilin direnci saptamışlardır (14). Şimşek M'nin çalışmasında *E. faecalis* için bu oran %10.6, *E. faecium* için %83.9 ile en yüksek direnç oranına sahip olarak belirlenmiştir (15). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde ampisilin direnci *E. faecalis* için %8.1, *E. faecium* için %95 ile en yüksek direnç oranına sahip olarak belirlenmiştir.

Kinolonların enterokoklara etkinliği sınırlıdır. Bu nedenle enterokok enfeksiyonları arasında yalnızca üriner sistem enfeksiyonlarında alternatif tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır (16, 17). Avrupa'da yapılan çok merkezli bir çalışmada, siprofloksasin direnç oranı *E. faecalis* suşlarında %6 ve *E. faecium* suşlarında %33 olarak bulunmuştur (18). Ülkemizde yapılan çalışmalarda *E. faecalis* ve *E. faecium* için sırasıyla Butcu ve ark. %34.3, %84.8; Ödemiş ve ark. %36, %86; Şimşek M %37.5 ve %68.5 olarak bildirmişlerdir (4, 15, 17). Bizim çalışmamızda da %45 ve %93 olarak siprofloksasine yüksek oranda direnç saptanmıştır. Kinolonların toplumda ve hastanelerde sık kullanılmasının bir sonucu olarak kinolon direnç oranlarının yüksek bulunduğu, ampirik tedavide kinolonların daha dikkatli kullanılması gerektiğini düşündürmektedir.

YDAD varlığında beta laktam-aminoglikozid kombinasyonunun sinerjistik bakterisidal etkisi ortadan kalkmaktadır. "Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance" (CAESAR) raporunda ülkemizdeki kan ve beyin omurilik sıvısından izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında, YDAD direnci sırasıyla %38 ve %52 olarak; Butcu ve ark. tarafından da %13.4 ve %58 olarak bildirilmiştir (17, 19). Sharifzadeh Peyvasti ve ark. çalışmalarında 195 izolatın %42.2'sinde YDAD saptamışlardır (20). Bizim çalışmamızda da YDAD *E. faecalis* için %36 ve *E. faecium* için %60 olarak diğer merkezlerle benzer oranlarda saptanmıştır.

Glikopeptidler özellikle beta laktam ve aminoglikozid dirençli enfeksiyonların tedavisinde sık tercih edilmektedir. Yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere vankomisin'in sık kullanımı direnç oranlarının artmasına neden olmaktadır. "Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı" verilerine ve diğer çalışmalara göre ülkemizdeki vankomisin direnci *E. faecalis*'te %0-4, *E. faecium*'da ise %0-23 olarak belirtilmektedir (3,17,21). CAESAR raporuna göre ise sırasıyla %1 ve %13 olarak bildirilmiştir (19). Çalışmamızda vankomisin direnci *E. faecalis* ve *E. faecium* için sırasıyla %0.5 ve %18, teikoplanin direnci de vankomisin direnci ile aynı oranda tespit edilmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda tespit edilen 15 vankomisin dirençli *E. faecium* (VRE) izolatlarının 6 tanesi palyatif servisinde, 6'sı yoğun bakımda, 4'ü de cerrahi servisindeki hastalardan izole edilmiştir. Sonuçlar yakın zamanda yapılan çalışmalarla benzer bulunmuştur. Bu veriler, hastanemizde enterokok enfeksiyonlarının tanısında tür düzeyinde identifikasyonun önemli olduğunu ve tedavisinde vankomisin'in daha dikkatli kullanılmasının ve duyarlılık oranlarının takip edilmesinin gerekliliğini göstermektedir.

Linezolid, klinik enfeksiyonlara neden olan tüm Gram pozitif bakterilerde güçlü in vitro aktivite gösteren ve son yıllarda klinik kullanımı artan yeni bir antimikrobiyal ajandır. Başta vankomisine

dirençli *E. faecium* suşları olmak üzere, çoklu ilaç dirençli Gram pozitif patojenlerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ajana karşı spontan mutasyonlar sonucunda direnç gelişimi çok düşük düzeylerde gözlenmesine karşın, tedavide yanlış olarak linezolidin suboptimal dozlarda kullanılmasının dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olabileceği bildirilmiştir (22). Ülkemizde yayınlanan bazı çalışmalarda ise enterokok suşlarında linezolid direncine rastlanmamıştır (1,16). Ödemiş ve ark. *E. faecalis*'te %1, *E. faecium*'da %6; Şimşek M. ise çalışmasında sırasıyla %3.1 ve %4.9 linezolid direnci saptamışlardır (4, 15). CAESAR verilerine göre ülkemizde *E. faecalis*'te direnç saptanmamış, *E. faecium*'da ise %3 linezolid direnci bildirilmiştir (19). Bizim çalışmamızda CAESAR verilerine benzer şekilde *E. faecalis*'te direnç saptanmamış ancak *E. faecium*'da %6 linezolid direnci saptanmıştır.

Tigesiklinin, glikopeptidlere dirençli enterokok gibi dirençli Gram pozitif bakterilere etkili olduğu gösterilmiştir (23). Ayrıca, tigesiklinin kinupristin/dalfopristin, linezolid ve daptomisine kıyasla VRE suşlarında daha etkili olduğu da yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (1). Yapılan yurt dışı çalışmalarda, Souli ve ark. 60 *E. faecium* suşunun hepsini tigesikline duyarlı olarak bulmuşlardır (24). Ülkemizde Etiz ve ark. çalışmalarında, 536 enterokok suşunun yalnızca ikisinde (%0.3) tigesiklin direnci bildirmişlerdir (15). Çalışmamızda, izole ettiğimiz 300 enterokok suşunun yalnızca bir *E. faecium* suşunda tigesiklin direnci tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *Enterococcus* spp. olarak çalışmaya dahil ettiğimiz 30 izolatın tür tayini yapılamamış olması çalışmamızda kısıtlılık oluşturmaktadır.

Sonuç olarak; hastanemizde izole edilen enterokoklarda siprofloksasin, vankomisin ve teikoplanin direncinin yüksek olması bu antibiyotiklerin tedavide kullanımını kısıtlamaktadır. Uygun olmayan antibiyotik kullanımı, vankomisine dirençli enterokok kolonizasyonunu artırarak hastane enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. Bu nedenle

antibiyotik kullanımında, kültür antibiyogram sonuçları göz önünde bulundurulmalıdır. Ampirik tedavinin önemli olduğu yaşamı tehdit eden ciddi enterokok enfeksiyonlarında, klinisyene yol göstermek amacıyla

aralıklı olarak her merkezde direnç paternlerinin belirlenmesi ve bildirilmesi enfeksiyonların önlenmesi ve yayılması açısından önem taşımaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıpta Uzmanlık Eğitim Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 12.03.2019 ve Karar no: TUEK 28-2019 BADK/6-48).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Aktepe OC, Aşık G, Çiftçi İH, Çetinkaya Z. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnç oranları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2011;41(2):86-90.
2. Çöleri A, Çökmüş C. Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2008; 65(2): 87-96.
3. Cömert F, Külah C, Eroğlu Ö, Aktaş E. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen enterokok izolatlarının üç yıllık değerlendirmesi. *Flora Derg.* 2007; 12(2): 98-102.
4. Ödemiş İ, Köse Ş, Ersan G, Çelik D, Akbulut İ. Hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2018; 75(4): 345-52.
5. Ersoy Y, Bayraktar M, Fırat M, Yağmur M, Durmaz R. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg.* 2005; 19(2):92-6.
6. Ekşi F, Gayyurhan ED. Klinik örneklerden izole edilen streptokok ve enterokok suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Ankem Derg.* 2008; 22(2): 53-8.
7. Teixeira LM, Carvalho MGS, Facklam RR. Enterococcus, "Murray PR, Baron E J, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manuel of Clinical Microbiology*, 10. baskı" kitabında, s.430- 43, Washington DC: ASM Press (2009).
8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2018). EUCAST Version 8.1.
9. Baykam M. İdrar örneklerinden izole edilen enterokokların in vitro antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Genel Tıp Derg.* 2001; (11): 119-21.
10. Yamazhan T. Vankomisine dirençli enterokoklar. Direncin önlenmesi ve kontrol. 2. EKMUD Bilimsel Platformu Kitabı, 11-14 Mart 2009, Antalya: 49-52.
11. Gulcan A, Celik G, Gulcan E, Cansever Z, Aladag DM. Performance evaluation of urinalysis and culture results in patients suspected urinary tract infection. *Abant Med J.* 2012; 1(3): 61-4. 19.
12. Murray BE. Enterococci. In Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds): *Infectious Diseases*. Second edition, Philadelphia: W. B. Saunders Company 1998; 1723-30.

13. Özseven AG, Çetin E, Arıdoğan B, Çiftçi E, Özseven L. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg, 2011; 25(4): 256-62.
14. Jia W, Li G, Wang W. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: a hospital-based study in China. Int J Environ Res Public Health. 2014; 11(3): 3424-42. doi: 10.3390/ijerph110303424.
15. Şimşek M. İdrar Kültürlerinden izole edilen enterokok suşlarının tür dağılımları ve antibiyotik duyarlılıkları. Kocatepe Medical Journal. 20: 177-182.
16. Yüksel Ergin Ö, Deniz Bayram E, Uzun B, Güngör S, Demirdal T. İdrar kültüründen izole edilen *Enterococcus* türleri ve antibiyotik dirençleri. ANKEM Derg. 2013; 27(4): 173-8.
17. Butcu M, Akcay SS, Inan S , Aksaray S, Engin DÖ, Çalışıcı G. In vitro susceptibility of enterococci strains isolated from urine samples to fosfomycin and other antibiotics. J Infect Chemother. 2011; 17(4): 575-8.
18. Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JAA, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(10): 2542-6.
19. World Health Organization. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2018 p88. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2018/central-asian-and-easterneuropean-surveillance-of-antimicrobialresistance.-annual-report-2018>. Erişim tarihi 17.01 2020.
20. Sharifzadeh Peyvasti V, Mohabati Mobarez A, Shahcheraghi F, Khoramabadi N, Razaz Rahmati N, Hosseini Doust R. High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of *Enterococcus* species in Tehran/ Iran. J Glob Antimicrob Resist. 2019;19:pii: S2213-7165(19)30206-1.
21. T.C.Sağlık Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Sağlık Hizmet Standartları Dairesi Başkanlığı Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyansı Ağı (UHESA) Raporu, Özet Veri 2015; 42.
22. Jones RN, DellaLatta P, Lee LV, Biedenbach DJ. Linezolid resistant *Enterococcus faecium* isolated from a patient without prior exposure to an oxazolidinone: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 42(2): 137-9.
23. Karaoğlan İ, Zer Y, Namıduru M. Vankomisine dirençli enterokok suşlarında tigesiklinin in vitro etkinliği. ANKEM Derg. 2008; 22(3): 153-5.
24. Souli M, Kontopidou FV, Koratzanis E, Antaniadeu A, Giannitsioti E, Evangelopoulou P et al. In vitro activity of tigecycline against multiple-drug-resistant, including pan-resistant, Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(9): 3166-9.

Melanoma hücrelerinde epoksomisinin indüklediği apoptozis sürecinde gerçekleşen erken spektral değişikliklerin belirlenmesi

Determination of early spectral changes in melanoma cells during epoxomicin-induced apoptotic process

Ertan KÜÇÜKSAYAN¹ (ID), Aslınur SIRCAN KÜÇÜKSAYAN² (ID)

ÖZET

Amaç: Hücrelerde apoptozis sürecinde meydana gelen spektral değişikliklerin belirlenmesi yeni tedavi ve ilaç araştırmalarına önemli bilgiler sağlayabilir. Apoptotik hücreler, hücre küçülmesi ve parçalanmasına yol açan bir dizi hücre altı değişikliğe uğrar. Apoptotik süreçte bu değişimlerin erken aşamada zamana bağlı olarak belirlenmesi hücre kültürü çalışmalarına yeni bir yön verebilir. Bu çalışmanın amacı melanoma hücrelerinin apoptozis sürecinde erken aşamada meydana gelen spektral değişikliklerin zamana bağlı olarak belirlenebileceği bir yöntem geliştirmektir.

Yöntem: Bu çalışmada A375 melanoma hücre hattında apoptozisi indüklemek için epoksomisin (Epo) kullanılmıştır ve apoptotik doz MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Erken apoptotik sürecinin zamana bağlı değerlendirilebilmesi için sabit Epo dozuyla beş farklı zaman noktasında (0.5-6 saat) ölçümler yapılmıştır. Apoptozisin en önemli uyararı olan ROS ölçümü DCFH-DA yöntemi ile yapılmıştır. Western Blot tekniği ile Bax miktarı belirlenmiştir. Geri yansıma spektroskopisi sistemi ile ölçülen spektrumlardan spektroskopik apoptozis indeksi belirlenmiştir.

ABSTRACT

Objective: Determining the changes in the apoptosis process in cells can provide important information for new treatment and drug research. Apoptotic cells undergo a series of subcellular changes that lead to cell shrinkage and fragmentation. Determining these early changes in the apoptotic process depending on time may provide a new perspective to cell culture studies. The aim of this study is to develop a method in which early spectral changes occurring in the apoptosis process of melanoma cells can be determined depending on time.

Methods: In this study, epoxomicin (Epo) was used to induce apoptosis in A375 melanoma cell line and apoptotic dose was determined by MTT method. In order to evaluate the early apoptotic process in a time-dependent manner, measurements were made at five different time points (0.5-6 hours) with a fixed Epo dose. DCFH-DA method was used to measure ROS, which is the most important stimulus of apoptosis. Bax amount was determined by Western Blot technique. Spectroscopic measurements were made with a back-reflection spectroscopy experiment setup consisting of spectrometer, tungsten-halogen light source and fiber optic probe. Apoptosis index values were determined from spectra.

¹Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Alanya, Antalya

²Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Alanya, Antalya



İletişim / Corresponding Author : Ertan KÜÇÜKSAYAN

Alanya Alaaddin Keykubat Üni. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD., Alanya, Antalya - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 15.12.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 18.04.2021

Bulgular: Melanoma hücrelerinin apoptozis süresinde ölçülen spektrumlar ile erken spektral değişiklikler belirlenmiştir. ROS ölçümlerinde 2., 4. ve 6. saat ölçümlerinde kontrole göre anlamlı fark bulunmuştur. Hücre canlılığının 24 saat sonra 75 ve 100 nM Epo dozlarında kontrole göre %70 azaldığı bulunmuştur. Apoptozisin bir göstergesi olarak tüm Epo gruplarında zamana bağlı olarak Bax seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Spektroskopik apoptozis indeks değeri tüm gruplarda ROS ve Bax sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Sonuç: Hücre kültüründe apoptozis sürecinde erken aşamada meydana gelen spektral değişikliklerin geri yansıma spektroskopisi ile belirlenebileceği yeni bir yaklaşım sunulmuştur. Bu yaklaşımın hücre kültürü çalışmalarında apoptozisi hücre kültürü koşullarına müdahale etmeden, zamana bağlı olarak izleyebilen bir yöntem olarak geliştirilme potansiyeli vardır.

Anahtar Kelimeler: Geri yansıma spektroskopisi, apoptozis, epoksomisin, melanoma

Results: Early spectral changes were determined with the spectra measured in the apoptosis time of melanoma cells. A significant difference was found in ROS measurements at 2, 4 and 6 hours compared to control. Cell viability was found to be 70% lower than control at 75 and 100 nM Epo doses after 24 hours. Time-dependent Bax levels were found to increase in all Epo groups as an indicator of apoptosis. Spectroscopic apoptosis index value was found to be compatible with ROS and Bax results at all groups.

Conclusion: A new approach has been presented in which spectral changes occurring in the early stage of the apoptosis process in cell culture can be determined by back reflection spectroscopy. This approach has the potential to be developed in cell culture studies as a method that can monitor apoptosis over time without interfering with cell culture conditions.

Key Words: Back reflection spectroscopy, apoptosis, epoxomicin, melanoma

GİRİŞ

Homeostazisin korunması, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki denge ile sağlanır. Apoptozis, homeostazide önemli bir rol oynayan programlanmış, inflamatuvar olmayan, fizyolojik bir hücre ölümü şeklidir. Apoptozis sırasında çok sayıda biyokimyasal mekanizmanın gerçekleşmesine paralel olarak hücre morfolojisinde karakteristik değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler hücre tipine, apoptozis indüksiyon mekanizmasına ve apoptozis sürecinin analiz edildiği zaman noktasına bağlı olarak değişir (1). Apoptozis sürecinin iyi anlaşılması, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasında dengesizlik gösteren kanser gibi hastalıkların terapötik tedavisinin potansiyel olarak yeni hedeflerine işaret edecektir (2-8). Kanser araştırmalarında apoptozisin başlatılması

hedeflenir ve meydana gelen değişikliklerin belirlenir (9, 10). Dolayısıyla apoptozis sürecinde erken aşamada gerçekleşen değişikliklerin belirlenebileceği yeni yöntemlerin araştırılması oldukça önemlidir.

Hücre içinde oluşan anormal proteinler veya zamanla oluşan istenmeyen proteinler, ubikitinlerle işaretlenir ve proteazom kompleksi aracılığıyla yıkılır (11). Epoksomisin (Epo) in vivo ve in vitro olarak anti-inflamatuar etkinliği iyi bilinen hücre içine geçebilen selektif irreversible bir proteazom inhibitörüdür ve çeşitli etki mekanizmaları ile ubikitin proteazom yolağını proteazom üzerinden inhibe etmektedirler (12). Proteazom inhibitörleri birçok çalışmada kanser hücrelerine karşı yeni bir tedavi seçeneği olarak denenmektedir (13).

Apoptozis sırasında meydana gelen morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler, hücre kültürlerinde apoptozisi tespit etmeye yönelik mevcut yöntemlerin temelini oluşturur. Apoptotik süreçler birkaç saat gibi kısa bir sürede gelişebilir ve kullanılan yöntem ve örnekleme süresine bağlı olarak tespit etmek zor olabilir. Hücre ölümü miktarını ve türünü ölçerken, yöntem seçimi kritik önem sahiptir ve elde edilen sonuçları etkileyebilir. Farklı saptama yöntemleri kullanan çok sayıda apoptozis belirleme kiti bulunmaktadır. Hücre canlılığını değerlendirmenin en basit ama yolu, dikkatli mikroskopik incelemesidir. İverted mikroskop ile hücre kültürü ortamındaki hücreler incelenecek ölü hücreler kantitatif olarak belirlenebilir. Hücreleri hemasitometre ile saymak, hücre ölümünü ölçmenin en temel yöntemidir. Bu yöntemde, hücre süspansiyonu PBS içinde eşit hacimde %0.01 tripan mavisi ile karıştırılır. Ancak apoptotik nekrotik hücre ayrımı yapılamaz. Floresan mikroskop kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücreler arasında daha iyi ayrım sağlayan bir protokol kullanılabilir. Bu teknikte bir hücre süspansiyonu, floresan DNA bağlayıcı boya ile karıştırılır ve saymak için floresan mikroskopu ile incelenir. Akış sitometrisi ile hücreler fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre analiz edilir ve apoptozisi belirlemenin ideal yöntemidir (14). Annexin V veya propidyum iyodür gibi işaretçilerin kullanıldığı ve hücrelere gönderilen ışığın ileri yönlü saçılma (forward scatter) miktarının ölçülmesi prensibiyle çalışan bir yöntemdir (15). Apoptozisi belirlemeye yönelik mevcut tüm yöntemler, hücreleri sabitlemek ve boyamak için bir eksojen ajanın eklenmesini ve / veya hücre kültürü ortamına fiziksel veya kimyasal etki edilmesini gerektirir. Bu yöntemler maliyet ve hücre kayıpları gibi dezavantajlara sahip olmalarının yanı sıra belirli bir zaman noktasındaki değerlendirme ile sınırlıdır. Apoptozisi belirlemenin en ideal yolu hücrelerin kültürü ortamına müdahale etmeden ve hızlı bir şekilde apoptotik sürecin değerlendirilmesidir.

Son yıllarda hücre kültürü çalışmalarında apoptozis sürecini daha uzun süreli in vivo ve noninvasif ölçümler ile değerlendirme hedefiyle optik yöntemler

geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır (16, 17). Geri yansımaya spektroskopisi yöntemi ile ölçüm yapılan numunenin optik özellikleri belirlenebilir (18). Bu yöntem ile ölçülen spektrumlar, ölçüm alınan numune hakkında bilgi veren, ışığın saçılımı ve absorpsiyonuna bağlı bir sinyaldir (19, 20). Numuneye gönderilen ışık, numunedeki parçacıkların boyutuna, şekline, ışığı kırma indisine bağlı olarak belirli açılar ile saçılır (21). Geri Yansımaya Spektroskopisi, hücrelerdeki kırılma indisi değişiminden dolayı elastik olarak saçılan fotonların oluşturduğu geri yansımaya sinyaline dayanır (22).

Apoptozisle ilgili hem biyokimyasal hem de morfolojik değişimler diğer hücre ölüm mekanizmalarından farklıdır. Apoptotik hücreler, hücre küçülmesi ve hücrenin parçalanmasına yol açan bir dizi hücre altı değişikliğe uğrar. Geri yansımaya spektroskopisi bu hücre altı düzeydeki mikro değişimlere duyarlıdır. Apoptotik süreçte bu değişimlerin erken aşamada zamana bağlı olarak belirlenmesi hücre kültürü çalışmalarına yeni bir yön verecektir. Bu çalışmanın amacı melanoma hücrelerinin apoptozis sürecinde erken aşamada meydana gelen spektral değişikliklerin zamana bağlı olarak geri yansımaya spektroskopisi ile belirlenebileceği bir yöntem geliştirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Kültürü ve Deney Grupları

A375 malin melanoma hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 units/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 1 mM glutamin içeren DMEM'de (Dulbecco's modified Eagle's medium), 37°C, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe standart hücre kültürü tekniği ile çoğaltılmıştır.

MTT ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Melanoma hücrelerinde uygun apoptozis dozunu belirlemek için Epoksomisin (5-100 nM) doz aralığında uygulandı. Hücrelerin petrilere ekilmesinden sonra

medyum atılarak, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 nM dozlarda Epo içeren medyum kuyulara uygulandı. Kontrol sadece melanoma hücrelerini içeren ve Epo uygulaması yapılmayan gruptur. Hücreler, belirlenen dozlardaki Epo ile petrilere metotlara uygun inkübasyon sürelerinde 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi ve 24 saat sonunda ve MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür] testi yapıldı.

Bu yöntemde MTT formazana indirgenir, bu reaksiyon ile oluşan renk kolorimetrik olarak ölçüldü. Canlı hücrelerin tetrazolyum ile formazan oluşturması temeline dayanır ve oluşan renk değişimi absorbans ölçümü ile belirlendi. Bunun için A375 hücreleri petrilere 1x10⁴ hücre olacak şekilde ayarlanarak ekildi ve yapışmaları için bir gece beklendi. Hücreler 5-100 nM dozlardaki Epo ile 96 kuyucuklu plakada 24 saat süresince inkübe edildikten sonra medyumlar atıldı. Taze medyum kuyucuklara eklenerek çalışılan her kuyucuğuna 0.5 mg/ml MTT içeren eklendi ve 4 saat 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon sürecinin sonunda kuyucukların dibinde formazan kristalleri görüldü ve 200 µL dimetil sülfoksit eklendi Pipetaj yapılarak karıştırıldı ve absorbans ölçümü için uygun homojen mavi bir solüsyon meydana gelmesini sağladı. Daha sonra bir saat içinde, 570 nm dalga boyunda, ELISA plak okuyucusunda ölçüm yapıldı. Sadece hücre (kontrol) veya Epo uygulanmış hücre içeren kuyuların absorbans değerlerinden, hücre içermeyen kuyuların absorbans değerleri çıkartıldı. Yaşayan hücre yüzdesi; kontrol grubunun absorbans değerlerinin ilaçla inkübe edilen hücrelerin absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar % canlılık olarak ifade edildi. Deneyler üç kere tekrarlandı ve her gruptan üç örnek çalışıldı.

Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi

Apoptozisin en önemli uyarıcı olan ROS olduğundan dolayı hücre içinde inkübasyon sonunda oluşan ROS

miktarı, DCF (2',7'-dichlorofluorescein)'nin floresans özelliğinden yararlanarak hesaplanmıştır. Bunun için A375 hücreleri 6 kuyulu plak içerisine 25 x 10⁴ hücre olacak şekilde ekildi ve bir gece hücrelerin yapışması için bekletildi. Hücreler 100 nM Epo ile 6 kuyulu plak 0.5, 1, 2, 4, 6 saat süresince inkübe edildikten sonra medyumlar atıldı ve hücreler PBS yıkandı. Son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde DCFH₂-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) boyası eklendi, 30 dakika boyunca karanlıkta 37 °C inkübatörde bekletildi. Daha sonra 10 dakika 500xg'de santrifüj edildi. Hücrelerde ROS ile oluşan DCF, 20X büyütme ile floresans mikroskopta incelendi. Bu ölçüm tüm gruplarda en az üç kere yapıldı. Daha sonra fotoğrafı çekilen hücrelerin hücre canlılığı Image j programı yardımıyla analiz edildi. Sonuçlar ilaç uygulanmayan kontrol grubuna oranlanarak verildi.

Apoptozisin Western Blot ile Belirlenmesi

Epo hücrede birçok apoptotik yolu aktive edebilir. Bax mitokondriyal membran geçirgenliği, mitokondriyal fonksiyon ve Cyt-c salınımının etkisini düzenlemede anahtar rol oynar (9). Bax seviyelerinin artışı apoptozisin uyarıldığını gösterebilir. Bu yüzden apoptotik marker olarak Bax'ı seçtik. A375 insan melanom hücreleri 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerde (0.5-6 saat) yapılan inkübasyonlardan sonra hücreler kazandıktan sonra iki kez PBS ile yıkandı ve santrifüj edildi. Hücre pelletleri, RİPA tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli içeren tamponda liziz edildi. Buz üzerinde 30 dakika inkübasyondan sonra süpernatantlar, 4°C'de 10 dakika 23.000 xg'de santrifüj edildi. Bradford yöntemi, protein konsantrasyonlarını belirlendi. 30 µg protein içeren numuneler Western Blot yöntemi ile analiz edildi. Proteinler, SDS-PAGE jelleri üzerinde ayrıldı ve PVDF membranlarına aktarıldı. Membranların oda sıcaklığında en az bir saat bloking tamponu (% 5 yağsız kuru süt, 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl ve % 0.1 Tween-20) ile inkübe edilmesiyle spesifik olmayan protein bağlanması önlenildi. Daha sonra membranlar, 1:1.000 oranında seyreltilen Bax spesifik birincil antikolarla

bir gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi. Membranlar daha sonra peroksidaz ile konjuge ikincil antikolar (1:10,000) 1 saat inkübe edildi. İmmüno blotların dansitometrik analizinde ECL reaktifi ve Syngene GBox görüntüleme cihazı kullanıldı. Görüntüler Image j programı yardımıyla analiz edildi. Sonuçlar ilaç uygulanmayan kontrol grubuna ve B-Aktin'e oranlanarak verildi.

Spektroskopik Ölçümler

Geri yansıma spektrumu ölçümleri, spektrometre, fiber optik prob, ışık kaynağı ve bir dizüstü bilgisayardan oluşan bir deney düzeneği ile yapıldı. Bu ölçümlerde ışık kaynağı olarak tungsten-halojen lamba (Ocean Optics, Inc. Florida, ABD), spektroskopik veriler için 400 ile 850 nm arasındaki dalga boyuna duyarlı, USB2000 model, spektrometre (Ocean Optics, Inc. Florida, ABD) kullanıldı. Spektrometreden gelen veriler bilgisayardaki yazılım (OoIbase32 Platinum, Ocean Optics, Inc, Florida, USA) ile analiz edilmiştir. Numuneye ışığı göndermek ve toplamak için dairesel geometriye sahip bir fiber optik prob kullanıldı. Optik probta altı tane dedektör fiber, bir tane kaynak fiberinin çevresine simetrik ve dairesel bir yapıda yerleştirilmiştir. Tüm fiberlerin çapları 400 µm dir ve probun ucunda birbirlerine bitişik olarak konumlandırıldı. Spektrumlar, Igor Pro 8.04 teknik grafik ve veri analizi programı ile işlendi.

Spektroskopik ölçümlerden önce, fiber bağlantıları ile ara yüzeylerde meydana gelen yansımaları ve tungsten halojen lambanın spektral dağılımının etkisini kaldırmak için kalibrasyon yapıldı (23). Kalibrasyondan sonra ölçümler siyah zemin üzerinde, probun hazırlanan hücre kültürü numune tüpünde 2-3 mm derinliğe daldırılması ile yapıldı. Her ölçüm sonrasında kalibre edilmiş spektrum daha önceki çalışmalarda açıklandığı gibi hesaplandı (24, 25). Kontrol ve farklı sürelerde (0.5-1 sa) 100 nM Epo ile inkübe edilen hücrelerden oluşan Epo gruplarının her birinden 8 defa geri yansıma spektrumu ölçüldü ve kaydedildi. Ölçülen bu 8 geri yansıma spektrumunun ortalaması alındı. Spektrumlardaki 550 ve 800 nm

deki ışık şiddeti oranı (I_{550}/I_{800}) daha önce yaptığımız çalışmalarda "Spektroskopik Apoptozis İndeksi" diye adlandırılmıştı (26). Bu çalışmada Spektroskopik Apoptozis İndeksi 800 nm deki ışık şiddetinin 550 nm deki ışık şiddetine oranından hesaplandı (I_{800}/I_{550}). Spektroskopik apoptotik indeks değerlerinin apoptozis sürecinde kontrole göre azalış yerine artış olarak ifade edilmesinin daha uygun olduğu düşünüldü. Ayrıca sonuçların kontrole oranının verilmesinin sonuçların sunumu açısından daha pratik ve standardize olduğu görüldü. Spektroskopik Apoptozis İndeksi spektrumlarında zamana bağlı olarak apoptozisin meydana getirdiği spektral değişimin nicel olarak ifadesidir.

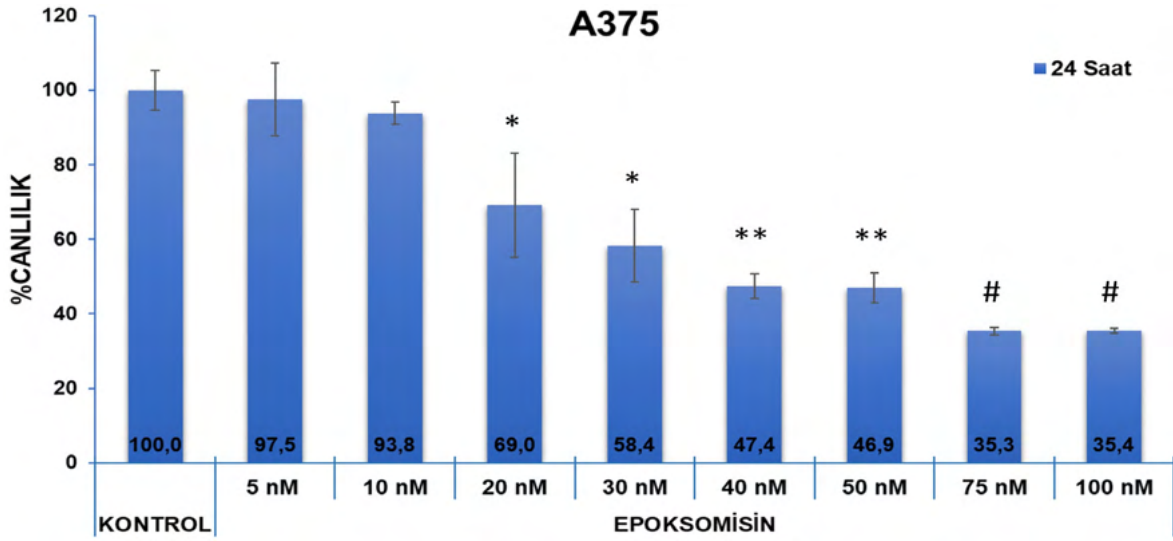
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Graphpad Prism Version 5.03 paket programı kullanılarak yapıldı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deneysel her grup için üç tekrarlı olarak yapıldı. Nicel veriler ortalama \pm SD olarak verildi. Gruplar arası anlamlı farklılıkları belirlemek için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testinde önemli bir fark bulunursa, iki grup arasındaki karşılaştırmaları değerlendirmek için Dunn's testi kullanıldı.

BULGULAR

MTT ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

A375 hücrelerine 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 nM Epo dozları 24 saatlik inkübasyon ile uygulandı. Şekil 1'de hücrelerin belirlenen dozlar ile 24 saatlik inkübasyonu sonrası kontrole göre % canlılık sonuçları görülmektedir. 20, 30, 40, 50, 75 ve 100 nM Epo uygulamasının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında canlılığın istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu ($p<0,001$). MTT sonucunda 75 ve 100 nM Epo dozlarında canlılığın kontrole göre %65 azaldığı bulundu. Canlılık testi sonucunda hücreleri apoptozise en iyi uğratan dozun 100 nM olduğu bulunmuştur. Bundan dolayı zamana bağlı ölçümlerin yapılacağı deney gruplarında 100 nM Epo uygulaması yapıldı.



Şekil 1. Farklı dozlardaki Epo'nin A375 hücrelerinde 24. saatin sonunda kontrole göre % canlılık üzerine etkisi.

* Değerleri, kontrol gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$).

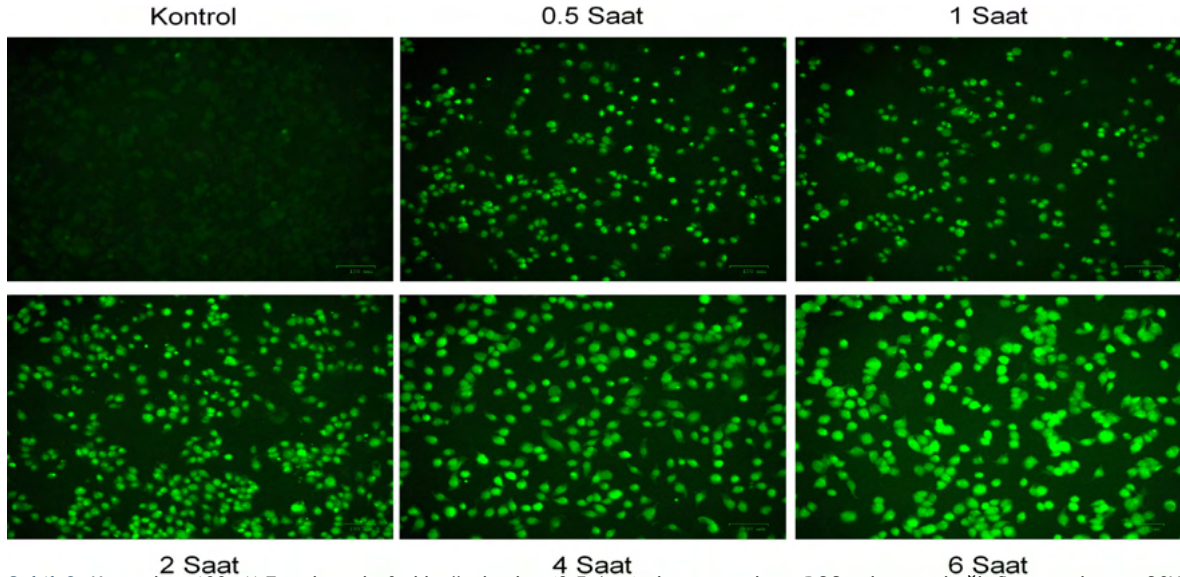
** Değerleri, kontrol 20 ve 30 nM gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$).

Değerleri, tüm gruplardan önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$)

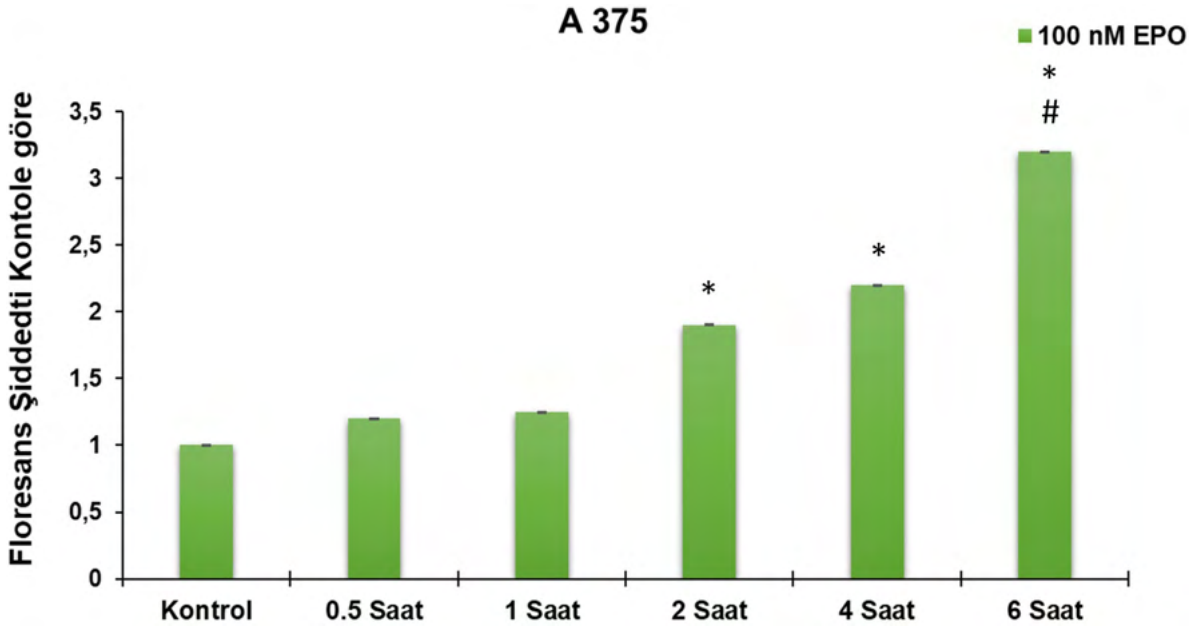
Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi

Hücrelere 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerde (0.5-6 saat) yapılan inkübasyonlardan sonra ROS miktarı ölçüldü. Kontrol ve Epo gruplarının floresans fotoğrafları Şekil 2'de görülmektedir. Tüm Epo gruplarında ROS miktarında kontrole göre artışlar

gözlemlendi. Bu artışın 0.5 ve 1 saatlik inkübasyon sürelerinde anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 3). Ancak ROS miktarının 2, 4 ve 6 saatlik inkübasyon sürelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p < 0,001$).



Şekil 2. Kontrol ve 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerden (0.5-6 sa) oluşan grupların ROS miktarına bağlı floresanslarının 20X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü



Şekil 3. Kontrol ve 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerden (0.5-6 saat) oluşan grupların ROS miktarına bağlı floresans şiddetleri. * Değerleri, kontrol gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$). # Değerleri, 2. ve 4. saat gruplardan önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$)

Western Blot ile Bax Proteinin Belirlenmesi

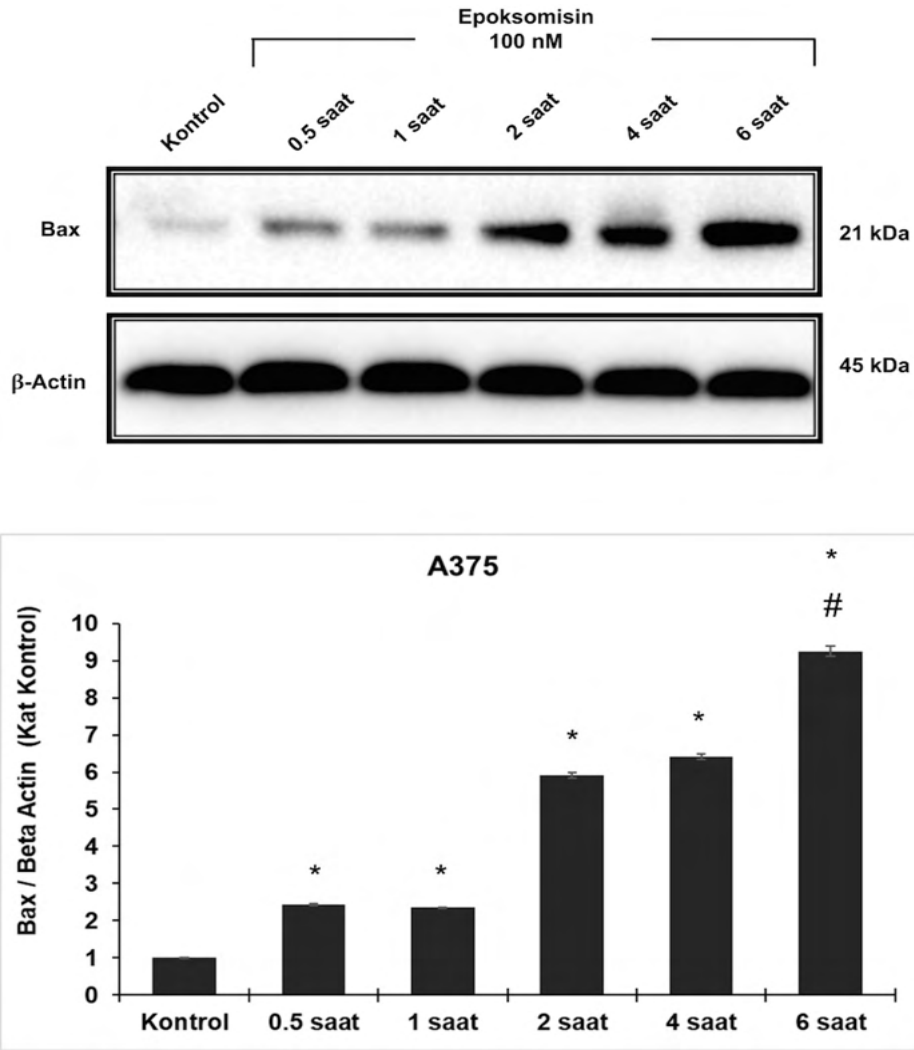
Hücrelere 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerde (0.5-6 saat) yapılan inkübasyonlardan sonra Bax miktarı western blot ile belirlendi. Kontrol ve Epo gruplarının Bax protein batları ve dansitometrik fotoğrafları Şekil 4'de görülmektedir. Tüm Epo gruplarında Bax miktarında kontrole göre artışlar gözlemlendi ve apoptozisin uyarıldığı belirlendi (Şekil 4). Ayrıca Bax miktarının 6. saatte kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 9 kat arttığı bulundu ($p < 0,001$).

Spektroskopik Veriler

Geri yansıma spektrumları kontrol ve 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerde (0.5-6 saat) ile inkübe edilen hücrelerden oluşan deney gruplarından ölçüldü. Şekil 5'de ölçülen spektrumlar kontrol ve zamana bağlı olarak 100 nM Epo uygulamasının dalga boyuna karşılık ışık şiddetinde oluşturduğu etkiyi göstermektedir. Spektrumlar incelendiğinde; zaman ilerledikçe kontrole göre geri yansıma spektrumlarında fark

görülmektedir.

Kontrolün spektrumu 500-800 nm arasında düzgün monotonik bir azalış göstermektedir (Şekil 5). Apoptozisin zamana bağlı etkisi incelendiğinde, 0.5 ve bir saatte ölçülen spektrumların kontrole benzer olduğu görülmektedir. Ancak 2. saatten itibaren kontrole göre spektrumların eğiminin azaldığı ve grafiklerin giderek düzleştiği görülmektedir. Spektrumlarındaki değişimi nicel olarak göstermek için Şekil 5'deki spektrumlardan tüm gruplar için Spektroskopik Apoptozis İndeksi hesaplandı (Şekil 6). Tüm zaman noktalarında spektroskopik apoptozis indeksinin kontrole göre arttığı gözlemlendi. Bu artışın 0.5 ve bir saatlik inkübasyon sürelerinde anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 6). Ancak 2, 4 ve 6 saatlik inkübasyon sürelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p < 0,001$). Spektroskopik apoptozis indeksi 0.5 saatte kontrole göre 1.12 kat artarken, 6. saatte 3.69 kat arttığı bulundu.



Şekil 4. Kontrol ve 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerden (0.5-6 saat) oluşan gruplarının Bax protein seviyelerinin western blot görüntüsü ve dansitometrik analizi.

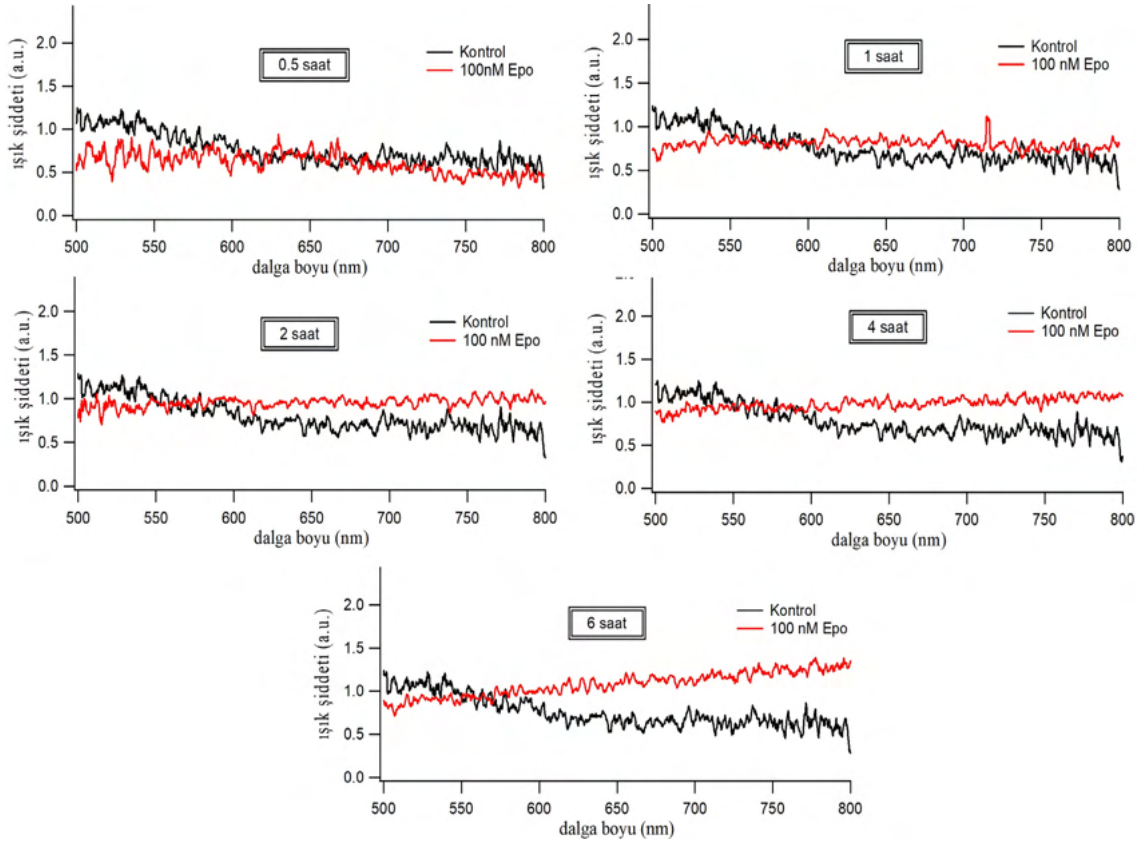
* Değerleri, kontrol gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$).

Değerleri, 2. ve 4. saat gruplardan önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$)

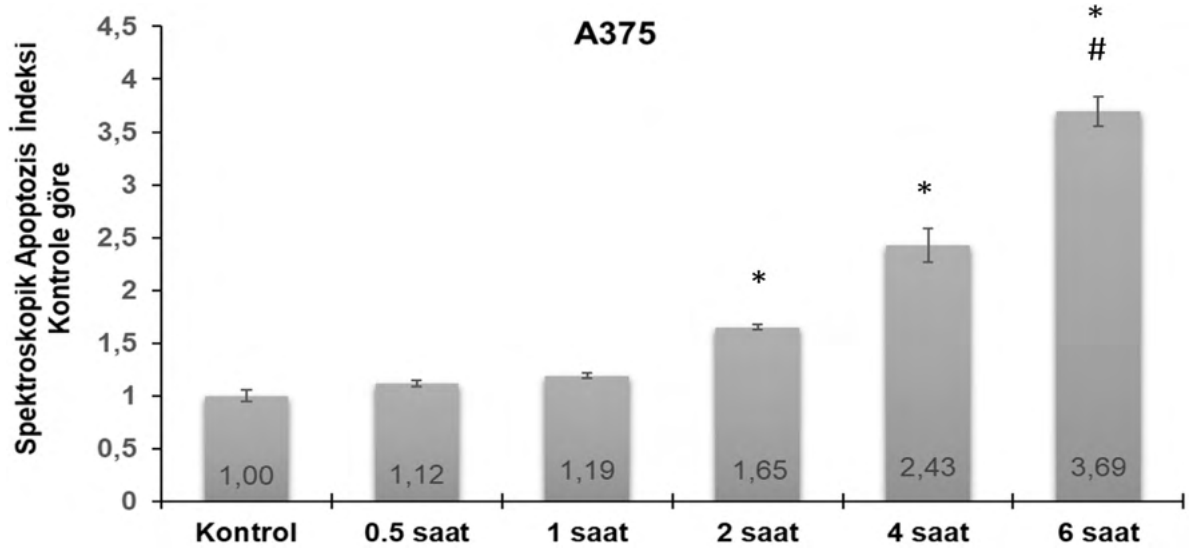
TARTIŞMA ve SONUÇ

Apoptozis, oldukça organize bir hücre ölümü sürecidir ve organizmanın daha büyük yararları için belirli hücreleri ortadan kaldırmaya yönelik rutin olarak gerçekleştirilen normal bir fizyolojik süreçtir. Apoptozisin hastalıklarda özellikle kanser tedavisindeki rolü, apoptozisi doğru, pratik, invazif olmayan bir şekilde saptamak ve izlemek için yeni

yöntemlerin geliştirilmesi için motivasyon sağlar. Apoptotik süreçte meydana gelen değişimlerin erken aşamada zamana bağlı olarak belirlenmesi hücre kültürü çalışmalarına yeni bir yön verecektir (27). Bu çalışmada apoptozis sürecinin erken aşamasında meydana gelen spektral değişikliklerin zamana bağlı olarak geri yansıma spektroskopisi ile belirlenebileceği yeni bir yöntem geliştirildi.



Şekil 5. Kontrol ve 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerde (0.5-6 saat) inkübasyon ile oluşan gruplardan yapılan ölçümlerin geri yansıma spektrumları



Şekil 6. Kontrol ve Epo gruplarının spektroskopik apoptozis indekslerinin karşılaştırılması.

* Değerleri, kontrol gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$).

Değerleri, 2. ve 4. saat gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$)

Hücre kültürü araştırmalarında bazı biyokimyasal ve morfolojik özellikleri kullanılarak, apoptozis ölçümlerinden yaygın olarak yararlanılmaktadır (28). Bu yöntemler arasında çeşitli optik mikroskopi türleri, jel elektroforezi, DNA nick-end etiketlemesi, mitokondriyal deneyler ve apoptotik proteinlerin saptanması bulunur (29, 30). Apoptozisi belirlemeye yönelik altın standart yöntemler multiple color floresan mikroskopu ve akış sitometrisidir (15). Floresans mikroskopu, konfokal lazer tarama mikroskopu (31), akış sitometrisi (32), ve mikroarray (33) gibi floresan tabanlı yöntemler de bulunmaktadır. Tüm mevcut yöntemler, bir eksojen boyanın veya etiketleme ajanının eklenmesini veya kültürün kendisinin fiziksel olarak bozulmasını gerektirir. Bu yöntemler apoptozisin doğru bir şekilde tespit edilmesini sağlasa da zaman alıcı, maliyetli ve belirli bir zaman noktasındaki değerlendirme ile sınırlıdır olmalarının yanı sıra uygulama ve sonuçların analizi için uzmanlık gerektirir (27).

Apoptotik hücreler hücre küçülmesi ve hücrenin parçalanmasına yol açan bir dizi hücre altı değişikliğe uğrar. Geri yansıma spektroskopisi bu hücre altı düzeydeki mikro değişimlere duyarlıdır. Bu çalışmada hücre hattı olarak melanoma A375 ve apoptozisi indükleyici ajan olarak anti-inflamatuvar etkinliği iyi bilinen hücre içine geçebilen selektif irreversible bir proteazom inhibitörü olan Epo seçilmiştir. Epo proteazom inhibisyonuyla hücrede katlanmamış miktarını artırarak ROS oluşumunu ve hücresel strese sebep olur (34). Bilindiği üzere ROS apoptozisin en önemli uyarandır (35). A375 hücrelerinde apoptozisi indükleyecek Epo dozunun tespit edilmesi için, 5-100 nM dozlardaki Epo ile 24 saat inkübasyon sonrası hücrelerin canlılığı MTT yöntemi ile belirlenmiştir. A375 hücrelerinde 75 ve 100 nM Epo uygulamasının kontrole göre canlılığı yaklaşık %65 azalttığı belirlenmiştir. MTT deneyinde canlılığın 24 saatte %35'e düşmesi spektroskopik veriler ile canlılık arasındaki sıkı ilişkiyi kanıtlamaktadır. Hücre içinde 6 saatte ROS miktarının artması ve ROS'un detoksifiye edilememesi nedeniyle hücre apoptozise gitme

kararı alır. Kontrol ve farklı sürelerde uygulanan 100 nM Epo uygulamalarının ROS fotoğrafları Şekil 2'de görülmektedir. Hücre içi ROS miktarının tüm sürelerde kontrole göre arttığı ancak bu artışın 0.5 ve 1 saat için anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3). Hücre içinde protein homeostazisi gereği bir süre denge korunduğu için erken aşamada ROS miktarında anlamlı bir artış bulunamadı. ROS miktarının 2, 4 ve 6. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p < 0,001$). Bu çalışmada hesapladığımız Spektroskopik Apoptozis İndeksi sonuçları ile ROS sonuçlarının korelasyon gösterdiği görülmektedir. Hücrelere 100 nM Epo dozu ile farklı yapılan inkübasyonlardan sonra Bax miktarı western blot ile belirlendi. Apoptozisin bir göstergesi olarak sabit tüm Epo gruplarında zamana bağlı olarak Bax miktarında kontrole göre artışlar gözlemlendi ve apoptozisin uyarıldığı belirlendi (Şekil 4). Ayrıca Bax miktarının 6. saatinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde bulundu ($p < 0,001$).

Spektroskopik veriler incelendiğinde Geri Yansıma Spektroskopisinin apoptotik prosese duyarlı olduğu görülmektedir. Kontrol ve Epo uygulanan hücrelerden ölçülen spektrumların farklı olduğu görülmektedir (Şekil 5). Bu çalışmada apoptozis sırasında erken aşamada meydana gelen erken spektral değişiklikler belirlendi. Spektrumlar incelendiğinde zamana bağlı olarak spektrumların eğiminin azaldığı görülmektedir. Ancak bu azalışın 2 saatten sonra belirgin hale geldiği Spektrumlarda apoptozise bağlı değişimi nicel olarak ifade etmek için Spektroskopik Apoptozis İndeksi hesaplandı. Ölçülen spektrumların analizinden spektrumlar arasındaki farkın en iyi belirlenebileceği dalga boylarının 550 ve 800 nm olduğu bulundu. Daha önce yaptığımız çalışmalarda spektrumlardaki 550 ve 800 nm deki ışık şiddeti oranı (I_{550}/I_{800}) "Spektroskopik Apoptozis İndeksi" diye adlandırılmıştı (26). Bu çalışmada ise Spektroskopik Apoptozis İndeksi 800 nm deki ışık şiddetinin 550 nm deki ışık şiddetine oranından hesaplanmıştır (I_{800}/I_{550}). Spektroskopik apoptotik indeks değerlerinin apoptozis sürecinde kontrole göre azalış yerine artış olarak ifade

edilmesinin daha uygun olduğu düşünülür. Ayrıca sonuçların kontrole oranının verilmesinin sonuçların sunumu açısından daha standardize ve pratik olduğu görüldü. Spektroskopik Apoptozis İndeksinin 2, 4 ve 6. saatte kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir ($p<0,001$). Spektroskopik sinyalde bu erken aşamada gözlenen değişimin nedeni apoptozise giden hücrede meydana gelen hacim azalması olabilir (36). Apoptotik hücrede su kaybıyla meydana gelen hacim azalması sitoplazmanın kırma indisinde artışa neden olur. Böylece organeller ve sitoplazma arasındaki kırılma indisi farkı azalır. Bu hücrede apoptozis oluştuğunda kontrole göre geri yansıma sinyalindeki farkın kaynağıdır (17, 37, 38). Geri Yansıma sinyalinde meydana gelen değişimin sebeplerini açıklayabilmek

için daha çok temel düzeyde moleküler çalışmaya ihtiyaç vardır. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, in vitro olarak apoptozisi izlemek için geri yansıma spektroskopisi ölçümlerini kullanan çok az sayıdaki çalışmalardan biridir. Yöntemi, akış sitometrisi gibi güvenilir bir nicel tekniğe dönüştürmek için daha ileri çalışmalar yapılacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışmada geri yansıma spektroskopisi ile hücre kültürü koşullarına minimum müdahale ederek ve eksojen bir ajan eklemeyen apoptozisi erken aşamada gösteren yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşımın apoptotik değişimleri diğer analiz yöntemlerinden daha erken, zamana bağlı olarak izleyebilen, invazif olmayan, tekrarlanabilir ve pratik bir yöntem olarak geliştirilme potansiyeli bulunmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (ALKÜ-BAP) Koordinatörlüğü tarafından 2019-04-01-MAP01 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. ALKÜ-BAP Koordinatörlüğünün vermiş olduğu destek için teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma Etik Kurul İzni gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ke B, Tian M, Li J, Liu B, He G. Targeting programmed cell death using small-molecule compounds to improve potential cancer therapy. *Med Res Rev.* 2016;36(6):983-1035
2. Pehlivanoğlu S, Aydın Acar Ç. PAK4 promotes invasive potential of MCF-7 cells in PKC-dependent manner through downregulation of E-Cadherin. *Turk Hij Den Biol Derg.* 2020;77(1):107-16
3. Akgun S, Kucuksayan H, Ozes ON, Can O, Alikanoglu AS, Yildiz M, et al. NF-kappaB-induced upregulation of miR-548as-3p increases invasion of NSCLC by targeting PTEN. *Anti-cancer Agents, Med Chem.* 2019;19(8):1058-68.
4. Kucuksayan H, Akca H. The crosstalk between p38 and Akt signaling pathways orchestrates EMT by regulating SATB2 expression in NSCLC cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2017;39(9):1010428317706212.
5. Kucuksayan H, Akgun S, Ozes ON, Alikanoglu AS, Yildiz M, Dal E, et al. TGF-beta-SMAD-miR-520e axis regulates NSCLC metastasis through a TGFB2-mediated negative-feedback loop. *Carcinogenesis.* 2019;40(5):695-705.
6. Hanikoglu A, Kucuksayan E, Hanikoglu F, Ozben T, Menounou G, Sansone A, et al. Effects of somatostatin and vitamin C on the fatty acid profile of breast cancer cell membranes. *Anti-cancer Agents, Med Chem.* 2019;19(15):1899-909.
7. Hanikoglu A, Kucuksayan E, Akduman RC, Ozben T. A review on melatonin's effects in cancer: Potential mechanisms. *Anti-cancer Agents, Med Chem.* 2018;18(7):985-92.
8. Kucuksayan E, Ozben T. Hybrid compounds as multitarget directed anticancer agents. *Curr Top Med Chem.* 2017;17(8):907-18.
9. Kucuksayan E, Cort A, Timur M, Ozdemir E, Yucel SG, Ozben T. N-acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors. *J Cell Biochem.* 2013;114(7):1685-94.
10. Cort A, Timur M, Ozdemir E, Kucuksayan E, Ozben T. Synergistic anticancer activity of curcumin and bleomycin: an in vitro study using human malignant testicular germ cells. *Mol Med Rep.* 2012;5(6):1481-6.
11. Yewdell JW. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* 2001;11(7):294-7.
12. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002;82(2):373-428.
13. Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X, Perez de Santos AM, Llobet D, Schoenenberger JA, et al. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Br J Dermatol.* 2008;158(3):496-504.
14. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol.* 2012;34(3):255-62.
15. Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.* 2011;103:55-98.
16. Chalut KJ, Ostrander JH, Giacomelli MG, Wax A. Light scattering measurements of subcellular structure provide noninvasive early detection of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2009;69(3):1199-204.
17. Mulvey CS, Sherwood CA, Bigio IJ. Wavelength-dependent backscattering measurements for quantitative real-time monitoring of apoptosis in living cells. *J Biomed Opt.* 2009;14(6).
18. Kucuksayan-Sircan A, Kucuksayan E. Geri Yansıma Spektroskopisi ile Hücre Kültürü Çalışmalarında Hücre Sayısının Belirlenmesi İçin Yeni Bir Metot. *Sdü Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2020;11(2).

19. Sircan-Kucuksayan A, Canpolat M. Estimating joint cartilage thickness on an animal model ex vivo using diffuse reflectance spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2019;86(4):623-8.
20. Sircan-Kucuksayan A, Yaprak N, Derin AT, Ozbudak IH, Turhan M, Canpolat M. Noninvasive assessment of oral lesions using elastic light single-scattering spectroscopy: a pilot study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(5):1467-72.
21. Mourant JR, Freyer JP, Hielscher AH, Eick AA, Shen D, Johnson TM. Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics. *Appl Optics*. 1998;37(16):3586-93.
22. Bohren CF, Huffman DR. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*: Wiley; 1998.
23. Sircan-Kucuksayan A, Canpolat M. Retrieval of chromophore concentration in a tissue phantom by diffuse reflectance spectroscopy. *Opt Spectroscopy*. 2014;117(4):663-9.
24. Turhan M, Yaprak N, Sircan-Kucuksayan A, Ozbudak I, Bostanci A, Derin A, et al. Intraoperative assessment of laryngeal malignancy using elastic light single-scattering spectroscopy: A pilot study. *Laryngoscope*. 2017;127(3):611-5.
25. Ozekinci M, Kucuksayan E, Erdogan G, Aslan M, Pestereli E, Canpolat M, et al. Histopathological and biochemical assessment of a novel diagnostic method for ovarian torsion. *Biotech Histochem*. 2020;95(3):203-9.
26. Kucuksayan E, Sircan-Kucuksayan A. Real-Time Detection of Doxorubicin-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells Using the Back Reflection Spectroscopy. *EJM*. 2021;26(1):128-34.
27. Monton H, Parolo C, Aranda-Ramos A, Merkoci A, Nogues C. Annexin-V/quantum dot probes for multimodal apoptosis monitoring in living cells: improving bioanalysis using electrochemistry. *Nanoscale*. 2015;7(9):4097-104.
28. Takemura G, Kanoh M, Minatoguchi S, Fujiwara H. Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart - A critical review from definition and classification of cell death. *Int J Cardiol*. 2013;167(6):2373-86.
29. Sgonc R, Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol*. 1998;33(6):525-33.
30. Kucuksayan E, Konuk EK, Demir N, Mutus B, Aslan M. Neutral sphingomyelinase inhibition decreases ER stress-mediated apoptosis and inducible nitric oxide synthase in retinal pigment epithelial cells. *Free radical biology & medicine*. 2014;72:113-23.
31. Dimitrijevic J, Krapf L, Wolter C, Schmidtke C, Merkl JP, Jochum T, et al. CdSe/CdS-quantum rods: fluorescent probes for in vivo two-photon laser scanning microscopy. *Nanoscale*. 2014;6(17):10413-22.
32. Chattopadhyay PK, Peretto SP, Yu J, Roederer M. The use of quantum dot nanocrystals in multicolor flow cytometry. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2(4):334-48.
33. Morales-Narvaez E, Monton H, Fomicheva A, Merkoci A. Signal enhancement in antibody microarrays using quantum dots nanocrystals: Application to potential Alzheimer's disease biomarker screening. *Anal Chem*. 2012;84(15):6821-7.
34. Fernandez-Estevéz MA, Casarejos MJ, Lopez Sendon J, Garcia Caldentey J, Ruiz C, Gomez A, et al. Trehalose reverses cell malfunction in fibroblasts from normal and Huntington's disease patients caused by proteasome inhibition. *PLoS One*. 2014;9(2):e90202.
35. Sidor-Kaczmarek J, Cichorek M, Spodnik JH, Wojcik S, Morys J. Proteasome inhibitors against amelanotic melanoma. *Cell Biol Toxicol*. 2017;33(6):557-73.
36. Porcelli AM, Ghelli A, Zanna C, Valente P, Ferroni S, Rugolo M. Apoptosis induced by staurosporine in ECV304 cells requires cell shrinkage and upregulation of Cl⁻ conductance. *Cell Death Differ*. 2004;11(6):655-62.

37. Mulvey CS, Zhang KX, Liu WHB, Waxman DJ, Bigio IJ. Wavelength-dependent backscattering measurements for quantitative monitoring of apoptosis, Part 1: early and late spectral changes are indicative of the presence of apoptosis in cell cultures. *J Biomed Opt.* 2011;16(11)

38. Mulvey CS, Zhang KX, Liu WHB, Waxman DJ, Bigio IJ. Wavelength-dependent backscattering measurements for quantitative monitoring of apoptosis, Part 2: early spectral changes during apoptosis are linked to apoptotic volume decrease. *J Biomed Opt.* 2011;16(11)

Transition from CLSI to EUCAST: How our antibiotic susceptibility tests will be affected

CLSI'den EUCAST'a geçiş: Antibiyotik duyarlılık testlerimiz nasıl etkilenecek

Gülşen HAZIROLAN¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Two standard guidelines are commonly used worldwide. In our country CLSI guidelines have been used up to recent years, but currently, a transition to EUCAST standards has begun in many centers. In this study the effect of transition from CLSI guideline to EUCAST guideline on antibiotic susceptibility test (AST) reports in a high prevalence region for antibiotic resistance was investigated.

Methods: Non-duplicated 5003 isolates (1902 Enterobacteriaceae, 1261 *Acinetobacter baumannii*, 697 *Pseudomonas aeruginosa*, 424 *Staphylococcus aureus*, 336 *Enterococcus faecalis*, 257 *Enterococcus faecium*, and 126 *Stenotrophomonas maltophilia*) isolated from the samples sent from intensive care units (ICUs) were included in the study. The identifications of the microorganisms were performed with Bruker Microflex MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) system, and their AST were evaluated with Phoenix automated system (BD, Sparks, MD, USA). The MIC values were interpreted according to the breakpoints indicated in CLSI and EUCAST guidelines.

Results: The highest resistance increase among Enterobacteriaceae was seen to beta lactam/ beta-lactamase inhibitor combinations, followed by

ÖZET

Amaç: Antibiyotik duyarlılık testlerinde iki standart kılavuz tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde son yıllara kadar CLSI kılavuzu kullanılmakta iken, günümüzde birçok merkezde EUCAST kılavuzuna geçildi. Bu çalışmada, antibiyotik direnci açısından yüksek prevalanslı bir merkezde CLSI kılavuzundan EUCAST kılavuzuna geçişin antibiyotik duyarlılık test (AST) raporlarına etkisi araştırıldı.

Yöntem: Yoğun bakım ünitesinden gönderilen örneklerden izole edilen tekrar içermeyen 5.003 izolat (1.902 Enterobacteriaceae, 1.261 *Acinetobacter baumannii*, 697 *Pseudomonas aeruginosa*, 424 *Staphylococcus aureus*, 336 *Enterococcus faecalis*, 257 *Enterococcus faecium* ve 126 *Stenotrophomonas maltophilia*) çalışmaya dahil edildi. Suşların tanımlanmasında Bruker Microflex MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) sistemi kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık sonuçları için Phoenix otomatize sistemi (BD, Sparks, MD, USA) ile elde edilen MİK değerleri, CLSI ve EUCAST kılavuzlarında belirtilen direnç sınır değerlerine göre yorumlandı.

Bulgular: Enterobacteriaceae'da en yüksek direnç artışının beta laktam / beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarında, ardından sefalosporinler,

¹Hacettepe University Medicine Faculty, Department of Medical Microbiology, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Gülşen HAZIROLAN

Hacettepe Univ. Medicine Faculty, Dep. of Medical Microbiology, Sıhhiye, Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 17.07.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 13.10.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.25428

Hazirolan G. Transition from CLSI to EUCAST: How our antibiotic susceptibility tests will be affected
Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 287 - 298

cephalosporins, quinolones and aminoglycosides. ESBL positive Enterobacteriaceae isolates were found more resistant to cephalosporins. The resistance rates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* seemed increased for quinolones, aminoglycosides and cephalosporins, however colistin resistance remained unchanged. All Gram-negative bacilli included in the study had decreased resistance rates for imipenem and meropenem. Similarly, *S. maltophilia* isolates had a decreased resistance rate for trimethoprim-sulfamethoxazole. While methicillin resistance rate did not change for *S. aureus*, minor changes were encountered for other antibiotic groups. There is no categorical changes observed at the susceptibility of enterococci to ampicillin, vancomycin, teicoplanin and linezolid.

Conclusion: Transition to EUCAST guideline in our hospital did not affect AST results of Gram- positive bacteria isolated from the patients in ICU. However, higher resistance rates were observed for all antibiotic groups except carbapenems in Gram- negative bacteria. As a result, following the current epidemiological data according to the standard used is of great importance in terms of determining the appropriate treatment.

Key Words: EUCAST, CLSI, antibiotic susceptibility tests

kinolonlar ve aminoglikozitlerde olduğu görüldü. ESBL pozitif Enterobacteriaceae izolatlarının sefalosporinlere karşı daha dirençli olduğu bulundu. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'nın direnç oranları kinolonlar, aminoglikozidler ve sefalosporinler için artmış görünse de kolistin için direnç değişmedi. Çalışmaya dahil edilen tüm gram-negatif basillerde, imipenem ve meropenem için direnç oranları azaldı. Benzer şekilde, *S. maltophilia* izolatları trimetoprim-sülfametoksazol için düşük direnç oranına sahipti. Metisilin direnç oranı *S. aureus* için değişmezken, diğer antibiyotik gruplarında minör değişikliklerle karşılaşıldı. Enterokokların ampisilin, vankomisin, teikoplanin ve linezolide duyarlılığında kategorik bir değişiklik gözlenmedi.

Sonuç: Hastanemizde YBÜ hastalarından izole edilen gram pozitif bakterilerin ADT sonuçlarını EUCAST kılavuzuna geçiş etkilemedi. Ancak, gram-negatif bakterilerdeki karbapenemler hariç tüm antibiyotik grupları için daha yüksek direnç oranları gözlemlendi. Sonuç olarak, kullanılan standarda göre güncel epidemiyolojik verilerin takip edilmesi, uygun tedavinin belirlenmesi açısından büyük önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: EUCAST, CLSI, antibiyotik duyarlılık testi

INTRODUCTION

There is no national standards for evaluation of antibiotic susceptibility tests (AST) in our country. Therefore, most of the Clinical Microbiology Laboratories report their AST results according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. Nowadays, more and more laboratories prefer the guideline that has been published by European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), due to free access on internet, translation of the documents into Turkish, and ease

of sending suitable data to studies performed by Turkey- Europe partnership.

Changes in AST reports will affect the policies on antibiotic prescription and use (1). When the breakpoints of EUCAST guideline are used, it was reported that mainly Gram-negative organisms were reported as more resistant to antimicrobials (2-6). The reasons for that are use of 1-3 dilutions lower clinical breakpoints for some antimicrobials in EUCAST, and omission or restriction of intermediate

category on the grounds that they are not supported by pharmacokinetic and pharmacodynamic values and clinical data.

High antimicrobial resistance rates have been reported in the microorganisms isolated from the patients hospitalized in the intensive care units (ICUs) in our country (7). Appreciating the changes that will appear in the reports after transition from CLSI guideline to EUCAST guideline in this group of patients may give us information on the effects of this change on antibiotic prescription policies, hospital costs, and resistance epidemiology.

In this study, minimal inhibition concentration (MIC) values of the most frequently isolated Gram-positive and Gram-negative microorganisms isolated from the patients hospitalized in ICU obtained by using Phoenix automated system (BD, Sparks, MD, USA) were evaluated according to CLSI and EUCAST guidelines (8, 9). This was to try to determine the changes that would appear in AST results.

MATERIAL and METHOD

Ankara Numune Training and Research Hospital, Turkey houses all clinics except Pediatrics and Pulmonology, it has 997 hospital beds, and 49,565 patients are hospitalized annually. There are 9 ICU with a total of 81 beds, including general ICU, Emergency Internal Medicine ICU, Emergency Surgery ICU, Surgery ICU, Anesthesia and Reanimation ICU, Neurology ICU, Neurosurgery ICU, Coronary ICU, and Cardiovascular Surgery ICU. A total of 6294 patients were hospitalized in ICUs in 2017. The identifications of the microorganisms were performed with Bruker Microflex MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) system, and their AST were evaluated with Phoenix automated system (BD, Sparks, MD, USA). Non-duplicated 5003 strains isolated from the samples sent from patients in ICU were included in the study. Isolated strains included 1261 *Acinetobacter baumannii*, 994 *Escherichia coli*, 697 *Pseudomonas aeruginosa*, 546 *Klebsiella pneumoniae*, 424

Staphylococcus aureus, 336 *Enterococcus faecalis*, 257 *Enterococcus faecium*, 126 *Stenotrophomonas maltophilia*, 103 *Proteus mirabilis*, 97 *Enterobacter cloacae*, 90 *Serratia marcescens*, 45 *Morganella morganii*, and 27 *Enterobacter aerogenes* isolates, in rank order.

BD Phoenix Gram-negative NMIC-99, Uriner Gram-negative UNMIC-200 and Gram-positive PMIC-79 panels were used for determination of AST results. MIC values were retrospectively analyzed using EpiCenter (BD Biosciences, Sparks, MD, USA), which is the information management system of Phoenix automated system. The susceptibility patterns of the microorganisms studied were determined according to both CLSI and EUCAST guidelines' clinical breakpoints, and compared (8, 9).

The susceptibilities for aztreonam, norfloxacin, netilmicin, as well as high-level aminoglycoside susceptibilities were left out of assessment since the antibiotic concentrations tested in Phoenix AST cards did not contain the breakpoints given in EUCAST guideline.

Escherichia coli ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 was used as quality control.

Statistical analysis of data was performed using SPSS 15.0 package program. The correlations of the categorical variables were analyzed with chi-square test. Statistical significance was set at $p=0.05$.

RESULTS

Comparison of CLSI and EUCAST guidelines for susceptibility categories according to their clinical breakpoints are presented in Table 1. EUCAST does not have an intermediate category to simplify the tables. In order to compare two guidelines easily, clinical breakpoints of EUCAST are presented in CLSI format in Table 1.

Table 1. Comparison of CLSI and EUCAST guidelines for susceptibility categories according to their clinical breakpoints for the most commonly isolated microorganisms from the patients in ICU

Species/drugs	CLSI			EUCAST			P-value
	S	I	R	S	I	R	
<i>Escherichia coli</i> (n=994)							
Ampicillin-sulbactam	39.6	18.0	42.4	39.6	-	60.6	<0.001
Amoxicillin-clavulanate	59.3	15.1	25.6	59.3	-	40.7	<0.001
Piperacillin-tazobactam	75.4	2.6	22.0	71.8	3.6	24.6	0.142
Ticarcillin- clavulanate	42.1	24.5	33.4	35.3	6.8	57.9	<0.001
Cefepime	56.3	8.1	35.6	53.3	-	40.1	<0.001
Ceftazidime	66.7	6.4	26.9	56.0	10.7	33.3	<0.001
Ceftriaxone	50.1	0.6	49.3	50.1	0.6	49.3	1.000
Cefuroxime	51.9	3.7	44.4	51.9	-	48.1	<0.001
Ertapenem	88.9	0.9	10.2	88.9	0.9	10.2	1.000
Imipenem	86.6	5.6	7.8	92.2	4.0	3.8	<0.001
Meropenem	91.2	1.5	7.3	92.7	3.7	3.6	<0.001
Ciprofloxacin	53.2	1.2	45.6	52.2	1.0	46.8	0.805
Levofloxacin	53.6	1.0	45.8	52.1	1.1	46.8	0.834
Amikacin	97.9	0.2	1.9	95.1	2.8	2.1	<0.001
Gentamicin	78.6	0.1	21.3	57.7	20.9	21.4	<0.001
Trimethoprim sulfamethoxazole	54.8	0	45.2	54.8	0.5	44.7	0.081
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=325)							
Ampicillin-sulbactam	31.7	4.4	63.9	31.7	-	68.3	<0.001
Amoxicillin-clavulanate	39.3	19.1	41.6	39.3	-	60.7	<0.001
Piperacillin-tazobactam	52.0	8.6	39.4	45.0	7.0	48	0.085
Ticarcillin- clavulanate	33.7	11.2	55.1	32.0	1.07	66.3	<0.001
Cefepime	49.7	4.9	45.4	48.5	3.2	48.3	0.428
Ceftazidime	48.4	6.2	45.4	44.8	3.6	51.6	0.160
Ceftriaxone	43.4	0.4	56.2	43.4	0.4	56.2	1.000
Cefuroxime	32.6	7.9	59.5	32.6	-	67.4	<0.001
Ertapenem	65.8	1.1	33.1	65.8	1.1	33.1	1.000
Imipenem	65.1	8.8	26.1	73.9	14.2	11.9	<0.001
Meropenem	72.8	7.8	19.4	80.6	6.7	12.7	0.047
Ciprofloxacin	53.4	5.9	40.4	51.6	1.8	46.6	0.016
Levofloxacin	60	2.7	37.3	59.0	1.0	40	0.188
Amikacin	93.8	0.6	5.6	90.6	3.2	6.2	0.060
Gentamicin	69	-	31.0	59.5	9.5	31.0	<0.001
Trimethoprim sulfamethoxazole	48.6	-	51.4	48.6	1.8	49.6	0.047

Table 1 (cont). Comparison of CLSI and EUCAST guidelines for susceptibility categories according to their clinical break-points for the most commonly isolated microorganisms from the patients in ICU

Species/drugs	CLSI			EUCAST			P-value
	S	I	R	S	I	R	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=1261)							
Imipenem	7.3	0.4	92.3	7.3	2.4	90.3	<0.001
Meropenem	6.8	0.2	93	6.8	2.3	90.9	<0.001
Ciprofloxacin	6.4	0.2	93.4	6.4	0.2	93.4	1.000
Levofloxacin	6	7.6	86.4	5.9	0.1	94	<0.001
Amikacin	12.7	3	84.3	11.5	1.2	87.3	0.003
Gentamicin	17.8	7.9	74.3	17.8	-	82.2	<0.001
Netilmicin	53.9	-	46.1	53.9	-	46.1	1.000
Colistin	98.9	-	1.1	98.9	-	1.1	1.000
Trimethoprim sulfamethoxazole	27.5	-	72.5	27.5	-	72.5	1.000
<i>Pseudomonas spp.</i> (n=697)							
Piperacillin-tazobactam	52.0	7.1	40.9	52.0	-	48.0	<0.001
Ticarcillin- clavulanate	25	17.7	57.3	25	-	75	<0.001
Cefepime	54.8	12.4	32.8	54.8	-	45.2	<0.001
Ceftazidime	54.8	4.6	40.6	54.8	-	45.2	<0.001
Imipenem	46.8	2.3	50.9	49.1	5.3	45.6	0.005
Meropenem	43.2	12.7	44.1	55.9	7.9	36.2	<0.001
Ciprofloxacin	52.1	7.8	40.1	46.2	5.9	47.9	0.010
Levofloxacin	47.5	10.1	42.4	40.1	7.4	52.5	0.001
Amikacin	73.6	10.1	16.3	68.8	4.8	26.4	<0.001
Gentamicin	59.5	3.2	37.3	59.5	-	40.5	<0.001
Netilmicin	91.7	8.3	-	58.3	-	41.7	<0.001
Colistin	98.3	1.1	0.6	99.4	-	0.6	0.018
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=424)							
Penicillin	10.5	-	89.5	10.5	-	89.5	1.000
Cefoxitin	73.9		26.1	73.9		26.1	1.000
Ciprofloxacin	77.2	0.3	25.5	77.2	-	22.8	0.404
Levofloxacin	98.9	1.1	-	98.9	1.1	-	1.000
Vancomycin	100	-	-	100	-	-	1.000
Teicoplanin	100	-	-	100	-	-	1.000
Erythromycin	75.8	1.1	23.1	75.1	0.7	24.2	0.727
Clindamycin	96.7	0.9	2.4	24.5	72.2	3.3	<0.001
Quinupristin-dalfopristin	100	-	-	100	-	-	1.000
Tetracycline	71.8	-	28.2	71	0.8	28.2	0.221
Linezolid	99.7	-	0.3	98.2	-	1.8	0.019
Trimethoprim sulfamethoxazole	100	-	-	100	-	-	1.000

Table 1 (cont). Comparison of CLSI and EUCAST guidelines for susceptibility categories according to their clinical breakpoints for the most commonly isolated microorganisms from the patients in ICU

Species/drugs	CLSI			EUCAST			P-value
	S	I	R	S	I	R	
<i>Enterococcus faecium</i> (n=336)							
Ampicillin	9.2	-	90.8	9.2	-	90.8	1.000
Teicoplanin	80.9	-	19.1	80.9	-	19.1	1.000
Vancomycin	79.9	-	20.1	79.9	-	20.1	1.000
Linezolid	100	-	-	100	-	-	1.000
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=257)							
Ampicillin	94.4	-	5.1	94.4	-	5.1	1.000
Teicoplanin	98.4	-	1.6	98.1	-	1.9	1.000
Vancomycin	98.4	-	1.6	98.1	-	1.9	1.000
Linezolid	100	-	-	100	-	-	1.000

***Enterobacteriaceae* species:** When the differences between CLSI and EUCAST were reviewed in general, all isolates reported as intermediate category according to CLSI were observed as resistant in EUCAST since there was no “intermediate category” option for ampicillin-sulbactam or amoxicillin-clavulanate in EUCAST. However, the rate of the susceptible isolates remained the same. All isolates that were reported as intermediate category for ampicillin-sulbactam or amoxicillin-clavulanate with CLSI were determined as resistant with EUCAST. Since the values observed for cephalosporins, quinolones and aminoglycosides by EUCAST were 1-3 dilutions lower compared to CLSI, resistance rates to those groups of antimicrobials were found higher with EUCAST. The only group with a decreased resistance rate for *Enterobacteriaceae* species was carbapenems (imipenem and meropenem). The susceptibility patterns for ceftriaxone and ertapenem remained the same since their clinical breakpoints were the same in two guidelines.

E. coli: When EUCAST guideline was compared with CLSI, the significant increase for resistance was seen in beta lactam-beta lactamase inhibitor

combinations ($p<0.05$). Cefepime, ceftazidime, and cefuroxime resistance increased from 35.6%, 26.9% and 44.4%, to 40.1%, 33.3% and 48.1%, respectively ($p<0.05$). No differences were seen in ceftriaxone, ertapenem and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance rates, however the resistance rates of the antimicrobials in quinolone and aminoglycoside groups increased by 0.1- 1.1% ($p<0.05$). The resistance for imipenem and meropenem decreased from 7.8% and 7.3%, to 3.8% and 3.6% respectively ($p<0.05$).

K. pneumoniae: Similar changes with *E. coli* isolates were seen in those isolates. The resistance isolates for imipenem and meropenem appeared decreased with use of EUCAST guideline when compared to CLSI, and the isolates reported as susceptible increased from 65.1% and 72.8%, to 73.9% and 80.6%, respectively ($p<0.05$).

P. mirabilis: The most important resistance change was seen for quinolones in this microorganism. The resistance for ciprofloxacin was 27.1% with CLSI while it was 56.5% with EUCAST ($p<0.05$). The susceptibility rate for levofloxacin decreased from 74.6% to 40% due to the isolates switched to intermediate category ($p<0.05$).

S. marcescens: The most appreciable changes for this microorganism were seen for meropenem and ciprofloxacin. The resistance decreased from 25.0% to 4.0% due to switch of *S. marcescens* isolates resistant to meropenem with CLSI to intermediate category with EUCAST guideline ($p<0.05$). The resistance rate increased mildly in ciprofloxacin, and sensitivity decreased from 90.9% to 64.9% since some sensitive isolates switched to moderately sensitive category with EUCAST ($p<0.05$).

M. morgani: The resistance increase from 19.0% to 69.0% due to switch of all isolates reported as intermediate category to ampicillin-sulbactam in CLSI to resistant category with EUCAST. The resistance rates for ciprofloxacin and levofloxacin increased from 7.1% and 0%, to 21.4% and 24.3%, respectively ($p<0.05$). The resistance rates did not increase for any of the other antimicrobials tested.

E. cloacae and E. aerogenes: Susceptibility patterns of these bacteria for ceftriaxone, ceftazidime and cefuroxime did not change. Resistance to cefepime increased from 13.3% and 8.3%, to 14.4% and 16.7% in *E. cloacae* and *E. aerogenes*, respectively ($p<0.05$). Imipenem resistance rates were found as 20.2% and 8.3%, respectively according to CLSI, and as 5.6% and 4.2%, respectively according to EUCAST ($p<0.05$).

A. baumannii: There were no differences between EUCAST and CLSI guidelines for ciprofloxacin, netilmicin, colistin and trimethoprim-sulfamethoxazole in *A. baumannii* isolates. The resistance rates for levofloxacin, amikacin and gentamicin increased from 86.4%, 84.3% and 74.3%, to 94.0%, 87.3% and 82.2%, respectively with EUCAST ($p<0.05$). Higher clinical breakpoints for imipenem and meropenem in EUCAST resulted in a decrease in imipenem and meropenem resistance rates, from 92.3% and 93%, to 90.3% and 90.9%, respectively ($p<0.05$).

P. aeruginosa: Susceptibility to colistin remained the same in *P. aeruginosa* isolates due to the same clinical breakpoints in two guidelines. However, higher

resistance rates were found for all antimicrobials except imipenem and meropenem with EUCAST ($p<0.05$). No resistance was determined for netilmicin in any of those isolates with CLSI, however resistance rate was observed as 41.7% with EUCAST ($p<0.05$).

S. maltophilia: EUCAST has observed a clinical breakpoint only for trimethoprim- sulfamethoxazol for *S. maltophilia*, and this value is higher than CLSI. Therefore, 91.9% of the isolates were found as susceptible and 8.1% of them were found resistant with CLSI while 96.4% of the isolates were observed as susceptible and 3.6% of them were found resistant with EUCAST ($p<0.05$).

S. aureus: All *S. aureus* isolates were found susceptible to teicoplanin, vancomycin, quinupristin-dalfopristin and trimethoprim- sulfamethoxazole both with CLSI and EUCAST guidelines. No differences were observed in the resistance rates to penicillin, levofloxacin, tetracycline or ceftazidime. A minor increase was seen in the resistance rates to erythromycin and clindamycin. The most important change was seen in the susceptibility rate to clindamycin. The susceptibility rate of clindamycin decreased from 96.7% with CLSI to 24.5% with EUCAST ($p<0.05$).

E. faecium and E. faecalis: There is no categorical changes observed at the susceptibility of enterococci to ampicillin, vancomycin, teicoplanin and linezolid.

ESBL positive Enterobacteriaceae isolates: CLSI and EUCAST revoked the decision that “all isolates found ESBL positive according to combined synergy test results should be reported resistant to all cephalosporins and monobactams”, lowered the clinical breakpoints, and requested that the reports to be written in line with those breakpoints. The differences between CLSI and EUCAST guidelines for reporting ESBL positive isolates as found by Phoenix system are presented in Table 2. ESBL rates were 57.2% (n=569) in *E. coli* isolates and 59.5% (n=325) in *K. pneumonia* isolates. There were no differences

for ceftriaxone since the clinical breakpoints were the same in two guidelines, however significantly more isolates were reported resistant to cefepime, ceftazidime, and cefuroxime with EUCAST ($p<0.05$).

Potential carbapenemase producer *Enterobacteriaceae* isolates: A total of 164 *K. pneumoniae* isolates (30%) and 158 *E. coli* isolates (15.9%) were found as potential carbapenemase

producer by Phoenix system. The susceptibility results differences between CLSI and EUCAST guidelines for ertapenem, imipenem and meropenem are presented in Table 3. Higher clinical breakpoints for carbapenems in EUCAST guideline resulted with a decrease in imipenem and meropenem resistance rates for potential carbapenemase producer ($p<0.05$).

Table 2. Comparison of CLSI and EUCAST guidelines for susceptibility categories according to their clinical breakpoints for cephalosporins in *Enterobacteriaceae* isolates producing extended- spectrum beta-lactamase (ESBL)

Species/drugs	CLSI			EUCAST			P-value
	S	I	R	S	I	R	
<i>Escherichia coli</i> (n=569)							
Cefepime	13.2	15.9	70.9	7.6	13.2	79.1	0.002
Ceftazidime	38.5	14.6	46.9	13.4	25.1	61.5	<0.001
Cefuroxime	0	4.8	95.2	0	-	100	<0.001
Ceftriaxone	4.2	0	95.8	4.2	0	95.8	1.000
<i>K. pneumoniae</i> (n=325)							
Cefepime	9.8	8.9	81.3	5.7	7.3	87.0	0.108
Ceftazidime	7.1	20.6	72.2	0	7.1	92.9	<0.001
Cefuroxime	0	0	100	0	0	100	1.000
Ceftriaxone	2.4	0	97.6	2.4	0	97.6	1.000

Table 3. Comparison of CLSI and EUCAST guidelines for susceptibility categories according to their clinical breakpoints for carbapenems in potential carbapenemase producer *Enterobacteriaceae* isolates

Species/drugs	CLSI			EUCAST			P-value
	S	I	R	S	I	R	
<i>Escherichia coli</i> (n=158)							
Ertapenem	38.6	1.9	59.5	38.6	1.9	59.5	1.000
Imipenem	24.1	30.4	45.5	54.4	22.2	23.4	<0.001
Meropenem	47.5	8.2	44.3	55.1	2.,5	23.4	<0.001
<i>K. pneumoniae</i> (n=164)							
Ertapenem	15.3	1.2	83.5	15.3	1.2	83.5	1.000
Imipenem	14.6	24.4	61.0	40.3	39.6	20.1	<0.001
Meropenem	36.6	21.3	4.1	57.9	18.3	23.8	<0.001

DISCUSSION and CONCLUSION

A number of laboratories in Turkey were transitioned from CLSI guideline to EUCAST guideline for interpretation of AST. This transition will affect AST results. Change in AST results may affect choice of empirical antibiotics, hospitals' isolation policies, and health costs may increase accordingly. Therefore, the changes that may occur must be known.

In our hospital, the AST results of the microorganisms isolated from the patients who admit to outpatient clinics are reported according to disk diffusion method. However, the results of the patients in ICU where more resistant isolates are seen are reported as MIC values, as determined by Phoenix automated system. Determination of MIC with manual microdilution method is hard in laboratories where many bacteria and antimicrobials are studied. Therefore, laboratories prefer automated antibiotic susceptibility test devices. Giani et al. analyzed the performance of Phoenix system, and reported that experimental agreement (concordance of MIC value) and categorical agreement (susceptible, intermediate category, resistant) were 97.3% and 95.2%, respectively, and the results fitted ISO 20776:2007 criteria (10). In this study, the MIC values determined by Phoenix system were interpreted according to EUCAST, and the changes in susceptibility categories were evaluated.

Resistance rates did not change for ceftriaxone and ertapenem in *Enterobacteriaceae* since the clinical breakpoints were the same in two guidelines. Previous studies reported that resistance rates of Gram- positive bacteria did not significantly change after transition from CLSI to EUCAST, however increased resistance was seen in Gram-negative bacteria particularly in cephalosporin, carbapenem and quinolone groups (2-4,11).

The reason for the highest resistance increase in beta- lactam/ beta- lactamase combinations is omission of the intermediate category in EUCAST for

those antibiotics. Although the rate of susceptible isolates remained the same, the number of resistant isolates increased for this group of antibiotics. Since EUCAST guideline reported the breakpoints of cephalosporins, quinolones, and aminoglycosides 1-3 dilutions lower for Enterobacteriaceae isolates, different rates of resistance increase were observed in those isolates. Previous studies reported a significant decrease in quinolone susceptibility after transition to EUCAST guideline particularly in *P.mirabilis* and *M. morgani*, and stated that those antibiotics would be preferred less for treatment. Rodriguez-Martinez et al. established that *E. coli* isolates that carry quinolone resistance genes were reported as resistant with EUCAST guideline while they were reported as susceptible or intermediate category with CLSI guideline (12). Previous CLSI- EUCAST comparison studies done with disk diffusion method reported a higher resistance rate for carbapenems with EUCAST guideline, however the only antibiotic group that showed a decrease in resistance was carbapenems with EUCAST in our study (2,3). We suppose that carbapenem susceptibility will be established more for *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* with EUCAST, and carbapenems will be increasingly preferred particularly for treatment of the infections caused with multi- drug resistant isolates.

CLSI and EUCAST omitted the rule of reporting resistant after ESBL phenotypic verification tests, changed zone diameter and MIC values, and suggested that the results should be given according to those without taking the verification tests into account. The reason for this is to prevent increased preference of carbapenems when cephalosporins cannot be used, and attempting to prevent selection of carbapenem-resistant isolates (13). This change increased the number of the strains reported as susceptible despite ESBL positivity (14-16, 17). It was seen that the isolates determined as ESBL- positive with Phoenix were reported to be more resistant to cephalosporins with EUCAST. This will cause less preference of cephalosporins in treatment after transition to

EUCAST guideline, and carbapenems may be used more frequently since increased susceptibility is reported for carbapenems in this guideline. On the other hand, it was reported that the reports prepared according to EUCAST guideline had a better correlation with clinic (9, 14, 15, 18).

A. *baumanii* isolates isolated frequently in ICU patients in our hospital are one of the most important problems due to multi- drug resistance. Usually, colistin is the only treatment option in those isolates. We did not determine a change in colistin resistance in A. *baumanii* isolates since breakpoints for colistin are the same in CLSI and EUCAST guidelines. Already-high resistance rates for other antibiotics increased some more. Although a small decrease was observed in imipenem and meropenem resistance, those isolates moved into intermediate category, and no change was observed in susceptibility rates. It was considered that colistin would remain to be the only option for treatment in those isolates after transition to EUCAST guideline.

P. aeruginosa isolates showed increased resistance to a number of antibiotics with EUCAST guideline, and it was supposed that the rate of multi- drug resistant isolates would further increase. *E. colistin* resistance remained the same, however a significant increase was seen in carbapenem susceptibility.

There was no change in MRSA rate since clinical breakpoints were the same in two guidelines for cefoxitin in *S. aureus* isolates. Although clinical resistance breakpoints are 2-3 dilutions lower for vancomycin and teicoplanin in EUCAST guideline, no glycopeptide- resistant *S. aureus* isolates were observed. The susceptibility patterns of other studied antibiotics did not show any differences. It was supposed that no change would be observed in

treatment options for Gram- positive bacteria with use of EUCAST guideline.

Studies that compared the guidelines according to the results of disk diffusion results could not report the results for piperacillin-tazobactam and ceftazidim since the disk contents were different in two guidelines (2, 4). We could not determine the change for those antibiotics since we used MIC results in this study. Another difference of our study is its performance in a region where high resistance rates are seen.

This study has a limitation. There is no molecular detection could be performed for carbapenem and quinolone resistance gene. This information may be important to microbiologists make a decision for antimicrobial therapy.

In conclusion, use of EUCAST guideline will result in an increase in the number of multi- drug resistant microorganisms except carbapenems due to increased resistance in all antimicrobial groups in Gram-negative bacteria. This may cause performing more verification tests in laboratories, change of antibiotic preferences, an increase in the number of isolated patients, and as a result, increased health costs. However, EUCAST standards are well-supported by pharmacodynamic- pharmacokinetic studies. Free access on internet, translation of the documents into Turkish, and ease of comparison of data in studies performed by Turkey- Europe partnership are other advantages of this guideline. The differences between two guidelines remain to be compared with evidence- based clinical studies. Determination of resistance changes after transition to EUCAST guideline will result in reviewing antibiotic notification and preference policies, and help to control development of resistance.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. MacKenzie FM, Gould IM, Bruce J, Mollison J, Monnet DL, Krcmery V. et al. The role of microbiology and pharmacy departments in the stewardship of antibiotic prescribing in European hospitals. *J Hosp Infect*, 2007; 65 (2): 73-81.
2. Hombach M, Bloemberg GV, Böttger ECJ. Effects of clinical breakpoint changes in CLSI guidelines 2010/2011 and EUCAST guidelines 2011 on antibiotic susceptibility test reporting of Gram-negative bacilli. *Antimicrob Chemother*. 2012; 67 (3): 622-32.
3. Hombach M, Wolfensberger A, Kuster SP, Böttger EC. Influence of clinical breakpoint changes from CLSI 2009 to EUCAST 2011 antimicrobial susceptibility testing guidelines on multidrug resistance rates of Gram-negative rods. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (7): 2385-87.
4. Wolfensberger A, Sax H, Weber R, Zbinden R, Kuster SP, Hombach M. Change of antibiotic susceptibility testing guidelines from CLSI to EUCAST: influence on cumulative hospital antibiograms. *PLoS One*. 2013; 8 (11) :e79130.
5. Van der Bij AK, Van Dijk K, Mulwijk J, Thijsen SF, Notermans DW, de Greeff S, et al. Clinical breakpoint changes and their impact on surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* causing bacteraemia. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18 (11): 466-72.
6. Hawser SP, Badal RE, Bouchillon SK, Hoban DJ, Hsueh PR. Comparison of CLSI 2009, CLSI 2010 and EUCAST cephalosporin clinical breakpoints in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from the SMART Global Surveillance Study. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36 (3): 293-94.
7. Gür D, Gülay Z, Akan OA, Aktaş Z, Kayacan CB, Cakici O, et al. Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42 (4): 537-44.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27rd informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>.
10. Giani T, Morosini MI, D'Andrea MM, García-Castillo M, Rossolini GM, Cantón R. Assessment of the Phoenix™ automated system and EUCAST breakpoints for antimicrobial susceptibility testing against isolates expressing clinically relevant resistance mechanisms. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18: (11): 452-58.

11. Marchese A, Esposito S, Barbieri R, Bassetti M, Debbia E. Does the adoption of EUCAST susceptibility breakpoints affect the selection of antimicrobials to treat acute community-acquired respiratory tract infections? *BMC Infect Dis.* 2012; 12 (16): 181.
12. Rodríguez-Martínez JM, Briales A, Velasco C, Díaz de Alba P, Martínez-Martínez L, Pascual A. Discrepancies in fluoroquinolone clinical categories between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI for *Escherichia coli* harbouring qnr genes and mutations in gyrA and parC. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66 (6): 1405-07.
13. Masterton RG. The new treatment paradigm and the role of carbapenems. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33 (2): 105-10.
14. Rodríguez-Baño J, Picón E, Navarro MD, López-Cerero L, Pascual A, ESBL-REIPI Group. Impact of changes in CLSI and EUCAST breakpoints for susceptibility in bloodstream infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18 (9): 894-900.
15. Wang P, Hu F, Xiong Z, Ye X, Zhu D, Wang YF et al. Susceptibility of extended- spectrum- beta-lactamase- producing Enterobacteriaceae according to the new CLSI breakpoints. *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (9): 3127-131.
16. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Hombach M. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI screening parameters for the detection of extended-spectrum β -lactamase production in clinical Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67 (1): 159-66.
17. Kaki R, Elligsen M, Walker S, Simor A, Palmay L, Daneman N. Impact of antimicrobial stewardship in critical care: a systematic review. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66 (6): 1223-230.
18. Kassim A, Omuse G, Premji Z, Revathi G. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016; (11): 15-21.

Association between T3, T4, and TSH hormones proportion and *Toxoplasma gondii* anti-IgG seroprevalence in patients suffering from clinical and drug-controlled thyroid dysfunctions in southeastern Iran

Güneydoğu İran'da klinik ve ilaç kontrollü tiroid fonksiyon bozukluğu olan hastalarda T3, T4 ve TSH hormonları oranı ile *Toxoplasma gondii* anti-IgG seroprevalansı arasındaki ilişki

Vahid RAİSSİ¹ (ID), Gita ALİZADEH¹ (ID), Fatemeh BAYAT¹ (ID), Elham AKHLAGHİ² (ID), Muhammad GETSO³ (ID), Omid RAİESİ⁴ (ID), Ali ABDOLLAHİ⁵ (ID), Asma İBRAHİM⁶ (ID), Sakineh AKBARİ⁷ (ID), Zahra NAVİ¹ (ID), Soudabeh ETEMADİ⁸ (ID)

ABSTRACT

Objective: *Toxoplasma gondii* is an important agent responsible for many hormonal and behavioral disorders in humans. The main objective of this study was to evaluate the hypothesis that '*T. gondii* infection interferes with thyroid hormones secretion or thyroid drug treatment'.

Methods: This is a cross-sectional study that involved 249 patients suffering from thyroid dysfunctions, divided into 3 groups: hypothyroidism (n=107), hyperthyroidism (n=96), and drug-controlled thyroid disorders (n=91), referred to Seyedoshohada Kerman private clinic. Serum samples were tested for thyroid-stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T3), and thyroxine (T4) along with *Toxoplasma* anti-IgG using ELISA technique. Demographic information was collected using a demographic sheet.

ÖZET

Amaç: *Toxoplasma gondii*, insanlarda birçok hormonal ve davranışsal bozukluktan sorumlu olan önemli bir ajandır. Bu çalışmanın temel amacı, '*T. gondii* enfeksiyonunun tiroid hormonlarının salgılanmasına veya tiroid ilaç tedavisine müdahale ettiği hipotezini değerlendirmektir.

Yöntem: Bu, Seyedoshohada'daki Kerman özel kliniği'ne yönlendirilen, tiroid disfonksiyonlarından muzdarip 249 hastayı 3 gruba ayıran kesitsel bir çalışmadır: hipotiroidizm (n=107), hipertiroidizm (n=96) ve ilaç kontrollü tiroid bozuklukları (n=91). Serum örnekleri tiroid stimulan hormon (TSH), triiyodotironin (T3) ve tiroksin (T4) ile *Toksoplazma* anti-IgG için ELISA tekniği kullanılarak test edildi. Demografik bilgiler bir demografik anket kullanılarak toplandı.

¹Tehran University of Medical Sciences, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Iran

²Kerman University of Medical Sciences, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran

³Bayero University, Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Health Sciences, Nigeria

⁴Ilam University of Medical Sciences, Department of Parasitology, School of Allied Medical Sciences, Iran

⁵Islamic Azad University, Department of Surgery, Science and Research Branch, Iran

⁶University of Sadat City (GEBRI, USC), Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute, Egypt

⁷Isfahan University of Medical Sciences, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran

⁸Zahedan University of Medical Sciences, Resistant Tuberculosis Institute, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Iran



İletişim / Corresponding Author : Soudabeh ETEMADİ

Zahedan University of Medical Sciences, Resistant Tuberculosis Institute, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Iran E-posta / E-mail : ssetemadi@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 17.05.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 20.10.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.95825

Raissi V, Ibrahim A, Bayat F, Akhlaghi E, Getso M, Ratesi O, Abdollahi A, Alizadeh G, Akbari S, Navi Z, Etemadi S. Association between T3, T4, and TSH hormones proportion and *Toxoplasma gondii* anti-IgG seroprevalence in patients suffering from clinical and drug-controlled thyroid dysfunctions in southeastern Iran Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 299 - 306

Results: The seroprevalence of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies among patients with hypothyroidism, hyperthyroidism, and drug-controlled thyroid disorders was 22.4%, 19.8%, and 22% respectively. The mean value of thyroid hormones of positive *T. gondii* samples in hypothyroidism, hyperthyroidism, and drug-controlled thyroid disorders was TSH=7.95, T3=1.12, T4=2.36; TSH=0.14, T3=1.42, T4=7.85; and TSH=2.75, T3=1.12, T4=1.45 respectively. The seropositivity of *Toxoplasma gondii* infection was 40.4% among individuals with a history of contact with pets and 26.3% among the rural dwellers.

Conclusion: There was no significant difference between *T. gondii* infection among the three study groups. A comparison of serum levels of thyroid hormones between infected and non-infected individuals in the above-mentioned groups illustrated that latent toxoplasmosis wasn't significantly associated with thyroid hormones secretion. Also, contact with pets and the rural lifestyle has a positive association with *T. gondii* seroprevalence.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, hypothyroidism, hyperthyroidism, cross-sectional study, TSH, T3, T4

Bulgular: Hipotiroidizm, hipertiroidizm ve ilaç kontrollü tiroid bozukluğu olan hastalarda *Toxoplasma gondii* IgG antikörlerinin seroprevalansı sırasıyla %22.4, %19.8 ve %22 idi. Hipotiroidizm, hipertiroidizm ve ilaç kontrollü tiroid bozukluklarında pozitif *T. gondii* örneklerinin tiroid hormonlarının ortalama değeri TSH ;7.95, T3;1.12, T4;2.36; TSH;0.14, T3;1.42, T4;7.85; ve sırasıyla TSH;2.75, T3;1.12, T4;1.45 idi. *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun seropozitifliği, evcil hayvanlarla temas öyküsü olan bireylerde %40.4 ve kırsalda yaşayanlarda %26.3 idi.

Sonuç: Üç çalışma grubu arasında *T. gondii* enfeksiyonu arasında anlamlı bir fark yoktu. Yukarıda belirtilen gruplarda enfekte olan ve olmayan bireyler arasında serum tiroid hormon seviyelerinin karşılaştırılması, latent toksoplazmozun tiroid hormonlarının salgılanmasıyla önemli ölçüde ilişkili olmadığını gösterdi. Ayrıca, evcil hayvanlarla temas ve kırsal yaşam tarzı, *T. gondii* seroprevalansı ile pozitif bir ilişkiye sahipti.

Anahtar Kelimeler: *Toxoplasma gondii*, hipotiroidizm, hipertiroidizm, kesitsel çalışma, TSH, T3, T4

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasite of worldwide distribution (1). It is an Apicomplexan protozoan that causes toxoplasmosis - an important zoonotic disease associated with high morbidity and mortality (2, 3). The disease is contracted essentially via the ingestion of tissue cysts in meat products or the intake of sporulated oocytes shed by cats into the environment (4). Clinical diagnosis of toxoplasmosis can be difficult since its clinical features are very similar to that of various illnesses (5). Latent toxoplasmosis is caused by the presence of tissue cysts in eyes leading to retina scars and eventual blindness (6) Infection with *T. gondii* affects about one-third of the world

population. Hence its prevention, diagnosis, and management should be an essential health priority (7). In addition, complications caused by *T. gondii* have an impact on maternal abortion (8). *Toxoplasma gondii* is practically accepted to cause miscarriages, intrauterine deaths or congenital abnormalities only as a result of the primary acute infection of the mother. Recurrent conditions such as infection with a different genotype or the tissue cyst in the uterine wall are all rare and accepted as negligible. As a result, *T. gondii* is not considered as a cause of recurrent abortion. Generally, all organ systems could be involved with disseminated toxoplasmosis with or without specific symptoms (9-19). Recently,

T. gondii is recognized as a target research in autoimmune thyroid diseases (20) and as a pathogen that accounts for other autoimmune diseases (8, 21, 22). Some studies illustrated that *T. gondii* is responsible for thyroid hormones alterations, consequent to changes in thyroid morphology and function; initial infection with *T. gondii* dramatically increases thyroid peroxidase (23, 24). Another study advocates that chronic toxoplasmosis can alter the stimulation of the hypothalamus, thus, alters T3, T4 secretion and results in TSH disturbance (13, 23). Based on the previous literature we hypothesized that chronic *T. gondii* infection can upset the serum level of thyroid hormones. Hence, the present study aimed to evaluate the serum thyroid hormones levels among members of the three study groups with thyroid dysfunctions and then compared data to that of the control (non-infected cases) in each group. Besides, the study evaluated the role of *T. gondii* in treatment of thyroid dysfunction disturbance. To our knowledge, this is the first time that the effects of *T. gondii* infection on drug treatment has been investigated among patients suffering from thyroid disorders.

MATERIAL and METHOD

This study was approved by the Zahedan University of Medical Sciences Ethics Committee (Date: 24.01.2020 and Number: IR.ZAUMS.REC.1399.486).

Study Design

This is a cross-sectional study involving 249 patients suffering from thyroid disorders - hypothyroidism (n=107), hyperthyroidism (n=96) and drug-controlled thyroid disorders (n=91) - referred to Seyedo Alshohada private clinic in Kerman city, southeastern IRAN. The study was performed between February 2018 and July 2019. All the participants gave their consent before the commencement of the study. We recorded the patients' demographic information, history about their locations, contact with pets,

meat product consumption, and pica behavior by demographic sheet. We collected 5 mL of blood from each patient, centrifuged the blood at 3000 rpm for 10 minutes, and then stored in 4 separate Eppendorf tubes at -20°C, till the next test.

Serological and Hormones Evaluations

Anti-IgG for *T. gondii* was measured using the *Toxoplasma* IgG ELISA kit (PISHTAZ TEB, Iran). We compared the OD of each sample with the cut-off value and recorded. We analyzed the hormones by TSH ELISA Kit (AUTOBIO- Zhengzhou, China), T3 ELISA kit (IDEAL-Tehran, Iran), and T4 ELISA Kit (AUTOBIO- Zhengzhou, China) according to the manufacturer's guidelines. Normal ranges of hormones kits were: TSH normal range: 0.3 - 5.5 µl U/ml, T4 normal range: 4.5 - 13 µg/dl, and T3 normal range: 0.55 - 1.9 ng/ml.

Statistics analysis

In this study, we used SPSS software version 20 for statistical analyses of our data. We compared the thyroid hormones and seroprevalence of *Toxoplasma* anti-IgG in the three groups (hypothyroidism, hyperthyroidism, and drug-controlled thyroid disorders) using independent sample T-test. Evaluation of independent variable efficacy (positive *T. gondii* anti IgG) over the dependent variables (thyroid hormones) along with the effect of demographic factors on IgG seroprevalence were assessed by multiple invariant analysis of variance (ANOVA) and Chi-Square test respectively. P-value ≤ 0.05 was considered significant in all the tests.

RESULTS

A total of 294 patients - referred to Seyedo Alshohada private clinic in Kerman, southeastern Iran - were recruited in this study and were divided among three groups: hypothyroidism (n=107), hyperthyroidism (n=96) and drug-controlled thyroid disorders (n=91). The study population consists of 135(54%) men and 114(46%) women. Their mean

age was 49.4, 56.7, 41.3 years for hypothyroidism, hyperthyroidism, and drug-controlled thyroid disorders groups, respectively. Our study findings showed that *T. gondii* infection doesn't have a

significant correlation with thyroids dysfunction. The seroprevalence of toxoplasmosis among patients with thyroid disorders was summarized in Table 1.

Table 1. Percentage distribution of Thyroid disorders patients infected with *Toxoplasma* by ELISA

	ELISA test						P-value
	Positive IgG		Negative IgG		Total		
Group	N	%	N	%	N	%	P>0.05
Hypothyroidism	24	(22.4 %)	83	(77.6%)	107	(36.4%)	
Hyperthyroidism	19	(19.8%)	77	(80.2%)	96	(32.6%)	
Drug-controlled thyroid disorder	20	(22,0%)	71	(78,0%)	91	(31,0%)	
Total	63	(21.4%)	231	(78.6%)	294	(100,0%)	

We compared the level of TSH, T3, T4 hormones among patients with hypothyroidism, hyperthyroidism and drug-treated thyroid dysfunction and found that there aren't significant statistical differences in hormones concentration between infected and non-

infected individuals. The mean concentration of the thyroid hormones (TSH, T4, and T3) in sera of thyroid disorders patients with toxoplasmosis (IgG-positive), by age groups and gender, are shown in Table 2 and 3.

Table 2. Association between the mean concentration of hormones (TSH, T4, and T3) in sera thyroid disorders patients with toxoplasmosis (IgG-positive) by age group, Iran

	Mean concentration of Thyroid hormones in Thyroid disorders									P-value
	Hypothyroidism mean ± SD			Hyperthyroidism mean ± SD			Drug-controlled thyroid disorder mean ± SD			
Age group	TSH	T4	T3	TSH	T4	T3	TSH	T4	T3	P>0.05
20-40	7.00 ±0.5	1.50±0.5	1.00±0.5	0.08±0.02	7.80±2.1	1.40±0.51	4.25±0.35	7.00±1.41	1.25±0.35	
41-60	8.03±1.64	2.53±0.71	1.03±0.3	0.10±0.04	9.18±1.9	1.15±0.46	1.59±0.7	7.54±2.16	1.29±1.23	
61≤	8.64±1.37	2.35±1.21	1.14±0.47	0.14±0.06	7.33±0.68	1.04±0.29	1.85±1.13	6.35±1.93	0.96±0.3	

Table 3. Association between the mean concentration of hormones (TSH, T4, and T3) in sera thyroid disorders patients with toxoplasmosis (IgG-positive) by gender, Iran

	Mean concentration of Thyroid hormones in Thyroid disorders									P-value
	Hypothyroidism mean ± SD			Hyperthyroidism mean ± SD			Drug-controlled thyroid disorder mean ± SD			
Gender	TSH	T4	T3	TSH	T4	T3	TSH	T4	T3	P>0.05
male	7.73±1.26	2.26±0.79	1.19±0.34	0.11±0.05	8.18±2.21	1.06±0.39	1.80±1.32	7.88±2.23	0.86±0.22	
female	8.66±1.78	2.50±1.08	1.19±0.39	0.10±0.05	8.27±1.55	1.27±0.45	2.06±1.02	6.40±1.62	1.43±1.20	

We evaluated the demographic and behavioral factors of each participant. We found, among the *Toxoplasma* seropositive, that 7 (20.6%) had a positive history of pica, 46 (40.4%) had direct contact with cats, 5 (35.7%) had a history of frequent raw meat consumption, and 41 (26.3%) lived in the rural areas. However, neither history of pica nor raw meat

consumption had a statistically significant association with seropositivity to *T. gondii*, while direct contact with cats and living in rural areas had a statistically significant association with seropositivity to *T. gondii* (P -value ≤ 0.05). The distribution and association between these factors and toxoplasma seropositivity among the study population are shown in Table 4.

Table 4. Investigation of Factors Affecting *Toxoplasma* seropositivity among the study populations, Iran

Variables	Samples		Positivity		P-value
	N	(%)	N	(%)	
Pica					
Yes	34	(11.6%)	7	(20.6%)	$P > 0.05$
No	260	(88.4%)	52	(20.0%)	
Contact with cats					
Yes	114	(38.8%)	46	(40.4%)	$P \leq 0.05$
No	180	(61.2%)	17	(9.4%)	
Consumption of raw meat					
Yes	14	(4.8%)	5	(35.7%)	$P > 0.05$
No	280	(95.2%)	58	(20.7%)	
Location					
Rural area	156	(53.1%)	41	(26.3%)	$P \leq 0.05$
Urban area	138	(46.9%)	22	(16.0%)	

DISCUSSION and CONCLUSION

T. gondii infection affects the multi-organ functions via hormones alteration. Some studies showed a defined correlation between *T. gondii* infection and a change in testosterone, cortisol, dopamine, and other hormones secretion (25, 26). The objective of our study was to assess the effect of latent toxoplasmosis on thyroid hormones in hypothyroidism and hyperthyroidism. Furthermore, we evaluated whether toxoplasmosis could interfere with the drug treatment of thyroid dysfunction. Our study findings showed that *T. gondii* infection doesn't significantly affect the serum concentration of thyroid hormones among patients with thyroid dysfunction. The rates of *T. gondii* infection positivity in all study

groups were approximately similar. According to our data, the seroprevalence of toxoplasmosis was higher among patients that live in rural areas. Some researchers have proven the association between toxoplasmosis and rural lifestyle with probable link to frequent contact with cats (27, 28). In our study, we analyzed hormone concentrations in three groups by their age and gender subgroups, there wasn't a significant difference in hormone concentrations in different subgroups. Some studies claim that *T. gondii* has a protective role in hypothyroidism in patients less than 50 years old and suggested that it can be used to treat hypothyroidism (15). In contrast to the previous study, a survey of dogs suffering from thyroid dysfunctions reported two positive cases of toxoplasmosis that developed hypothyroidism six

months after treatment (23). In this study, latent *T. gondii* didn't show any correlation with thyroid dysfunction in general and results reject the hypothesis that *T. gondii* can be used to treat or ameliorate hypothyroidism. Kenova Sarka et al. corroborated our finding that latent toxoplasmosis has no association with thyroid hormones alteration. Moreover, they observed a mild decrease in TSH and an increase in T4 secretion in pregnant women infected with *T. gondii* (29). This little alteration of hormones might be related to HCG hormones in pregnant women, which has a TSH-like effect causing temporary gestational hyperthyroidism in pregnancy (30). A significant decline in T4 and an increase in T3 and TSH hormones were reported in pregnant women who had miscarriage from chronic toxoplasmosis (31). Also, another research confirmed that non-pregnant women with toxoplasmosis have significantly lower serum levels of TSH in comparison to non-infected control group, whereas, there weren't difference in T3 and T4 (32). Salman and Mustafa (2014), claimed that *T. gondii* infection could decrease levels of thyroid hormones (33). Mice infected with *T. gondii*

Curnell strains showed a decline in serum thyroxine (T4) levels (34). Furthermore, an impaired thyroid function was recorded in murine infected by *T. gondii*. A decline in serum thyroxine (T4) occurs in NYLAR female mice infected with *T. gondii* (35). Controversial results of our and other's study findings show that the association of toxoplasmosis with thyroid dysfunction remains in darkness. Although in our survey we didn't find any relation between chronic toxoplasmosis and thyroid hormones alteration, further research will needed to evaluate the actual mechanism of interaction between *T. gondii* infection and thyroid dysfunction.

In conclusion, our study illustrated that the presence of toxoplasmosis infection doesn't significantly alter thyroid hormones secretion in patients with thyroid disease. Due to the approximately similar mean proportion of TSH, T3 and T4 hormones in hypothyroidism and hyperthyroidism and the control groups. We can conclude that the infection with *T. gondii* had no specific role in the disturbance of serum levels of thyroid hormones.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Zahedan University of Medical Sciences Ethics Committee (Date: : 24.01.2020 and Number: IR.ZAUMS.REC.1399.486).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Raissi V, Bayat F, Taghipour A, Raiesi O, Ibrahim A, Getso M, Hoseiny Z, Alizadeh G, Shahraki MK, Etemadi S. Seroepidemiology and risk factors of toxoplasmosis among children age ranged from 1 to 14 years referred to medical diagnostic laboratories in Southeast Iran. *Clin Epidemiol Glob Health*. 2019 Dec 23.
2. Raissi V, Taghipour A, Navi Z, Etemadi S, Sohrabi Z, Sohrabi N, Getso M, Shamsaei S, Fasihi Karami M, Raiesi O. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp. infections among pregnant women with and without previous abortions in the west of Iran. *J Obstet Gynaecol Res*. 2020 Mar;46(3):382-8.
3. Karami MF, Rafiei A, Raiesi O, Getso M, Akhlaghi E, Jalali P, Shayanfard M, Beigzadeh E, Arbat SK, Mirabedini Z, Raissi V. The relation between toxocariasis and toxoplasmosis co-infection and the presence of Rheumatoid Factor (RF) in people with hydatidosis in Southwestern Iran, from 2013 to 2018. *J Parasit Dis*. 2019 Sep 1;43(3):379-84.
4. Eskandarian A, Jahani S, Hejazi H, Yousefi H, Raissi V. Investigation of *Toxoplasma gondii* infection in cutaneous leishmaniasis patients of the Isfahan province. *Int J Infect*. 2017 Jan 1;4(2).
5. Dard C, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Pelloux H. Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. *Trends parasitol*. 2016;32(6):492-506.
6. Bosch-Driessen LE, Berendschot TT, Ongkosuwito JV, Rothova A. Ocular toxoplasmosis: Clinical features and prognosis of 154 patients. *Ophthalmology*. 2002;109(5):869-78.
7. Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis*. 2012;44(11):805-1.
8. Abdoli A, Dalimi A, Soltanghorae H, Ghaffarifar F. Molecular detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in paraffin-embedded fetoplacental tissues of women with recurrent spontaneous abortion. *I J Fertil Steril*. 2017;10(4):327.
9. Liu D, Lin C, Seshan V. AIDS complicated with disseminated toxoplasmosis: a pathological study of 9 autopsy cases. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, (Chinese journal of pathology) 1994;23(3):166-9.
10. Cohn JA, McMeeking A, Cohen W, Jacobs J, Holzman RS. Evaluation of the policy of empiric treatment of suspected *Toxoplasma encephalitis* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*. 1989;86(5):521-7.
11. Passos LN, Araújo Filho OFd, Andrade Junior Hfd. *Toxoplasma encephalitis* in AIDS patients in Sao Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2000;42(3):141-5.
12. Kusbeci OY, Miman O, Yaman M, Aktepe OC, Yazar S. Could *Toxoplasma gondii* have any role in Alzheimer disease? *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2011;25(1):1-3.
13. Torrey EF, Bartko JJ, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. *Schizophr Bull*. 2012;38(3):642-7.
14. Dalimi A, Abdoli A. Latent toxoplasmosis and human. *Iran J Parasitol*. 2012;7(1):1.
15. Alvarado-Esquivel C, Ramos-Nevarez A, Guido-Arreola CA, Cerrillo-Soto SM, Perez-Alamos AR, Estrada-Martinez S, et al. Association between *Toxoplasma gondii* infection and thyroid dysfunction: a case-control seroprevalence study. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):826.
16. Alvarado-Esquivel C, Sánchez-Anguiano LF, Hernández-Tinoco J, Berumen-Segovia LO, Torres-Prieto YE, Estrada-Martínez S, et al. *Toxoplasma gondii* infection and depression: a case-control seroprevalence study. *Eur J Microbiol Immunol*. 2016;6(2):85-9.
17. Ivarado-Esquivel C, Sanchez-Anguiano LF, Hernandez-Tinoco J, Berumen-Segovia LO, Torres-Prieto YE, Estrada-Martinez S, et al. *Toxoplasma gondii* infection and mixed anxiety and depressive disorder: a case-control seroprevalence study in Durango, Mexico. *J Clin Med Res*. 2016;8(7):519.
18. Chen X, Chen B, Hou X, Zheng C, Yang X, Ke J, et al. Association between *Toxoplasma gondii* infection and psychiatric disorders in Zhejiang, Southeastern China. *Acta Trop*. 2019;192:82-6.

19. Shiadeh MN, Rostami A, Pearce B, Gholipourmalekabadi M, Newport DJ, Danesh M, et al. The correlation between *Toxoplasma gondii* infection and prenatal depression in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(11):1829-35.
20. Benvenega S, Guarneri F. Molecular mimicry and autoimmune thyroid disease. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016;17(4):485-98.
21. Prandota J. Possible critical role of latent chronic *Toxoplasma gondii* infection in triggering, development and persistence of autoimmune diseases. *Int J Neurology Resh*. 2018;4(1):379-463.
22. Rivera-Correa J, Rodriguez A. Divergent roles of antiself antibodies during infection. *Trends immunol*. 2018;39(7):515-22.
23. Castillo VA, Gámbaro G, Sinatra V. Toxoplasmosis as a cause of subacute thyroiditis in dogs. *REDVET*. 2006;7(3):1-11.
24. Wasserman EE, Nelson K, Rose NR, Rhode C, Pillion JP, Seaberg E, et al. Infection and thyroid autoimmunity: A seroepidemiologic study of TPOAb. *Autoimmunity*. 2009;42(5):439-46.
25. Mahbodfar HR, Yousefi Razin E, Saki J, Rafie A, Khademvatan S. Study of latent *Toxoplasma gondii* role in level of testosterone, DHEA, cortisol and prolactin hormones of young persons. *Asian J Epidemiol*. 2015;8(3):64-71.
26. Flegr J, Lindová J, Kodym P. Sex-dependent toxoplasmosis-associated differences in testosterone concentration in humans. *Parasitology*. 2008;135(4):427-31.
27. Kolbekova P, Kourbatova E, Novotna M, Kodym P, Flegr J. New and old risk-factors for *Toxoplasma gondii* infection: prospective cross-sectional study among military personnel in the Czech Republic. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(10):1012-7.
28. Stray-Pedersen B, Lorentzen-Styr A-M. The prevalence of toxoplasma antibodies among 11 736 pregnant women in Norway. *Scand J Infect Dis*. 1979;11(2):159-65.
29. Kaňková Š, Prochazkova L, Flegr J, Calda P, Springer D, Potlukova E. Effects of latent toxoplasmosis on autoimmune thyroid diseases in pregnancy. *PLoS one*. 2014;9(10):e110878.
30. Glinoyer D, Nayer PD, Bourdoux P, Lemone M, Robyn C, Steirteghem AV, et al. Regulation of maternal thyroid during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71(2):276-87.
31. Al-Khamesi MB. Effect of Toxoplasmosis on lipid profile and thyroid hormones in aborted women. *J Al-Nahrain Univ*. 2016;19(4):122-6.
32. Al-Kurdy MJ, Al-Bdairi TA, Jawad TI, Amana AM. Serological detection of *Toxoplasma gondii* antibodies and its effect on thyroid function in non-pregnant women. *Int J Sci Technol*. 2015;143(2013):1-11.
33. Salman Y, Mustafa WG. Correlation between *Toxoplasma gondii* and thyroid function hormone levels in sera of patients attending private clinics and laboratories in Kirkuk City. *Int J Curr Res Biosci Plant Biol*. 2014;1(4):27-34.
34. Galván-Ramírez MdL, Gutiérrez-Maldonado AF, Verduzco-Grijalva F, Jiménez JMD. The role of hormones on *Toxoplasma gondii* infection: a systematic review. *Front Microbiol*. 2014;5:503.
35. Stahl W, Kaneda Y. Impaired thyroid function in murine toxoplasmosis. *Parasitology*. 1998;117(3):217-22.

GC-MS-based metabolic profiling of *Escherichia coli* exposed to subinhibitory concentration of enoxacin

Enoksasin subinhibitör konsantrasyonu maruziyeti altında *Escherichia coli*'nin GC-MS bazlı metabolomik profillemesi

Engin KOÇAK¹ (ID), Ceren ÖZKUL² (ID)

ABSTRACT

Objective: The rapid development of bacterial resistance to antibiotics is one of the most recent threats to human health. Understanding the metabolism of pathogens is essential to gain insights into the adaptation strategies that are required to deal with the host environment during infection and to identify new drug targets. In recent years omics technologies have offered new routes to understand adaptation and resistance mechanisms of pathogens against antibiotics at molecular level. In present work, we analyzed the metabolic response of *Escherichia coli* during treatment with enoxacin to identify metabolic adaptation processes.

Methods: Gas chromatography/Mass spectroscopy (GC/MS) based metabolomics approach was used for metabolomics analysis. Metabolites were extracted using methanol: water co-solvent system. After derivatization process, Metabolites separated in GC column and analyzed in MS. MS-DIAL metabolomics and lipidomics platform was performed to analyze raw GC/MS data. Metabolites were identified with retention index database and quantified relatively between control and enoxacin-treated groups. Statistically

ÖZET

Amaç: Antibiyotiklere karşı hızla gelişen bakteri direnci insan sağlığını etkileyen en önemli tehlikelerden biri haline gelmiştir. Patojenlerin metabolizmalarının anlaşılması konak ortama karşı gerekli metabolik adaptasyonların anlaşılmasında ve yeni antimikrobiyal hedeflerin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Son yıllarda gelişen omik teknolojiler patojenlerin antibiyotiklere karşı adaptasyon ve direnç süreçlerinin moleküler düzeyde incelenmesinde yeni fırsatlar sunmuştur. Bu çalışmada *Escherichia coli*'nin enoksasine karşı verdiği metabolik cevabı araştırarak metabolik adaptasyon süreçlerini belirlemeye çalıştık.

Yöntem: Bu çalışmada metabolomik analiz için gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi (GC/MS) bazlı metabolomik yaklaşım kullanılmıştır. Metabolitlerin ekstraksiyonunda metanol: su çözücü karışımı kullanılmıştır. Türevlendirme işlemi sonrasında metabolitler önce GC kolonunda ayırmış daha sonrasında kütle spektroskopisinde analiz edilmiştir. Elde edilen ham GC/MS verilerinin biyoinformatik analizleri için MS-DIAL metabolomik ve lipidomik platform kullanılmıştır. Metabolitlerin yapıları alıkonma indeksi veri bankasına göre yapılmıştır. İki grup arasında anlamlı olarak değişen

¹Health Sciences University, Gulhane Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Ankara
²Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Engin KOÇAK

Sağlık Bilimleri Üni., Gülhane Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya AD, Etlik, Ankara - Türkiye
E-posta / E-mail : kocakengin@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 24.09.2020
Kabul Tarihi / Accepted : 28.04.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.00008

Koçak E, Özkul C. GC-MS-based metabolic profiling of *Escherichia coli* exposed to subinhibitory concentration of enoxacin. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 307 - 316

significant altered metabolites were investigated via pathway enrichment analysis.

Results: Metabolite profile of control and enoxacin-treated groups were compared to observe cellular adaptation against the antibiotic stress. Principal component analysis of GC/MS results showed that there was a dramatic shift at general metabolome structure under antibiotic stress. We identified 92 metabolites and statistical analysis indicated 36 metabolites altered significantly between experimental groups. Pathway enrichment analysis showed that amino acid biosynthesis, glycine, serine, and threonine metabolism, Aminoacyl-tRNA metabolism, purine metabolism, galactose metabolism was induced in *E. coli* exposed to subinhibitory concentration of enoxacin.

Conclusion: In present study, we investigated metabolic adaptation of *E. coli* against enoxacin-induced stress. Our findings may contribute to current literature to expand the understanding of bacteria-antibiotic interactions at metabolome level.

Key Words: Enoxacin, *Escherichia coli*, GC/MS, Metabolomics

metabolitler belirlendikten sonra yolak analizleri ile değerlendirmeler yapılmıştır.

Bulgular: Bu çalışmada metabolik adaptasyonu anlamak için kontrol ve enoksasin maruziyeti altında bulunan *E. coli* hücrelerinin metabolit profilleri karşılaştırılmıştır. Temel bileşenler analizi (PCA) sonuçları enoksasin maruziyeti altında *E. coli* hücrelerinin metabolit yapısının dramatik şekilde değiştiğini göstermiştir. Yapılan analizlerde toplam 92 metabolitin yapısı aydınlatılmış ve bunlardan 36 tanesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştiği belirlenmiştir. Miktarı değişen metabolitler yolak analizleri ile değerlendirilmiş ve enoksasin maruziyeti altında aminoasit biyosentezi, aminoasil-tRNA metabolizması, pürin metabolizması, glisin, serin ve treonin metabolizması ve galaktoz metabolizması gibi hücrel süreçlerin farklılaştığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar enoksasin maruziyeti altında *E. coli*'de meydana gelen metabolik değişiklikleri ve antibiyotik kaynaklı stres koşullarında nasıl adapte olduğu hakkında bilgi sunmaktadır. Yapılan çalışmanın sonuçları antibiyotik-bakteri ilişkisinin anlaşılması ile ilgili olarak literatüre ve gelecek çalışmalara katkıda bulunacaktır.

Anahtar Kelimeler: Enoksasin, *Escherichia coli*, GC/MS, Metabolomik

INTRODUCTION

Antibiotic resistance is one of the most critical problems worldwide. Overpopulation, increasing use of the antibiotics in clinical settings and animal production, wildlife spread are major causes of antibiotic resistance. World health organization (WHO) centers for disease control and prevention (CDC) estimate 700.000 deaths annually worldwide and every country is potentially affected. Moreover, economic impact of resistant bacteria infections is a big challenge for each country. In the USA alone, the total economic burden is estimated \$20 billion in a year (1).

After the successes of the antibiotic golden

age, the discovery rate was decreased, along with an increase in the number of multi drug resistance strains. Today there is a great effort to discover new antibiotics. Many researches analyze antimicrobial properties of semi-synthetic and synthetic molecules. Moreover, target (gene)-based screening and cell-based screening techniques have been used to find new antimicrobial targets in cells and discover candidate molecules (2, 3). However, these strategies have not been sufficient to find realistic solution for antibiotic resistant problem. Antibiotic-pathogen interaction has been missing part and gained importance to

understand mode of action of antibiotics, adaptation and resistance mechanisms of pathogens. The post-genomics technologies (proteomics, transcriptomics and metabolomics) have offered great opportunity to respond to this challenge (4-7). This growing trend could lead to find new routes to overcome resistance problem.

The fluoroquinolones are broad-spectrum antibiotics that have been used in clinical practice for the treatment of infections since 1980s. Their effect over wide range of gram negative and positive bacteria has led to widespread use worldwide. However, fluoroquinolone-resistant strains have emerged and increased dramatically in recent years (8, 9). Metabolomics, proteomics and transcriptomics techniques have been used to understand the effect of various members of fluoroquinolones (ciprofloxacin, ofloxacin) over pathogens and also resistance and adaptation mechanisms against the fluoroquinolones (10-12). However, these studies were early steps and there is long way to understand fluoroquinolone-bacteria relationship at molecular level. Enoxacin that is a member of fluoroquinolone family has been used for especially urinary tract infections. There is any detailed study about the metabolic adaptation of pathogen against the enoxacin.

In present work, we used gas chromatography/mass spectroscopy (GC/MS) based metabolomics approach to analyze the change of metabolome structure of *E. coli* under enoxacin stress conditions. Result showed that there was a dramatic shift in metabolome structure and various cellular pathways altered with the effect of enoxacin. We believe that our findings will contribute to understand bacteria-antibiotic relationship and further experiments regarding with fluoroquinolone resistance.

MATERIAL and METHOD

Bacterial Culture

E. coli ATCC 25922 was subcultured on Tryptic Soy Agar. In order to confirm the minimum inhibitory

concentration (MIC) value of enoxacin against *E. coli*, standard broth microdilution was performed according to the method reported by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). The MIC value of enoxacin was determined and compared with the latest breakpoint tables of EUCAST. For metabolomics experiments, subinhibitory concentration (half of the MIC) enoxacin was used. *E. coli* ATCC 25922 was cultured on Mueller Hinton Broth (MHB) and incubated under 37°C until the log phase was achieved. The bacterial suspension was prepared using MHB that contained the MIC/2 value of enoxacin to obtain a bacterial concentration of 5x10⁵ cfu/ml bacteria. The same concentration of bacterial culture under same conditions was also prepared without adding any antibiotic. Flasks were incubated at 37°C for 20 h. Experiments were performed with three replicates.

Extraction of Metabolites

After centrifugation the cell pellets were washed by phosphate buffer saline (PBS) twice. In present work, we used enzymatic lysis procedure, we used lysozyme for enzymatically disruption. Incubation time was set to 30 minutes. Methanol:Water (9:1 v/v) co-solvent system was used for metabolite extraction from cellular lysate. 850 µL extraction solvent added to 150 µL sample and mixed in a vortex for 1 min. Samples were centrifuged at 15.000 g for 10 minutes. Supernatant were taken and carefully evaporated under vacuum centrifuge.

In derivatization process, firstly 20µL methoxyamine solution in pyridine (20 mg/ml) (Sigma) was added to the dried extract and incubated at 70°C for 90 min. In second step, 100 µl of MSTFA (sigma) was added and incubated at 37°C for 30 minutes. After derivatization, samples were transferred to auto sampler vials for GC/MS analysis.

GC/MS conditions

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics analysis was performed as described previously (13). Metabolites were analyzed

using GC-MS (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra) with a DB-5MS stationary phase column (30 m + 10 m DuraGuard × 0.25 mm i.d. and 0.25-µm film thickness). Helium was used as the carrier gas at 1 ml/min flow rate. Samples were injected in non-split mode. Injection volume was adjusted at 2 µl. The injector temperature was held at 250°C. In gradient system, oven temperature was fixed at 70°C for one minute, then increasing up to 325°C by 10°C/min gradient and held for 10 minutes at 325°C. Total separation time was 37.5 minutes. The MS detector was performed at EI mode. Data acquisition was performed in full scan mode with mass range between 50-650 m/z.

GC/MS Data Processing

Raw GC/MS data was processed in MS-DIAL (version 3.96) metabolomics and lipidomics platform (http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-DIAL/). In MS-DIAL settings, mass range was between 0-1000 Da. Minimum peak height for peak detection was 1000 amplitude. Retention time tolerance was 1 min. Identification score cut off was 60%. We used GC/MS all public Kovats retention index database (15302 records)(http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-DIAL/) for metabolite identification. Peak areas of metabolites were calculated in MS-DIAL and normalized according to total ion chromatogram. Metaboanalyst 4.0 platform was used for statistical analysis. Volcano plot analysis was applied to find altered metabolites (Fold change >1.5 and p value<0.05). Altered metabolites were analyzed in pathway module in metaboanalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) and KEGG database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

RESULTS

The MIC value of enoxacin against *E. coli* ATCC 25922 was 0.12 µg/ml, which was within the expected susceptibility range. Thus the half of the MIC value (0.06 µg/ml) was used for further metabolomics studies.

In metabolomics analysis, extracted metabolites were analyzed in GC/MS system. Base peak chromatograms of control and enoxacin treated groups were given in supplementary information. Raw GC/MS data was processed in MS-DIAL software. We detected 930 features and identified 92 metabolites. Peak intensities were calculated and normalized according to total ion chromatogram (TIC). Metaboanalyst 4.0 platform was used for statistical analysis.

We focused on principal component analysis (PCA) to observe general metabolic changes with the effect of enoxacin and results showed that there was a dramatic shift in metabolome structure under stress conditions (Figure 1A). Volcano plot analysis was applied to find altered metabolites (Fold change >1.5 and p value<0.05) (Figure 1B). We observed that 36 differentially expressed metabolites were detected between control and enoxacin treated groups including 22 upregulated and 16 downregulated metabolites, respectively (supplementary information).

Altered metabolites were evaluated in Metaboanalyst 4.0 (pathway analysis module) and KEGG mapper platform to understand systematic effect of enoxacin over *E. coli* (Figure 2).

DISCUSSION and CONCLUSION

In present work, extracted metabolites from control and enoxacin treated groups were analyzed with GC/MS based metabolomics analysis. PCA analysis showed that there is a dramatic shift in metabolome structure of *E. coli* under enoxacin stress. Metabolome structure is very dynamic and environmental stress could trigger many biological processes simultaneously and PCA indicated that antibiotic induced stress leads deep impact over cellular metabolism.

Statistical analysis showed that 36 metabolites altered between two experimental groups (*p* value < 0.05 and fold change > 1.5). Altered metabolites were evaluated in pathway analysis in metaboanalyst

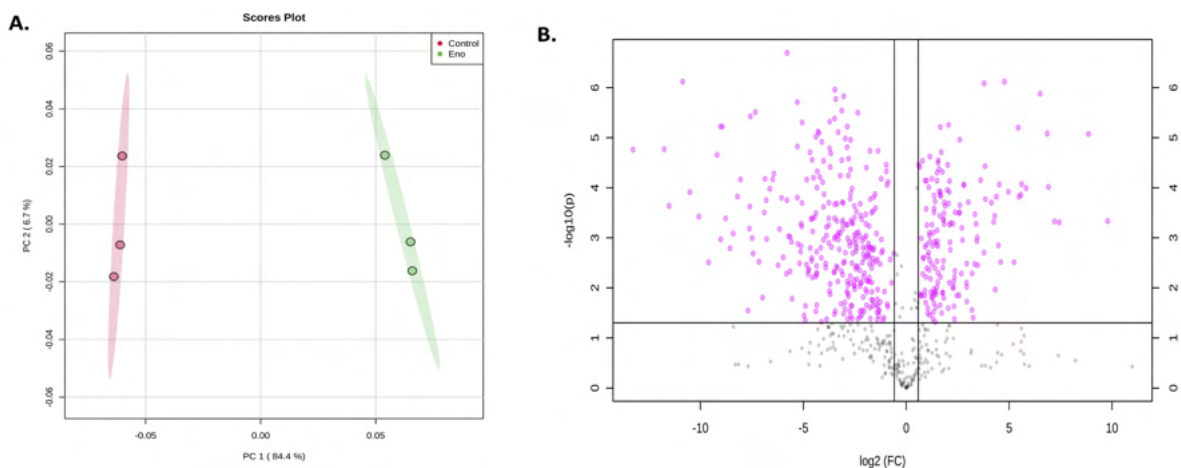


Figure 1. A) Principal component analysis of control and enoxacin treated groups. B) Volcano plot analysis of features (Pink dots indicate significantly altered features between two experimental groups)

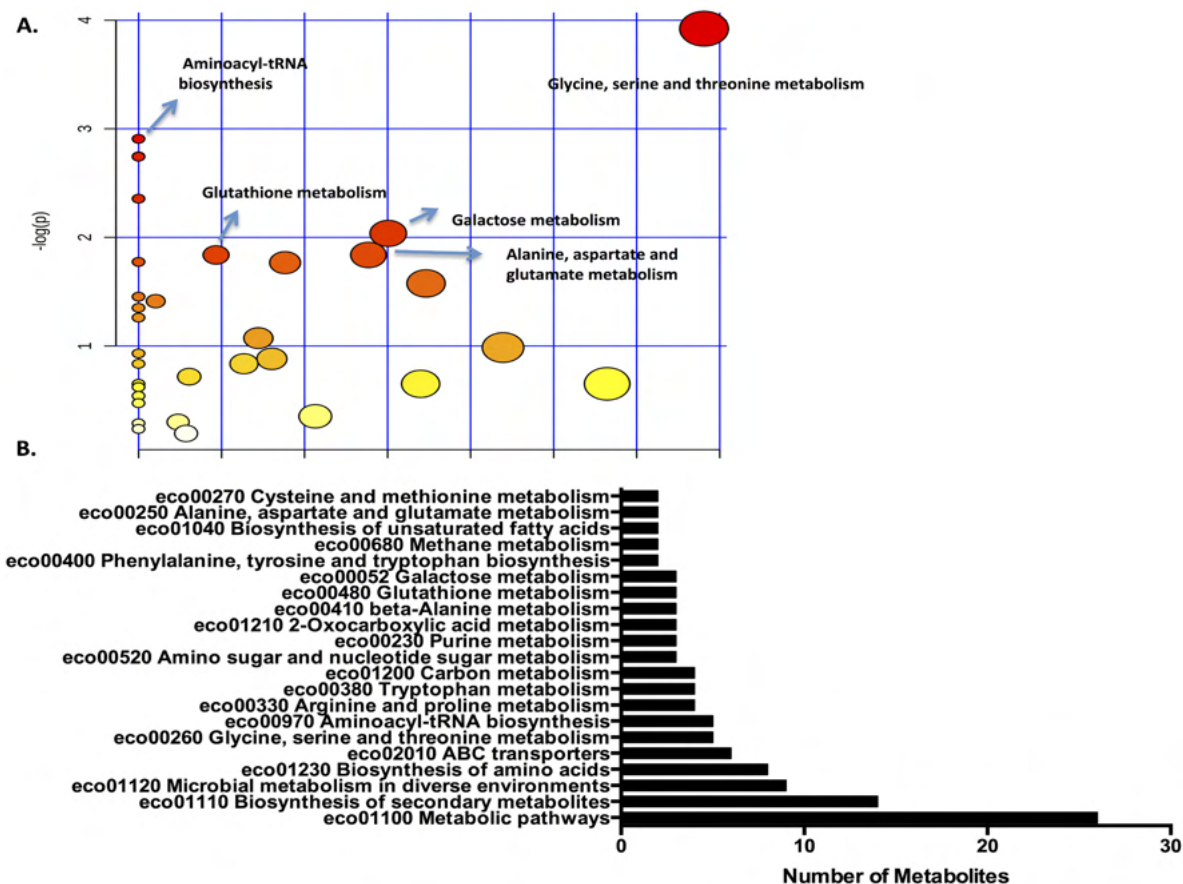


Figure 2. Induced pathways under enoxacin stress. A) Pathway analysis module in Metaboanalyst 4.0 B) KEGG mapper database.

4.0 and KEGG database to explain metabolic changes.

Changes in metabolic pathways within *E. coli*

Amino acids, referred to as the building blocks of proteins, are compounds that play many critical roles in cells. Studies showed that amino acid biosynthesis is one of the key parameter for cell growth, pathogenicity, biofilm-formation (14, 15). Moreover, various proteomics, metabolomics and transcriptomics studies revealed that this pathway is changed dramatically under antibiotic stress (10, 16-18). Zampieri et. al. showed that amino acid biosynthesis is the most affected pathway in *E. coli* at early phase of antibiotic stress and it has direct connection to general antibiotic- stress-response. In present work, we observed that amino acid metabolism was changed under enoxacin stress condition. Most of the altered metabolites were up regulated in enoxacin treated group (Figure 3A). This biological process could be one of the key steps in adaptation process.

Glycine, serine, and threonine metabolism was also one of the most significant pathways. Cheng. et al., showed that glycine, serine and threonine pathway altered between resistant and sensitive strains of *E. coli* isolates (19). Also Ye et al, used

LC/MS based proteomics approach and showed that glycine, serine and threonine pathway was one of the most important regulatory mechanisms (20). Schelli et al, used comparative metabolomics analysis to understand metabolic adaptation in *Staphylococcus aureus* under the effect of various antibiotics and they observed that glycine, serine, and threonine metabolism was significantly different (21). In present work, we found similar results with this pathway (Figure 3B). There is no detailed mechanistic study role of glycine, serine and threonine metabolism with metabolic adaptation process. In further experiments, targeted studies could response to this question.

Aminoacyl-tRNA metabolism is very important in protein biosynthesis and cell envelope. Previous studies have indicated that some antibacterial quinolones induce bacterial aminoacyl-tRNA synthetase (ARS) (10, 22). In pathway analysis, we observed that glycinine (downregulated), L-alanine (upregulated), L-tryptophan (upregulated), L-threonine (upregulated) and phosphoserine (downregulated) were involved in Aminoacyl-tRNA biosynthesis (Figure 3). Changes in Aminoacyl-tRNA metabolism could demonstrate differentiation in translation process.

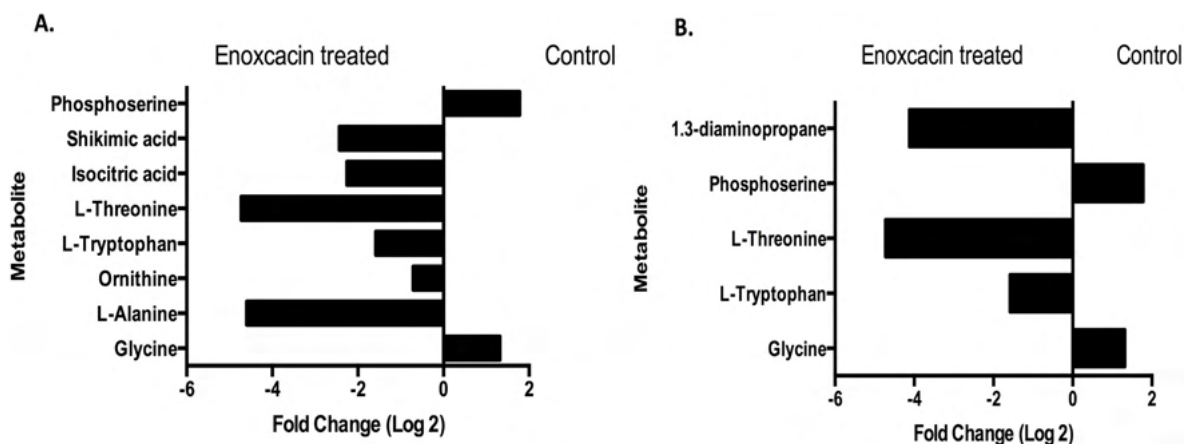


Figure 3. Fold changes of metabolites in
A) Amino acid biosynthesis,
B) glycine, serine, and threonine metabolism

Purine and pyrimidine nucleotides are major energy carriers, subunits of nucleic acids and precursors for the synthesis of nucleotide cofactors. In literature, there has been growing evidence regarding with alteration of purine metabolism under antibiotic stress. Zampieri et al, showed that purine metabolism was one of the most affected cellular process in early phase of antibiotic stress for *E. coli* (18). Dorries et al, observed similar results for *Staphylococcus aureus* with metabolomics analysis. They found that most of the metabolites purine metabolism was up regulated under ciprofloxacin stress but they found purine metabolism was down regulated under vancomycin and ampicillin treated groups (23). All these data suggested that purine metabolism play important role in resistance and adaptation process. Various

metabolites in purine metabolism were altered under enoxacin stress (Figure 4A).

The cellular antioxidant mechanism plays critical role in antibiotic resistance against the reactive oxygen species (ROS). Glutathione metabolism is the key system in defense system against ROS species and very important for cell growth and survival. In previous studies, it was showed that glutathione metabolism plays important role in antibiotic resistance process (24). In present work, we found that various metabolites altered in enoxacin-treated group (Figure 4B). Moreover, we observed that expression level of spermin increased dramatically. Spermine, which is in glutathione metabolism, is a member of polyamines, which are polycationic molecules, produced through complex pathways.

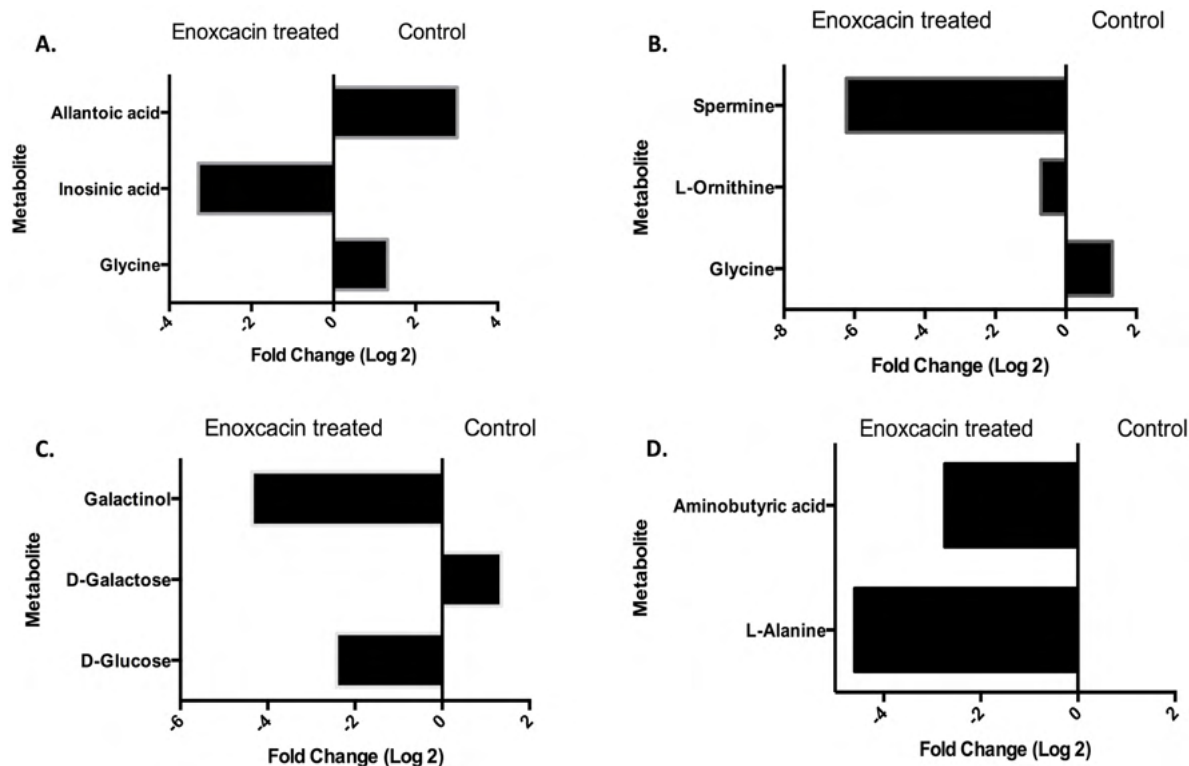


Figure 2. Fold change of metabolites in
 A) Purine metabolism,
 B) Glutathione metabolism,
 C) Galactose metabolism,
 D) Alanine, aspartate and glutamate biosynthesis

Polyamines involve in a wide range of biological processes. The interactions between polyamines and porins were defined in recent years. Porin proteins are main regulators for overall permeability of the outer membrane. Lyer et al, showed that four polyamines (spermine, spermidine, cadaverine and putrescine) were very effective on the activity of porin proteins (25). These polyamines suppress channel opening and promote the inactive state. Sarathy et al, showed that polyamines induced membrane permeability via affecting porin proteins. (26). They found that polyamines decreased membrane permeability of the outer membrane, which leads to decreased intake of fluoroquinolones in *Mycobacteria*. In our work, increasing level of spermine may lead to membrane based-resistance against enoxacin.

Galactose metabolism, is also known as Leloir pathway, is very important for energy production, protein glycosylation, LPS biosynthesis and virulence (27). Chai. et al, showed that galactose metabolism played essential role in biofilm formation (28). Yang et al, analyzed general carbon metabolism of *E. coli*

under doxycycline stress (29). They showed that expression level of genes in galactose metabolism were significantly different from control group. In present work, we found that three metabolite in this pathway altered under enoxacin stress (Figure 4C).

Alanine, aspartate and glutamate biosynthesis is another important metabolic pathway. In previous studies showed that this pathway altered under antibiotic stress conditions (30, 31). In present work, we observed that various metabolites in this pathway altered significantly (Figure 4D).

In conclusion, antimicrobial resistance is one of the most important global problems. Understanding of antibiotic-pathogen relationship at molecular level could give opportunity to discover new antibiotics and treatment methods. In present work, we investigated altered metabolome structure of *E. coli* with GC/MS based metabolomics approach. Results showed that various metabolic pathways altered simultaneously under enoxacin stress. We believe that our results will contribute to understand antibiotic-pathogen relationship.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(2):129-36.
2. Mills SD. When will the genomics investment pay off for antibacterial discovery? *Biochem Pharmacol*. 2006;71(7):1096-102.
3. Moloney MG. Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(8):689-701.
4. McGettigan PA. Transcriptomics in the RNA-seq era. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17(1):4-11.
5. Pulido MR, Garcia-Quintanilla M, Gil-Marques ML, McConnell MJ. Identifying targets for antibiotic development using omics technologies. *Drug Discov Today*. 2016;21(3):465-72.
6. Vranakis I, Goniotakis I, Psaroulaki A, Sandalakis V, Tselentis Y, Gevaert K, et al. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. *J Proteomics*. 2014;97:88-99.
7. Hoerr V, Duggan GE, Zbytniuk L, Poon KK, Grosse C, Neugebauer U, et al. Characterization and prediction of the mechanism of action of antibiotics through NMR metabolomics. *BMC Microbiol*. 2016;16:82.
8. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*. 2014;22(8):438-45.
9. Thabet L, Memmi M, Turki A, Messadi AA. The impact of fluoroquinolones use on antibiotic resistance in an intensive care burn department. *Tunis Med*. 2010;88(10):696-9.
10. Li W, Zhang S, Wang X, Yu J, Li Z, Lin W, et al. Systematically integrated metabolomic-proteomic studies of *Escherichia coli* under ciprofloxacin stress. *J Proteomics*. 2018;179:61-70.
11. Erickson KE, Otoupal PB, Chatterjee A. Transcriptome-Level Signatures in Gene Expression and Gene Expression Variability during Bacterial Adaptive Evolution. *mSphere*. 2017;2(1).
12. Patkari M, Mehra S. Transcriptomic study of ciprofloxacin resistance in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Biosyst*. 2013;9(12):3101-16.
13. Gonulalan EM, Nemutlu E, Bayazeid O, Kocak E, Yalcin FN, Demirezer LO. Metabolomics and proteomics profiles of some medicinal plants and correlation with BDNF activity. *Phytomedicine*. 2019:152920.
14. Lu H, Que Y, Wu X, Guan T, Guo H. Metabolomics deciphered metabolic reprogramming required for biofilm formation. *Sci Rep*. 2019;9(1):13160.
15. Li T, Zhan Z, Lin Y, Lin M, Xie Q, Chen Y, et al. Biosynthesis of amino acids in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is essential to its pathogenicity. *Microorganisms*. 2019;7(12).
16. Le CF, Gudimella R, Razali R, Manikam R, Sekaran SD. Transcriptome analysis of *Streptococcus pneumoniae* treated with the designed antimicrobial peptides, DM3. *Sci Rep*. 2016;6:26828.
17. Maass S, Otto A, Albrecht D, Riedel K, Trautwein-Schult A, Becher D. Proteomic signatures of *Clostridium difficile* stressed with metronidazole, vancomycin, or fidaxomicin. *Cells*. 2018;7(11).
18. Zampieri M, Zimmermann M, Claassen M, Sauer U. Nontargeted metabolomics reveals the multilevel response to antibiotic perturbations. *Cell Rep*. 2017;19(6):1214-28.
19. Cheng ZX, Guo C, Chen ZG, Yang TC, Zhang JY, Wang J, et al. Glycine, serine and threonine metabolism confounds efficacy of complement-mediated killing. *Nat Commun*. 2019;10(1):3325.
20. Ye JZ, Lin XM, Cheng ZX, Su YB, Li WX, Ali FM, et al. Identification and efficacy of glycine, serine and threonine metabolism in potentiating kanamycin-mediated killing of *Edwardsiella piscicida*. *J Proteomics*. 2018;183:34-44.
21. Schelli K, Zhong F, Zhu J. Comparative metabolomics revealing *Staphylococcus aureus* metabolic response to different antibiotics. *Microb Biotechnol*. 2017;10(6):1764-74.

22. Kim S, Lee SW, Choi EC, Choi SY. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;61(4):278-88.
23. Dorries K, Schlueter R, Lalk M. Impact of antibiotics with various target sites on the metabolome of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(12):7151-63.
24. Cameron JC, Pakrasi HB. Glutathione facilitates antibiotic resistance and photosystem I stability during exposure to gentamicin in cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(10):3547-50.
25. Iyer R, Delcour AH. Complex inhibition of OmpF and OmpC bacterial porins by polyamines. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18595-601.
26. Sarathy JP, Lee E, Dartois V. Polyamines inhibit porin-mediated fluoroquinolone uptake in mycobacteria. *PLoS One.* 2013;8(6):e65806.
27. Carlson-Banning KM, Chou A, Liu Z, Hamill RJ, Song Y, Zechiedrich L. Toward repurposing ciclopirox as an antibiotic against drug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2013;8(7):e69646.
28. Chai Y, Beauregard PB, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *mBio.* 2012;3(4):e00184-12.
29. Yang Y, Mi J, Liang J, Liao X, Ma B, Zou Y, et al. Changes in the carbon metabolism of *Escherichia coli* during the evolution of doxycycline resistance. *Front Microbiol.* 2019;10:2506.
30. Lin X, Kang L, Li H, Peng X. Fluctuation of multiple metabolic pathways is required for *Escherichia coli* in response to chlortetracycline stress. *Mol Biosyst.* 2014;10(4):901-8.
31. Su YB, Peng B, Li H, Cheng ZX, Zhang TT, Zhu JX, et al. Pyruvate cycle increases aminoglycoside efficacy and provides respiratory energy in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(7):E1578-E87.

Türkiye’de tıp fakültesi öğrencilerinin aşı, bağışıklama, aşı kararsızlığı ve COVID-19 aşısı hakkındaki bilgi ve düşünceleri

The knowledge and opinions of the faculty of medicine students about vaccination, immunization, vaccine hesitation and COVID-19 vaccine in Turkey

Efsa ÖZBALIKÇI¹ (ID), Elif Sude AYDIN¹ (ID), İlayda İPEK² (ID), Nalan ÖZEN³ (ID), Merve YÜCELER¹ (ID), Onur ATEŞ¹ (ID), Hasan Sadık MAYDA¹ (ID), Muhammed Yasir KARTANCI¹ (ID), Sedanur GÜÇLÜ¹ (ID), Şevval AKDOĞAN² (ID), Tuğçe EFE² (ID), Elif Cansel KARASU¹ (ID), Murat TOPBAŞ³ (ID)

ÖZET

Amaç: Aşılama, bulaşıcı hastalıkları önleme ve kontrol konusunda en etkili halk sağlığı uygulamalarındandır. Aşı kararsızlığı tüm dünya için olduğu kadar ülkemiz için de hızla artan bir risk olarak karşımıza çıkmaktadır. Hekimlerin aşılarla yönelik tutumları ile hastalarına aşıya yönelik önerileri arasında güçlü bir ilişki vardır. COVID-19 pandemisi ile mücadele döneminde ön planda olan aşının, tutum ve davranışlarıyla topluma rol model olan hekimler tarafından kabulünün belirlenmesi, yapılacak aşılama çalışmaları için yol gösterici olacaktır. Bu çalışmada ülkemizdeki tıp fakültesi öğrencilerinin aşı, bağışıklama, aşı kararsızlığı ve COVID-19 aşısı konusundaki bilgi ve düşüncelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Tanımlayıcı tipteki bu çalışmada, Aralık 2020-Ocak 2021 tarihleri arasında, Türkiye’de bulunan Avrupa Tıp Öğrencileri Birliği (EMSA, European Medical Students’ Association)’ne bağlı 33 “Öğrenci Toplulukları” (FMO, Faculty Member Organization) üyelerine ve bu üyeler aracılığıyla ülkemizdeki tıp fakültelerinde okuyan öğrencilere ulaşmak hedeflenmiştir. Veriler çevrim içi anket formu ile toplanmıştır. Çalışmaya 1.015 öğrenci

ABSTRACT

Objective: Vaccination is one of the most effective public health practices in preventing and controlling infectious diseases. Vaccine instability is a rapidly increasing risk for our country as well as for the whole world. There is a strong relationship between physicians’ attitudes towards vaccines and their recommendations for vaccines to their patients. Determining the acceptance of the vaccine, which is at the forefront during the fight against the COVID-19 pandemic by physicians who are role models for the society with their attitudes and behaviors, will guide the vaccination studies to be carried out. In this study, it was aimed to examine the knowledge and thoughts of medical faculty students in our country about vaccination, immunization, vaccine instability and COVID-19 vaccine.

Methods: In this descriptive study, between December 2020-January 2021, it is aimed to reach the medical students members of “33 Student Societies” (FMO, Faculty Member Organization) affiliated to the European Medical Students’ Association (EMSA) in Turkey and students studying at medical faculties in our country through members. The data were collected through an online

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Trabzon

²İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul

³Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Trabzon



İletişim / Corresponding Author : Murat TOPBAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Trabzon - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 23.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 11.06.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.39205

Özbalıkçı E, Aydın ES, İpek İ, Özen N, Yüceler M, Ateş O, Mayda HS, Kartancı MY, Güçlü S, Akdoğan S, Efe T, Karasu EC, Topbaş M. Türkiye’de Tıp Fakültesi öğrencilerinin aşı, bağışıklama, aşı kararsızlığı ve COVID-19 aşısı hakkındaki bilgi ve düşünceleri. Turk Hij Den Biol Derg, 2021; 78(3): 317 - 332

katılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya katılanların %64,7'si kadındır. Yaş ortalaması 21,2±2,5 yıldır. Katılımcıların %86,4'ü ülkemizdeki aşı kararsızlığının arttığını belirtmektedir. Medyada aşilar ile ilgili olumsuz ifadelerin bu durumun en önemli nedeni olduğu düşünülmektedir. Aşı kararsızlığının önlenmesi/azaltılması için ebeveynlere eğitim vermenin önemli olduğu belirtilmektedir. Katılımcıların %53,4'ü COVID-19 aşısı Sağlık Bakanlığı tarafından kullanıma uygun olduğu bildirildiğinde “Hemen yaptırım, beklerim” yanıtını vermiştir.

Sonuç: Ülkemizdeki aşı kararsızlığı sayısının artmakta olduğu ve bunun salgıların artmasına neden olacağı düşünülmektedir. Toplumda rol model olan tıp fakültesi öğrencilerinin, fakülteye başladıkları dönemden itibaren aşilar, bağışıklama ve aşı kararsızlığı konusundaki bilgi ve farkındalıklarının artırılması önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Aşilar, bağışıklama, aşı kararsızlığı, COVID-19

questionnaire. 1015 students participated in the study.

Results: In the study 64.7% of the participants are women. The average age is 21.2 ± 2.5 years. 86.4% of the participants state that vaccine instability in our country has increased. It is thought that the negative statements about vaccines in the media are the most important reason for this situation. It is stated that it is important to educate parents in order to prevent / reduce vaccine instability. When 53.4% of the participants are informed that the COVID-19 vaccine is suitable for use by the Ministry of Health, they indicated “I will not do it immediately, I wait.” as the answer.

Conclusion: It is thought that the number of vaccine instabilities in our country is increasing and this will cause an increase in epidemics. It is important to increase the knowledge and awareness of medical faculty students, who are role models for the society, about vaccines, immunization and vaccine hesitation from the beginning of the faculty.

Key Words: Vaccines, immunization, vaccine hesitation, COVID-19

GİRİŞ

Aşilar, hem bireysel bağışıklığı sağlaması hem de toplumda aşılanmış birey sayısının artmasıyla birlikte aşılammış bireylerin etkenle karşılaşma olasılığının azalması sonucunda ortaya çıkan toplumsal bağışıklığı (herd immunity) sağlaması açısından önemlidir (1). Aşılama programları bulaşıcı hastalıkları önleme ve ortadan kaldırma, hastalıkların morbidite ve mortalitesini azaltma, sağlıklı toplum gelişimi için maliyet etkin en iyi yöntemdir (2).

Etkin ve kapsayıcılığı yüksek aşılama çalışmaları sayesinde bugün tüm dünyada çiçek hastalığı eradike, ülkemizin de içinde olduğu 47 ülkede maternal ve neonatal tetanoz elimine edilmiştir (3). Ülkemiz 2002 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından “Poliodan

Arındırılmış Bölge” sertifikası ile belgelendirilmiştir. Ayrıca 22 Aralık 2020 tarihinde DSÖ, aşı ile önlenen hastalıklardan kızamıkçık hastalığının elimine edildiği ülke olduğumuz müjdesini de vermiştir. Diğer aşı ile önlenbilir hastalıklardan difteri, kızamık, kabakulak, hepatit A-B, boğmaca, *Streptococcus pneumoniae*'ya bağlı invaziv pnömokokal hastalıklar ve *Haemophilus influenzae* tip b'ye bağlı gelişen menenjit, sepsis, bakteriyemi ve suçiçeği vaka görülme sıklıkları oldukça azalmıştır. Ancak bulaşıcı hastalıklara karşı kazanılan tüm bu başarılarla birlikte giderek artan aşı kararsızlığı, dünya için olduğu kadar ülkemiz için de büyük bir risk olarak karşımıza çıkmaktadır.

Aşı kararsızlığı, aşığı kabullenmekte gecikme veya

aşıya ulaşılmış olmasına rağmen reddetme durumu olup, bir ya da daha fazla aşı için söz konusudur (4). Zaman, yer ve aşılara göre değişen aşı kararsızlığı, yüksek aşı talebi ile tam aşı reddi arasındaki süreçte ortaya çıkmakta, aşılardan bazılarının kabulünü, aşılardan geciktirmeyi ve aşılardan bazılarının reddetmeyi kapsamaktadır. Dolayısıyla aşı kararsızlığı ile aşı reddi arasında geçirgenlik de söz konusu olup birbirlerine dönüşebilme potansiyelleri oldukça yüksektir (5). Aşı kararsızlığının bu hızla devam etmesi durumunda kazanılan başarıların yok olması ve tekrar salgınlara zemin hazırlaması riski büyüktür (6). Yakın zamanda Avrupa’da yaşanan ve on binlerce çocuğu etkileyen, onlarcasının ölümüne yol açan kızamık salgını bunun belirgin örnekleridir. Ülkemizde 2016 yılında görülen kızamık vaka sayısı 9 iken 2019 yılında bu sayı 2904’e yükselmiştir (7). ABD’de 1 Ocak-18 Temmuz 2019 tarihleri arasında 31 eyalette toplam 1148 kızamık vakası görülmüş (1992 yılından beri bildirilen en büyük vaka sayısı) ve vakaların çoğunun kızamığa karşı aşılanmamış kişiler olduğu belirlenmiştir (8). Dolayısıyla kazanılan başarıların yok olmaması için aşı kararsızlığı durumunun anlaşılması ve çözümüne yönelik stratejiler geliştirilmesi gerekmektedir.

Aşı kararsızlığı ile ilgili yapılan birçok çalışmada topluma rol model olan hekimlerin ve diğer sağlık personelinin bireyler ile olan iletişiminin, doğru ve güvenilir bilgi aktarımının önemi vurgulanmaktadır. Hekimlerin aşılara yönelik tutumları ile hastalarına aşılara yönelik önerileri arasında güçlü bir ilişki vardır. Aşılamada kararsızlığı olan sağlık çalışanları, aşılara güveni bir şekilde zayıflatabilir ve toplumdaki aşı kararsızlığı üzerinde güçlü bir etkiye sahip olabilir (9). İçinde bulunduğumuz COVID-19 pandemisi ile mücadele döneminde, sağlık çalışanları için COVID-19 aşılamada çalışmalarını ön plana çıkarmıştır. Bu mücadelede, tutum ve davranışları ile topluma rol model olan hekimler tarafından COVID-19 aşısının kabulünün belirlenmesi, önümüzdeki aşılamada çalışmalarını için de yol gösterici olacaktır.

Bu çalışmada hem topluma rol model olmaları

hem de uzaktan eğitim uygulamasından dolayı bu konu hakkında bilgiye ulaşmak için farklı kaynaklar kullanmaları nedeniyle ülkemizdeki tıp fakültesi öğrencilerinin, aşı, bağışıklama, aşı kararsızlığı ve COVID-19 aşısı konusundaki bilgi ve düşüncelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma tanımlayıcı tipte bir araştırmadır. Aralık 2020-Ocak 2021 tarihleri arasında Türkiye’de bulunan Avrupa Tıp Öğrencileri Birliği’ne (EMSA, European Medical Students’ Association) bağlı 33 “Öğrenci Toplulukları” (FMO, Faculty Member Organization) üyelerine ve bu üyeler aracılığıyla ülkemizdeki tıp fakültelerinde okuyan öğrencilere ulaşmak hedeflenmiştir. Veri toplama aracı olarak araştırmacılar tarafından literatür taraması sonucu geliştirilen, aşı, bağışıklama, aşı kararsızlığı ve Covid-19 aşısı hakkında bilgi ve düşünceleri değerlendiren bir anket kullanılmıştır.

COVID-19 pandemisinden dolayı ülkemizdeki üniversiteler Mart 2020’den beri uzaktan eğitim sistemi ile eğitim vermektedir. Öğrenciler fakültelerinde olmadıklarından yüz yüze veya gözlem altında anket yapılamamaktadır. Bu nedenle literatürde de tanımlanan “uygun örnekleme yöntemi (Convenience Sampling)” kullanılmaya çalışılmıştır. Bu örnekleme yönteminde, diğer örnekleme yöntemlerini kullanma olanağının olmaması ve araştırmanın konusu COVID-19 aşısı olduğu için zaman konusunda sınırlılıklar olması nedeniyle, erişilmesi kolay sistemler / kişiler üzerinden yararlanılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla uzaktan/ çevrim içi anketlerin tıp fakültesi öğrencilerine ulaşmada önemli bir yol olabileceği düşünülmüştür. Araştırma için hazırlanan çevrim içi anket linki, FMO üyeleri tarafından ulaşılabilen tüm tıp fakültesi öğrencilerine gönderilmiştir. Anket formu sistemde 15 gün ulaşılabilir kılınmış, ulaşılabilen kişilere en az 2 defa e-posta / sosyal medya / kişisel mesajlaşma servisleri kullanılarak bilgilendirme ve hatırlatma yapılmıştır. Sonuçta 1.015 tıp fakültesi öğrencisine ait

anket formu değerlendirmeye alınmıştır.

Çevrim içi anket formu toplamda 4 bölüm ve 42 sorudan oluşmaktadır. Birinci bölümde katılımcılara sosyodemografik ve sağlık durumu ile ilgili sorular (Cinsiyet, yaş, sınıf, yaşanılan şehir, birlikte yaşanılan kişiler, medeni durum, çocuk sahibi olup olmama, kronik hastalık durumu, düzenli kullanılan ilaç olup olmadığı, birlikte yaşanılan kişilerin kronik hastalık durumu, COVID-19 şüphesi ile hekim başvurusu olup olmadığı, COVID-19 tanısı alıp almadığı, COVID-19 pandemisi sürecinde temaslı olup karantina uygulanıp uygulanmadığı), ikinci bölümde aşı ve bağışıklama ile ilgili bilgi ve düşüncelerini (Çocukluk çağı aşılarının tam olarak yaptırılıp yaptırılmadığı, erişkin dönemde aşı yaptırap yaptırmadığı, yaptırmış ise hangi aşilar olduğu, aşı/ bağışıklama ile yeterli bilgiye sahip olup olmama konusunda düşünceleri, ülkemizin Ulusal Aşı Takvimi'nde yer alan aşilar, ülkemizde uygulanan "standart, tek tip" Ulusal Aşı Takvimi hakkındaki düşünceleri, aşiların bulaşıcı hastalıkları önleme konusunda etkili olup olmadığı hakkındaki düşünceleri, toplumdaki aşıli bireylerin sayısının artmasının, aşılanmamış bireylerin hastalık etkeniyle temas olasılığını ve hastalığın o toplumda görülme sıklığını nasıl etkilediği konusundaki düşünceleri, aşiların önemi ve güvenilirliği konusundaki düşünceleri, bulaşıcı hastalıkları önleme konusundaki düşünceleri, bir çocuğa aşı yaptıрма-yaptırmama kararını kim vermelii konusundaki düşünceleri, aşilara karşı düşüncelerini etkileyen faktör / faktörlerin neler olduğu, mevsimsel grip aşısı hakkındaki tutum ve davranışları), üçüncü bölümde aşı kararsızlığı ile ilgili düşüncelerini (Ülkemizdeki aşı kararsızlığı hakkındaki düşünceleri, ülkemizde aşı kararsızlığının en önemli nedeni, aşı kararsızlığına neden olan en önemli faktör, aşı kararsızlığının önlenmesi / azaltılması için alınması gereken önlemler, toplumda kararsızlığının yaygınlaşması durumunda; toplum sağlığının nasıl etkileneceği konusundaki düşünceleri, hekimlik uygulamaları sırasında aşı kararsızlığı ile karşılaşma durumunda nasıl bir yol izleneceği düşüncesi) ve dördüncü bölümde ise katılımcılara COVID-19 aşısı ile

ilgili düşüncelerini (COVID-19 aşı çalışmalarını takip edip etmedikleri, COVID-19 aşısı Sağlık Bakanlığı tarafından kullanıma uygun olduğu bildirildiğinde yaptırap yaptırmama ile ilgili düşünceleri, COVID-19 aşısını yaptırmayı düşünürlerse nedenlerinin ne olduğu, COVID-19 aşısını yaptırmamayı düşünürlerse nedenlerinin ne olduğu, COVID-19 aşısını yakınlarına (aile / arkadaş / akraba) önerip önermeme ile ilgili düşünceleri) değerlendiren sorular yöneltilmiştir.

Araştırmaya başlamadan önce Sağlık Bakanlığı Bilimsel Araştırma Platformu'ndan (09.12.2020 tarihli) ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay (25.01.2021 tarih ve KTÜ-BAEK 2020/368-6 nolu karar) alınmıştır.

Verilerin analizinde SPSS 23,0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Çalışmada tanımlayıcı veriler sayı ve yüzde olarak sunulmuştur. Kategorik verilerin analizinde ki-kare testi kullanılmıştır. İki'den fazla grup karşılaştırmalarında (çok gözülü tablolarda) istatistiksel anlamlılık ortaya çıktığında, gruplar arası fark/farkların hangi durumlardan kaynaklandığını belirleyebilmek için SPSS "Custom tables" komutu kullanılarak post hoc analiz yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık seviyesi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya 1015 kişi katılmıştır. Katılımcıların %64,7 (n=657)'si kadın, %35,3 (n=358)'ü erkektir. Katılımcıların yaş ortalaması $21,2 \pm 2,5$ yıl (17-49) olarak belirlenmiştir. Katılımcıların %59,3 (n=602)'ü klinik öncesi (hazırlık, dönem 1, 2 ve 3), %40,7 (n=413)'si klinik dönem (dönem 4, 5 ve 6) öğrencisidir. Katılımcılara ait diğer sosyodemografik özellikler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Çalışmaya katılan öğrencilerin %8,3 (n=84)'ünün kronik hastalığı bulunmakta ve %14,9 (n=151)'ü düzenli ilaç kullanmaktadır. %35,1 (n=356)'i birlikte yaşadığı kişilerden en az birinin kronik hastalığa sahip olduğunu belirtmiştir. COVID-19 şüphesi ile hekime başvuranların oranı %23,5 (n=239) olup tüm katılımcıların %10,0 (n=101)'i kesin COVID-19 tanısı

Tablo 1. Katılımcıların sosyodemografik özellikleri (N=1015)

Özellikler	Seçenekler	n	%
Cinsiyet	Kadın	657	64,7
	Erkek	358	35,3
Yaş (Ortalama ± SS)	21,2 ± 2,5 (Yıl)		
Sınıf	Hazırlık	11	1,1
	Dönem 1	253	24,9
	Dönem 2	235	23,2
	Dönem 3	103	10,1
	Dönem 5	93	9,2
	Dönem 4	54	5,3
	Dönem 6	266	26,2
Yaşanılan şehir	İstanbul	192	18,9
	Trabzon	159	15,7
	Ankara	106	10,4
	İzmir	39	3,8
	Samsun	38	3,7
	Bursa	30	3,0
	Diğer	451	44,5
Birlikte yaşanılan kişi/kişiler	Aile ile	731	72,0
	Akraba ile	8	0,8
	Arkadaş ile	138	13,6
	Yalnız	138	13,6
Medeni durum	Bekar	1005	99,0
	Evli	10	1,0

almıştır. Temaslı durumunda olup karantina uygulanan kişi sayısı 249 (%24,5)'tir (Tablo 2).

Katılımcılarının %87,2 (n=885)'si çocukluk çağı aşılarının tam olarak yaptırıldığını, %1,8 (n=18)'i yaptırılmadığını, %11,0 (n=885)'i ailesinin hatırlamadığını veya bu konu hakkında bilgisinin olmadığını belirtmiştir. Erişkin dönemde aşı yaptırılanların oranı ise %34,5 (n=350) olup yaptırılan aşılardan Hepatit A, Hepatit B, Kızamık-Kızamıkçık-Kabakulak (KKK), Pnömonik, Meningokok, Hpv, Kuduz, Tetanoz ve İnfluenza aşılardır. Çalışmamıza

katılan öğrenciler arasında, genişletilmiş bağışıklama programı, aşı takvimi, aşı türleri, aşıların içerikleri, aşılarla ilgili olası yan etkiler, aşı yapılmadığı takdirde ortaya çıkabilecek riskler konusunda yeterli bilgiye sahip olup olmadığını düşünenlerin dağılımı Tablo 3'te gösterilmiştir. Toplumsal bağışıklık hakkında yöneltilen "Toplumdaki aşılu bireylerin sayısının artması, aşılanmamış bireylerin hastalık etkeniyle temas olasılığını ve hastalığın o toplumda görülme sıklığını nasıl etkiler?" sorusuna katılımcıların %84,6 (n=859)'sı "azaltır" yanıtını vermiştir.

Tablo 2. Katılımcıların ve birlikte yaşadıkları kişilerin sağlık durumu ile ilgili özellikler (N=1015)

Özellikler	Seçenekler	n	%
Kronik hastalık varlığı	Evet	84	8,3
	Hayır	931	91,7
Düzenli kullanılan ilaç	Evet	151	14,9
	Hayır	864	85,1
COVID-19 şüphesi ile hekim başvurusu	Evet	239	23,5
	Hayır	776	76,5
COVID-19 tanısı alma	Evet	101	10,0
	Hayır	914	90,0
Karantina durumu	Evet	249	24,5
	Hayır	766	75,5

Tablo 3. Katılımcıların aşı ve bağışıklama ile ilgili bilgi sahibi olma durumları (N=1015)

Özellikler	Seçenekler	n	%
Genişletilmiş aşılama programı/Aşı takvimi ile ilgili bilgi sahibi olma	Evet	504	49,7
	Hayır	511	50,3
Aşı türleri ile ilgili bilgi sahibi olma	Evet	604	59,5
	Hayır	411	40,5
Aşıların içeriği ile ilgili bilgi sahibi olma	Evet	439	43,3
	Hayır	576	56,7
Aşıların olası yan etkileri ile ilgili bilgi sahibi olma	Evet	558	55,0
	Hayır	457	45,0
Aşı yapılmadığı zaman ortaya çıkabilecek riskler konusunda bilgi sahibi olma	Evet	774	76,3
	Hayır	241	23,7

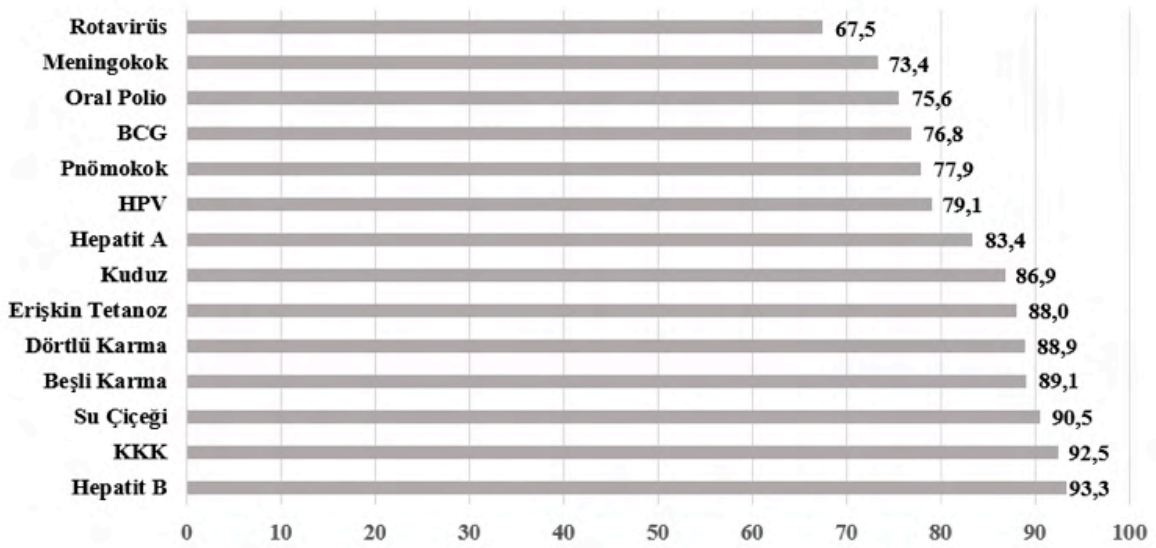
Aşı ve bağışıklama ile ilgili düşünceler incelendiğinde katılımcıların %43,5 (n=442)'i "Standart, tek tip" ulusal aşı takvimini doğru bulurken %48,2 (n=489)'si bu konuda kararsız olduğunu ve %8,3 (n=84)'ü ise doğru bulmadığını belirtmiştir. Aşıların bulaşıcı hastalıkları önleme konusunda etkili olduğunu düşünenlerin oranı ise %93,5 (n=949)'dur. Katılımcıların %70,0'ı (n=711) aşılarla karşı olumlu düşüncelere sahip olmalarını en çok etkileyen faktörün aşıların zararından çok yararının olması olduğunu belirtmiştir. Olumsuz düşüncelere sahip

olmalarını en çok etkileyen faktörün ise aşıların firmalar tarafından ticari amaçlı üretilmesi ve aşıların ülkemizde üretilmemesi olduğunu belirtmişlerdir. Bir çocuğa aşı yaptıрма/yaptırmama kararını kim vermeli sorusunda en çok tercih edilen seçenekler Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı (%80,8), Enfeksiyon Hastalıkları Uzmanı (%63,6) ve Aile Hekimi (%50,6) olmuştur. Mevsimsel grip aşısına karşı tutum ve davranışlar incelendiğinde katılımcıların %25,5 (n=259)'i hayatı boyunca en az bir defa grip aşısı yaptırdığını, %22,8 (n=231)'i hayatı boyunca hiç

yaptırmadığını ancak yaptırmayı düşündüğünü, %51,8 (n=525)'i ise hayatı boyunca hiç yaptırmadığını ve yaptırmayı da düşünmediğini belirtmiştir.

Şekil 1'de katılımcıların bazı aşıların önemi hakkındaki düşünceleri gösterilmiştir. Hepatit B aşısı %93,3 oranla en çok katılımcı (n=947) tarafından önemli görülen aşı olmuştur. Şekil 2'de katılımcıların aşıların

güvenilirliği hakkındaki düşünceleri gösterilmiştir. Katılımcıların %82,6'sı (n=838) aşıların uygulama şeklini güvenli bulurken, %21,5 (n=218)'i aşıları olası yan etkileri nedeniyle güvenilir bulmadığını ve %40,6 (n=412)'sı ise aşıların içeriğinde bulunan kimyasal maddeler nedeniyle güven konusunda kararsız olduğunu belirtmiştir.



Şekil 1. Katılımcıların aşıların önemlilik durumu hakkındaki düşünceleri (n=1015)



Şekil 2. Katılımcıların aşıların güvenilirliği hakkındaki düşünceleri (n=1015)

Aşı kararsızlığı ile ilgili düşünceler incelendiğinde katılımcıların %86,4 (n=877)'ü ülkemizdeki aşı kararsızlığı sayısının zamanla arttığını düşünmektedir. Aşı kararsızlığına neden olan en önemli faktör olarak katılımcıların %45,2 (n=459)'si medya araçlarının, %24,2 (n=246)'si toplumda rol model olarak kabul edilen insanların aşılardan hakkındaki olumsuz ifadelerinin, %13,6 (n=138)'si ise geleneksel tıp sempatizanlarının aşılardan hakkındaki düşüncelerinin olduğunu belirtmişlerdir. Ülkemizdeki aşı kararsızlığının en önemli nedenleri olarak katılımcıların %87,1 (n=884)'i medyada aşılardan ile ilgili olumsuz ifadeler okuma-duyma olduğunu, %82,7 (n=839)'si aşılardan içeriğine güvenmemeye olduğunu, %77,5 (n=787)'i ilaç-aşı şirketleri hakkında olumsuz düşüncelere sahip olma olduğunu, %68,1 (n=691)'i ise aşılardan yan etkilerine yönelik duyulan endişe olduğunu belirtmişlerdir. Toplumda aşı kararsızlığının yaygınlaşması durumunda katılımcıların %87,3 (n=886)'ü bulaşıcı hastalık salgınlarının artacağını düşünmektedir. Katılımcılara göre aşı kararsızlığının önlenmesi/azaltılması için alınması gereken en etkili önlemler; ebeveynlere aşılama/bağışıklama ile ilgili

eğitim verilmesi, devletin konuya sahip çıkarak sahiplenici bir rol üstlenmesi ve aşılardan güvenli olduğuna yönelik bilimsel araştırmalar yapılması şeklinde belirlenmiştir. Hekimlik uygulamaları sırasında aşı kararsızlığı ile karşılaşmaları durumunda katılımcıların %46,9 (n=476)'u kişi/kişileri ikna edemezse gerekli makamlara durumu bildireceğini, %44,9 (n=456)'u kişi/kişileri ikna edemezse kararlarına saygı duyacağını, %8,2 (n=83)'si karara saygı duyup hiçbir şey yapmayacağını belirtmiştir.

Tablo 4'te katılımcıların COVID-19 aşısı ile ilgili düşünceleri gösterilmiştir. Aşının Sağlık Bakanlığı tarafından kullanıma uygun olduğu bildirildiğinde katılımcıların %53,4 (n=542)'ü hemen yaptırmayı bekleyeceğini belirtmiştir. COVID-19 aşısını yaptırmayı yaptırmama konusundaki düşünceler incelendiğinde aşığı yaptırmayı düşünenlerin (n=296) %69,5 (n=206)'i hastalığın yayılmasını engellemek için aşığı yaptıracığını belirtmiştir. COVID-19 aşısını yaptırmamayı düşünenlerin (n=27) ise %97,0 (n=26)'ı aşının yan etkilerinin olup olmayacağı konusundaki endişelerinden dolayı aşığı yaptırmayacağını belirtmiştir.

Tablo 4. Katılımcıların COVID-19 aşısı ile ilgili düşünceleri (N=1015)

Özellikler	Seçenekler	n	%
COVID-19 aşısı çalışmalarını	Evet, ara sıra takip ediyorum	627	61,8
	Evet, yakından takip ediyorum	342	33,7
	Hayır, hiç ilgilenmiyorum	46	4,5
COVID-19 aşısının hangi ülke tarafından geliştirildiği sizin için önemli midir?	Evet	600	59,1
	Hayır	415	40,9
Çalışmaları devam eden COVID-19 aşısını Sağlık Bakanlığı tarafından kullanıma uygun olduğu bildirildiğinde:	Hemen yaptırmam, beklerim	542	53,4
	Hemen yaptırmam	296	29,2
	Kararsızım	150	14,8
	Asla yaptırmam	27	2,7
COVID-19 aşısını yakınlarınıza (aile / arkadaş / akraba) önerir misiniz?	Evet	527	51,9
	Kararsızım	438	43,2
	Hayır	50	4,9

Tablo 5'te katılımcıların bazı özelliklerine göre COVID-19 aşısını yaptırap yaptırmama konusundaki düşünceleri gösterilmiştir. Katılımcıların kronik hastalığa sahip olup olmama durumlarına göre COVID-19 aşısını yaptırap yaptırmama konusundaki düşünceleri ki-kare testi ile karşılaştırıldığında arada istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p=0,011$). Gruplar arasındaki fark/farkların hangi durumlardan kaynaklandığını belirleyebilmek için SPSS "Custom tables" komutu kullanılarak post hoc analiz yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda kronik

hastalığa sahip olan ve olmayan iki grupta "Hemen yaptırmam" yanıtını verenler arasında (Kronik hastalığa sahip olanların %42,9 (n=36)'u, kronik hastalığa sahip olmayanların ise %27,9 (n=260)'u "Hemen yaptırmam" yanıtını vermiştir.) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,004$). Aynı analiz sonucunda aynı iki grupta "Kararsızım" yanıtını verenler arasında da (Kronik hastalığa sahip olanların %6,0 (n=5)'i, kronik hastalığa sahip olmayanların ise %15,6 (n=145) 'sı "Kararsızım" yanıtını vermiştir.) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p=0,017$).

Tablo 5. Katılımcıların bazı özelliklerine göre COVID-19 aşısını yaptırap yaptırmama konusundaki düşünceleri

Özellikler	Seçenekler	COVID-19 Aşısını hemen yaptırmam		COVID-19 Aşısını hemen yaptırmam, beklerim		COVID-19 Aşısını asla yaptırmam		Kararsızım		p
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Cinsiyet	Kadın	179	27,2	356	54,2	18	2,7	104	18,5	0,261
	Erkek	117	32,7	186	52,0	9	2,5	46	12,8	
Kronik hastalık varlığı	Evet	36	42,9*	41	48,8	2	2,4	5	6,0	0,011
	Hayır	260	27,9	501	53,8	25	2,7	145	15,6**	
*Posthoc p = 0,004, **Posthoc p = 0,017										
Düzenli ilaç kullanma durumu	Evet	55	36,4	72	47,7	2	1,3	22	14,6	0,139
	Hayır	241	27,9	470	54,4	25	2,9	128	14,8	
Birlikte yaşanılan kişilerde kronik hastalık durumu	Evet	96	27,0	195	54,8	10	2,8	55	15,4	0,726
	Hayır	200	30,3	347	52,7	17	2,6	95	14,4	
COVID-19 tanısı alma	Evet	29	28,7	54	53,5	8	7,9*	10	9,9	0,004
	Hayır	267	29,2	488	53,4	19	2,1	140	15,3	
*Posthoc p = 0,001										
Herhangi bir yakınının (aile/ arkadaş / akraba) COVID-19 tanısı alması	Evet	248	28,5	473	54,4	21	2,4	127	14,6	0,325
	Hayır	48	32,9	69	47,3	6	4,1	23	15,8	
COVID-19 pandemisi döneminde temaslı durumda olup karantina uygulanması	Evet	62	24,9	141	56,6	10	4,0	26	14,5	0,172
	Hayır	234	30,5	401	52,3	17	2,2	114	14,9	

Katılımcıların COVID-19 tanısı alıp almama durumlarına göre COVID-19 aşısını yaptırmayı yaptırmama konusundaki düşünceleri ki-kare testi ile karşılaştırıldığında arada istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p=0,004$). Gruplar arasındaki fark/farkların hangi durumlardan kaynaklandığını belirleyebilmek için SPSS “Custom tables” komutu kullanılarak post hoc analiz yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda COVID-19 tanısı alan ve almayan iki grupta “Asla yaptırmam” yanıtını verenler arasında (COVID-19 tanısı alanların %7,9 ($n=8$)’u, COVID-19 tanısı almayanların ise %2,1 ($n=19$)’i “Asla yaptırmam” yanıtını vermiştir.) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,001$). Katılımcılardan COVID-19 hastalık tanısı alanların %33,6 ($n=34$)’sı, hastalık tanısı almayanların ise %33,7 ($n=308$)’si COVID-19 aşısını yakından takip etmektedir. Yapılan analiz sonucunda hastalık tanısı alanlar ile almayanlar arasında COVID-19 aşısını takip etme davranışları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,977$).

Katılımcıların klinik öncesi dönem ve klinik dönemde olmalarına göre COVID-19 aşısını yakınlarına

önerip önermeme konusundaki düşünceleri ki-kare testi ile karşılaştırıldığında arada istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p=0,010$). Gruplar arasındaki fark/farkların hangi durumlardan kaynaklandığını belirleyebilmek için SPSS “Custom tables” komutu kullanılarak post hoc analiz yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda klinik dönemde olanlar ve klinik öncesi dönemde olanlar şeklindeki iki grupta “Öneririm” yanıtını verenler arasında (Klinik dönemde olanların %57,1 ($n=236$)’i, klinik öncesi dönemde olanların ise %48,3 ($n=291$)’ü “Öneririm” yanıtını vermiştir.) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,006$). Aynı analiz sonucunda aynı iki grupta “Kararsızım” yanıtını verenler arasında da (Klinik dönemde olanların %39,5 ($n=163$)’i, klinik öncesi dönemde olanların ise %45,7 ($n=275$)’si “Kararsızım” yanıtını vermiştir.) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p=0,050$). COVID-19 hastalık tanısı alanlarla almayanlar arasında COVID-19 aşısını yakınlarına önermeyi düşünme açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,616$) (Tablo 6).

Tablo 6. Katılımcıların bazı özelliklerine göre COVID-19 aşısını tanıdıklarına önerip önermeme konusundaki düşünceleri

Özellikler	Seçenekler	COVID-19 aşısını yakınlarına önermeyi düşünenler		COVID-19 aşısını yakınlarına önermeyi düşünmeyenler		Kararsızlar		p
		n	%	n	%	n	%	
Dönem	Klinik Öncesi	291	48,3	36	6,0	275	45,7**	0,010
	Klinik	236	57,1*	14	3,4	163	39,5	
Posthoc p* = 0,006, Posthoc p** = 0,050								
COVID-19 tanısı alma	Evet	51	50,5	7	6,9	43	42,6	0,616
	Hayır	476	52,1	43	4,7	395	43,2	

TARTIŞMA ve SONUÇ

Milyonlarca çocuğun yaşamını kurtaran ve engelli kalmalarını önleyen aşılarda günümüzde bulaşıcı hastalıkların ve komplikasyonlarının önlenmesinde en etkili yöntemlerin başında gelmektedir. Aşılama programları sayesinde özellikle yüksek ve orta gelirli ülkelerde aşı ile önenebilir hastalıkların sıklıklarında çok büyük düşüşler sağlanmıştır (10). Ancak aşıyla önenebilir hastalıklara karşı verilen başarılı mücadele sonunda, bazı tehlikeli hastalıkların ciddi oranda yaşamımızdan çıkması, toplumun hafızasında bu hastalıkların büyük risklerinin giderek silikleşmesine, bunun sonucunda da risk-fayda hesaplamalarında aşılarda risklerinin daha büyük endişe kaynağı haline gelmesine neden olmuştur (11).

Bu çalışmada ülkemizdeki tıp fakültesi öğrencilerinin aşı, bağışıklama, aşı kararsızlığı ve COVID-19 aşısı konusundaki bilgi ve düşüncelerinin incelenmesi amaçlanmış olup öğrencilerin bu konudaki görüşleri COVID-19 aşısı uygulamasına başlamadan hemen önce değerlendirilmiştir.

Toplumda aşılarda konusunda önemli/önemsiz ayrımı yapılmakta ve bireyler kendilerince önemli gördükleri aşılarda yaptırmakta ancak yeni çıkmış, yaygın görülmeyen, nasıl bir koruyuculuğunun olacağını bilmediği aşılarda tereddüt göstermektedir. Ölümcül olduğu, tedavisinin olmadığı düşünülen hastalıklara yönelik üretilen aşılarda ise önemli olduğu düşünülmekte ve risk alınmak istenmemektedir. Diğer yandan içerdikleri kimyasal maddeler sebebiyle bazı hastalıklara neden olduğu düşünülen aşılarda konusunda ise yaptırılmama yolu izlenmektedir. Literatüre baktığımız zaman özellikle 20.yy'da aşı ile ilgili tartışmaların temelinde iki farklı aşılama uygulamasına (Difteri-Boğmaca-Tetanoz (DBT) ve KKK) yönelik duyulan güvensizlik yatmaktadır. Hollanda'da yapılan bir çalışmada özellikle otizme yol açabileceği endişesi ile KKK aşısına karşı kararsızlık yaşandığı belirlenmiştir (12). Bir üniversite hastanesindeki hekimlerin bağışıklamayla ilgili tutumlarını incelemek amacıyla yapılmış bir çalışmada hekimlerin %10,5'i aşı konusunda tereddütte sahip olduğunu belirtmiştir.

Bunların %12'si Genişletilmiş Bağışıklama Programı (GBP) çerçevesinde uygulanan aşılarda yönelik tereddütte sahipken, %88'inin GBP çerçevesi dışında uygulanan aşılarda ilgili tereddütte sahip olduğu görülmüştür (13). Yapılan bu çalışmada ise tıp fakültesi öğrencilerinin genel olarak aşılarda önemli olduğunu düşündükleri görülmüştür (Tablo 4).

Yaptığımız bu çalışmada katılımcıların %86,4'ü ülkemizde aşı kararsızlığının arttırdığını ve %87,3'ü de aşı kararsızlığının yaygınlaşması durumunda salgınların artacağını belirtmişlerdir.

Ülkemizde aşı kararsızlığına yönelik sosyodemografik özelliklerin etkisi ile tek bir tipoloji belirlemek mümkün değildir. Ege Üniversitesinde yapılan bir çalışmada sağlık çalışanlarının H1N1 pandemisinde, aşı yaptırmama konusunda kadınlarla erkekler arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (14). Fransa'da yapılan bir çalışmada ise pratisyen hekimlerin ve aile hekimlerinin H1N1 pandemisinde, aşılara karşı tutumlarında aşı yaptırmama konusunda kadınlarla erkekler arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (15). Malta'da yapılan çalışmada, erkeklerin COVID-19 aşısını yaptırmama konusunda daha istekli olduğu görülmüştür (16). Yapılan çalışmalarda cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ancak kadınlar için aşı yaptırmaya engel olabilecek gebelik ve emzirme durumlarının dikkate alınmadığı görülmüştür. Bizim yaptığımız çalışmada COVID-19 aşısını hemen yaptırmama seçeneğini erkekler kadınlara oranla daha fazla tercih etmiş ancak aşılara karşı tutumlarda cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Aşı ile ilgili toplumsal tereddütler toplumun çok farklı kesimlerinin ve farklı niyetlerin (dini söylemlerde bulunma, ticari kazanç sağlama, popülerliği artırma gibi) etkisi ile ortaya çıkabilmektedir (17). Bu farklı kesimlerin görüşlerini paylaşmasında ise medya önemli bir araçtır. Farklı medyaların aşılara özendirici yayınlarının, aşılarda kabullenilmesini artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Ma K. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre ABD'de 2003-2004 yıllarında haftalık influenza aşılama hızı, medyada destekleyici şekilde yer almasıyla birlikte %2,4'ten %8,6'ya çıkmıştır (18). Benzer şekilde medyada aşılarda ilgili şüphe

oluşturan yayınlar yer aldığında, aşı kararsızlığı da artış göstermektedir. ABD’de yapılan bir araştırma çocuklarını bilinçli olarak aşılantmayan ailelerin, aşılama takvimine uyan ailelere göre anlamlı derecede daha fazla şekilde medyadaki aşı karşıtı yayınları okudukları ya da dinledikleri gösterilmiştir (19). Ayrıca aşılarla ilgili bilgi kirliliği ebeveynleri korkutarak aşılama oranlarının düşmesine ve pek çok bulaşıcı hastalığın salgınlar halinde tekrar ortaya çıkmasına neden olmaktadır (20). Yaptığımız bu çalışmada ise aşı kararsızlığına neden olan faktörler konusunda katılımcıların %45,2’si medya araçlarının önde geldiğini ve aşı kararsızlığının en önemli nedeni konusunda katılımcıların %87,1’i medyada aşılarla ilgili olumsuz ifadeler okuma veya duyma olduğunu belirtmiştir. Medya ve iletişim alanına yönelik, sosyal medyada farklı paylaşım ortamlarında aşı ile ilgili içeriklere anında doğru ve güvenilir yanıt verecek birimler oluşturulabilir, televizyon programlarına aşı ile ilgili çalışan akademisyenlerin katılımı sağlanabilir, kamu spotları oluşturulabilir ve “neden aşı yaptırılmalı” sorusuna bilimsel, açıklayıcı ve güncel yanıtlar üretilmesi sağlanabilir.

Ülkemizde aşı konusunda bireylerin kafalarını karıştıran en önemli unsurlardan birinin aşıların içinde bulunan tiyomersal veya alüminyum gibi koruyucu bileşenlere ilişkin kuşular olduğu görülmektedir. Binlerce çocuk üzerine yapılan analizler thimerosal maddesinin insan vücudu için herhangi bir yan etki yaratmadığını kanıtlamıştır ancak bütün bu bilimsel verilere rağmen aşı karşıtı bazı gruplar tarafından oluşturulan psikolojik baskı ve korku algısı sayesinde civa günümüzde birçok aşının içeriğinden çıkarılmıştır (21). Benzer şekilde aşılarla alınan düşük miktarlardaki alüminyumun insan sağlığına negatif bir etkisi bilimsel çalışmalarca gösterilmiş değildir, aynı zamanda her insan ortalama 7-9 mg alüminyumu besinlerden, havadan ve içme suyundan günlük yaşamında zaten almaktadır (20).

Aşıların içeriğine güvenmeme konusunda önemli etkenlerden birisi, özellikle dini konuda hassasiyetleri olan kesimin, aşı içeriğinde olduğunu düşündüğü domuz ürünleri ile ilgilidir. İstanbul’da bulunan dört ilçedeki

(Esenyurt, Bağcılar, Başakşehir, Küçükçekmece) Aile Sağlığı Merkezlerinde yapılan çalışmada, katılımcıların büyük çoğunluğu aşıların dinen sakıncalı olduğunu (%64) belirtmişlerdir (22). Yaptığımız bu çalışmada ise aşı kararsızlığının en önemli nedeni konusunda katılımcıların %30,4’ü dini görüşlerin etkili olduğunu belirtmiştir. Buradaki hassasiyeti anlayan, ona göre çalışmalar ve açıklamalar getirmeye çalışan bir bakış açısının üretilmesi konu ile mücadele açısından oldukça önemlidir.

Ülkemizde bazı aşıların ücretli, bazı aşıların ücretsiz olması toplumda kafa karışıklığı yaşanmasına yol açmaktadır. Özellikle bazı aşıların paralı olması, maddi imkansızlığı olan bireyler için baştan sorunlu görülmekte ve aşıların “toplumsal yararı” iddiası sorgulanmaktadır. Bununla birlikte bazı aşıların ücretsiz olması da sorgulanmakta ve altında başka nedenlerin olduğu düşünülmektedir. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde Kadın Hastalıkları ve Doğum stajını yapmış öğrencilerde yapılan bir çalışmada HPV aşısını önermeyi düşünen öğrencilerdeki çekincelere neden olan faktörlerin dağılımında, HPV aşısının çok pahalı olması %51,6 oranında en etkili faktör olarak bulunmuştur (23). Edirne ilinde aile sağlığı elemanlarının bağışıklama hizmetleri ve aşı tereddüdüne ilişkin bilgilendirme ve tutum geliştirilmesi amacıyla yapılan bir müdahale çalışmasında sağlık çalışanlarının %14,5’i ihtiyaç duymalarına rağmen aşıların ücretleri nedeniyle kendi çocuklarını aşılatamadıklarını belirtmişlerdir (24). Düzenli bir gelir sahibi olan sağlık çalışanlarında dahi ücret nedeniyle kimi aşıların yaptırılmaması önemli bir sorundur. Yaptığımız bu çalışmada ise aşılarla karşı düşünceleri etkileyen faktörler sorusuna katılımcıların %14,4’ü bazı aşıların ücretli olduğunu belirtmiştir. Kararsızlığa neden olması açısından ücret konusunun ele alınıp toplumun bu konudaki kafa karışıklığı giderilmelidir.

Doktorlar ve ilaç firmaları arasındaki ilişkiler, kapitalist sistemin doğası, sağlığın aşılar da dahil çok ticari bir alan olarak görülmesi ve kar-zarar mantığı ile işleyen bir sistem ve bu sistemin en önemli aktörleri olan doktora güvenmeme aşı kararsızlığına ilişkin

iklimin oluşmasına neden olmaktadır. İstanbul'da bulunan dört ilçedeki (Esenyurt, Bağcılar, Başakşehir, Küçükçekmece) Aile Sağlığı Merkezlerinde yapılan çalışmada kurumlara/hekimlere duyulan güvensizliğin bireylerin aşı yaptırmayı yaptırmama kararını etkileyen faktörler arasında olduğu belirlenmiştir (22). Yaptığımız bu çalışmada da aşı kararsızlığının en önemli nedenleri konusunda katılımcıların %44,3'ü sağlık sistemine/doktorlara duyulan güvensizlik olarak belirtmiştir. "Tıp camiasına" güvenmiyor olmak; aşı konusunda karar vermesi gereken kişinin bireyin kendisi olması gerektiği düşüncesini geliştirmektedir. Düşük güven duygusu, kurumların açıklamalarını yeterince önemsememeye neden olmaktadır. Devletin şeffaf bir mekanizma kurması, kuracağı mekanizmalar aracılığı ile ikna edici bir kampanya başlatması, aşya ilişkin olası yan etkilerin açıklanması güvenin yeniden kazanılması açısından önemlidir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; çocuklara Tamamlayıcı Alternatif Tıp (TAT) uygulaması sıklığı %46-%77 düzeylerinde saptanmıştır. TAT uygulamalarının olumsuz etkileri arasında bradikardi, beyin hasarı, kardiyojenik şok, diyabetik koma, ensefalopati, karaciğer yetmezliği, solunum yetmezliği, toksik hepatit ve ölüm sayılmıştır. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi son sınıf öğrencileri üzerinde yapılan bir araştırmaya göre tıp fakültesi son sınıf öğrencilerinin %23'ü "Sizce aşı reddine neden olan en önemli faktör hangisidir?" sorusuna alternatif tıp sempatizanlarının neden olduğunu belirtmiştir (25). Yaptığımız bu çalışmada ise bu oran %13,6'dır. Yapılan çalışmalarda yeterli ve geçerli kanıt olmaksızın kullanılan alternatif uygulamaların çocukların ve ergenlerin sağlığı için önemli risk oluşturacağı belirtilmekte (26) ve bu yöntemleri uygulayan kişilerin büyük çoğunluğunun eğitimsiz, sertifikasız ve devlet kontrolünden uzak olması ülkemiz için büyük tehlike oluşturmaktadır (27).

Günümüz ebeveynleri, özellikle eğitilmiş, medyayı iyi takip eden, interneti etkin kullanan anne-babalar çocuklarının sağlığı ile ilgili kararlara ve uygulamalara daha katılımcı olmayı talep etmektedirler. Çocuklarının sağlığına ilişkin yapılacak her türlü girişim ve pratiğin gerekçesini öğrenmek istemekte

ve kendilerine bir yol bulunarak açıklanmasını talep etmektedirler. Bu kapsamda iletişim konusu büyük önem kazanmaya başlamış ve sağlık çalışanlarının bu iletişim yollarını etkin kullanmalarının önemli olduğu anlaşılmaktadır. Niğde ili Merkez ilçesine bağlı Aile Sağlığı Merkezlerinde (ASM) görev yapan aile sağlığı çalışanları ve Sağlık Evlerinde görev yapan sağlık evi personeli üzerinde yapılan bir çalışmada katılımcıların %76'sı aşılar ve yaptırmazsa ortaya çıkabilecek olumsuz sonuçlarla ilgili bilgilendirme yapacağını, %28'i ikna etmeye çalışacağını, %15'i kararın ebeveyne ait olduğunu belirtmişlerdir (28). Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi son sınıf öğrencileri üzerinde yapılan çalışmada, öğrencilerin yarısının çocuklarını aşılatmayı kabul etmeyen aileleri ikna etme konusunda ısrarcı olmadıkları ve çekingen davranış sergiledikleri belirlenmiştir (25). Yaptığımız bu çalışmada ise klinik öncesi dönemdeki öğrencilerin %51,3'ü aileyi çocuklarına aşı yaptırmaları için ikna etmeye çalışacağını, ısrar ederlerse kararlarına saygı duyup başka bir şey yapmayacağını, klinik dönemdeki öğrencilerin ise %59,6'sı aile ikna çabalarına rağmen aşya reddederse gerekli makamlara durumu bildireceğini belirtmiştir. Sağlık profesyonellerinin en önemli rolü, ebeveynlerin endişelerini etkili bir şekilde ele alabilmek için bu endişeleri anlamak ve ebeveynlere çocuklarının aşı ile önlenabilir bulaşıcı hastalıklara karşı en uygun korumayı seçmelerine yardımcı olmaktır (29). Bu ise özel iletişim stratejilerini gerektirir. Sağlık çalışanları ebeveynlerin aşı endişelerini giderebilmek için, bilimsel ve doğru bilgileri açık ve kolay anlaşılır şekilde aktarabilmelidirler. Bu açıdan sağlık çalışanları bilimsel bilgilere ulaşma, sözlü ve sözsüz etkili iletişim tekniklerini kullanabilme konusunda desteklenmelidirler (30).

Salgının başlangıç döneminde İstanbul'da bir Tıp Fakültesi öğrencilerinin COVID-19 hakkında bilgi ve görüşlerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada katılımcıların yaklaşık %80'i piyasada aşı olduğu takdirde aşılacağını belirtmiştir (31). Yaptığımız bu çalışmada, aşının Sağlık Bakanlığı tarafından kullanıma uygun olduğu bildirildiğinde öğrencilerin %29,2'si hemen yaptıracığını belirtmiştir.

2009 yılında H1N1 pandemisinde Türkiye’de üniversite öğrencilerinde aşılama sıklıklarının %7,2-11,9 (32, 33), tıp fakültesi öğrencilerinde ise %9,6 (34) olduğu düşünülürse, öğrencilerin aşılama konusunda oldukça motive olduğu çıkarımı yapılabilir.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde görevli hekim ve hemşireler üzerinde, sağlık çalışanlarının kendilerine yönelik uygulanması gereken aşılarla karşı tutum ve davranışlarını incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada kronik hastalığı olanların tutum puanlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum sağlık kaygılarının artmış olmasından ve enfeksiyonlardan korunmak için bağışıklanmayı etkin bir yol olarak görmelerinden kaynaklanıyor olabilir. Yaptığımız bu çalışmada kronik hastalığı olanların %42,9’u, olmayanların %27,9’u COVID-19 aşısını hemen yaptıracaklarını belirtmiştir ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (35).

İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi’nde sağlık personelleri üzerinde yapılan çalışmada COVID-19 aşısı konusunda tereddüt eden katılımcıların başlıca nedenleri aşıya güvenmemek ve yan etkileri konusunda endişelenmek olarak belirlenmiştir (36). Yaptığımız bu çalışmada da COVID-19 aşısını yaptırmamayı düşünenlerin %97’si aşının yan etkilerinin olup olmayacağı konusundaki endişelerinden dolayı aşıyı yaptırmayacağını belirtmiştir. Bu sonuç, sağlık çalışanlarının yeni çıkmış, nasıl bir koruyuculuğunun olacağına bilinmediği aşılar konusundaki endişelerini gösteren önceki çalışmaları doğrulamaktadır.

Aşı kararsızlığının önemli bir bileşeninin düşük risk algısı olduğu bilinmektedir. Edirne ilinde çalışmakta olan aile hekimleri ve il aşı yönetim ekibini bağışıklama ve aşı tereddütüne ilişkin bilgilendirme ve tutum geliştirilmesine yönelik yapılan bir müdahale çalışmasında katılımcıların %23,9’u çocuğunun/ çocuklarının, artık yaygın olmayan hastalıklar için aşılarla ihtiyaç duymadığını ifade etmiştir. Yaptığımız bu çalışmada katılımcılar çocuk sahibi değildi ancak ileride çocuk sahibi olduklarında Ulusal Aşı Takvimi’nde yer alan aşılarla karşı tutumları sorulmuştur. Katılımcıların %8,4’ü aşıları hiç yaptırmam veya bazılarını yaptırmam yanıtını vermiştir. Toplumla rol model olan hekimlerin

aşı ile önenebilir bulaşıcı hastalıkların riskini doğru değerlendirmeleri önemlidir. Bu doğrultuda hekimlere hizmet içi eğitimle aşı ile önenebilir hastalıklar sürveysından elde edilen bilgiler verilmelidir. Sürveys verileri kamuoyu ile paylaşılmalı, mezuniyet öncesi tıp eğitimi (MÖTE) ve mezuniyet sonrası tıp eğitimine (MSTE) kanıta dayalı bilgi sunma olanağı sağlanmalıdır (37).

Literatürde öğrenim düzeyi, konu ile ilgili alınan eğitimler ile bilgi seviyesi ve tutum arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Diyarbakır’da Aile Sağlığı Merkezi’nde yapılan bir çalışmada, aşıyı reddeden ebeveynlerin %18,4’ünün sağlık personeli olduğu saptanmış, sağlık personelinin de aşılama konusunda bilgilendirilmesi, eğitilmesi, aşı kampanyasının gerekliliğine inandırılmasının son derece önemli olduğu vurgulanmıştır (38).

Ülkemizde aşı uygulama konusunda zorunluluk söz konusu olmakla birlikte mevzuat eksikliği söz olup bu konuda yasal bir düzenleme yoktur. Edirne ilinde aile sağlığı elemanlarının bağışıklama hizmetleri ve aşı tereddütüne ilişkin bilgilendirme ve tutum geliştirilmesi amacıyla yapılan bir müdahale çalışmasında sağlık çalışanlarının %95’i aşılarla ilgili yasal düzenleme getirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Ancak yasal düzenleme ile ilgili dikkat edilmesi gereken, zorunluluk ile ilgili etik tartışmalar ve bireysel faydanın toplumsal faydayı zedelememesidir. Yapılan çalışmalarda mevzuat eksikliğinden dolayı toplum sağlığının bir nevi kişilerin insafına bırakıldığı ve kanun koyucuların bir an önce üzerine düşeni yapmaları gerektiği vurgulanmaktadır (39). Özellikle içinde bulunduğumuz COVID-19 pandemisi ile mücadele döneminde bu boşluğun doldurulması gerektiği ve konunun önemi bir kez daha anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızın en önemli ve güçlü yönü, güncel bir konu hakkında ülkemizdeki tüm tıp fakültelerinde öğrenim gören öğrencilerde yapılan geniş çaplı bir çalışma olmasıdır. Kısıtlılıkları ise COVID-19 pandemisi nedeniyle katılımcılarla yüze görüşülemediğinden çalışmanın çevrim içi ortam üzerinden yapılması ve dolayısıyla örneklem büyüklüğünün net belirlenememesidir. Tanımlayıcı

tipte olan bu araştırma için, katılan 1015 tıp fakültesi öğrencisinin, sonuçlar tamamen genellenebilir olmasa da konu hakkında genel bilgi vermesi açısından uygun ve yeterli olduğu düşünülmüştür.

Aşılar güveni artıracak stratejiler kapsamında aşıların üretim, saklama, dağıtım ve uygulama süreçlerinin tıp fakültesi öğrencileri de dahil olmak üzere tüm sağlık çalışanları ile uygun bir yöntemle paylaşılması, aşı hakkındaki bilgilerini artıracak, şüphelerini ve endişelerini giderecek ve böylece hem kendi aşılarını hem de topluma tavsiyelerini kolaylaştıracaktır. COVID-19 aşısı ile ilgili endişeler

çoğunlukla yeni bir aşı hakkındaki yetersiz bilgidir ve özellikle uzun vadede olası yan etkiler konusundaki endişelerden kaynaklanmaktadır. COVID-19 aşısının kabulü, süregelen pandeminin zamanla değişen morbidite ve mortalite değerlerine göre değişebilir.

Tıp fakültesi öğrencilerinin aşı, bağışıklama, aşı kararsızlığı ve COVID-19 aşısı konusundaki bilgilerini arttırmak amacıyla bu konuda düzenlenen kongre, sempozyum, toplantı ve eğitimlere katılımlarının sağlanması, ulusal sağlık sorunlarına duyarlı, toplum sağlığıyla ilgili becerilere sahip hekimler yetiştirilmesi açısından önemlidir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 25.01.2021 ve Sayı: KTÜ-BAEK 2020/368-6).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Fine P, Eames K, Heymann DL. "Herd immunity": a rough guide. *Clin Infect Dis.*, 2011; 52(7);911-6.
2. Haverkate M, D'Ancona F, Giambi C, Johansen K, Lopalco P, Cozza V, et al. Mandatory and recommended vaccination in the EU, Iceland and Norway: results of the VENICE 2010 survey on the ways of implementing national vaccination programmes. *Euro Surveill*, 2012; 17(22); 20183.
3. WHO. Maternal and Neonatal Tetanus Elimination. c.2020 (güncelleme Temmuz 2020; alıntılama 12 Ocak 2021 10:28)
4. Sweileh WM. Bibliometric analysis of global scientific literature on vaccine hesitancy in peer-reviewed journals. *BMC Pub Heal*, 2020; 20(1); 1-15.
5. MacDonald NE. Vaccine hesitancy: Definition, scope and determinants. *Vaccine*, 2015; 33(34); 4161-4.
6. Yalçın SS, Bakacak AG, Topaç O. Unvaccinated children as community parasites in National Qualitative Study from Turkey. *BMC Public Health*, 2020; 20(1); 1-17.
7. WHO Vaccine-Preventable Diseases: Monitoring System. 2020 global summary (Last updated 15-July-2020 (data as of 12-October-2020 11:32))
8. CDC. Measles cases and outbreaks. 2019. <https://www.cdc.gov/measles/cases-outbreaks.html>
9. Karafillakis E, Dinca I, Apfel F, Cecconi S, Würz A, Takacs J, et al. Vaccine hesitancy among healthcare workers in Europe: A qualitative study. *Vaccine*, 2016; 34(41); 5013-20.
10. Chen RT, Hibbs B. Vaccine safety: current and future challenges. *Pediatr Ann*, 1998; 27(7); 445-55.
11. Omer SB, Salmon DA, Orenstein WA, Dehart MP, Halsey N. Vaccine refusal, mandatory immunization, and the risks of vaccine-preventable diseases. *N Eng J Med.*, 2009; 360(19); 1981-8.
12. Yüksel GH, Topuzoğlu A. Aşı Retlerinin artması ve Aşı Karşıtlığını Etkileyen Faktörler. *ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi*, 2019; 4(2); 244-58.
13. Han-Yekdeş D, Altunok A, Eskiocak M, Marangoz B. [Immunization attitudes of physicians at a university hospital]. *Klimik Derg.* 2020; 33(3); 255-9.

14. ArdaB, Durusoy R, Yamazhan T, Sipahi OR, Taşbakan M, Pullukcu H et al. Did the pandemic have an impact on influenza vaccination attitude? A Survey among health care workers. *BMC Infect Dis.* 2011; 11:87.
15. Human Vaccines and Immunotherapeutics 2016, Vol. 12, No. 5, 1282-1292 .
16. Kwok KO, Li KK, Wei WI, Tang A, Wong SYS, Lee SS. Influenza vaccine uptake, COVID-19 vaccination intention and vaccine hesitancy among nurses: A survey. *Int J Nurs Stud* 2021; 114 103854.
17. Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, S.B., 3. Ulusal Aşı Çalıştayı, Çalıştay Raporu. 2018: Ankara.
18. Ma KK, Schaffner W, Colmenares C, Howser J, Jones J, Poehling KA. Influenza vaccinations of young children increased with media coverage in 2003. *Pediatrics*, 2006; 117(2), e157-e163.
19. Smith PJ, Humiston SG, Parnell T, Vannice KS, Salmon DA. The association between intentional delay of vaccine administration and timely childhood vaccination coverage. *Public Health Rep*, 2010; 125(4); 534-41.
20. Arıcan I. Sık rastlanan aşı karşıtı iddialara yanıtlar. *Toplum ve Hekim*, 2018; 33(3); 195-206.
21. Gerber JS, Offit PA. Vaccines and autism: a tale of shifting hypotheses. *Clin Infect Dis*, 2009; 48(4); 456.
22. Aygün E, Tortop HS. Ebeveynlerin aşı tereddüt düzeylerinin ve karşıtlık nedenlerinin incelenmesi. *Güncel Pediatri*, 2020; 18(3); 300-16.
23. Önsüz FM, Topuzoğlu A. Bir tıp fakültesinde kadın hastalıkları ve doğum stajını yapmış öğrencilerin HPV aşısı hakkında bilgi düzeyleri ve tutumlarının değerlendirilmesi. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 2011; 10, 557-64.
24. Han-Yekdeş D. Edirne İlinde Çalışmakta Olan Aile Sağlığı Elemanlarının Bağışıklama ve Aşı Tereddütüne İlişkin Bilgilendirme ve Tutum Geliştirilmesine Yönelik Müdahale Çalışması. *Uzmanlık Tezi, Trakya Üni, Tıp Fak Halk Sağlığı ABD*, 2020.
25. Günay İ, Tatar M, Saygılı M, Yörük BG, Başpınar S, Saygun M. Tıp fakültesi son sınıf öğrencilerinin ülkemizdeki aşı reddi hakkındaki düşünceleri. *Genel Tıp Derg.* 2020; 30(3).
26. Ulukol B. GATT Uygulamalarına Çocuk Hastalıkları Açısından Yaklaşım. *Tıbbın Alternatifi Olmaz! Geleneksel Alternatif ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları. Yayına Hazırlayanlar: Tütüncü S., Etiler N. Türk Tabipleri Birliği Halk Sağlığı Kolu. Ankara Türk Tabip. Bir. Yay., Kasım 2017: 197-213.*
27. Bozkurt HB. Aşı reddine genel bir bakış ve literatürün gözden geçirilmesi. *Kafkas J Med Sci*, 2018; 8(1); 71-6.
28. Yakşi N. Aile sağlığı merkezi çalışanlarının aşı reddi konusundaki düşünceleri ve davranışlarının değerlendirilmesi. *Turk J Public Health*, 18(3); 143-54.
29. Dáňová J, Šálek J, Kocourková, A, Čelko AM. Factors associated with parental refusal of routine vaccination in the Czech Republic. *Cent Eur J Public Health*, 2015; 23(4); 321-3.
30. Costa-Pinto JC, Willaby HW, Leask J, Hoq M, Schuster T, Ghazarian A, Danchin MH. Parental Immunisation Needs and Attitudes Survey in paediatric hospital clinics and community maternal and child health centres in Melbourne, Australia. *J Paediatr Child Health*, 2018; 54(5); 522-9.
31. Taneri PE. Salgının başlangıç döneminde İstanbul'da bir Tıp Fakültesi öğrencilerinin COVID-19 hakkında bilgi ve görüşlerinin değerlendirilmesi. *Turk J Public Health* 2020;18(Special issue):78-85
32. Beyhun NE, Kosan Z, Aras A, Guraksin A, Ezmeci T. Willingness to receive the influenza A (H1N1) vaccine and its determinants among university students during the 2009 outbreak in Turkey. *Eurasian J Med.* 2014;46(1);8.
33. Akan H, Gurol Y, Izbirak G, et al. Knowledge and attitudes of university students toward pandemic influenza: a cross-sectional study from Turkey. *BMC Public Health.* 2010;10(1);413.
34. Ozer A, Kirecci E, Ekerbicer HC, Celik M. Medical faculty and school of health student knowledge of and behavior regarding swine flu and vaccine, in Kahramanmaraş, Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011;42(1);161.
35. Erken RR, Ergin A. Healthcare personnel's attitudes and behaviours for vaccination recommendations of health care providers. *Klimik Derg.* 2019; 32(3); 259-64.
36. Kose S, Mandiracioglu A, Şahin S, Kaynar T, Karbus O, Ozbel Y. Vaccine hesitancy of the COVID-19 by health care personnel. *Int J Clin Pract*, 2020; e13917.
37. Marangoz B. Edirne İlinde Çalışmakta Olan Aile Hekimleri ve Edirne İli Aşı Yönetim Ekibini Bağışıklama ve Aşı Tereddütüne İlişkin Bilgilendirme ve Tutum Geliştirilmesine Yönelik Müdahale Çalışması. *Uzmanlık Tezi, Trakya Üni. Tıp Fak. Halk Sağ. ABD*, 2019
38. Erdem Ö, Toktaş İ, Çelepkolu T, Demir V. The Characteristics of Families who rejected Vaccination during the Mop-up Oral Polio Vaccination Campaign and Their Reasons of Rejection: A Family Health Center Experience. *Konuralp Tıp Dergisi*, 9(1); 19-23.
39. Üner S. et. al. Çocukluk Aşılarında Artan Kararsızlık/ Nedenleri Farklı Aktörlerin Deneyiminden Anlamak. 1. Baskı, Ankara, Hipokrat Yay., 2020.

A study of nutrient and cost analysis of gluten-free packaged products from Turkey

Türkiye’de paketli glutensiz ürünlerin besin ögesi ve fiyat analizleri üzerine bir çalışma

Mahmut BODUR¹ (ID), Esra TUNÇER¹ (ID), Alev KESER¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Gluten-free products, despite their increasing popularity, energy and macronutrient contents are unknown. Therefore, this study aims to compare gluten-free products with their gluten containing counterparts on energy, macronutrients (carbohydrate, added sugar, total fat, saturated fat, dietary fiber, protein) and prices.

Methods: In this study, 129 gluten-free (GF) and 304 similar gluten-containing (GC) products are bought from five supermarkets in which located in Ankara, the capital city of Turkey to analyze their contents of energy, macronutrients, and prices based on their label information. The products were evaluated in eight subgroups: bread, pasta, flour, breakfast cereals, processed meat products, snack bars, sweet biscuits-cookies-cakes, crackers-salty crispies. The comparisons between groups performed using SPSS software.

Results: In this study, gluten-free foods in bread, pasta, flour, biscuits-cookies-cakes, and crackers-salty crispies products are found to contain less protein than gluten containing products ($p<0.05$). Besides, compared to their GC counterparts, GF bread contains more total fat, and GF flours contain more carbohydrates ($p<0.05$). GF pasta contains less fiber and more carbohydrate than GC equivalents ($p<0.05$).

ÖZET

Amaç: Artan popülerliklerine rağmen, glutensiz ürünlerin enerji ve makro besin ögesi içerikleri tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada enerji içeriği, makro besin ögesi içerikleri (karbonhidrat, eklenmiş şeker, toplam yağ, doymuş yağ, posa, protein) ve fiyat açısından glutensiz ürünlerin gluten içeren muadilleriyle kıyaslanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada, enerji içeriği, makro besin ögesi içerikleri ve fiyat bilgisini etiket bilgilerine göre değerlendirmek için 129 glutensiz ürün ve 304 gluten içeren ürün Türkiye’nin başkenti olan Ankara’da bulunan beş hipermarketten satın alınmıştır. Ürünler; ekmek, makarna, un, kahvaltılık gevrekler, işlenmiş et ürünleri, atıştırmalık barlar, tatlı bisküvi - kurabiye - kekler, krakerler - tuzlu gevrekler olmak üzere sekiz alt grupta değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar SPSS yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Bu çalışmada ekmek, makarna, un, bisküvi - kurabiye - kek ve kraker - tuzlu atıştırmalık gruplarında yer alan glutensiz ürünlerin gluten içeren muadillerine göre daha az protein içerdiği bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca, gluten içeren muadillerine göre glutensiz ekmek daha fazla toplam yağ içerirken; glutensiz unlar ise daha fazla karbonhidrat içermektedir ($p<0.05$). Glutensiz makarnalar, gluten içeren muadillerine kıyasla daha az

¹Ankara University, Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Mahmut BODUR

Tepebaşı Mahallesi Fatih Caddesi No: 197/A PK: 06290 Keçiören / Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : mahmutbodur@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 24.02.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 07.05.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.97344

Bodur M, Tunçer E, Keser A. A study of nutrient and cost analysis of gluten-free packaged products from Turkey. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 333 - 342

Gluten-free sweet biscuits-cookies-cakes group has more added sugar than gluten-containing counterparts ($p<0.05$). Gluten-free snack products were found to contain more total fat, less fiber than counterparts. The gluten-free product groups except for processed meat products were more expensive than gluten-containing product groups ($p<0.001$).

Conclusion: Despite the variations of food groups, gluten-free products are not nutritionally superior for healthy people because of their high carbohydrate, high total fat, low protein, and low dietary fiber contents. In addition, the high prices of GF products should also be considered. As a conclusion that recommending gluten-free products to healthy individuals will not provide additional benefits.

Key Words: Gluten-free product, cost, food label, healthy eating

posa ve daha fazla karbonhidrat içermektedir ($p<0.05$). Glutensiz bisküvi-kurabiye-kekler, gluten içeren muadillerine göre daha fazla şeker içermektedir ($p<0.05$). Glutensiz atıştırma ürünlerinin, muadillerine göre daha çok toplam yağ ve daha az posa içerdiği bulunmuştur. İşlenmiş et ürünleri dışındaki glutensiz ürün gruplarının tamamı, gluten içeren ürün gruplarından daha pahalıdır ($p<0.001$).

Sonuç: Besin gruplarının çeşitliliğine rağmen, glutensiz ürünler, yüksek karbonhidrat, yüksek toplam yağ, düşük protein, ve düşük diyet lifi içerikleri nedeniyle sağlıklı bireyler için beslenme açısından üstün değildir. Ayrıca, glutensiz ürünlerin yüksek fiyatları da göz önünde bulundurulmalıdır. Sonuç olarak, sağlıklı bireylere glutensiz ürünleri önermek ek bir fayda sağlamayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Glutensiz ürünler, fiyat, besin etiketi, sağlıklı beslenme

INTRODUCTION

Today, due to changing dietary habits, the content of a balanced and adequate nutrition concept is being questioned (1). There is increasing information pollution about what is healthy and what is not healthy. The gluten-free diet is also one of them. The gluten-free (GF) diet is increasing in popularity in the general population. As a result, sales of gluten-free products are increasing. Global sales of GF foods increased by 12.6% in 2016. This may be due to increased awareness of gluten-related diseases and changing consumer perception that gluten-free products are healthier (2).

The gluten-free diet is the elimination of all gluten and gluten-containing products from the diet. Although the most abundant dietary sources of gluten appear to be barley, wheat, rye, and oats, many food additives, medicines, and cosmetics also contain some gluten (3). Gluten-free diet is the gold

standard treatment for some diseases such as celiac disease, wheat allergy, nonceliac gluten sensitivity (4, 5). Exposure to gluten in patients with celiac may cause gastrointestinal symptoms. Nevertheless, gluten-free diet is not recommended for the general population, and there is no evidence that the gluten-free diet is beneficial except for celiac disease and gluten-related disorders (6). According to a study, the gluten-free diet did not provide additional benefits for the health of individuals who are under no compulsion to adhere to a gluten-free diet (7). Additionally, the gluten-free diet may have some risks like nutrient deficits, constipation, missed diagnosis of celiac disease (5). Routine initiation of a gluten-free diet may hide a diagnosis of celiac disease. It is important to note that patients should be on a gluten-containing diet at diagnostic testing due to avoid false-negative results in tests used in celiac

disease diagnosis (8). Inadequacies of micronutrients such as zinc, magnesium, iron, calcium, vitamin D, thiamine, pyridoxine, folate, and vitamin B₁₂ may be common in a gluten-free diet (9, 10). Besides, insufficient dietary fiber intake on a gluten-free diet causes to constipation (9). Other possible harms of the gluten-free diet are increased financial costs, and social impairment/restrictions (11). However, on the other hand, there are not enough studies on the long-term effects of gluten-free diet.

Gluten-free products have a wide range of products in recent years. Increasing numbers of gluten-free products also attract consumers' interest (3). The gluten-free diet is thought to be healthy because of avoiding processed foods and also increasing consumption of other whole grains (pseudo-cereals), low-energy density vegetables (12). On the other hand, gluten-free diet may be deficient in cereals and fiber, may have high in fat content, and may lead to lack of vitamins and minerals (5, 9). The availability of gluten-free products has been partially increased, but gluten-free products are more expensive than gluten-containing counterparts (13, 14). Also, it is indicated that consumers have the perception that gluten-free products are healthier than conventional counterparts (15). However, the energy and macronutrient content of the gluten-free products that considered healthier is also a question mark against gluten-containing products.

Therefore, the aim of this study is to compare gluten-free products with their gluten-containing counterparts on energy, macronutrients (carbohydrate, added sugar, total fat, saturated fat, dietary fiber, protein) and prices on label information.

MATERIAL and METHOD

Design and Data

This study consists of comparing gluten-free versus gluten-containing foods based on their labels. The data were obtained from the hypermarkets with

the highest product diversity, located in the central places from given in another study conducted by the researchers (16). Briefly, between January and May 2018, 129 gluten-free products and 304 its similar gluten-containing products are taken from five hypermarkets in Ankara to analyzed their contents of energy and carbohydrate/ protein/ total fat/ saturated fat/ fiber based on their label information. Price comparisons of products are calculated on the price paid for 100 g of each product (Figure 1). Each product symbolized the table in "n". Number of brands and products included in this study is given in Table 1.

Food categories included

Products are classified as gluten-free or gluten-containing if a declaration appeared on their packages. In the study, the main food groups, bread, flour, pasta, breakfast cereals, processed meat products (sausage, sucuk, salami, smoked meat, jambon, canned mackerel) which are food groups with a high contribution to the energy content of the gluten-free diet, were included. Also, several snack product groups, including wafers, sweet biscuits, cookies, cakes, chocolate-filled biscuits, snack bars, crackers, salty crispies, mainly produced for the gluten-free diet, were included in this study.

There is no enrichment procedure developed for gluten-free products in Turkey. Therefore, vitamin-mineral contents of the products were not included in the comparison. In addition, most labels of products do not exist vitamin and mineral information. In order to determine the accessibility of the packaged products included in the study, the products offered for sale at each period were included, given the seasonal effects. The product that has been discounted for any reason is not included in the study.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed in SPSS software. The variables were investigated using visual and analytical methods to determine whether

Tablo 1. Number of brands and products

Food Categories	Gluten-Free		Gluten-Containing		Total	
	Brands	Products (n)	Brands	Products (n)	Brands	Products (n)
Bread	4	13	8	32	12	45
Pasta	8	24	16	76	24	100
Flour	7	21	12	34	19	55
Breakfast Cereals	3	6	4	17	7	23
Processed Meat Products	2	13	14	31	16	44
Snack Bars	5	12	8	26	13	38
Sweet Biscuits - Cookies-Cakes	6	28	20	65	26	93
Crackers - Salty Crispies	6	12	7	23	13	35

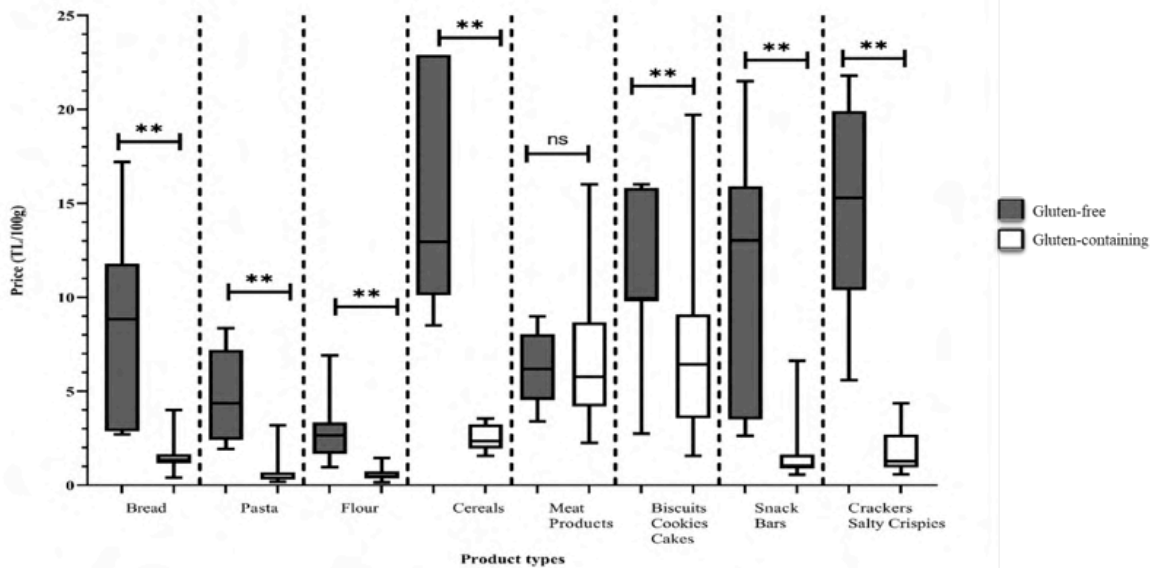


Figure 1. The price comparison of the groups based on gluten status ("TL/per 100 g"). Mann-Whitney U was conducted. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

they are normally distributed. Descriptive analyses were presented using medians and interquartile ranges (IQR) for non-normally distributed variables. The Mann-Whitney U test was used to compare

parameters between gluten-free products and their gluten-containing counterparts. In all analyses, a 5% significance level ($p < 0.05$) was considered.

RESULTS

In this cross-sectional market study, a total of 433 products, 129 gluten-free products, and 304 gluten-equivalent products were included. Table 2 shows the comparison of energy and macronutrients according to the gluten content of the products in the main food groups. In the bread group, the median value of total fat content of gluten-containing breads was 1.98 g, whereas the median value of gluten-free products was 4.75 g ($p < 0.05$). In terms of protein content, the median value was 10.4 g in gluten-containing products, whereas it was 3.70 g in gluten-free products ($p < 0.001$). There was no statistical significance difference between the bread groups in terms of energy, carbohydrates, added sugar, saturated fat, and dietary fiber ($p > 0.05$).

In the pasta group, the carbohydrate content of the gluten-free products was 78.00 g, while the gluten-containing products were 73.10 g ($p < 0.001$). The protein content median value of gluten-free products was 6.65 g; it was 10.70 g for gluten-containing products ($p < 0.001$). When the dietary fiber contents were examined, the median was 1.20 g for gluten-free products and 3.00 g for gluten-containing products ($p < 0.001$). No statistically significant difference was found in terms of energy, added sugar, total fat, and saturated fat in pasta groups ($p > 0.05$).

In the flour group, the carbohydrate median value of gluten-free products was 77.00 g, whereas, for gluten-containing products, this value was 73.00 g ($p < 0.001$). In terms of protein contents, the median value of gluten-free products was 3.70 g, whereas it was 12.30 g in gluten-containing products ($p < 0.001$). There was no statistically significant difference in terms of energy, added sugar, total fat, saturated fat, dietary fiber in flour group products ($p > 0.05$).

In the breakfast cereals group, the median added sugar content of gluten-free products was 4.10 g and 19.50 g in gluten-containing products ($p < 0.001$). There was no statistically significant difference in

terms of energy, carbohydrate, total fat, saturated fat, protein, and dietary fiber in the breakfast cereal groups ($p > 0.05$).

Processed meat products have been introduced as gluten-free in recent years. When the total carbohydrate amounts were examined, the median value of gluten-free products was 3.00 g, while it was found to be 1.57 g in gluten-containing products ($p < 0.001$). There was no statistically significant difference in processed meat products in terms of energy, total fat, and protein values ($p > 0.05$).

Energy, carbohydrate, added sugar, total fat, saturated fat, protein, and dietary fiber values in 100 g according to the label information of different snack groups are shown in Table 2. In the snack bars groups, the median amount of carbohydrate in gluten-free products was 53.05 g, while it was 56.65 g in gluten-containing products ($p < 0.05$). When the total fat amount was examined, the median value of gluten-free products was 28.70 g, while it was 21.60 g for gluten-containing products ($p < 0.05$). When the dietary fiber was examined, the median of gluten-free products was 4.10 g, whereas it was 5.05 g for gluten-containing products ($p < 0.05$). No statistically significant difference was found in energy, added sugar, saturated fat, and protein amounts in snack bars groups ($p > 0.05$).

Sweet biscuits-cookies-cakes group in terms of carbohydrate amounts of gluten-free products with a median value of 67.50 g, while 62.40 g gluten-containing products ($p < 0.05$). When the added sugar amount was examined, it was found that while gluten-free products were 29.20 g, it was 24.50 g in gluten-containing products ($p < 0.05$). The amount of protein was 4.75 g in gluten-free products and 6.40 g in gluten-containing products ($p < 0.001$). There was no statistically significant difference in the amount of energy, total fat, saturated fat, and dietary fiber in the packaged biscuit-cookie-cake group products ($p > 0.05$).

In the crackers-salty crispies group, the median

Table 2. Comparison of food groups based on gluten status (per 100 g).

Products	Gluten-Free			Gluten-Containing			p	Products	Gluten-Free			Gluten-Containing			p
	n	Median	IQR	n	Median	IQR			n	Median	IQR	n	Median	IQR	
Bread															
Energy (kcal)	13	256.00	157.50	32	274.00	127.23	0.293	Energy (kcal)	12	519.50	36.25	26	461.00	137.90	0.841
Carbohydrate(g)	13	47.50	33.0	32	54.72	27.45	0.287	Carbohydrate(g)	12	53.05	12.17	26	56.65	18.11	0.004*
Added sugar (g)	13	3.75	1.65	32	2.90	0.98	0.693	Added sugar (g)	12	30.70	9.02	26	30.60	19.63	0.420
Total Fat (g)	13	4.75	3.05	32	1.98	1.78	0.018*	Total Fat (g)	12	28.70	8.07	26	21.60	20.47	0.047*
Saturated Fat (g)	13	1.00	1.35	32	0.70	1.17	0.407	Saturated Fat (g)	12	12.30	15.61	26	4.50	3.68	0.089
Protein (g)	13	3.70	1.88	32	10.4	3.70	<0.001**	Protein (g)	12	9.50	9.17	26	7.70	5.80	0.312
Fiber (g)	13	6.00	2.53	32	4.10	4.11	0.286	Fiber (g)	12	4.10	2.15	26	5.05	7.44	0.015*
Pasta															
Energy (kcal)	24	357.50	15.00	76	357.00	5.68	0.945	Energy (kcal)	28	481.50	52.75	65	493.30	41.00	0.719
Carbohydrate(g)	24	78.00	1.63	76	73.10	2.50	<0.001**	Carbohydrate(g)	28	67.50	11.25	65	62.40	8.10	0.027*
Added sugar (g)	24	1.90	1.40	76	3.00	0.80	0.429	Added sugar (g)	28	29.20	15.25	65	24.50	10.70	0.048*
Total Fat (g)	24	1.80	0.93	76	1.70	0.60	0.496	Total Fat (g)	28	22.00	10.58	65	23.20	7.20	0.372
Saturated Fat (g)	24	0.40	0.15	76	0.40	0.20	0.728	Saturated Fat (g)	28	10.80	6.88	65	12.70	5.60	0.243
Protein (g)	24	6.65	1.67	76	10.70	2.00	<0.001**	Protein (g)	28	4.75	2.22	65	6.40	1.80	<0.001**
Fiber (g)	24	1.20	0.98	76	3.00	0.20	<0.001**	Fiber (g)	28	3.10	2.33	65	3.20	2.30	0.370
Flour															
Crackers-salty crisps															
Energy (kcal)	21	357.00	35.40	34	358.15	19.18	0.349	Energy (kcal)	12	444.00	87.00	23	414.00	59.00	0.959
Carbohydrate(g)	21	77.00	27.75	34	73.00	3.72	<0.001**	Carbohydrate(g)	12	77.70	9.72	23	69.95	9.60	<0.001**
Added sugar (g)	21	3.40	4.30	34	0.75	0.91	0.083	Added sugar (g)	12	4.95	3.90	23	6.00	6.60	0.278
Total Fat (g)	21	1.10	7.15	34	1.45	1.41	0.065	Total Fat (g)	12	12.45	16.73	23	13.30	10.80	0.572
Saturated Fat (g)	21	0.30	3.07	34	0.25	0.23	0.112	Saturated Fat (g)	12	6.50	10.33	23	6.80	5.26	0.745
Protein (g)	21	3.70	10.30	34	12.30	2.35	<0.001**	Protein (g)	12	2.80	6.60	23	9.00	4.30	<0.001**
Fiber (g)	21	6.10	21.80	34	2.40	7.88	0.130	Fiber (g)	12	3.72	2.17	23	3.10	6.16	0.327
Breakfast cereals															
Energy (kcal)	6	374.50	54.00	17	378.00	13.50	0.99	Energy (kcal)	13	285.00	262.50	31	215.00	213.50	0.817
Carbohydrate (g)	6	77.45	8.72	17	75.00	9.15	0.919	Carbohydrate(g)	13	3.00	3.00	31	1.57	2.20	0.029*
Added sugar (g)	6	4.10	21.60	17	19.50	11.75	0.044*	Added sugar (g)	13	NA	NA	31	NA	NA	NA
Total Fat (g)	6	4.20	8.50	17	2.90	2.85	0.759	Total Fat (g)	13	25.00	28.00	31	16.75	23.10	0.846
Saturated Fat (g)	6	1.30	1.10	17	0.90	1.10	0.392	Saturated Fat (g)	13	NA	NA	31	NA	NA	NA
Protein (g)	6	8.00	2.70	17	8.40	2.30	0.812	Protein (g)	13	13.00	4.50	31	14.00	3.98	0.724
Fiber (g)	6	4.95	3.40	17	7.40	3.90	0.135	Fiber (g)	13	NA	NA	31	NA	NA	NA

The data are shown median, interquartile range (IQR). Mann-Whitney U test were applied. n:count, kcal:kilocalorie, g:gram, NA: not available, *p<0.05, ** p<0.001

carbohydrate value was 77.70 g in gluten-free products and 69.95 g in gluten-containing products ($p<0.001$). When the median amount of protein in gluten-free products was 2.80 g, it was found to be 9.00 g in gluten-containing products ($p<0.001$). As the crackers-salty crispies group was examined, no statistically significant difference was found between the groups in terms of energy, added sugar, total fat, saturated fat, and dietary fiber ($p>0.05$).

The comparison of the prices of gluten-free and gluten-containing products examined in terms of energy and macro-nutrients is given in (Figure 1). The price assessments are compared in terms of the Turkish liras (Tls) value paid per 100 g of the product. In the bread group, the median value of gluten-free products was 8.84 Tls, whereas it was 1.37 Tls for gluten-containing products ($p<0.001$). In the pasta group, the median value was 4.36 Tls for gluten-free products and 0.38 Tls for gluten-containing products ($p<0.001$). While the median value of gluten-free products was 2.66 Tls in flour group products, it was 0.49 Tls in gluten-containing products ($p<0.001$). The median value of breakfast cereals was 12.96 in gluten-free products, while it was 2.36 Tls in gluten-containing products ($p<0.001$). In the processed meat products group, the median value for gluten-free products was 6.18 Tls, whereas, for gluten-containing products, it was 5.78 Tls ($p>0.05$). In the snack bar group, the median value of gluten-free products was 9.87 Tls, whereas it was 6.42 Tls for gluten-containing products ($p<0.001$). When the biscuit-cookie-cake group products were examined, it was found that while gluten-free products were 14.31 Tls, it was 1.63 Tls for gluten-containing products ($p<0.001$). In the cracker-salted crispies, gluten-free products were 15.30 Tls while it was 1.28 Tls for gluten-containing products ($p<0.001$).

DISCUSSION and CONCLUSION

In this research, a total of 433 products, 129 gluten-free products, and 304 gluten-containing products were included. Gluten-free products, which have become popular with the development of food

processing techniques, attract attention with their increasing consumption, especially in a healthy population (17). There is a perception and opinion that gluten-free products are healthy. While highlighting the organoleptic properties of gluten-free products, nutritional values can be ignored. However, the long-term effects of gluten-free diet, carbohydrate, protein, B-group vitamins, dietary fiber, and iron are found to be inadequate nutrients (18).

Grains and grain products are one of the dietary sources that provide energy, carbohydrate, protein, dietary fiber, and B-group vitamins. In the gluten-free diet, the replacement of grain products removed from the individual's consumption is recommended. The low fiber content in gluten-free products is another critical issue encountered in the gluten-free diet. In recent studies, adequate intake of dietary fiber is vital in many areas, from the development of chronic diseases to bowel health (19). In this study, the gluten-free pasta group has less dietary fiber than gluten-containing pasta group ($p<0.001$). Similar to this study, Jamieson et al., found that pasta groups have less dietary fiber than gluten-containing counterparts (20). However, a study conducted in Austria also found that gluten-free pasta contains more dietary fiber than equivalent products (21). These results may be due to different product types and enrichment processes in countries. Because gluten-free products are not enriched with dietary fiber in Turkey. In this study, dietary fiber content of the majority of product groups (except for pasta and snack bars) was found to be similar. The gluten-free snack bars had less dietary fiber than gluten-containing snack bars. Unlike a study conducted in Canada was found that gluten-free bars were higher in fiber than gluten-containing bars (20). In this study, gluten-free foods in bread, pasta, and flour products were found to contain less protein than gluten-containing counter products ($p<0.001$). Similar to this study, in Canada and Spain, GF breads have less protein and more total fat than GC equivalents (22, 23). The reason for the low protein content of gluten-free products is thought to be the removal of gluten, which is the primary protein in wheat flour from these products.

Allen and Orfila (2018) were found similar energy and saturated fat between standard breads and GF breads in the UK (2). In the present study, the energy and saturated fat contents of gluten-free breads were found to be similar to gluten-containing counterparts, but they contained more total fat ($p < 0.05$). In addition, gluten-free bread contains less protein ($p < 0.001$). On the other hand, carbohydrate, added sugar, and fiber contents of gluten-free breads were similar.

Breakfast cereals are an essential alternative for the first meal of the day. A study in Australia found that gluten-free breakfast cereals contain lower dietary fiber than gluten-containing alternatives (7). Similarly, the dietary fiber content of gluten-free breakfast cereals was found to be low in this study, but it was not statistically significant. Gluten-free breakfast cereals were found to contain less added sugar than their counterparts ($p < 0.05$). Breakfast cereals can help prevent vitamin and mineral deficiencies through enrichment (24). The consumption of gluten-free breakfast cereals in gluten-free diet may be one of the right steps to prevent long term vitamin and mineral deficiencies.

Simple sugars increase the consumption of packaged products by creating a sweet taste (25). However, studies suggest that simple sugar consumption should be reduced in the diet. World Health Organization recommends that the amount of simple sugar to be taken by diet should not exceed 10% of the total energy per day (26). In daily intake, the contribution of packaged products to simple sugar intake is enormous. Therefore, it is recommended to limit the consumption of packaged foods. Similarly, high gluten-free packaged products contain simple sugar. In sweet biscuits-cakes-cookies group, gluten-free products contain higher sugar than their gluten-containing counterparts ($p < 0.05$). However, a study in Austria showed no difference in the amount of added sugar in gluten-free foods (21).

The total amount of fat consumed in the diet is another essential nutrient that needs to be reduced.

Increased consumption of processed, packaged products increased the total amount of fat and saturated fatty acids consumed in the diet. The risk of heart disease increases with the increase in total fat and saturated fatty acids consumed in the diet (27). In a study, gluten-free cereal/granola bars were found to contain higher total fat than their gluten-containing counterparts (20). In this study, gluten-free snack bars were found to contain higher fat than their counterparts ($p < 0.05$).

The availability and price of gluten-free products produced for particular groups are one of the crucial topics for the consumer. Accessibility is not covered in this study. As mentioned above, the contents of gluten-free products differ from their gluten-containing counterparts. While gluten-free products in different food groups had less protein and less fiber content, high fat, high saturated fatty acids, and high sugar content were determined. In this study was found that the gluten-free products groups except for processed meat products were more expensive than gluten-containing product groups ($p < 0.001$). The studies conducted in different countries were also found that the price of gluten-free products was higher compare to gluten-containing products (14, 21, 28, 29). The high price of gluten-free products can be a problem for patients with celiac disease. It would be useful to carry out projects to reduce the price of these products. In Turkey, a monthly support fee for individuals who need to use gluten-free products are made. However, this financial support is provided according to the age of the patient, and most of the time, this financial support does not cover any of these products.

The sample of this study consisted of 304 products in the gluten-containing group and 129 products in the gluten-free group. Additionally, the products were divided into eight subgroups. As far as we know, this is the first study conducted in Turkey regarding the price and the variety of gluten-free products. As the study is carried out on the largest supermarkets

in Ankara, there is a variety of products compared to other parts of the country. The number of products included in the study could be further increased. This situation is one of the limitations of the present study. Another limitation of the study is the unavailability to compare micronutrient contents between the gluten-free group and the gluten-containing group because there was limited data about micronutrients in the label of the products. This study was done in only one city of Turkey (Ankara), so the study does not present enough information about the availability of gluten-free products in general of the country. Future studies should be planned to cover the whole country for general information.

In conclusion, it is not the right approach to recommend gluten-free products to healthy individuals. Despite the variations of food groups, gluten-free products are not nutritionally superior for healthy people because of their high carbohydrate, high total fat, low protein, and low dietary fiber contents. However, the high prices of the products should also be considered. So that gluten-free products should not be recommended for healthy individuals. The gluten-free diet should be prepared by a dietician who is experts in gluten-related disease field under the needs of the individual and to reduce the consumption of packaged products.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank them for their contributions in the data collection process, dietician Sıdıka Merve Cansever, dietician Ümmügülsüm Azili, dietician Gülşah Altıngöz and dietician Gizem Emer.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Drewnowski A, Popkin BM. The nutrition transition: new trends in the global diet. *Nutr Rev*. 1997;55(2):31-43.
2. Allen B, Orfila C. The Availability and Nutritional Adequacy of Gluten-Free Bread and Pasta. *Nutrients*. 2018;10 (10):1370.
3. Gaesser GA, Angadi SS. Gluten-free diet: imprudent dietary advice for the general population? *J Acad Nutr Diet*. 2012;112(9):1330-3.
4. Armstrong MJ, Hegade VS, Robins G. Advances in coeliac disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28(2):104-12.
5. Reilly NR. The gluten-free diet: Recognizing fact, fiction, and fad. *J Pediatr*. 2016;175:206-10.
6. Rostami K, Bold J, Parr A, Johnson MW. Gluten-free diet indications, safety, quality, labels, and challenges. *Nutrients*. 2017;9 (8):846.

7. Wu JH, Neal B, Trevena H, Crino M, Stuart-Smith W, Faulkner-Hogg K, et al. Are gluten-free foods healthier than non-gluten-free foods? An evaluation of supermarket products in Australia. *Br J Nutr.* 2015;114(3):448-54.
8. Jones AL. The gluten-free diet: Fad or necessity? *Diabetes Spectr.* 2017;30(2):118-23.
9. Theethira TG, Dennis M. Celiac disease and the gluten-free diet: Consequences and recommendations for improvement. *Dig Dis.* 2015;33(2):175-82.
10. Vici G, Belli L, Biondi M, Polzonetti V. Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin Nutr.* 2016;35(6):1236-41.
11. Niland B, Cash BD. Health benefits and adverse effects of a gluten-free diet in non-Celiac disease patients. *Gastroenterol Hepatol.* 2018;14(2):82-91.
12. Pantaleão LC, Rogero MM, Amancio OMS. Brazilian Society for Food and Nutrition position statement: Gluten-free diet. *Nutrire.* 2016;41(1).
13. Singh J, Whelan K. Limited availability and higher cost of gluten-free foods. *J Hum Nutr Diet.* 2011;24(5):479-86.
14. Burden M, Mooney PD, Blanshard RJ, White WL, Cambray-Deakin DR, Sanders DS. Cost and availability of gluten-free food in the UK: in store and online. *Postgrad Med J.* 2015;91(1081):622-6.
15. Marcason W. Is there evidence to support the claim that a gluten-free diet should be used for weight loss? *J Am Diet Assoc.* 2011;111(11):1786.
16. Guzel S, Keser A, Hatun S. Investigating the nutritional value of foods targeting children. *Eat Weight Disord.* 2020;25(1):51-8.
17. Hüttner EK, Arendt EK. Recent advances in gluten-free baking and the current status of oats. *Trends in Food Science and Technology.* 2010;21(6):303-12.
18. Theethira TG, Dennis M, Leffler DA. Nutritional consequences of Celiac disease and the gluten-free diet. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;8(2):123-9.
19. Slavin JL. Position of the American Dietetic Association: Health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc.* 2008;108(10):1716-31.
20. Jamieson JA, Weir M, Gougeon L. Canadian packaged gluten-free foods are less nutritious than their regular gluten-containing counterparts. *PeerJ.* 2018;6:e5875.
21. Missbach B, Schwingshackl L, Billmann A, Mystek A, Hickelsberger M, Bauer G, et al. Gluten-free food database: the nutritional quality and cost of packaged gluten-free foods. *PeerJ.* 2015;3:e1337.
22. Kulai T, Rashid M. Assessment of nutritional adequacy of packaged gluten-free food products. *Can J Diet Pract Res.* 2014;75(4):186-90.
23. Miranda J, Lasa A, Bustamante MA, Churrua I, Simon E. Nutritional differences between a gluten-free diet and a diet containing equivalent products with gluten. *Plant Foods Hum Nutr.* 2014;69(2):182-7.
24. Fulgoni VL, Buckley RB. The Contribution of fortified ready-to-eat cereal to vitamin and mineral intake in the U.S. population, NHANES 2007-2010. *Nutrients.* 2015;7(6):3949-58.
25. Ismail AI, Tanzer JM, Dingle JL. Current trends of sugar consumption in developing societies. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997;25(6):438-43.
26. World Health Organization (WHO). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases: WHO Technical Report Series 916; 2003 [Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO_TRS_916.pdf;jsessionid=E964F141EB30BA1594B1EFD241B1BD83?sequence=1. ISSN 012-3054.
27. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Fats and fatty acids in human nutrition Report of an expert consultation. 2008. ISBN 978-92-5-106733-8.
28. Fry L, Madden AM, Fallaize R. An investigation into the nutritional composition and cost of gluten-free versus regular food products in the UK. *J Hum Nutr Diet.* 2018;31(1):108-20.
29. Stevens L, Rashid M. Gluten-free and regular foods: a cost comparison. *Can J Diet Pract Res.* 2008;69(3):147-50.

The first discovery of Chaphamaparvovirus in sheep with encephalitis and anemia

Ensefalitli ve anemili koyunda Chaphamaparvovirüs'ün ilk keşfi

Eda ALTAN^{1,2} (ID), Gilberto SABINO-SANTOS JR^{1,2} (ID), Patricia PESAVENTO³ (ID), Eric DELWART^{1,2} (ID)

ABSTRACT

Objective: Parvoviruses have been shown to exist in sheep since 1987. To this date there are only three reports pertaining to the existence parvoviruses in sheep. The first reported parvovirus study did not provide genomic information whereas the latter two belonged to the tetraparvovirus and copiparvovirus genera. This study focused on discovering the possible reasons of encephalitis and anemia in a dead sheep whose tissue samples were submitted to our laboratory.

Methods: In the present study next-generation sequencing (NGS) was utilized. Nextera™ XT Sample Preparation Kit was used to generate a library for Illumina MiSeq using dual barcoding. An in-house pipeline was used for analyzing raw data generated from Miseq. Several software were used to create in house-pipeline to trim sequences and de novo assembly. For the alignment genome and phylogenetic tree Geneious and MEGA X software were used.

Results: A novel ovine chaphamaparvovirus and pestivirus D both were characterized simultaneously. Although chaphamaparvoviruses had had been reported in various animals, this is the first time they have been reported in sheep. PCR analyses confirmed the presence of chaphamaparvovirus in multiple tissues. The partial nonstructural protein (NS1) and the complete capsid

ÖZET

Amaç: Parvovirüsler koyunlarda ilk olarak 1987 yılında tespit edilmiştir. Günümüze kadar koyunlarda parvovirüslerin varlığına ilişkin sadece üç rapor vardır. İlk bildirilen parvovirüs çalışması genomik bilgi sağlamazken, son ikisi tetraparvovirus ve copiparvovirus cinslerine aittir. Bu çalışmada doku örnekleri laboratuvarımıza gönderilen sebebi belli olmayan ensefalit ve anemi tespit edilen ölü bir koyunda olası nedenleri keşfetmeye odaklanılmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada yeni nesil dizileme (NGS) kullanılmıştır. Nextera™ XT Numune Hazırlama Kiti, ikili barkod kullanarak Illumina MiSeq platformu için bir kitaplık oluşturmada kullanıldı. Miseq'ten üretilen ham verileri analiz etmek için şirket içi bir data analiz altyapısı kullanıldı. Okuma dizilerini kırpmak ve de novo bağlama analizi için çeşitli yazılımlar kullanıldı. Genomun hizalama işlemi ve filogenetik ağaç için Geneious ve MEGA X yazılımından faydalanıldı.

Bulgular: Çalışmada yeni bir küçükbaş hayvan chaphamaparvovirüsü ve pestivirus D aynı anda karakterize edildi. Chaphamaparvovirüsler çeşitli hayvanlarda bildirilmiş olmasına rağmen koyunlarda ilk kez rapor edilmektedir. PCR analizleri, birçok dokuda chaphamaparvovirus varlığını doğruladı. Kısmi yapısal olmayan protein (NS1) ve tam kapsid proteinleri (VP1)

¹Vitalant Research Institute, San Francisco, USA

²University of California, Department of Laboratory Medicine, San Francisco, USA

³AUC Davis School of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Microbiology and Immunology



İletişim / Corresponding Author : Eda ALTAN

270 Masonic Vitalant Research Institute, San Francisco, CA 94118 - USA

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

Geliş Tarihi / Received : 16.06.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 30.06.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.07348

Altan E, Sabino-Santos G, Pesavento P, Delwart E. The first discovery of Chaphamaparvovirus in sheep with encephalitis and anemia. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 343 - 350

proteins (VP1) protein sequences displayed the closest amino acid identity of 49% and 69%, respectively, to the proteins of a non-human primate chapparvovirus from *Macaca fascicularis*.

Conclusion: This ovine parvovirus is the fourth parvovirus and the first chaphamaparvovirus reported in sheep. Both chaphamaparvovirus and pestivirus were shown to co-exist simultaneously in sheep. The role of this dual virus infection in the disease signs of this sheep remains to be determined. This study will shed light on future chaphamaparvovirus studies in sheep.

Key Words: Next-generation sequencing, Parvovirus, Chaphamaparvovirus, ovine

protein dizileri, insan olmayan bir primat *Macaca fascicularis*'te bulunan chapparvovirüsün proteinlerine sırasıyla %49 ve %69'luk en yakın amino asit özdeşliği sergiledi.

Sonuç: Bu küçükbaş hayvan parvovirüsü koyunlarda bildirilen dördüncü parvovirüs ve ilk chaphamaparvovirustur. Hem chaphamaparvovirus hem de pestivirüs'ün koyunlarda aynı anda birlikte var olduğu gösterilmiştir. Bu koyunun hastalık belirtilerinde bu ikili virüs enfeksiyonunun rolü henüz belirlenmemiştir. Bu çalışma ileride koyunlarda yapılacak olan chaphamaparvovirus çalışmalarına ışık tutacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Yeni nesil dizileme, Parvovirus, Chaphamaparvovirus, küçükbaş hayvan

INTRODUCTION

The genomes of members of the *Parvoviridae* family members are ssDNA and 4-6.3 kb in size with two to four recognized open reading frames (ORFs). *Parvoviridae* family is now classified into 3 different subfamilies: recently added *Hamaparvovirinae* capable of infecting either invertebrate or vertebrate, *Parvovirinae* infecting vertebrate hosts, *Densovirinae* infecting invertebrate hosts (1). The subfamily *Hamaparvovirinae* can be divided into five genera. Members of four of them infect invertebrates (*Penstylhamaparvovirus*, *Brevihamaparvovirus*, *Hepanhamaparvovirus*, *Ichthamaparvovirus*) while members of *Chaphamaparvovirus* genus infect vertebrates (1). *Chaphamaparvovirus* genus members have been defined in multiple animal species including human (2), dogs (3, 4), cats (4), bear (5), wild birds (6), red-crowned cranes (7), turkeys and chickens (8, 9), reptile (10), bats (11, 12), macaques (13, 14), pigs (15), tasmanian devils (16), fish (17), and rats (18, 19). Disease association

has not been established in most species, however a murine *Chaphamaparvovirus*, named Mouse kidney parvovirus causes chronic tubulointerstitial nephritis in both immunocompromised and immunocompetent laboratory mice (20, 21). Another *Chaphamaparvovirus* has been associated with massive mortality in tilapia fish. *Chaphamaparvoviruses* have also been associated with diarrhea in dogs (3) and cats (4).

Small ruminants are important to the livelihoods of farmers around the world, and food security is important for both their milk and meat products consumed by the public. Diverse viruses including pestivirus (Border disease), bunyavirus (Rift valley fever), pox virus (Contagious ecthyma, Sheep and goat pox), orbivirus (Bluetongue), retrovirus (Pulmonary adenomatosis-Jaagsiekte, Driving sickness), lentivirus (Ovine progressive interstitial pneumonia) and orthonairovirus (Nairobi sheep disease) are known to cause pathogenic infections in sheep (22). The first parvovirus in sheep was reported in 1987

and named ovine parvovirus but detailed information including its genome is not available (23). In 2011, a parvovirus (ovine hokovirus 1) in the liver and spleen of a sheep was sequenced, and classified into the Ungulate tetraparvovirus four species (24). This virus has not (yet) been associated with clinical symptoms (24). Recently, another sheep parvovirus belongs to copiparvovirus genera was reported from Brazil (25).

Here, we used deep sequencing to evaluate the virome of multiple tissues from a sheep that had both anemia and encephalitis of unknown origin. A novel *Chaphamaparvovirus* genome was characterized and its presence in multiple tissues confirmed by PCR.

MATERIAL and METHOD

The animals were submitted with owner consent for routine necropsy to the Anatomic Pathology Service of the Veterinary Medical Teaching Hospital at the School of Veterinary Medicine at UC Davis. Lung, spleen and liver samples were collected at the time of routine necropsy from a sheep with a clinical evaluation of encephalopathy and anemia. The main histologic findings were myelitis (spinal cord white matter degeneration), crusting skin lesions, lymphocytic perivascular cuffing in multiple tissues, gastrointestinal erosion, and proliferative colitis.

Viral Discovery

A tissue pool of lung, spleen and liver tissues stored at -80°C from index sheep case was thawed and a hand-held rotor was used with 10X volume of phosphate-buffered saline for tissue homogenization. Homogenate was then rapidly frozen and thawed on dry ice 5 times. Centrifugation (10 min, $15\ 000 \times g$) used to collect the supernatant (400 ml). The supernatant was filtered through a 0.45 mm centrifugal filter (Millipore). The filtrate was treated with enzyme cocktail at 37°C for 90 minutes for viral enrichment (26). The MagMAX Viral RNA Isolation kit (Ambion) protocol was used with small modification (without carrier RNA) for nucleic acid extraction.

SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) was used for reverse transcription step and then random PCR reaction was performed with random primer (26). Nextera™ XT Sample Preparation Kit (Illumina) was used to generate a library for Illumina MiSeq (2×250 bases) using dual barcoding (26). An in-house pipeline was used for analyzing raw data generated from MiSeq. Several software were used to create in-house-pipeline to trim sequences and de novo assembly (27, 28). BLASTx (version 2.2.7). BLASTx (version 2.2.7) was used to analyze singlets and contigs for similarity to all viral protein sequences available in GenBank's virus RefSeq and non-redundant database using an E-value cutoff of 0.001. DIAMOND (version 0.9.6) was then used to compare initial viral hits to all protein sequences in NR and were retained only when the top hit was to a sequence annotated as viral. The Geneious R10 program was used for alignments, translation to amino acid, and ORF finding. The amino acid (aa) pairwise alignments of Parvoviruses Non-structural protein 1 (NS1) and Capsid protein (VP1) and pestivirus were performed by the Geneious using the in-built MAFFT algorithm. The amino acid phylogenetic trees were constructed using the Maximum likelihood method with two substitution models: Le Gascuel 2008 model based with gamma distributed (G+) for NS1 and VP1 and D polyprotein in MEGA software version X (29, 30).

PCR detection

To confirm that the parvoviral genome was present in tissues from this animal, PCR primers Ovichap_F (5'- GCAGAGAGGACAACAACCCATA-3') and Ovichap_R (5'- ACCATTTCCCATTGCTCTCAT-3') were used to amplify a 471 bp size of ovine chaphamaparvovirus NS1 region. The mixture was placed in a thermal cycler (Biorad, Chromo-4) and the polymerase activated, by incubation at 95°C for 5 min. Cycling conditions were 95°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min for 35 cycles, a final extension at 72°C for 10 min. Bands of expected size were isolated and extracted and Sanger sequenced.

RESULTS

The lung, liver and splenic tissue of a neurologic, anemic sheep were pooled and processed for viral metagenomics. Virus like particle (VLP)-associated DNA and RNA fragments were processed for sequencing following enrichment and random amplification. Illumina MiSeq platform was used for library generation (materials and methods) and resulting raw sequence data can be accessed at NCBI's GenBank with accession number SRP13198876. BLASTx analyses of the fragments yielded to chaphamaparvovirus proteins with E score ranging from $3.44e^{-34}$ to $4.64e^{-11}$ including a 2603 bases contigs. Also detected were 7321 reads matching Pestivirus D yielding a complete polyprotein encoding sequence. The chaphamaparvovirus contigs were used to design PCR primers. Lung, liver, and splenic tissues were

separately extracted and individually tested by PCR and Sanger sequencing and all tissues contained detectable parvoviral genome.

A partial genome of a virus we called ovine chaphamaparvovirus (GenBank accession number MW344047) of 2603 nucleotides was generated. The genome was 42.8% G+C with a distribution of 37.1% A, 20.1% T, 20.6% G and 22.1% C. The expected ATP- or GTP-binding Walker A loop motif (GxxxxGKT/S; GPSNTGKS) and Walker B motif (EE) were found in NS1(31).

The partial nonstructural protein (NS1) and the complete capsid proteins (VP1) proteins had closest aa identity of 49% and 69%, to the corresponding proteins of *Macaca fascicularis* chapparravirus (MN312221) (Figure 1).

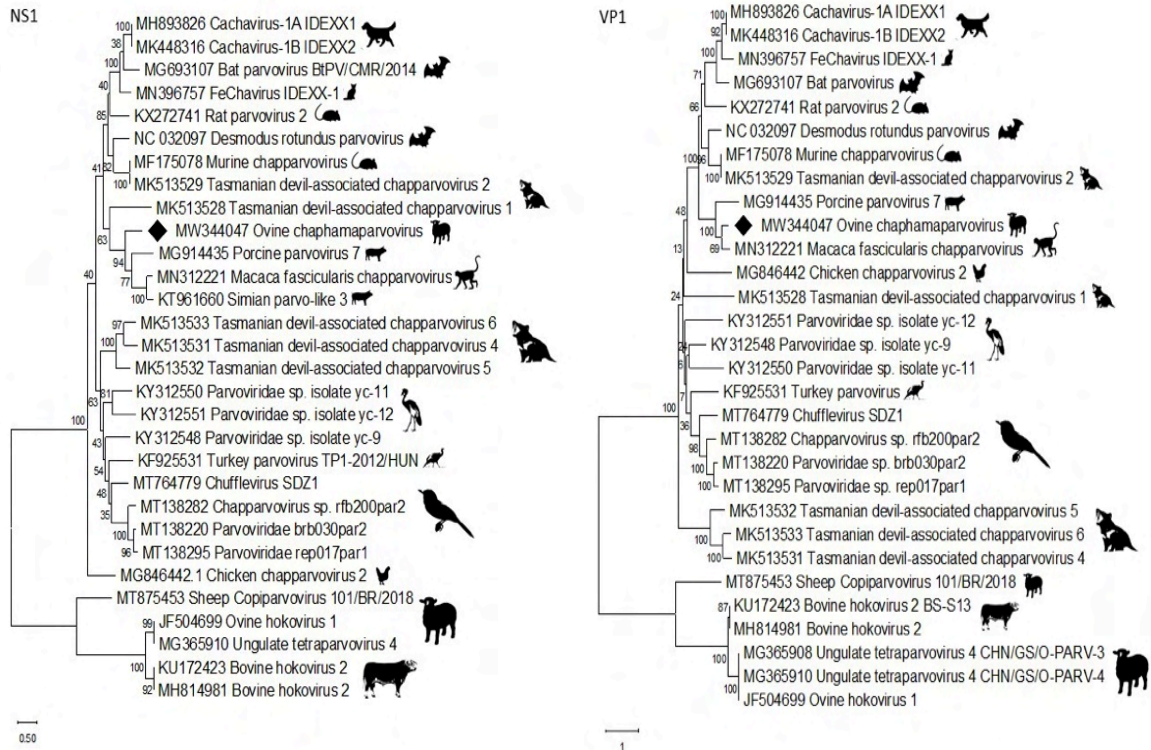


Figure 1. Phylogenetic trees (A; NS1 and B; VP1) were constructed using the Maximum likelihood method with two substitution models: Le_Gascule_2008 model (LG) with Freqs and gamma distributed, invariant sites (G + I) model MEGA software version X.

Protein based phylogenetic trees of this new chaphamaparvovirus and of the pestivirus D strain were constructed using Maximum likelihood method (see materials and methods). The novel ovine chaphamaparvovirus proteins both fell within the *Chaphamaparvovirus* genus.

The complete pestivirus D polyprotein coding region also detected in this sheep tissue pool was assembled (MT108680) showing best amino acid identity of 94% to Border disease virus strain: BD31 from the USA (U70263), FNK2012-1 from Japan (AB897785), and strain Coos Bay 5 from USA (KJ463422) (Figure 2).

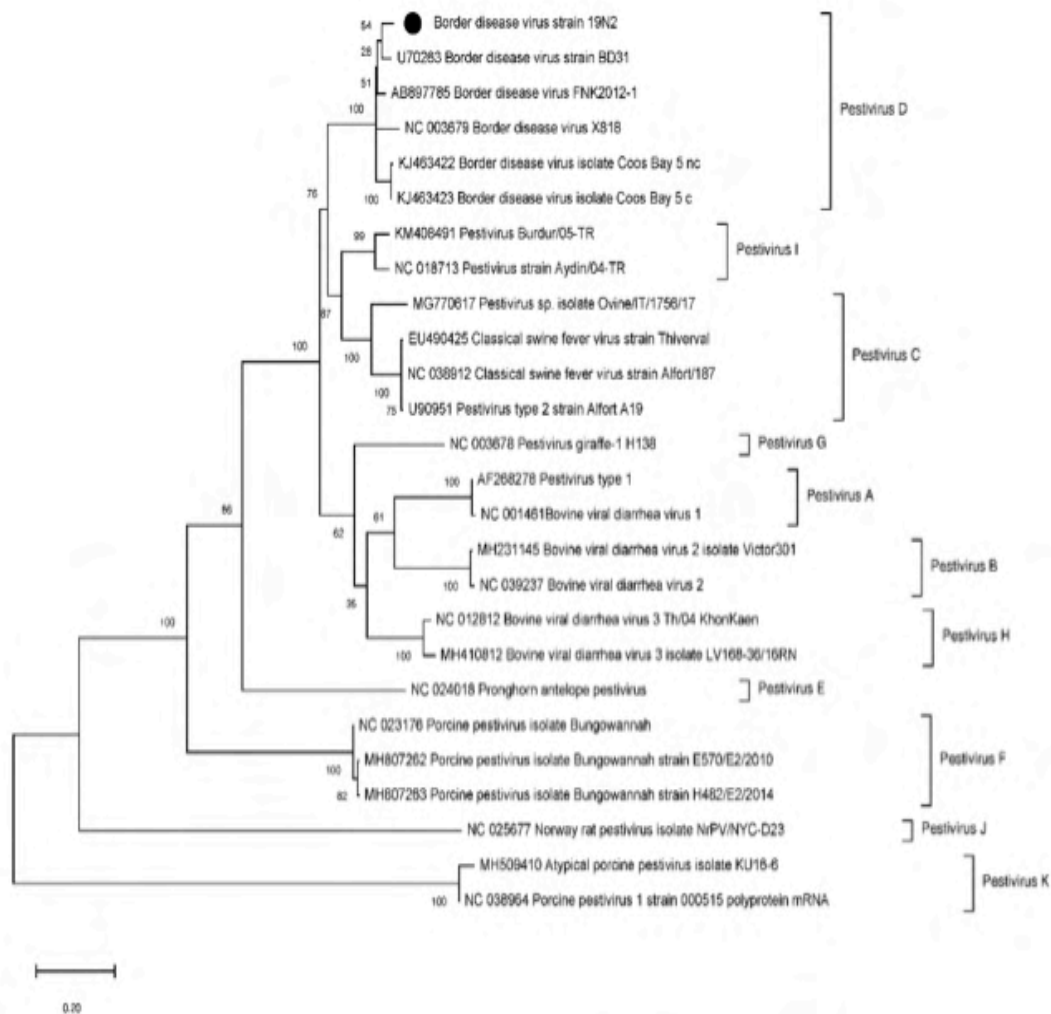


Figure 2. PThe complete pestivirus D polyprotein phylogenetic tree.

DISCUSSION and CONCLUSION

We describe here the first ovine chaphamaparvovirus. The viral genome encoded typical genome organization and ORFs. Based on ICTV criteria (1) the low level of sequence identity (<85% identity in NS1) between the ovine chaphamaparvovirus genome and those of the other known chaphamaparvoviruses indicates membership in a distinct viral species. We propose the name ungulate chaphamaparvovirus 2 as the species name following ungulate chaphamaparvovirus 1 containing porcine parvovirus 7 (KU5637330), the only member of that species to date (15).

Pestivirus D (Border disease virus) first discovered in 1959 and has been reported world wide in both sheep and goats. Acute infections of Border disease generally are associated with a mild leukopenia and slight-fever. The main significant, but less common, clinical sequelae is abortion (32, 33). The disease

signs exhibited by this sheep are not consistent with those typically associated with Border disease virus.

Viral encephalitis and anemia are known signs for lentiviral infections in sheep such as maedi-visna disease. Small ruminant lentiviruses cause chronic inflammatory and degenerative lesions in the brain, lungs, joints and mammary glands (34, 35). The main findings include spinal cord white matter degeneration, crusting skin lesions, and lymphocytic perivascular cuffing in a variety of organs (36). Although the symptoms were similar to those of lentiviral disease, no lentiviral read was observed in the viral metagenomics of the affected sheep's tissues.

The role of novel ovine chaphamaparvovirus infection in the clinical signs and pathological lesions of this sheep remains to be determined. Availability of the chaphamaparvovirus genome will facilitate detection in sick or healthy sheep in order to further examine a potential pathogenic role.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the support from Vitalant Research Institute (formerly Blood Systems Research Institute).

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Penzes JJ, Soderlund-Venermo M, Canuti M, Eis-Hubinger AM, Hughes J, Cotmore SF, et al. Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Arch Virol.* 2020;165(9):2133-46.
2. Fahsbender E, Charlys da-Costa A, Elise Gill D, Augusto de Padua Milagres F, Brustulin R, Julio Costa Monteiro F, et al. Plasma virome of 781 Brazilians with unexplained symptoms of arbovirus infection include a novel parvovirus and densovirus. *PLoS One.* 2020;15(3):e0229993.
3. Fahsbender E, Altan E, Seguin MA, Young P, Estrada M, Leutenegger C, et al. Chapparvovirus DNA found in 4% of dogs with diarrhea. *Viruses.* 2019;11(5).
4. Li Y, Gordon E, Idle A, Altan E, Seguin MA, Estrada M, et al. Virome of a feline outbreak of diarrhea and vomiting includes bocaviruses and a novel chapparvovirus. *Viruses.* 2020;12(5).
5. Alex CE, Fahsbender E, Altan E, Bildfell R, Wolff P, Jin L, et al. Viruses in unexplained encephalitis cases in American black bears (*Ursus americanus*). *PLoS One.* 2020;15(12):e0244056.
6. Altan E KS, Stalis I, Li Y, Deng X, Delwart E. Novel chaphamaparvovirus in a paradise tanager songbird with encephalitis, neuritis, and ventriculitis during the process for publish. 2021.
7. Wang Y, Yang S, Liu D, Zhou C, Li W, Lin Y, et al. The fecal virome of red-crowned cranes. *Arch Virol.* 2019;164(1):3-16.
8. Lima DA, Cibulski SP, Tochetto C, Varela APM, Finkler F, Teixeira TF, et al. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics. *Virus Res.* 2019;261:9-20.
9. Reuter G, Boros A, Delwart E, Pankovics P. Novel circular single-stranded DNA virus from turkey faeces. *Arch Virol.* 2014;159(8):2161-4.
10. Chang WS, Li CX, Hall J, Eden JS, Hyndman TH, Holmes EC, et al. Meta-transcriptomic discovery of a divergent circovirus and a chaphamaparvovirus in captive reptiles with proliferative respiratory syndrome. *Viruses.* 2020;12(10).
11. Baker KS, Leggett RM, Bexfield NH, Alston M, Daly G, Todd S, et al. Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology.* 2013;441(2):95-106.
12. Yinda CK, Ghogomu SM, Conceicao-Neto N, Beller L, Deboutte W, Vanhulle E, et al. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol.* 2018;4(1):vey008.
13. Kapusinszky B, Ardeshir A, Mulvaney U, Deng X, Delwart E. Case-control comparison of enteric viromes in captive rhesus macaques with acute or idiopathic chronic diarrhea. *J Virol.* 2017;91(18).
14. Sawaswong V, Fahsbender E, Altan E, Kemthong T, Deng X, Malaivijitnond S, et al. High Diversity and Novel Enteric Viruses in Fecal Viromes of Healthy Wild and Captive Thai Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Viruses.* 2019;11(10).
15. Palinski RM, Mitra N, Hause BM. Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. *Virus Genes.* 2016;52(4):564-7.
16. Chong R, Shi M, Grueber CE, Holmes EC, Hogg CJ, Belov K, et al. Fecal viral diversity of captive and wild tasmanian devils characterized using virion-enriched metagenomics and metatranscriptomics. *J Virol.* 2019;93(11).
17. Du J, Wang W, Chan JF, Wang G, Huang Y, Yi Y, et al. Identification of a novel ichthyic parvovirus in marine species in Hainan Island, China. *Front Microbiol.* 2019;10:2815.
18. Williams SH, Che X, Garcia JA, Klena JD, Lee B, Muller D, et al. Viral Diversity of House Mice in New York City. *mBio.* 2018;9(2).
19. Yang S, Liu Z, Wang Y, Li W, Fu X, Lin Y, et al. A novel rodent chapparvovirus in feces of wild rats. *Virol J.* 2016;13:133.
20. Edmondson EF, Hsieh WT, Kramer JA, Breed MW, Roelke-Parker ME, Stephens-Devalle J, et al. Naturally acquired mouse kidney parvovirus infection produces a persistent interstitial nephritis in immunocompetent laboratory mice. *Vet Pathol.* 2020;57(6):915-25.
21. Roediger B, Lee Q, Tikoo S, Cobbin JCA, Henderson JM, Jormakka M, et al. An atypical parvovirus drives Chronic tubulointerstitial nephropathy and kidney fibrosis. *Cell.* 2018;175(2):530-43 e24.
22. Murphy FA. *Veterinary virology.* 3rd ed. San Diego: Academic Press; 1999. x, 629 p. p.

23. Chappuis G, Soulier M, Nettleton PF. Ovine parvovirus infection in Scottish sheep. *Vet Rec.* 1987;121(8):182.
24. Tse H, Tsoi HW, Teng JL, Chen XC, Liu H, Zhou B, et al. Discovery and genomic characterization of a novel ovine partetravirus and a new genotype of bovine partetravirus. *PLoS One.* 2011;6(9):e25619.
25. Mosena ACS, da Silva MS, Lorenzetti MP, Cibulski SP, Weber MN, Budaszewski RF, et al. A new highly divergent copiparvovirus in sheep. *Arch Virol.* 2021;166(5):1517-20.
26. Li L, Deng X, Mee ET, Collot-Teixeira S, Anderson R, Schepelmann S, et al. Comparing viral metagenomics methods using a highly multiplexed human viral pathogens reagent. *J Virol Methods.* 2015;213:139-46.
27. Deng X, Naccache SN, Ng T, Federman S, Li L, Chiu CY, et al. An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e46.
28. Ye J, McGinnis S, Madden TL. BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Web Server issue):W6-9.
29. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-9.
30. Le SQ, Gascuel O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol.* 2008;25(7):1307-20.
31. Zadori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Garipey S, Raymond P, et al. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell.* 2001;1(2):291-302.
32. Loken T. Border disease in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1995;11(3):579-95.
33. Thabti F, Fronzaroli L, Dlissi E, Guibert JM, Hammami S, Pepin M, et al. Experimental model of Border Disease Virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet Res.* 2002;33(1):35-45.
34. Dawson M. Pathogenesis of maedi-visna. *Vet Rec.* 1987;120(19):451-4.
35. Narayan O, Clements JE. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol.* 1989;70 (Pt 7):1617-39.
36. Benavides J, Fuertes M, Garcia-Pariente C, Ferreras MC, Garcia Marin JF, Perez V. Natural cases of visna in sheep with myelitis as the sole lesion in the central nervous system. *J Comp Pathol.* 2006;134(2-3):219-30.

Gıda çalışanlarından izole edilen Enterobacterales suşlarında antimikrobiyal direnç ve GSBL/Karbapenemaz varlığının araştırılması

Investigation of antimicrobial resistance and ESBL/Carbapenemase presence in Enterobacterales strains isolated from food workers

Nesrin ÇAKICI¹ (ID), Yasemin NUMANOĞLU ÇEVİK² (ID), Serap SÜZÜK YILDIZ² (ID),
Alper AKÇALI³ (ID), Nükhet Nilüfer DEMİREL ZORBA⁴ (ID)

ÖZET

Amaç: Bu çalışma gıda endüstrisi çalışanlarından elde edilen toplum kaynaklı Enterobacterales üyelerinde antimikrobiyal direnç ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL), karbapenemaz üretme durumunun belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yöntem: Çanakkale il merkezi ve ilçelerindeki hastaneler (n: 9) ile gıda işletmelerinde (n: 17) görevli gıda çalışanlarının (n: 300) el sürüntü örnekleri Brain Heart Infusion Broth (BHI) besiyerine alındı. İnokülasyon 37°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra Eosine Methylen Blue agar (EMB) besiyerine ekildi. Bakterilerin tanımlanmasında klasik identifikasyon ve Matris aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS) yöntemi kullanıldı. Sefotaksim, seftazidim, meropenem ve ertapenem antibiyotiklerine karşı direnci ölçmek için disk difüzyon ve minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) yöntemleri uygulandı ve EUCAST 2020'ye göre değerlendirildi. Tarama testi sonuçlarına göre GSBL ve karbapenemaz fenotipik doğrulama testleri uygulandı. GSBL pozitif bulunan izolatlarda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemine göre CTX-M geni araştırıldı.

ABSTRACT

Objective: This study was carried out to determine the antimicrobial resistance and the production status of ESBL, carbapenemase in community-acquired Enterobacterales members obtained from food industry workers.

Methods: Hand swab samples of food workers (n: 300) working in hospitals (n: 9) and food businesses (n: 17) in Çanakkale city center and districts were taken into Brain Heart Infusion Broth (BHI) medium. Inoculum was inoculated into EMB medium after 24 hours of incubation at 37°C. Classical identification and MALDI-TOF MS method were used to identify bacteria. Disk diffusion and minimal inhibitory concentration (MIC) methods were applied to measure resistance against cefotaxime, ceftazidime, meropenem and ertapenem antibiotics and were evaluated according to EUCAST 2020. ESBL and carbapenemase phenotypic confirmation tests were performed according to the screening test results. The CTX-M gene was investigated in ESBL positive isolates using the PCR method.

* Bu çalışma, Ulusal Tek Sağlık Sempozyumunda sözlü sunum olarak sunulmuştur (21-22 Kasım 2019, Ankara).

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Çanakkale

²Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Biyolojik Ürünler Daire Bşk., Ankara

³Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Çanakkale

⁴Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği AD., Çanakkale



İletişim / Corresponding Author : Nesrin ÇAKICI

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Hiz. MYO Terzioğlu Kampüsü Çanakkale - Türkiye

E-posta / E-mail : ncakici@comu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 14.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 29.06.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.89814

Çakıcı N, Numanoğlu Çevik Y, Süzük Yıldız S, Akçali A, Demirel Zorba NN. Gıda çalışanlarından izole edilen Enterobacterales suşlarında antimikrobiyal direnç ve GSBL/Karbapenemaz varlığının araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 351 - 362

Bulgular: Elde edilen 222 adet gram negatif bakterinin tür bazında dağılımı; 129 (%58.1) *Klebsiella pneumoniae*, 32 (%14.4) *Enterobacter cloacae*, 31 (%13.9) *Acinetobacter baumannii*, 11 (%4.9) *Escherichia coli*, 8 (%3.6) *Enterobacter asburiae*, 4 (%1.8) *Escherichia hermanni*, 3 (%1.4) *Enterobacter aerogenes 2* (%0.9) *Klebsiella oxytoca*, 2 (%0.9) *Enterobacter cancerogenus* olarak belirlendi. Enterobacterales üyelerinden (n: 191) 7 (%3.7)'sinin klinik sınır değerlere göre sefotaksime dirençli (<17 mm) olduğu tespit edildi. Sefotaksim inhibisyon çapı GSBL tarama sınır değeri altında (<21 mm) tespit edilen 13 izolatın kombine disk ve çift disk sinerji testi sonuçlarına göre 2 adet bakterinin (*K. pneumoniae*, *E. cloacae*) GSBL pozitif olduğu belirlendi. PZR yöntemine göre *K. pneumoniae* izolatının CTX-M geni taşıdığı ve hastanede görevli olan bir gıda çalışanından izole edildiği tespit edildi. Enterobacterales suşlarının ve *A. baumannii* izolatlarının hiçbirinde karbapenem direncine rastlanmadı. Meropenem inhibisyon zon çapı 28 mm'den küçük olan 46 adet Enterobacterales türünün meropenem MK değeri 8 mg/l ile 0.125 mg/l arasında bulunmuştur. Meropenem zon çapı karbapenemaz tarama sınır değerinin (<25 mm) altında tespit edilen 2 adet izolata kombinasyon disk testi uygulandı buna göre karbapenemaz negatif olduğu tespit edildi.

Sonuç: Toplumda dirençli bakteri el taşıyıcılığının düşük olması (%3.7), toplum kaynaklı izolatların GSBL pozitifliğinin oldukça düşük (%1.04) bulunması, karbapenemaz pozitifliğine rastlanmaması antibiyotik dirençli izolatların gıda çalışanlarında düşük olduğunu düşündürmektedir. Gıda çalışanlarında bu sayıda gram negatif bakterilerin tespit edilmesi hijyen eğitimlerine önem verilmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Sefalosporin, karbapenem, enterobacterales, gıda çalışanları, MALDI-TOF MS

Results: Distribution of 222 gram-negative bacteria on the basis of species; 129 (%58.1) *Klebsiella pneumoniae*, 32 (14.4%) *Enterobacter cloacae*, 31 (13.9%) *Acinetobacter baumannii*, 11 (4.9%) *Escherichia coli*, 8 (3.6%) *Enterobacter asburiae*, 4 (1.8%) *Escherichia hermanni*, 3 (1.4%) *Enterobacter aerogenes 2* (0.9%) *Klebsiella oxytoca*, 2 (0.9%) *Enterobacter cancerogenus*. It was determined that 7 (3.7%) of the Enterobacterales members (n: 191) were resistant to cefotaxime (<17 mm) according to clinical limit values. According to the combined disc and double disc synergy test results of 13 isolates whose cefotaxime inhibition diameter was detected below the ESBL screening limit value, 2 bacteria (*K. pneumoniae*, *E. cloacae*) were found to be ESBL positive. According to the PCR method, it was determined that the *K. pneumoniae* isolate carried the CTX-M gene and was isolated from a food worker in the hospital. No carbapenem resistance was found in any of the Enterobacterales strains and *A. baumannii* isolates. Meropenem MIC values of 46 Enterobacterales species with a meropenem inhibition zone diameter smaller than 28 mm were found between 8 mg/l and 0.125 mg/l. Combination disc test was applied to 2 isolates whose diameter was below the carbapenemase screening limit (< 25mm) and accordingly it was found that they were carbapenemase negative.

Conclusion: The low rate of resistant bacteria hand carriers in the community (3.7%), the very low ESBL positivity of the community-acquired isolates (1.04%), and the absence of carbapenemase positivity suggest that antibiotic resistant isolates are low in food workers. The detection of gram-negative bacteria in this number of food workers made us think that hygiene training should be given importance.

Key Words: Cephalosporin, carbapenem, enterobacterales, food workers, MALDI-TOF MS

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünyanın dört bir yanından gelen verileri analiz ederek 2014 yılında derlediği raporunda antibiyotik direncinin küresel bir tehdit oluşturduğunu, ciddi ve etkin önlemler alınmaz ise yıllardır kolayca tedavi edilebilen enfeksiyonların zamanla ölümlere yol açmasının kaçınılmaz olacağını belirtmektedir. Antimikrobiyal ilaç direncinin en acil alanlarından biri son yıllarda dünyaya yayılmış olan Enterobacterales türlerinde rastlanan florokinolon, sefalosporin ve karbapenem direncinin hızlı artışıdır. Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) enzimleri sebebiyle penisilinler ve sefalosporinlerin çoğunu hidrolize edebilen şuşların tüm dünyada yayıldığı, GSBL üretiminin en sık *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* türlerinde saptandığı görülmektedir (1). GSBL pozitif şuşlar, nozokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyonların yanı sıra toplum kaynaklı enfeksiyonlardan da artan sıklıkla izole edilmektedir (2). GSBL prevalansındaki artış karbapenemlerin (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) kullanılmasında da artışa neden olmuştur. Karbapenem direncine neden olan en önemli mekanizma karbapenemaz enzimleridir. Enterobacterales üyelerinde Ambler sınıflandırmasına göre A, B ve D sınıfına ait enzimler karbapenem direncinden sorumludurlar (3). Başta *K. pneumoniae* olmak üzere Enterobacterales üyelerinde karbapenemaz üreten şuşların Türkiye dahil küresel anlamda yayıldıkları bilinmektedir (4). Karbapenemazlar tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı dirence yol açmaları ve kolayca yayılabilmeleri nedeniyle bir endişe kaynağı oluşturmaktadır. Karbapenemaz üreten Enterobacterales türleri sebep olduğu enfeksiyonların yüksek mortalite hızları nedeniyle önemli bir sorun teşkil etmektedir (5-6).

Günümüzde ülkeler antimikrobiyal direnç verilerini yayınlamaya başlamıştır. ECDC (Avrupa Hastalıkları Önleme Merkezi) ve EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) ortaklığında hazırlanan

raporda gıda kaynaklı enfeksiyon etkeni olan *E. coli* gibi bazı bakterilerin gıda, hayvan ve insan kaynaklı izolatlarının antibiyotik direnç verilerine yer verilmiştir (7). Enterobacterales türleri bağırsak mikrobiyotasının üyeleridir aynı zamanda en yaygın insan patojenlerini barındırabilmektedir. Ateş, septisemi, pnömoni, peritonit, menenjit ve vücuda takılan araçla (kateter, sonda vb.) ilişkili enfeksiyonlarla birlikte sistit ve piyelonefrit gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır Toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olabilen Enterobacterales grubu bakteriler kontamine eller, kontamine gıda ve su aracılığıyla kolaylıkla yayılabilmektedir (8). Suudi Arabistan'da gerçekleştirilen bir çalışmada gıda çalışanlarının el ve nazal sürüntü örnekleri incelenmiş, izole edilen *E. coli* şuşlarının %19'u, *K. pneumoniae* şuşlarının %12'sinin GSBL olduğu belirlenmiştir (9). Katar'da gerçekleştirilen başka bir çalışmada gıda çalışanlarının dışkı örneklerinden elde edilen 78 *E. coli* izolatından yedi tanesinin (%9) GSBL üreticisi ve bunların beşinin MDR olduğu belirlenmiştir (10).

Bu çalışmanın amacı, gıda endüstrisi çalışanlarından elde edilen toplum kaynaklı Enterobacterales türlerinde antimikrobiyal direnç ve GSBL, karbapenemaz üretme durumunun belirlenmesi, enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığına katkı sağlayabilecek verilerin elde edilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örnekleme

Araştırma, Çanakkale il merkezi ve ilçelerindeki hastaneler (n=9) ile bazı yemek fabrikası, restoran, lokanta vb. gıda işletmelerinde (n=17) gıdaların işlenmesinde ve servisinde görevli gıda çalışanlarının (n=300) sağ ve sol el sürüntü örneklerinden izole edilen toplam 222 adet Enterobacterales türü olan bakteriler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Steril eküvyonlarla el içlerinden, parmak aralarından ve el

üstünden alınan sürüntü örnekleri 10 ml steril Brain Heart Infusion Broth besiyerine (Merck, 110493) inokule edilerek soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir. Elde edilen inokulümler 37°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra Eosin Metilen Blue agar (Merck 1.01347) besiyerine ekilmiştir. 37°C de 24-48 saatlik inkübasyon sonrası görülen tipik kolonilerden elde edilen Gram negatif basiller %20 lik gliserollü buyyon (Merck, 110493) besiyeri içerisinde -20°C saklanmıştır.

Bakteriyel Tanımlama

Tanımlama amacıyla izolatlar oksidaz testi, gaz ve H₂S oluşumu, glikoz, laktoz ve sükroz kullanımı, üreaz üretimi ve IMVIC testlerinden oluşan klasik identifikasyon testlerine tabi tutulmuştur (11). İzolatların tür düzeyinde tanımlanması amacıyla Matriks aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI TOF MS) yöntemi ile mikrobiyal biyokütle analizi için MALDI-TOF MS cihazı (Bruker Microflex LT, Almanya) ve Flex Control 3.0 yazılımı kullanılmıştır. Her bir izolattan tek birkoloni alınarak özel çelik 96 Micro Score Plate MALDI plakasındaki kuyucuklara doğrudan transfer yöntemi ile ince film halinde sürümüştür. Kuruduktan sonra üzerine 1 µl HCCA matris çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında tamamen kurumaya bırakılarak kristal oluşumu sağlanmıştır. Örnek yüklü plaka MALDI- TOF MS cihazında işleme alındı ve sistem lineer pozitif iyon moduyla ve 2.000-20.000 Da kütle aralığında mikroorganizmaların tanımlanması için optimize edilmiş yöntemle çalıştırılmıştır.

Spektrumları elde etmek için, her numunenin ölçümünde 40 paket 240'dan oluşan lazer darbeleri gerçekleştirilerek her örnek için üç çalışma yapıldı ve en yüksek puana sahip okuma dikkate alınmıştır. Spektrumlar, MALDI Biotyper otomasyon kontrollü yazılımı ve kütüphanesi kullanılarak analiz edilmiştir. Kullanılan tanımlama puan (skor) ölçütleri imalatçı firma (Bruker) tarafından tavsiye edilen prosedüre göre uygulanmıştır.

Enterobacterales türlerinde GSBL varlığının belirlenmesi

GSBL Tarama Testleri: İzolatların “Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi” (EUCAST, 2020) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile sefotaksim (5 µg) ve seftazidim (10 µg) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları analiz edilmiştir. İnhibisyon zon çapı sefotaksim için 21 mm, ve/veya seftazidim için 22 mm'den küçük olması durumunda türe bağlı GSBL fenotipik doğrulama testi uygulanmıştır (12). Kalite kontrol suşları olarak *E. coli* ATCC 25922 (Negatif kontrol) ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Pozitif kontrol) kullanılmıştır.

Fenotipik Doğrulama Testleri: *E. coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarının GSBL aktivitesinin in vitro şartlarda klavulanik asit ile inhibisyonu temeline dayanan fenotipik yöntemlerden Kombinasyon Disk Testi (KDT) kullanılmıştır. Sefotaksim (<21 mm) ve seftazidim (<22 mm) disklerinden birine veya her ikisine birden dirençli olan bakterilerin sefotaksim/klavulanik asit (30/10 µg) ve seftazidim/klavulanik asit (30/10 µg) disklerine karşı duyarlılıklarına bakılmıştır. Eğer kombinasyon diski çevresindeki zon, tek başına sefalosporin içeren diskin inhibisyon zonuna kıyasla ≥5 mm daha genişse, GSBL pozitif kabul edilmiştir.

Sefotaksim ve seftazidim disklerinden birine veya her ikisine birden dirençli olan *Enterobacter* spp. İzolatlarının GSBL fenotipik doğrulaması için, çift disk sinerji yöntemi uygulanmıştır (ÇDS). Sefepim (30 µg) ve klavulanik asit (10 µg) birlikte konulduğu petri kabında Sefepim diskinin zon çapının klavulanik asit diskinin yüzünde genişleme olması GSBL pozitif kabul edilmiştir (12).

Genotipik Doğrulama Testleri: GSBL pozitif bulunan izolatların beta-laktamaz kodlayan ctx, shv, tem genleri Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırılmıştır. DNA izolasyonu için 8-10 koloni steril saf su içerisinde 10 dakika kaynatılmıştır. 2 dakika 13000 xg devirde santrüfuj edildikten sonra süpernatant DNA kaynağı olarak kullanılmıştır. Önceden tanımlanmış primerler kullanılarak PZR reaksiyon karışımı ve PZR

döngüleri oluşturulmuştur. Amplifiye edilmiş DNA ürünleri 1x TBE tamponu içerisinde, etidyum bromür eklenmiş % 1.5'lik agaroz içerisinde jel elektroforezi yöntemine göre analiz edilmiştir. 100 Volt akımda, 40 dakika yürütülmüştür (13).

Enterobacterales Türlerinde Karbapenemaz Varlığının Saptanması

Tarama Testleri: Karbapenemaz taraması için meropenem zon çapı 25-27 mm olan izolatlarda temosilin'e karşı direnç bakıldı. Temosilin'e dirençli olmayan ve meropenem inhibisyon zon çapı karbapenemaz tarama sınır değerinin (<25mm) altında tespit edilen bakterilere karbapenemaz kombinasyon disk testi uygulanmıştır. Tarama eşik değerleri meropenem (10µg) diski için 28 mm'den küçük olan izolatlara Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) testi uygulanmıştır (Tablo 1).

Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK): EUCAST standartları doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 0.125-128 mg/l konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Bakteri üremesinin gözlenmediği son kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak tespit edilmiştir. Meropenem için direnç sınır değeri >2mg/l olarak değerlendirilmiştir.(12).

Fenotipik Doğrulama Testleri: EUCAST önerileri doğrultusunda steril petri kaplarının içerisinde meropenem diskleri üzerine 100 mg/l dipikolinik asit (DPA), 0.2 M EDTA, 60 mg/ml aminofenil boronik asit (APBA), 75 mg/l kloksasilin solüsyonundan 10'ar µl damlatılarak 30 dak. bekletilmiştir. 0.5 McFarland standardına göre hazırlanan inokulum Mueller Hinton agar plaklarına yayılıp üzerine, inhibitör içeren

ve içermeyen meropenem disklerinden birer adet konuldu. Karbapenemaz kombinasyon disk testine göre inhibitörlü disklerde sinerji olup olmadığı test edilmiştir(12).

Çalışma için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 15.03.2017 tarihinde verdiği 2017/05-03 sayılı izin alınmıştır.

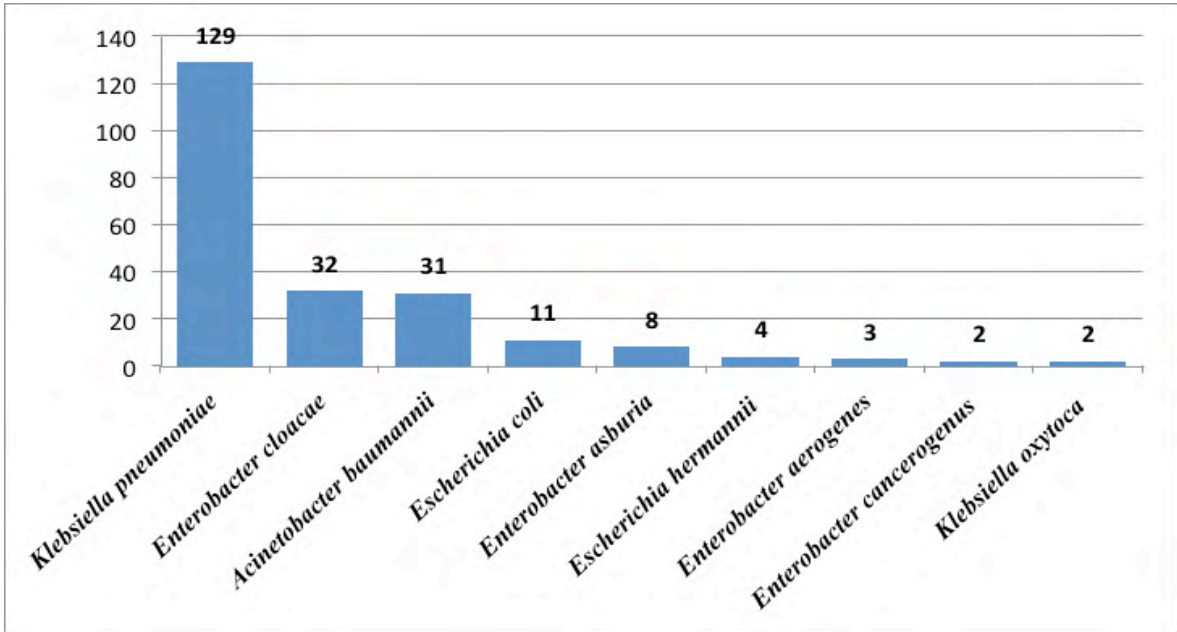
BULGULAR

Çanakkale ilinde çalışmaya dahil edilen gıda çalışanlarını (n:300) farklı gıda işletmelerinde (lokanta, restoran, yemek fabrikası vb.) çalışanlar (n:128) ve hastanelerin yemek pişirme ve dağıtım işlerinde görevli kişiler (n:72) oluşturmuştur. Gıda işletmelerinde çalışan kişilerin 164 (%71.9)'ü erkek, 64 (%28.1)'ü kadın iken, hastanede çalışanların 29 (%40.2)'u erkek, 43 (%59.8)'ünün kadın olduğu tespit edilmiştir. Gıda işletmelerinde çalışanların 124 (%54.4)'ünde, hastane çalışanların 34 (%47.2)'ünde Gram negatif bakteri el taşıyıcılığı tespit edilmiştir (Tablo 2).

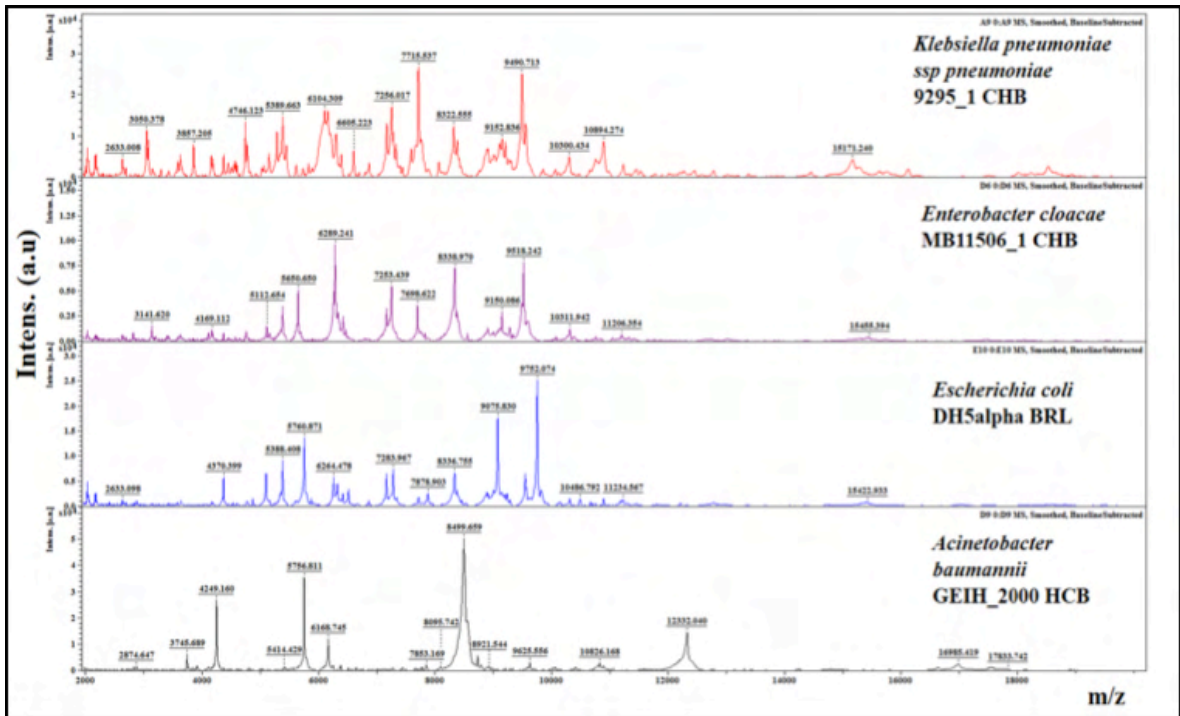
Gıda çalışanlarının el sürüntü örneklerinden 222 adet Gram negatif bakteri izole edildi. MALDI-TOF MS'ye göre izolatların 129 (%58.1)'ünün *K. pneumoniae*, 32 (%14.4)'sinin *E. cloacae*, 31 (%13.9)'inin *Acinetobacter baumannii*, 11 (%4.9)'inin *E. coli* olduğu tespit edildi. Ayrıca izolatlar arasında *Enterobacter asburiae* (n:8), *Escherichia hermannii* (n:4), *Enterobacter aerogenes* (n:3), *Klebsiella oxytoca* (n:2), *Enterobacter cancerogenus* (n:2) türlerine rastlandı (Şekil 1). En çok tespit edilen bakterilere ait spektrumlar Şekil 2'de verildi.

Tablo 1. Karbapenemaz tarama testleri

Karbapenem	MİK (mg/L)		Disk difüzyon zonları (mm)	
	S/I sınır değeri	Tarama eşik değeri	S/I sınır değeri	Tarama eşik değeri
Meropenem (10µg)	≤2	>0.12	≥22	<28
Ertapenem (10µg)	≤0.5	>0.12	≥25	<25



Şekil 1. MALDI-TOF MS yöntemine göre tespit edilen bakteri türleri ve dağılımları



Şekil 2. MALDI-TOF MS yöntemi ile en çok tespit edilen bakterilere ait kütle spektrumları

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre; 191 adet Enterobacterales üyesinden yed'sinin (%3.7) klinik sınır değerlere göre (EUCAST) sefotaksime dirençli (<17mm) olduğu tespit edildi. Bu izolatların *E. cloacae* (n:4), *K. pneumoniae* (n:2), *E. coli* (n:1) oldukları belirlendi. Dirençli suşların 6'sı gıda işletmelerinde çalışanları, bir tanesi hastane gıda çalışanı el sürüntü örneğinden izole edilmiştir (Tablo 2).

On üç izolatın (%6.8) sefotaksim inhibisyon zon çapının GSBL tarama sınır değeri altında (<21mm) olduğu tespit edilmiştir. Tarama sınır değeri altında kalan *K. pneumoniae* (n:6), *E. cloacae* (n:6) ve *E. coli* (n:1) bakterilerine uygulanan kombine disk ve çift disk sinerji fenotipik doğrulama testi sonuçlarına göre iki adet bakterinin (*K. pneumoniae*, *E. cloacae*)

GSBL pozitif olduğu belirlendi. PZR yöntemine göre *K. pneumoniae* izolatının CTX-M enzimi geni taşıdığı ve hastanede görevli olan bir gıda çalışanından izole edildiği belirlenmiştir.

Enterobacterales suşlarının ve *A. baumannii* izolatlarının hiçbirinde disk difüzyon yönteminde klinik sınır değerlere göre karbapenem direncine rastlanmamıştır. Meropenem MİK testi için meropenem zon çapı 28 mm'den küçük olan 46 adet izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Bu izolatların meropenem MİK değeri klinik sınır değer olan 8 mg/l ile 0.125 mg/l arasında tespit edildi. Karbapenemaz taraması sonuçlarına göre iki adet bakteriye karbapenemaz kombinasyon disk testi uygulandı. İnhibitörlü disklerde sinerjiye rastlanmadı. Bu izolatlarda karbapenemaz negatif olarak belirlendi.

Tablo 2. Gıda çalışanlarının işyeri, cinsiyet, taşıyıcılık durumları ve dirençli bakterilerin dağılımı.

İşyerleri	Cinsiyet n (%)	Gram negatif bakteri el taşıyıcısı, n (%)	Enterobacterales türleri (n:191) Sefalosporin direnci n (%)
Gıda işletmeleri (lokanta, restoran, yemek fabrikası vb.)	Kadın 64 (28.1)	124 (54.4)	3 (1.6)
	Erkek 164 (71.9)		3 (1.6)
	Toplam 228 (100)		6 (3.1)
Hastane (mutfak, yemek servisi)	Kadın 43 (59.8)	34 (47.2)	0
	Erkek 29 (40.2)		1 (0.5)
	Toplam 72 (100)		1 (0.5)
Toplam	Genel Toplam 300 (100)	158 (52.7)	7 (3.7)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda gıda çalışanlarında izole ettiğimiz 222 Gram negatif bakterinin 2 adedinde GSBL varlığı, bunların içinde bir tanesinin CTX-M türü olduğu tespit edilmiştir. Bakterilerin hiçbirisinde karbapenemaz varlığı gösterilmemiştir.

Gıda çalışanları farklı yollarla patojen veya dirençli bakterilerin yayılımına sebep olabilirler. Patojen bakteri el taşıyıcılığı olan kişiler hazırladıkları/sundukları gıdaların, kullandıkları ekipmanların, çalıştıkları ortamın hatta çalışma arkadaşlarının. kontaminasyonuna sebep olabilirler. Bir üniversite kampüsünün altı farklı kantinindeki gıdalar, hazırlama yüzeyleri ve çalışan ellerinin mikroorganizmalar ile kontamine olduğu, bu mikroorganizmaların birbirleriyle aynı veya benzer yapıda oldukları saptanmıştır. Ayrıca, izolat sayıları dikkate alındığında, en yüksek kontaminasyonun gıda çalışan ellerine ait olduğu tespit edilmiştir (14). Güney Afrika'da şarküteri bölümünde çalışan gıda işçilerinin ellerinde ve önlüklerindeki Enterobacterales türleri taşıyıcılık oranının sırasıyla ı %44, %16 olduğu tespit edilmiştir (15). Kayseri'de yapılan çalışmada da pastırma satış noktalarındaki gıda çalışanlarının ellerindeki *E. coli* el taşıyıcılığı oranı %10,6, Enterobacterales türleri taşıyıcılığı %44,6 oranında bulunmuştur (16). Hastanelerde yemek hizmeti ile görevli kişiler hastane ortamında direnç kazanmış bakterilerle kontamine olduklarında hastanede ve toplumda yayma potansiyeline sahip olmaktadır. Böylece dirençli bakterilerin toplumda yayılarak halk sağlığı sorunu oluşturması kaçınılmaz olmaktadır. Antibiyotik direnci görülen bakterilere genellikle klinik izolatlarda rastlanmakla beraber yapılan çalışmalarda hastanelerin yanı sıra toplumda da dirençli bakterilere rastlandığı gösterilmiştir (17).

Fas'taki bir hastaneye yemek hizmeti veren işletmedeki gıda işçilerinin *E. coli* el taşıyıcılık oranı %45 bulunmuştur. Gıda, yüzey ve işçilerden izole edilen izolatlardan sefotaksim'e karşı %55.6 oranında dirençli oldukları gösterilmiştir (18). Bu çalışmada

lokanta, restoran gibi gıda işletmelerinde çalışan kişilerin Enterobacterales türleri taşıyıcılık oranı %54.4, hastane yemek hizmetinde çalışanların ise %47.2 saptanmıştır. Genel olarak taşıyıcılık oranı %52.7 olarak oldukça yüksek bulunmuştur. Toplum kaynaklı Enterobacterales türlerinin 7 (%3.7)'sinin sefotaksime dirençli olduğu, dirençli suşların 6 (%3.1)'sının gıda işletmelerinde çalışanlardan, bir tanesinin (%0.5) hastane gıda çalışanından izole edildiği görülmüştür.

GSBL üretimi Enterobacteriaceae ailesi türlerinin sefalosporinlere karşı en yaygın direnç nedenidir. 2000 yılından bu yana, GSBL üreten Enterobacteriaceae enfeksiyonlarının insidansı hem hastanelerde hem de toplumda küresel olarak artmıştır. Son yıllarda, GSBL/AmpC üreten *E. coli* hayvanlardan, yiyeceklerden, çevresel kaynaklardan ve insanlardan artan sıklıkta izole edilmiştir (19). Antibiyotik dirençli suşlar toplumda kontamine eller, kontamine gıdalar vasıtasıyla yayılabilirler. Kümes hayvanlarının hazırlanmasından sonra GSBL üreten *E. coli*, kesme tahtalarının %12'sinde ve eldivenlerin %50'sinde tespit edilmiş ve bu sonuçlar bulaşma için önemli bir kaynağa işaret etmiştir (20).

Yapılan çalışmalarda toplumda sağlıklı bireylerin dışkılarında değişen oranlarda GSBL taşıyıcılığı rapor edilmiştir. Doğu Akdeniz bölgesinden 2005 yılında yayınlanan ilk verilere göre genç sağlıklı öğrencilerde GSBL taşıyıcılığı %2.4 olarak saptanmıştır. Tunus'ta 2010'da %7.3, 2011'de Mısır'da %63.3 olarak belirlenmiştir. Afrika'dan bildirilen oranlara göre Senegal'de %10, Nijerya'da %30.9 olarak saptanmıştır. GSBL taşıyıcılık oranı Avrupa'da %5'in altında bulunmuştur (21). 2003-2007 yılları arasında Avrupada Sağlıklı kişilerde fekal GSBL taşıyıcılık oranı %1-%8 iken Asya ve Afrika ülkelerinde bu oranın %50-%60 olduğu bildirilmiştir. Güney Etiyopya'da öğrenci kafeteryasında çalışan gıda işçilerinin dışkılarında izole edilen *E. coli* ve *K. pneumonia* izolatlardan %25.3'ü GSBL pozitif olduğu belirlenmiştir (22). Japonya'da yapılan başka bir çalışmada sağlıklı gıda çalışanlarının dışkısı sadece bir defa ve ikiden fazla

GSBL pozitif bakteri açısından taranmıştır. Sırasıyla GSBL pozitifliği %3.1 ve %15.6 oranında olduğu saptanmış, üç aydan iki yıla kadar taşıyıcılıklarının devam ettiği belirlenmiştir (23). Bu konuda ülkemizde yapılmış bir çalışmada hastaneye ayaktan başvuran kişilerin dışkılarında %30 oranında GSBL taşıyıcılığına rastlandı (24). İnsan bağırsak florasının üyeleri olan Enterobacterales türleri eller, su ve yiyecekler vasıtasıyla kolayca yayılabilirler.

Dünyada toplum kökenli idrar yolu enfeksiyonlarından en sık *E. coli*, ardından *Klebsiella* ve *Proteus* türleri izole edilmektedir. Toplum kaynaklı GSBL üreten Enterobacterales izolasyon sıklığı, sosyokültürel özelliklere ve coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. (25). Türkiye’de yapılan bir meta-analizde hastaneye ayaktan başvuran hastaların idrar kültür sonuçlarının değerlendirildiği 67 çalışmanın sonuçlarına göre GSBL oranları %20’nin altında tespit edilmiştir (26).

2000 yılından beri CTX-M tip enzimleri, tüm kıtalardan çeşitli bakteri türlerinde özellikle *E. coli*’de sık gösterilmiştir (27). CTX-M enzimi pozitif *E. coli*’nin dünya çapında (sağlık hizmetleri, toplum, çiftlik hayvanları, evcil hayvanlar, çevre) yaygınlığı söz konusudur (28). CTX-M üreten *E. coli*, çoklu ilaca dirençli bakteriler arasında önemlidir ve antimikrobiyal ilaç direnci alanında gözetim, enfeksiyon kontrolü, temel araştırmalar için ana hedef olarak kabul edilmelidir (29). Enterobacterales ailesine ait ESBL üreten bakterilerin, özellikle CTX-M-15 üreten *E. coli* ST131 klonunun bağırsakta taşınmasının yaygınlığı, son zamanlarda büyüyen bir halk sağlığı olarak kabul edilmektedir ve dünya çapında endişe verici bir durumdur (30). Küresel olarak, son yirmi yılda toplumda GSBL pozitif *E. coli*’nin bağırsakta taşıma oranında 8 kat artış meydana gelmiştir. Yayılmasının önlenmesi, yeni tedavi ve halk sağlığı stratejileri uluslararası işbirliğini gerektirmektedir (31).

CTX-M pandemisi Enterobacterales suşları arasında sefalosporin direncindeki hızlı artışa önemli

ölçüde katkıda bulunmuştur. Bu artış çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin kullanımının artmasına neden olmuştur (27). Epidemiyolojik açıdan ve halk sağlığı açısından önem arz eden karbapenem direnç mekanizması, karbapenemleri hidrolize eden beta-laktamazların (karbapenemazların) üretimidir. Karbapenemaz üretimi plazmidlerle aktarılabildiğinden, çoklu veya tam dirence neden olabildiğinden önemli bir direnç mekanizması olarak kabul edilmektedir (31, 32). Karbapenem dirençli Enterobacteriaceae, halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır ve hızla küresel olarak yayılmaktadır (33). Avrupa Hastalık Kontrol Merkezinin (ECDC) Avrupa kıtasındaki EURGen-Net süveyans sistemi kapsamında Türkiye’de 26 farklı hastanede toplanan izolatların karbapenemaz epidemiyolojik verileri elde edilmiştir (34). Ülkemizde karbapenemaz süveyansının izlenmesinde toplum kökenli dirençli suşlara ait verilere de yer verilmesi epidemiyolojik izleme katkı sağlayabilir.

Ülkemizde ve Avrupa’da toplum kaynaklı suşlar arasında karbapenem direnci yok denecek kadar azdır. Bizim çalışmamızda da toplum kaynaklı 222 adet gram negatif bakterinin hiçbirinde karbapenem direncine rastlanmamıştır. Tarama sonuçlarına göre karbapenemaz taşıyan bakteriye de ulaşılamamıştır.

Sonuç olarak; çalışmamızda toplum kaynaklı Enterobacterales türlerinde sefalosporin dirençli suşların çok yaygın olmadığı, karbapenem direnci taşımadıkları tespit edilmiştir. Son yıllarda toplumda kazanılmış enfeksiyonlarda dirençli suşların ortaya çıkışı önem kazanan bir halk sağlığı sorunudur. “Tek Sağlık” yaklaşımı altında sağlıklı bireyler, çevre, su, gıda, toprak, tarımsal ürünler hatta hayvanlardan elde edilen izolatlarda direnç verilerinin belirlenmesi enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığı açısından katkı sağlayacaktır. Bunun yanında gıda çalışanlarında hijyen eğitimi önem verilmesi gerektiği düşünülmüştür.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: THD-2019-3085.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 15.03.2017 ve Karar no: 2017/05-03).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance. World Health Organization. 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> Erişim tarihi: 31.1.2021.
2. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:144-53.
3. Tekintaş Y, Çilli F, Eraç B, Yaşar M, Aydemir SS, Hoşgör Limoncu M. Klinik *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz üretiminin saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu ve fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul, 2017; 51(3):269-76.
4. Poirel L, Heritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*, Antimicrob. Agents Chemother, 2004; 48:15-22.
5. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. Arch Intern Med, 2005;165(12):1430-5.
6. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):413-31.
7. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2017/2018. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/EU-summary-report-antimicrobial-resistance-zoonotic-bacteria-humans-animals-2018.pdf>. Erişim Tarihi: 2.02.2021.
8. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis, 2011;17:1791-1798.

9. Khan M. A. Detection of colonized pathogenic bacteria from food handlers in Saudi Arabia. *J Pure Appl Microbiol*, 2018; 12(3):1301-1306.
10. Eltai NO, Yassine HM, Al Thani AA, Abu Madi MA, Ismail A, Ibrahim E, et al. Prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* isolates from fecal samples of food handlers in Qatar. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7: 78.
11. Bilgehan, H.: Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 2 nci Baskı, İzmir, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 1995, s.425-50.
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>. Erişim Tarihi:18.12.2020.
13. Kacmaz B, Unaldi O, Sultan N, Durmaz R. Drug resistance profiles and clonality of sporadic *Shigella sonnei* isolates in Ankara, Turkey. *Braz J Microbiol*, 2014; 45: (3) 845-9.
14. Erdoğan M, Pamuk Ş. Microbial contamination in food, food- handlers' hands and surfaces and evaluation of contamination sources by the similarity between isolates. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 2020;67: 73-9.
15. Lues JFR, Van Tonder I., The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group, *Food Control*, 2007; 18(4): 326-32.
16. Yıldırım Y, Ertaş Onmaz N, Gönülalan Z, Hızlısoy H, Al S, Karadal F ve ark.. Knowledge and attitudes in food safety and the occurrence of indicator bacteria on hands of food handlers at the point of pastrami sale. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 2020; 67, 153-160.
17. Van Duin D, Paterson DL. Multidrug-resistant bacteria in the community: Trends and lessons learned. *Infect Dis Clin North Am*, 2016; 30:377-90.
18. Benjelloun T.G, Laila B, Sanae B, Moussa B, Bahia B. Molecular serotyping and antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolated in hospital catering service in Morocco. *Int J Microbiol*. 2020; 5961521: 8.
19. Dorado-GarciaA, Smid JH., PeltWvan, Bonten MJM., FluitAC, et al. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother*, 2018;73 : 339-47.
20. Tschudin-Sutter S, Frei R, Stephan R, Hachler H, Nogarth D, Widmer AF. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: a threat from the kitchen. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2014;35: 581-4.
21. Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev*, 26 (2013), pp. 744-58.
22. Çakır Erdoğan D , Cömert F, Aktaş E, Köktürk F, Külah C. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Turkish community. *Turk J Med Sci*, 2017; 47: 172-9.
23. Nakane K, Kawamura K, Goto K, Arakawa Y. Long-term colonization by blaCTX-M-harboring *Escherichia coli* in healthy japanese people engaged in food handling. *Appl Environ Microbiol*, 2016; 82:1818-27.
24. Diriba K, Awulachew E, Tekele L, Ashuro Z. Fecal carriage rate of extended-spectrum Beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among apparently health food handlers in Dilla University Student Cafeteria. *Infect Drug Resist*. 2020; 13: 3791-800.
25. Çelikkbilek N, Gözalan A, Özdem B, Kırca F, Açıkğöz ZB. Genişlemiş spektrumlu Beta-laktamaz üretimi: yedi yıllık izlem sonuçları. *Mikrobiyol Bul*, 2015; 49(2): 259-65.
26. Akyan ŞB, Çiftçi İH. Türkiye'de idrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotiklere direnç durumu: Bir meta-analiz. *Mikrobiyol Bul*, 2013; 47(4): 603-18.
27. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum -lactamaseproducing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern, *Lancet Infect Dis*, 2008;8:159 -66
28. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group, *Clin Microbiol Rev*, 2014; 27:543-74
29. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Jr Gilber D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: An update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America, *Clin Infect Dis*, 2006;42:657-68
30. Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Kamimura T, Shimono N, AkashiK. Community spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long-term study in Japan. *J Med Microbiol*, 2013; 62:1038-43.

31. BezabihY, Sabiiti W, Alamneh E , Bezabih A, Peterson G, Bezabhe W, Roujeinikova A. The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* in the community. J Antimicrob Chemother, 2020;76 (1): 22-9
32. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2950-4
33. Alizadeh N, Rezaee MA, Kafil HS, Barhaghi MHS, Memar MY, Milani M, Hasani A, Ghotaslou R. Detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae by chromogenic screening media. J Microbiol Methods. 2018;153:40-4.
34. Süzük Yıldız S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, Numanoğlu Çevik Y, Hekimoğlu CH, Kılıç S ve ark. Türkiye’de 2019 yılı içinde izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz epidemiyolojisi. Mikrobiyol Bul, 2021;55(1):1-16

Investigation of biofilm formation of *Enterococcus* species isolated from blood by phenotypic and genotypic methods

Kandan izole edilen *Enterococcus* türlerinde biyofilm oluşumunun fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması

Zeynep ÖZKÖK¹ (ID), Kemal BİLGİN² (ID), Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI² (ID), Asuman BİRİNCİ² (ID)

ABSTRACT

Objective: *Enterococcus* spp. are widely found in environment and can cause diseases. Although the factors that explain its virulence have not yet been fully clarified, enterococcal surface protein (esp) has been associated with the ability of biofilm formation in both *Enterococcus faecalis* and the *Enterococcus faecium*. In our study, it was aimed to determine the vancomycin resistance status of *E. faecalis* and *E. faecium* species and to investigate the presence of esp gene which is thought to be related of with polymerase chain reaction and biofilm formation capacity by phenotypic methods.

Methods: A total of 170 *Enterococcus* spp. (*E. faecalis* n = 85, *E. faecium* n = 85) isolates that were isolated from blood culture were included in the study. Species identification was performed using conventional and automated methods. Vancomycin susceptibilities of isolates were determined by Kirby-Bauer disk diffusion method. Biofilm formation was evaluated phenotypically by using Tube and Microtitration plate methods. In all isolates, the presence of esp gene which is associated biofilms was investigated by polymerase chain reaction (PCR) method.

ÖZET

Amaç: Doğada yaygın olarak bulunabilen enterokoklar, çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Virülansını açıklayan faktörler henüz tam olarak netlik kazanmamış olmakla birlikte enterokokal yüzey proteini (esp), hem *Enterococcus faecalis* hem de *Enterococcus faecium*'un biyofilm oluşturma yeteneğiyle ilişkilendirilmektedir. Çalışmamızda *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin vankomisine direnç durumlarının belirlenmesi ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülen esp gen varlığının polimeraz zincir reaksiyonu ile, biyofilm oluşturma kapasitelerinin de fenotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya kan kültüründen izole edilen 85'i *E. faecalis*, 85'i *E. faecium* olacak şekilde toplam 170 adet *Enterococcus* izolatu dahil edilmiştir. Türlerin tanımlanması konvansiyonel ve otomatize yöntemler kullanılarak yapılmıştır. İzolatların vankomisine duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Tüm izolatlar tüp ve mikrotitrasyon plak yöntemleri kullanılarak biyofilm oluşumu yönünden fenotipik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca izolatlarda, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak enterokoklarda biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülen esp geninin varlığı araştırılmıştır.

¹Başakşehir Çam and Sakura City Hospital, İstanbul

²Ondokuz Mayıs University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Samsun



İletişim / Corresponding Author : Kemal BİLGİN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD Samsun - Türkiye

E-posta / E-mail : kemal.bilgin@omu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 17.03.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 29.06.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.02328

Özkök Z, Bilgin K, Tanrıverdi Çaycı Y, Birinci A. Investigation of biofilm formation of *Enterococcus* species isolated from blood by phenotypic and genotypic methods. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 363 - 372

Results: When the vancomycin susceptibilities of the strains included in the study were examined, it was found that 14 of the *E. faecalis* isolates (16.5%) were moderately susceptible and 1 of them was (1.2%) resistant. And 29 (34.1%) of *E. faecium* isolates were found to be resistant. It was determined that 5 strains (5.9%) were formed biofilm by tube method. By microtiter plate method, 27 (31.8%) tested strains were determined positive for biofilm formation. The 5 isolates which were positive by tube method also found positive by microtiter plate method. All strains that were positive in both phenotypic methods were found to be *E. faecalis*. And 49 (57.6%) *E. faecalis* and 20 (23.5%) *E. faecium* strains were found positive esp. When the genotypic method was compared with phenotypic methods, 24 isolates which were found positive by microtiter plate method and 5 isolates which were found positive by tube method, were found positive for esp gene.

Conclusion: According to these results, *E. faecalis* isolates are thought to have higher biofilm formation capacity than *E. faecium*. Furthermore, it is thought that the esp gene may be related to biofilm formation but the presence of esp alone is not sufficient for biofilm formation. New and comprehensive studies on the subject will be able to provide new and useful data on the role of biofilm formation in the virulence of enterococci.

Key Words: *Enterococcus* spp., biofilm, virulence factors

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen suşların vankomisine duyarlılıkları incelendiğinde, *E. faecalis* izolatlarının 14 tanesi (%16,5) orta duyarlı, 1 tanesi (%1,2) dirençli; *E. faecium* izolatlarının ise 29 tanesi (%34,1) dirençli olarak bulunmuştur. Tüp yöntemi ile 5 suşun (%5,9) biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Mikrotitrasyon plak yöntemi ile ise 27 suş (%31,8) pozitif olarak tespit edilmiştir. Tüp yönteminde pozitif çıkan beş izolatın hepsinin aynı zamanda mikrotitrasyon yönteminde de pozitif olduğu görülmüştür. Her iki fenotipik yöntemde de pozitif olan suşların tamamının *E. faecalis* olduğu görülmüştür. PZR işleminin sonucunda 49 (%57,6) *E. faecalis*, 20 (%23,5) *E. faecium* suşunda esp varlığı saptanmıştır. Fenotipik yöntemler ile genotipik yöntem karşılaştırıldığında mikrotitrasyon plak yönteminde pozitif olan izolatlardan 24 tanesi, tüp yönteminde pozitif olan izolatlardan ise 5 tanesinde esp geninin varlığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu bulgulara göre *E. faecalis* izolatlarının biyofilm oluşumu kapasiteleri *E. faecium*'a göre daha fazla bulunmuştur. Ayrıca esp geninin biyofilm oluşumu ile ilgisi olabileceği ancak tek başına esp varlığının biyofilm oluşumu için yeterli olamayacağı düşünülmektedir. Konu ile ilgili yapılacak yeni ve kapsamlı çalışmalar enterokoklarda biyofilm oluşumunun virülansdaki rolü ile ilgili yeni ve faydalı veriler sağlayabilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus* spp., biyofilm, virülans faktörü

INTRODUCTION

Although there are 18 different strains in the genus *Enterococcus*, the most common infection in humans *Enterococcus faecalis* (responsible for 80-90% of all enterococcal infections) and *Enterococcus faecium* (tends to be more resistant to antibiotics) (1).

Enterococci cause a variety of infections, including meningitis, respiratory system infections, endocarditis, intra-abdominal and pelvic infections, urinary tract infections, bacteremia, wound, and tissue infections and neonatal sepsis (2).

Virulence factor of enterococci has not yet been fully clarified (3,4). However, they are considered to be pathogenicity factors such as enterococcal surface protein (esp), aggregation factor, lipoteichoic acid, bacteriocin, gelatinase, serine protease and hyaluronidase (5). In these factors, there are publications that esp associated with the ability of both *E. faecalis* as well as *E. faecium* to form biofilm (6). Biofilm can be defined as the placement of the microorganism within a matrix of extracellular polymeric material that irreversibly binds to a surface, interface or to each other (7).

Virulence factors situated in the strains of *E. faecalis* and *E. faecium* may play a role in colonizing and initiating infection by forming biofilm (6). Biofilm formation has been investigated in strains isolated from different samples in various studies, but not all of the studies have blood isolates (7,8). Knowledge of their own patient profile, microorganisms that make up the hospital flora, and their resistance patterns will enable health institutions to develop the right strategies (9).

In this study, it was aimed to determine the vancomycin resistance status of *E. faecalis* and *E. faecium* species and to investigate the presence of esp gene which is thought to be related of with polymerase chain reaction and biofilm formation capacity by phenotypic methods.

MATERIAL and METHOD

Isolates

A total of 170 *E. faecium* and *E. faecalis* clinical isolates, recovered from blood culture samples, sent from various services between June 2016 - June 2017, were included. Only one sample of for patient included in the study. Non-biofilm former *Escherichia coli* ATCC 25922, and biofilm former *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 was used as control strains.

Identification of the isolates included in the study was performed using conventional methods and Vitek-

MS (bioMérieux, France) system.

Determination of antimicrobial resistance

The vancomycin resistance of the isolates used in the study was first determined by the Vitek 2 Compact (bioMérieux, France) system and then the Kirby-Bauer disk diffusion method was performed according to CLSI recommendations and interpreted (10).

Investigation of biofilm presence

In order to investigate the presence of biofilm in enterococci phenotypically tube method and microtitration plate management were performed.

Tube method

Tryptic Soy Broth (TSB) (BD, France) containing 0.25% glucose was prepared sterile for tube biofilm research. The prepared medium was dispensed into 5 ml of pre-sterilized glass tubes. A few colonies were then taken from freshly produced isolates in blood agar (Himedia, India) and inoculated into tubes containing 5 ml of TSB.

The tubes were incubated at 35 °C for 48 hours. At the end of the period, the whole surface of the glass tubes was aspirated without contacting the pipette. 1 ml of 25% safranin (Merck, Germany) was added into the evacuated tube and the tube was capped to stain the inner surface and gently turned. After the entire surface had come into contact with the paint, it was checked whether a film had formed on the inner surface of the tube and evaluated as follows: it was scored negative if there was no staining on the wall; it was scored + 1 if there is very slight staining on the side of the tube; it was scored + 2 if there is slight staining on the side of the tube; it was scored + 3 if there was intense staining along the walls of the tube. As a result of this grading, negative and + 1 results were evaluated as negative, + 2 and + 3 results were evaluated as positive for tube method. In addition, the formation of an annular strip only on the air contacting part of the medium was also considered a negative result (11).

Microtitration plate method

Enterococcus isolates were passaged into the blood agar medium in a pure manner. Passaged enterococci were seeded on TSB medium containing 0.25% glucose and incubated for 24 hours at 36 °C. After incubation, cultures were diluted 1:20; 200 µl of each well was placed in a 96-well flat-bottom polystyrene microtitration plate. Thus, the plate was allowed to incubate at 36 °C for 24 hours. After incubation, the medium in the wells was aspirated. After, it was gently washed three times with sterile distilled water and inverted and dried. 100 µl of a 1% crystal violet (Merck, China) solution prepared into the wells were dispersed and incubated at room temperature for 15 minutes. After staining, the plate was washed 3 times with sterile distilled water and inverted and dried. 200 µl of the ethanol/acetone (80:20) solution, prepared to dissolve the stain, was dispensed and the stain was allowed to dissolve for 10 minutes. Plates were then read in ELISA (ChroMate, USA) reader at 492 nm wavelength (12,13).

Each isolate was studied 3 times by microtitration plate method. The results were evaluated according to the optical density values of the positive and negative control strains (13,14).

DNA extraction from isolates

DNA extraction of *Enterococcus* isolates was performed by boiling (15). The resulting DNAs were stored at -20 °C until use.

Analysis of *esp* gene with PCR analysis

The presence of *esp* gene was investigated by PCR.

For this purpose, primers *esp11* and *esp12*, which multiply the region of 954 bp were used (16). The base sequences of the primers are given in Table 1.

PCR reaction content was prepared according to the amounts defined by Shankar et al (16). The amplification program, identified by Shankar et al (16), was modified and used. Amplification was carried out with the following thermal cycling profile: 2 min at 95 °C and 30 cycles of amplification consisting of 45 sec at 94 °C, 45 sec at 54 °C and 4 min at 72 °C and 5 min at 72 °C for the final extension.

The amplified products were subjected to electrophoresis for 1 hour at 120 V on 1.5% agarose gel (Biomax). At the end of the procedure, the gels were kept in distilled water containing 0.5 µg/ml ethidium bromide for 20 minutes. At the end of the period, gels were examined for the presence of bands under UV light (Biorad, Italy) and the image was recorded and stored.

In order to confirm the duplicated region, the product selected as an example from amplicon shown to be positive in electrophoresis, sequence process applied (Sentebiolab, Turkey).

Statistical analysis

The data were analyzed using IBM SPSS V23. Pearson chi-square test was used to compare the method results according to the species. Significance level was considered as $p < 0.05$.

This study was carried out with the permission of 2017/321 granted by Ondokuz Mayıs University Clinical Research Ethics Committee on 14.09.2017.

Table 1. Sequences of *esp11* and *esp12* primers

Primary	Primary Sequences (5' - 3')	Size (bp)
<i>esp11</i>	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	954
<i>esp12</i>	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	

RESULTS

Resistance to vancomycin

When the susceptibility of 85 isolates of *E. faecalis* to vancomycin was evaluated; 70 (82.3%) were susceptible, 14 (16.5%) were moderately susceptible and one (1.2%) resistant. It was seen that 56 (65.9%) of 85 isolates were susceptible and 29 (34.1%) were resistant in *E. faecium*.

Four (80%) of the five isolates that were positive by tube method were found to be susceptible to vancomycin and one (20%) was found to be moderately susceptible. Twenty-one (77.8%) of the 27 isolates, that were positive by microtitration plate method, were susceptible to vancomycin and six (22.2%) were found to be moderately susceptible.

Biofilm results of phenotypic tests

Only five (5.9%) of the 85 *E. faecalis* isolates produce biofilm by performing tube method. In one of the five strains, it was + 3 positive; the remaining 4 isolates were found to be + 2 positive. Biofilm production by tube method was not detected in any

of the *E. faecium* isolate.

By performing the microtitration plate method 27 (31.8%) of the 85 *E. faecalis* isolates produce biofilm. Biofilm production by microtitration plate method was not detected in any of the *E. faecium* isolates.

Determination of the presence of *esp* gene region by PCR

As a result of the PCR process; *esp* gene was found in 49 of 85 *E. faecalis* isolates (57.6%) and 20 of 85 *E. faecium* isolates (23.5%). When phenotypic and genotypic methods were compared, the presence of *esp* gene was detected in 24 isolates which were positive in microtitration plate method and in five isolates which were positive in tube method. When vancomycin susceptibility and PCR results were compared; 43 of the 49 *E. faecalis* isolates which are *esp* positive, were susceptible, five of them were moderately susceptible, one of them was resistant; nine of in 20 *E. faecium* isolates were susceptible and 11 of them were resistant. Example gel images for *E. faecalis* are shown in Figure 1.

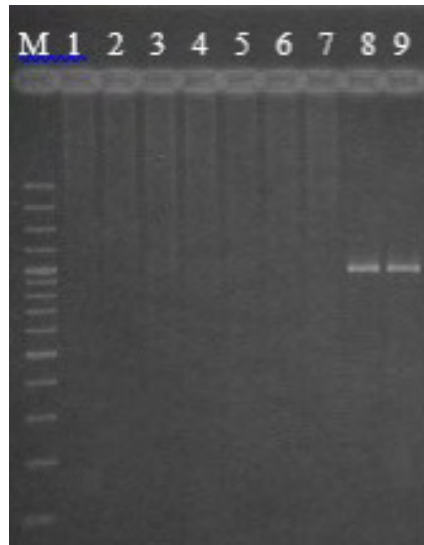


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of *E. faecalis*
M: Marker (Bioron, Germany); 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7. samples were negative; 8 ve 9. samples were positive for *esp*.

The results of the analysis of disc diffusion for *E. faecalis* and *E. faecium*, tube biofilm formation, microtitration plate method and the presence of esp gene are presented in Table 2.

Table 2. Statistical analysis of *E. faecalis* and *E. faecium* species for phenotypic and genotypic methods

	<i>E. faecalis</i> (n = 85)	<i>E. faecium</i> (n = 85)	P
Resistance to vancomycin n (%)	1 (1,2)	29 (34,1)	<0,001
Tube method n (%)	5 (5,9)	0	0,023*
Microtitration plate method n (%)	27 (31,8)	0	<0,001
Presence of esp by PCR n (%)	49 (57,6)	20 (23,5)	<0,001

*Fisher's exact test was used to compare.

DISCUSSION and CONCLUSION

In order to understand the ability of enterococci to cause disease, virulence characteristics and increased antibiotic resistance need to be investigated better (17). Biofilm can make microorganisms resistant to antibacterial agents and antibacterial molecules produced by the host (7).

Oli et al (18), investigated the formation of biofilm in multidrug-resistant of *E. faecalis*'s obtained from clinical specimens. For this purpose, they used the plate method and tube method. In that study, it has been demonstrated from 40 isolates, 11 (27.5%) of them were strong biofilm producer, 22 (55%) of them were medium biofilm producer and seven (17.5%) of them were weak biofilm or no biofilm producer. The researchers concluded that biofilm formation plays an important role in nosocomial infections.

Fallah et al (8), compared biofilm formation and antimicrobial resistance in enterococcus isolates isolated from urine samples. In the study 57 clinical isolates were included. Biofilm formation properties of isolates were investigated by phenotypically modified

congo red agar method and microtitration plate method. Also with the PCR method, the presence of esp was examined. At the end of phenotypic methods, It was accepted that 26.5% of the *E. faecalis* and 75% of the *E. faecium* form biofilm. In addition, researchers found the presence of esp in 48 of the 57 enterococcal isolates. In the study, the presence of *asa1* and of *ebp* was also investigated. As a result of the study, it was considered that biofilm formation in vitro is very complex in enterococci and the presence of esp, *asa1* and of *ebp* genes was insufficient for biofilm formation

Dupre et al (4), have studied on virulence factors with 15 *E. faecalis* and 32 *E. faecium* isolates, totally 47 enterococcal isolates. In 9 of the *E. faecalis* isolate of 15, 23 of the *E. faecium* isolate of 32, esp gene were detected.

In the study of Kafil et al (19), they investigated the presence of esp in *E. faecium* and *E. faecalis* isolates, which are effective in urinary tract infection and the relationship between antibiotic resistance. 166 enterococcus strains were included in the study. It is determined that 43.3% of them are *E. faecium*,

56.7% of them are *E. faecalis*. In 76.1% of the *E. faecium* isolates and 77.9% of the *E. faecalis* isolates esp gene were found positive. In addition, it has been stated that there is a significant relationship between esp positive *E. faecium* isolates and vancomycin resistance. It has been considered that the incidence of esp in enterococci isolates, which are effective in urinary tract infection, is important in these types of infection.

Udo et al (20), have included a total number of 466 *E. faecalis* isolates to their studies. These isolates were obtained from 313 urine specimens, 68 wound specimens, 36 blood specimens, 25 rectal swabs, 12 vaginal swabs and 12 other sources. It has been found that in 147 (31.5%) of these samples esp gene was positive.

Baylan et al (15), have investigated enterococcal surface protein (esp) of a total of 91 isolates (59 *E. faecalis*, 31 *E. faecium*, and one *E. gallinarum*) isolated from urine cultures by molecular methods. The esp gene region was the second most common virulence factors in the study with a positivity rate of 25.6%. At the end of the study, the researchers concluded that the identification of virulence factors of enterococci and the relationship of these virulence factors with antibiotics is an important research topic.

Saba Çopur et al (21), included 116 strains including 93 vancomycin-resistant enterococci (VRE) and 23 vancomycin susceptible enterococci (VSE) in their study. They have stated that 95.6% of VRE was *E. faecium* (n = 89), 4.3% of the VRE was *E. faecalis* (n = 4), and 17.4% of VSE was *E. faecium* (n = 4) and 82.6% of VSE *E. faecalis* (n = 19). PCR study revealed the presence of esp in 75 (80.6%) of 93 VRE isolates and 16 (69.9%) of 23 VSE isolates. At the end of the study, it was concluded that not only VRE but also VSE may cause important infections due to virulence factors and new studies would be useful for clarifying this issue.

Mete et al. (22) aimed to evaluate virulence factors

and antibiotic susceptibility patterns of enterococcal isolates in their study. 229 enterococcal isolates were included in their study. They revealed the presence of esp in 46 (33.3%) of the 138 *E. faecalis* isolates, and in 28 (30.8%) of the 91 *E. faecium* isolates. When comparing virulence factors of vancomycin-resistant and susceptible isolates; esp gene level in vancomycin resistant *E. faecium* isolates was present as 24.1%, while the esp gene was absent in vancomycin-resistant *E. faecalis* isolates. In VSE isolates, the presence of esp gene was found to be 35.1% for *E. faecalis* and 29.4% for *E. faecium*. At the end of the study, the researchers emphasized that VRE can cause difficult infections to treat, especially in hospitalized patients, and that VSE can cause serious infections due to its important virulence factors.

We have studied a totally 85 *E. faecalis* isolates in terms of susceptibility of to vancomycin and obtained the results as follows; 70 (82.3%) of them were susceptible, 14 (16.5%) of them were moderately susceptible and one (1.2%) of them was resistant. It was found that 56 (65.9%) of the 85 *E. faecium* isolates were susceptible and 29 (34.1%) of them were resistant. In the isolates the biofilm-producing strains were included in the study, four of the five isolates, positive in the tube method, were found to be vancomycin susceptible and 1 of them was medium susceptible. It has been reported that 21 of the 27 isolates that were detected to produce biofilm by microtitration method, were found to be vancomycin-susceptible and six of them were moderately sensitive.

It has been reported that in esp positive *E. faecalis* strains, 43 of them were susceptible, five of them were intermediate susceptible, one of them was resistant; and in *E. faecium* isolates, nine of them were susceptible and 11 of them were resistant when compared vancomycin resistance with PCR process.

When the phenotypic methods used to detect biofilm production were compared; it has been seen that all of the five isolates, which are positive in

tube method, were positive in the microtitration method as well. Both phenotypic methods used, it was observed that all strains with positive biofilm production were the strains of *E. faecalis*.

As a result of statistical evaluation, There is a significant difference between the resistance to vancomycin in *E. faecalis* and *E. faecium*, the presence of biofilm detected by tube and microtitration plate method, and the presence of *esp* detected by PCR.

As a result of PCR process; 49 (57.6%) of the 85 *E. faecalis* isolates; 20 (23.5%) of 85 *E. faecium*

isolates were found to be positive in terms of the presence of *esp*. When phenotypic and genotypic methods were compared, the presence of *esp* gene was detected in 24 isolates which were positive in microtitration plate method and in 5 isolates which were positive in tube method. Based on these results, it has considered that *esp* gene may have a relation with biofilm formation and the only presence of *esp* may be insufficient in biofilm formation. New and comprehensive studies on the subject will provide important data about the mechanisms and the ability of enterococci to cause disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Ondokuz Mayıs University (Project number PYO.TIP.1904.18.001).

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Ondokuz Mayıs University Clinical Research Ethics Committee (Date: 14.09.2017 and Number: 2017/321).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji. 4th ed. İzmir: Asya Tıp Kitabevi, 2005.
2. Özkaya Şahin G. Gram-pozitif kok infeksiyonları. In: Ulusoy S, ed. Gram Pozitif Kok İnfeksiyonları; Sorunlar ve Çözümler. Ankara: Güneş Kitabevi, 2003:1-9.
3. Durmaz G. Enterokoklar. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2008: 2057-65.
4. Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). J Med Microbiol, 2003; 52 (6): 491-8.
5. Arkan Akan Ö. Enterokok Türlerinin Mikrobiyolojisi ve Antimikrobiyal Direnç. In: Arman D, Ünal S, eds. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2010: 137-49.
6. Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clin Microbiol Infect, 2010; 16 (6): 533-40.
7. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev, 2002; 15 (2): 167-93.
8. Fallah F, Yousefi M, Pourmand MR, Hashemi A, Nazari Alam, Afshar D. Phenotypic and genotypic study of biofilm formation in *Enterococci* isolated from urinary tract infections. Microbial Pathogenesis, 2017; 108: 85-90.
9. Çetinkaya Şardan Y. Hastane Enfeksiyonları: Tanımlar, Sürveyans, Epidemilere Yaklaşım. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2008: 545-57.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100, Wayne, PA: CLSI, 2017.
11. Bektöre B. Stafilokoklar İçin Slime Testi. In: Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, eds. Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı (Çeviri). 3th ed. Ankara: Atlas Yayıncılık, 2014: 13.16.3.
12. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol, 1985; 22 (6): 996-1006.
13. Milletli Sezgin F, Çoban AY, Günaydın M. Investigation of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* isolates and their colistin susceptibilities in biofilm. Int J Antimicrob Agents, 2013; 41 (2): 199.
14. Us D. Serolojik Tanı Yöntemleri. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2006.
15. Baylan O, Nazik H, Bektöre B, Çitil BE, Turan D, Öngen B, ve ark. Üriner enterokok izolatlarının antibiyotik direnci ile virülans faktörleri arasındaki ilişki. Mikrobiyol Bul, 2011; 45 (3): 430-45.
16. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. Infect Immun, 1999; 67 (1): 193-200.
17. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology, 2009; 155: 1749-57.
18. Oli AK, Raju S, Rajeshwari, Nagaveni S, Kelmani Chandrakanth R. Biofilm formation by multidrug resistant *Enterococcus faecalis* (MDEF) originated from clinical samples. J Microbiol Biotech Res, 2012; 2 (2): 284-8.
19. Kafıl HS, Mobarez AM. Spread of enterococcal surface protein in antibiotic resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from urinary tract infections. Open Microbiol J, 2015; 9: 14-7.

20. Udo EE, Al-Sweih N. Frequency of virulence-associated genes in *Enterococcus faecalis* isolated in Kuwait hospitals. *Med Princ Pract*, 2011; 20 (3): 259-64.
21. Saba Çopur Ş, Şahin F, Göçmen JS. Determination of virulence and multidrug resistance genes with polymerase chain reaction method in vancomycin-sensitive and-resistant enterococci isolated from clinical samples. *Turk J Med Sci*, 2016; 46 (3): 877-91.
22. Mete E, Kaleli İ, Cevahir N, Demir M, Akkaya Y, Kiriş Satılmış Ö. Enterokok türlerinin virulans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2017; 51 (2): 101-14.

Influenza and SARS-CoV-2 coinfection during the COVID-19 pandemic

COVID-19 pandemisinde SARS-CoV-2 ve İnfluenza koinfeksiyonu

Mehmet Sami İSLAMOĞLU¹ (ID), Betül BORKU UYSAL¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Because severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which produces pandemic pneumonia and has a more fatal course than seasonal flu, has no effective treatment, protection against secondary infections is essential in preventing disease-related mortality. The study's goal is to prove a link between seasonal Influenza A-B and SARS-CoV-2 coinfections in the winter, when respiratory tract illnesses are widespread.

Methods: This study was designed retrospective. After ethic committee approval; 515 patients with cold symptoms between November 2, 2020 and February 17, 2021 were included in study. Influenza Antigen Card Plus was used for the detection of influenza. In the PCR test for SARS-CoV-2, swab samples taken from both the mouth and nose were studied in the CFX96 Real time PCR device. Patients were divided into groups according to whether the Influenza A-B and COVID-19 PCR tests were positive or negative. The relationship between influenza A-B positivity and SARS-CoV-2 positivity was investigated.

Results: The female / male ratio in the 515 patients included in the research was 60.7% / 39.2%. Influenza positivity was found 55.2% in women and 44.5% in men. Influenza-A was revealed to be the most prevalent influenza subtype. Influenza and COVID-19 coinfection was detected in 33.1% of the cases. Influenza-A was

ÖZET

Amaç: Pandemi pnömoniye neden olarak tüm dünyada hızla yayılan ve mevsimsel gribe göre daha mortal seyreden Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)'nin etkin bir tedavisi olmadığından hastalığa bağlı ölümlerde sekonder enfeksiyonlardan korunma önemlidir. Çalışmanın amacı, solunum yolu enfeksiyonlarının sık görüldüğü kış sezonunda mevsimsel İnfluenza A-B ve SARS-CoV-2'nin birlikte olduğu ko-infeksiyonun gösterilmesidir.

Yöntem: Çalışma retrospektif olarak planlandı. Etik kurul onayının alınmasının ardından 2 Kasım 2020 ile 17 Şubat 2021 arasında soğuk algınlığı semptomları ile başvurmuş olan 515 hasta çalışmaya alındı. İnfluenza tespiti için İnfluenza Antijen Card Plus yöntemi kullanıldı. SARS-CoV-2'nin PCR yöntemi ile tespiti için ağız boşluğu ve burundan alınan sürüntü örnekleri CFX96 Real time PCR cihazında çalışıldı. Hastalar İnfluenza A-B ve Reverse transcription polymerase chain reaction COVID-19 RT-PCR pozitif veya negatif olmasına göre gruplara ayrıldı. Hastalarda İnfluenza A-B pozitifliği ile SARS-CoV-2 pozitif vakaların birlikteliğine bakıldı.

Bulgular: Çalışmaya alınan 515 hastada kadın / erkek oranı %60.7 / %39.2 saptandı. İnfluenza pozitifliği kadınlarda %55.2, erkeklerde %44.5 saptandı ve COVID-19 ko-infeksiyonu %33,1 vakada saptandı. COVID-19 RT-PCR testi pozitif olan 177 hastanın %29,9 (53)'ünde İnfluenza-A, %10.1 (18)'inde İnfluenza-B

¹Biruni University, Medical Faculty, Department of Internal Medicine, İstanbul



İletişim / Corresponding Author : Mehmet Sami İSLAMOĞLU
Beşyol, Eski Londra Asfaltı No:10 Küçükçekmece / İstanbul - Türkiye
E-posta / E-mail : mislamoglu@biruni.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 21.06.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 05.09.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.92489

İslamoğlu MS, Borku Uysal B. İnfluenza and SARS-CoV-2 coinfection during the COVID-19 pandemic.
Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 373 - 378

positive in 29.9% and Influenza B was positive in %10.1 of the patients with positive COVID-19 RT-PCR test.

Conclusion: We have determined that it can be seen as a coinfection with SARS-CoV-2, as well as the occurrence of Influenza alone during the flu season. Although the pandemic appears to be speeding up at times owing to changes in isolation measures, the impact of influenza, other respiratory tract diseases, and coinfection on the disease's progression is unknown, and further study is needed.

Key Words: SARS-CoV-2, Influenza, coinfection, flu season

pozitif saptandı.

Sonuç: Grip sezonunda tek başına İnfluenza görülmesinin yanında, SARS-CoV-2 ile koinfeksiyon olarak da görülebildiği ortaya konuldu. İzolasyon önlemlerindeki değişimlere bağlı olarak pandeminin aralıklı olarak hızlandığı görülmeyle birlikte influenzanın, diğer solunum yolu infeksiyonlarının ve koinfeksiyonun hastalık seyrine etkisi net olmayıp bu konuda ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, İnfluenza, koinfeksiyon, grip sezonu

INTRODUCTION

Coronavirus disease-2019 (COVID-19) spread rapidly after being identified as cases of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China on December 19th 2019, and was recognized as a pandemic by the World Health Organization in March 2020. In many countries, the health-care system was overburdened (1). It was predicted that SARS-CoV-2, which spread all over the world in March 2020, towards the end of the flu season, would increase the burden on the health system in the autumn-winter period of 2021 due to its longer-term association with influenza. (2). The coexistence of influenza and COVID-19 during influenza season, as expected, made COVID-19 diagnosis and treatment complicated (2).

Influenza is most common in the winter, and the severity of the disease varies depending on the vaccine's efficacy, the nature of the circulating virus, and the length of the season (3). Symptoms described in COVID-19, such as headache, fever, malaise, and a runny nose, are also present in influenza and other severe respiratory infections (3-4). Atypical symptoms associated with COVID-19, such as nausea, vomiting, and diarrhea, can also be observed with influenza (5).

The World Health Organization reported the annual incidence of death due to seasonal influenza as 650 thousand (6). Between October 2019 and April 2020, the United States of America Disease Control and Prevention Center estimated that influenza caused 30-56 million patients, 410-740 thousand hospitalizations, and 24-62 thousand deaths (7). Human-to-human transmission of SARS-CoV-2 is 3.6 times more than that of influenza, the population is more vulnerable to SARS-CoV-2, and the mortality rate of SARS-CoV-2 is higher (8-9). The epidemiology and course of coinfection is poorly known (2). The frequency of coinfection ranges between 0.5% and 50% in studies. Seasonal, vaccination coverage, and geographical variables might all play a role in the variability (2).

The goal of our investigation was to discover influenza and COVID-19 coinfection throughout the flu season.

MATERIAL and METHOD

The study consists of 605 patients in 4-month period from November 2th, 2020 to February 17th,

2021 who had applied to internal medicine outpatient clinics with cold symptoms (sore throat, weakness, fever, runny nose, joint pain, headache). Data of 90 patients could not be accessed. In 515 patients whose data were available, co-existence of positivity in influenza A or B and SARS-CoV-2 were investigated. The patients were divided into groups according to whether the Influenza A-B and COVID-19 PCR tests were positive or negative. Influenza Antigen Card Plus was used for the detection of influenza. Influenza Antigen Card Plus is an in vitro descriptive test based on the immunochromatographic method. This test, which results in eight minutes using nasopharyngeal swab samples of symptomatic patients, was developed to qualitatively detect influenza type A and type B. Influenza Antigen Card Plus uses monoclonal antibodies specific for influenza type A and type B antigen for accurate determination of influenza. In the PCR test for coronavirus, swab samples taken from both the mouth and nose were studied in the CFX96 Real time PCR device. In the device, 200 RFU values in each channel were taken as threshold values. HEX channel was studied as an internal control and sigmoidal curves with Ct value \leq 32 in this channel were accepted. Sigmoidal curves with a Ct value of \leq 38 in the FAM channel were considered positive.

Both authors declare that the study was

conducted in accordance with the World Medical Association Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Containing Human Subjects". This study was approved by an Ethics Committee of Biruni University and numbered as 2015KA EK-50-21-07.

The compliance of all data to normal distribution was analyzed using the Kolmogorov - Smirnov test. Categorical variables are presented as percentages, while continuous variables are presented as mean \pm standard deviation. Categorical variables were analyzed with the chi-square test, while continuous variables were analyzed in two-way groups with the t test. All data were tested using SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) software and $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

RESULTS

The female / male ratio in the 515 patients included in the research was 313/202. Influenza positivity was found 55.2 % in women and 44.5 % in men. In influenza negative patients, the mean age was 33.1 ± 15.7 . The mean age of influenza positive patients was 31.14 ± 13.40 and similar. Dyspnea, taste and smell abnormalities, and diarrhea were significantly more common in influenza positive patients. Influenza and COVID-19 coinfection was detected in 33.1% (n=87) of the cases (Table-1).

Table 1. Demographic and clinical characteristics of Influenza positive and negative patients

	Influenza Positive (n=263)	Influenza Negative (n=252)	p
Age	31.14 \pm 13.40	33.10 \pm 15.10	0.827
Gender (Female)	173 (55.2)	140 (44.7)	0,971
Fever	133 (50.6)	148 (59)	0.224
Cough	161 (61.5)	148 (59)	0.823
Fatigue	228 (87.9)	195 (77.7)	0.080
Dyspnea	163 (62.3)	42 (16.7)	<0.001
Taste/smell abnormalities	52 (19.7)	21 (8.3)	0.011
Diarrhea	16 (6.3)	16 (6.6)	0.562
Chest pain	129 (49.2)	69 (27.3)	0.001
Coronavirus PCR positivity	87 (33.1)	90 (35.7)	0.578

According to influenza subtypes, the most common types are Influenza-A 62.7%; Influenza B 17.1%; Influenza A-B was found to be 20.1%. In 87 coronavirus PCR positive patients, the most common types of influenza in the form of coinfection were Influenza A 53; Influenza B 18; Influenza A-B was determined as 16 (Table 2). When the distribution of influenza and

SARS-CoV-2 co-infection was examined by months and weeks throughout the flu season between November and February, November was the month with the highest prevalence of SARS-CoV-2 and influenza coinfection. Despite the fact that coinfection reduced in December and January, it increased in the first 15 days of February (Table3).

Table 2. Coronavirus positivity and Influenza subtype positivity

	SARS-CoV-2 PCR		p
	PCR Positive (n=87)	PCR Negative (n=176)	
Influenza Type A	53 (20.1)	112 (42.5)	0.537
Influenza Type B	18 (6.8)	27 (10.2)	
Influenza Type A-B	16 (6.0)	37 (14.0)	

Table 3. Evaluation of infectivity by months and weeks during the flu season

Month	Total sample number (n=515)	n	SARS-CoV-2 PCR Positive and Influenza Positive (n=87)	SARS-CoV-2 positive (n=177)	Influenza Positive (n=263)
November	2-8 November	66	15	28	35
	9-15 November	59	14	29	29
	16-22 November	49	6	19	22
	23-30 November	55	13	23	26
December	1-7 December	25	3	10	6
	8-14 December	23	6	8	11
	15-22 December	23	3	10	10
	23-31 December	30	5	9	17
January	1-8 January	24	3	6	18
	9-16 January	23	4	5	13
	17-24 January	18	0	1	12
	25-31 January	24	4	9	13
February	1-7 February	34	6	7	23
	8-17 February	62	5	13	28
p			0.271	0.009	0.058

DISCUSSION and CONCLUSION

In our study, influenza and SARS-CoV-2 positivity in the form of coinfection was 33.1%, and the most common coinfection associated with coinfection was

influenza-A. COVID-19 is thought to have originated in a food market where wild animals are sold, and an intermediate host has not yet been identified by genomic sequencing (10-11). It can be transmitted via contaminated hands, surfaces and aerosol droplets

from human to human (12). The average incubation period is 5 days and may extend up to 2 weeks (13). If COVID-19 is in the form of an influenza or any other agent coinfection, it can be difficult to distinguish symptoms. Influenza differs from COVID-19 because it takes 5-10 days to spread, patients are generally in mild to moderate clinical condition, mortality is less than 1%, acute respiratory distress syndrome is rare, and antiviral therapy is available (3). The frequency of coinfection in patients with COVID-19 is up to 50% in studies, and the most common pathogens are *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Acinetobacter baumannii*; *Candida species* and *Aspergillus flavus*; Influenza, coronavirus, rhinovirus / enterovirus, parainfluenza, metapneumovirus, influenza B virus, and human immunodeficiency virus are the leading ones (14). In the study conducted by Lai and friends., the most common viral pathogens in the meta-analysis of 8 studies were rhinovirus / enterovirus and influenza A, as well as coronavirus, respiratory syncytial virus, parainfluenza, metapneumovirus, and influenza B virus coinfection (14). In this study, in influenza-A cases, COVID-19 caused false negativity in the RT-PCR test and the patients were later found to be positive for the COVID-19 RT-PCR test. Zhu et al. showed the most frequent bacterial coinfections in their study on 257 COVID-19 patients and they were mostly detected in the first 4 days of the disease (15). In their study conducted in Northern California, Kim and friends found 9.5% SARS-CoV-2 positivity and 26.7% non-SARS-CoV-2 pathogens in 1217 samples. They reported the most common coinfection as rhinovirus / enterovirus (6.9%), respiratory syncytial virus (5.2%), and non-SARS-CoV-2 coronaviridae (4.3%) in those who were positive for SARS-CoV-2(16).

Influenza and COVID-19 coinfection was detected in 33.1% of the cases (87 cases). The detection of 29.9% influenza-A and 49.1% influenza in patients with positive COVID-19 PCR test suggests possible false positivity between tests. Cheng et al. detected SARS-CoV-2 and influenza together in 97 patients and SARS-CoV-2 alone in 116 patients among 213 patients they retrospectively screened in Wuhan between January

2020 and March 2020. They found no difference in disease severity between the group with coinfection and the group with only SARS-CoV-2. They found higher cytokine levels in patients with SARS-CoV-2, and observed that cytokine storm decreased in patients with coinfection (2). They did not determine the relationship between coinfection with age and gender. In the study conducted by Hernandez and friends, vaccination rate against influenza over 65 years of age in every region in Italy and deaths related to COVID-19 in the region were compared. They found low mortality rates due to COVID-19 in regions with strong negative correlation and high vaccination rate (17). This may be related to the vaccine's rapid local immune response when another pathogen such as SARS-CoV-2 enters by providing sufficient immune memory (17). When the distribution of coinfection cases was investigated by months and weeks in our study, it was discovered that influenza increased in conjunction with the acceleration of the pandemic and the dissemination of SARS-CoV-2. During the pandemic, it was observed that influenza also decreased during the period when the number of cases decreased due to measures such as masks and distance. The precautions taken against SARS-CoV-2 can also be considered as protective against other upper respiratory tract infections.

The most important limitation in the study was that only the influenza panel was examined, but not a large panel covering other viral infections. Secondly, the study cannot be generalized to the whole society, since symptomatic patients who applied to the hospital were included and asymptomatic patients were not in the study. The third limitation was that patients cannot be compared according to their clinics. Finally, since the average age of the study was low and it did not include the elderly and groups with comorbid diseases, further studies are needed in this group.

In conclusion, due to the similarity of symptoms and the margin of error in diagnostic testing, coinfection should not be overlooked in patients diagnosed with influenza and COVID-19 during the influenza season. For a sufficient immunological response, community vaccination for influenza and COVID-19 should be expanded, and when coinfection is confirmed, appropriate antimicrobial therapy should be administered.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Biruni University Ethics Committee (Date: : 09.06.2021 and Number: 2015KAEK-50-21-07).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Maltezos HC, Theodoridou K, Poland G. Influenza immunization and COVID-19. *Vaccine*. 2020;38(39):6078-9.
- Cheng Y, Ma J, Wang H, Wang X, Hu Z, Li H, et al. Co-infection of influenza A virus and SARS-CoV-2: A retrospective cohort study. *J Med Virol*. 2021;93(5):2947-954.
- Konala VM, Adapa S, Gayam V, Naramala S, Daggubati SR, Kammari CB, et al. Co-infection with Influenza A and COVID-19. *Eur J Case Rep Intern Med*. 2020;7:001656.
- Cox MJ, Loman N, Bogaert D, O'Grady J. Co-infections: potentially lethal and unexplored in COVID-19. *Lancet Microbe*. 2020;1.
- Balla M, Merugu GP, Patel M, Koduri NM, Gayam V, Adapa S, et al. COVID-19, Modern Pandemic: A Systematic Review From Front-Line Health Care Providers' Perspective. *J Clin Med Res*. 2020;12(4):215-29.
- Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modeling study. *Lancet*. 2018;391:1285-300.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2019-2020 U.S. flu season: preliminary burden estimates. 2020. <https://www.cdc.gov/flu/about/burden/preliminary-in-season-estimates.htm>.
- Distante C, Piscitelli P, Miani A. Covid-19 outbreak progression in Italian regions: approaching the peak by the end of March in Northern Italy and first week of April in Southern Italy. *Int J Environ Res Public Health*. 2020.
- Faust JS, del Rio C. Assessment of deaths from COVID-19 and from seasonal influenza. *JAMA Intern Med*. 2020 .
- Peeri NC, Shrestha N, Rahman MS, Zaki R, Tan Z, Bibi S, et al. The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned? *Int J Epidemiol*. 2020 doi: 10.1093/ije/dyaa033.
- The Atlantic News Report from February 24, 2020. Accessed on February 25, 2020. <https://www.theatlantic.com/health/archive/2020/02/covid-vaccine/607000/>.
- Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382:1199-207.
- Chan JF, Yuan S, Kok KH, To KK, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020;395(10223):514-23.
- Lai CC, Wang CY, Hsueh PR. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;53(4):505-12.
- Zhu X, Ge Y, Wu T, Zhao K, Chen Y, Wu B, et al. Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. *Virus Res*. 2020;285.
- Kim D, Quinn J, Pinsky B, Shah NH, Brown I. Rates of Co-infection Between SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. *JAMA*. 2020;323(20):2085-6.
- Marín-Hernández D, Schwartz RE, Nixon DF. Epidemiological evidence for association between higher influenza vaccine uptake in the elderly and lower COVID-19 deaths in Italy. *J Med Virol*. 2021;93(1):64-5.

Düşük doz fraksiyone olmayan heparin ve düşük moleküler ağırlıklı heparinin farelerde subaraknoid kanama sonrası erken beyin hasarı üzerindeki etkileri

Effects of low-dose unfractionated heparin and low molecular weight heparin on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice

Orhan ALTAY¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Kapsamlı araştırma çabalarına rağmen, subaraknoid kanama sonrası erken beyin hasarını (EBI) önlemek için kanıtlanmış etkili bir tedavi yoktur. Heparin, birçok patofizyolojik mekanizmayı antagonize eden pleiotropik bir ilaçtır. Bu çalışmada, heparinin subaraknoid kanama (SAK) sonrası erken beyin hasarını (EBH) önleyip önlemediğini değerlendirdik.

Yöntem: SAK, farelerde endovasküler perforasyonla induklendi ve hayvanlar Kontrol (n = 8), SAK (n=12), SAK + 10U UFH (n=11), SAK + 40U UFH (n=13), SAK + 4U dalteparin (n=11) ve SAK + 16U dalteparin (n=14) olarak gruplara ayrıldı. SAK'dan 24 saat sonra subaraknoid kanama ciddiyeti, mortalite, nörolojik skor ve beyin su içeriği değerlendirildi.

Bulgular: Düşük doz fraksiyone olmayan heparin (UFH) ile düşük doz düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH)'in beyinde subaraknoid kanama miktarında bir değişiklik olmadığı ve nörolojik muayenede, beyin su içeriğinde erken dönemde iyileştirme yaptığı, mortaliteyi sayısal olarak azalttığı belirlenmiş ancak istatistiksel olarak birbirine üstünlüğü görülmemiştir. Yüksek doz fraksiyone olmayan heparin (UFH) veya düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH) nöroprotektif

ABSTRACT

Objective: Despite extensive research efforts, there is no proven effective treatment to prevent early brain damage (EBI) after subarachnoid hemorrhage. Heparin is a pleiotropic drug that antagonizes many pathophysiological mechanisms. In this study, we evaluated whether heparin prevents early brain damage (EBI) after subarachnoid hemorrhage (SAH).

Methods: SAH was induced by endovascular perforation in mice and animals divided into 6 groups; Control (n = 8), SAH (n = 12), SAH + 10U UFH (n = 11), SAH + 40U UFH (n = 13), SAH + 4U dalteparin (n = 11) and SAH + 16U dalteparin (n = 14). Subarachnoid hemorrhage severity, mortality, neurological score and brain water content were evaluated at 24 hours after SAH.

Results: It was found that low-dose unfractionated heparin (UFH) and low-dose low molecular weight heparin (LMWH) decreased brain water content, improved neurological score and did not increase subarachnoid hemorrhage amount in the early period of SAH. It was observed that it decreased mortality numerically, however it was not observed statistically superiority to each other. It has been shown that high-dose unfractionated heparin (UFH) or high-dose

¹Ankara Bilkent Şehir Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Orhan ALTAY
Üniversiteler Mahallesi 1604. Cadde No: 9 Çankaya / Ankara - Türkiye
E-posta / E-mail : orhanaltay@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 14.06.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 07.09.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.83798

Altay O. Düşük doz fraksiyone olmayan heparin ve düşük moleküler ağırlıklı heparinin farelerde subaraknoid kanama sonrası erken beyin hasarı üzerindeki etkileri. Türk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 379 - 388

etkilerini engelleyen subaraknoid kanama artışına meyil yarattığı ve başka mekanizmaları aktive ederek beyin hasarını artırdığını göstermiştir.

Sonuç: SAK sonrası erken dönemde düşük doz fraksiyone olmayan heparin (UFH) ve düşük doz düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH) tedavisi erken beyin yaralanmasını azaltabilir. Klinik olarak akut anevrizma rüptüründen sonraki sekonder beyin hasarının erken dönemde önlenmesinde etkin olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fraksiyone olmayan heparin (UFH), düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH), erken beyin hasarı, subaraknoid kanama

low molecular weight heparin (LMWH) inhibits the neuroprotective effects, creating a tendency to increase subarachnoid hemorrhage and increase brain damage by activating other mechanisms.

Conclusion: Low-dose unfractionated heparin (UFH) and low-dose low molecular weight heparin (LMWH) treatment in the early period after SAH may reduce early brain injury and clinically imply that it may be effective for the early prevention of secondary brain injury after acute aneurysm rupture.

Key Words: Unfractionated heparin (UFH), low molecular weight heparin (LMWH), early brain injury, subarachnoid hemorrhage

GİRİŞ

Subaraknoid kanama (SAK), ani ölüm riski ile hayatı tehdit eden bir hastalıktır. SAK, inmelerin %5'ini oluşturur, yaklaşık %85 hastada intrakraniyal anevrizmanın rüptüründen kaynaklanır, ölümcüllük oranı yaklaşık %50'dir. Serebral anevrizma rüptüründen sonraki 48-72 saat içinde ortaya çıkan erken beyin hasarı (EBI, early brain injury), subaraknoid kanamadan sonra kötü sonuçların ciddiyetini ifade eden bir faktör olarak belirlenmiş sekonder beyin hasarıdır (1). Subaraknoid kan pıhtısı, kafa içi basıncının yükselmesine ve serebral perfüzyon azalmasına, SAK sonrası olumsuz sonuçların önemli nedenlerinden biri olan mikrovasküler dolaşım bozukluğuna neden olur ve inflamatuvar reaksiyon gibi akut bir yaralanma kaskadını başlatır (2).

Trombin, pıhtılaşma kaskadında aktif olan tripsin benzeri bir allosterik serin proteazdır. Kimotripsin ailesine aittir ve aktif olmayan prekürsör protrombinin protrombinaz kompleksi tarafından proteolitik bölünmesi ile üretilir. Bu aktivasyon kompleksi, aktive edilmiş faktör V (FVa), FX (Stuart-Prower faktörü), Ca²⁺ ve fosfolipidlerden oluşur (3,4). Trombin çok fonksiyonlu bir serin proteaz pıhtılaşma proteinidir ve

endotel, epitel, nöronal ve glial hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinin yüzeyinde eksprese edilen proteazla aktive edilmiş reseptörler (PAR) yoluyla etki eder. Trombin, kan pıhtısının ana bileşeni olan fibrinojenin fibrin'e dönüşümüne aracılık eder. Ayrıca trombin, kan pıhtılaşma faktörleri V, VIII, XI, XIII ve antikoagülan protein C'yi aktive eder (5). Trombin kan-beyin bariyerinde (BBB, blood-brain barrier) bozulma, beyin ödemi, inflamasyon ve apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (6). Bununla birlikte, esas trombin reseptörü olan PAR1'in aktivasyonunun, insan endotel hücrelerinde trombin dozajına bağlı olarak apoptozu indüklediği veya inhibe ettiği bildirilmiştir (7).

1916'da keşfedilen heparin, 1935'ten beri klinik olarak antikoagülan olarak kullanılmaktadır. Standart heparin olarak da bilinen fraksiyone olmayan heparin (UFH) ve düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH) türünde klinikte kullanılan iki çeşit heparin molekülü vardır. Düşük moleküler ağırlıklı heparinin ise (LMWH) bir kaç değişik molekül tipi (örneğin, enoksaparin, dalteparin, nadroparin, tinzaparin, sertoparin) bulunmaktadır (8). Heparinin antikoagülan özellikleri, hem trombin'e bağlanmasına hem de

antitrombin III'ün allosterik aktivasyonunu sağlamak için negatif yüküne bağlıdır ancak negatif yüklü sülfat parçalarından heparin moleküllerini çıkarmak heparinin antikoagülan işlevini azaltır (9, 10). Düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH), fraksiyone olmayan heparine kıyasla altı kat daha az thrombin (anti-IIa) aktivitesine ve yarı anti-Xa (protrombinaz kompleksinin anahtar bileşeni) aktivitesine sahiptir (11). Literatürde fraksiyone olmayan heparin (UFH) veya düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH) gibi antikoagülanların farelerde fokal serebral iskemide nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (12, 13).

Yayımlanmış makaleler ve verilere göre standart heparinin terapötik dozu çoğunlukla sürekli olarak infüzyon şeklinde uygulanması nedeniyle yarılanma ömrü metabolizmasının tam olarak bilinmemesine sebep olup, gelişebilecek kanamanın kontrol altında tutamama korkusu oluşturmuştur. Bu yüzden heparinin koruyucu veya antienflamatuar bir ajan olarak klinik kullanımından kaçınılmasına sebep olmuştur. Bu çalışmada düşük veya yüksek doz fraksiyone olmayan heparin (UFH) ile düşük veya yüksek doz düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH)'in beyinde subaraknoid kanama miktarında bir değişiklik yapıp yapmadığı ve bu farklı dozlar kullanılarak nörolojik muayenede, beyin su içeriğinde erken dönemde iyileştirme yapıp yapmadığı mortaliteyi azaltıp azaltmadığı konusunda araştırma yapılmamış ve bu yüzden bizim bu çalışmamızda birbirine üstünlüğü karşılaştırma yapılmak istenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Tasarımı ve Hayvan Grupları

Loma Linda Üniversitesi Kaliforniya hayvan ve etik inceleme komitesi tüm protokolleri onayladı. Altmış dokuz 8 haftalık erkek CD-1 fareleri (30-38g; Charles River, Wilmington, MA) kullanıldı.

SAK sonrası erken dönemde gelişen erken beyin yaralanmasına kanamadan 2 saat sonra uygulanan yüksek veya düşük doz fraksiyone olmayan heparin (UFH) veya düşük moleküler ağırlıklı heparinin (LMWH/

Dalteparin) etkisinin olup olmadığını incelemek için rastgele 6 farklı hayvan grubu oluşturuldu ve ameliyattan 24 saat sonra fareler değerlendirildi. Gruplar şu şekilde adlandırıldı: Kontrol (sham) (n = 8), SAK (n=12), SAK + 10U UFH (n=11), SAK + 40U UFH (n=13) SAK + 4U dalteparin (n=11) ve SAK + 16U dalteparin (n=14).

Fare Subaraknoid Kanama (SAK) Modeli

SAK, endovasküler monofilament perforasyon modeli farelerde daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirildi (1,16). Kısaca, hayvanlara intraperitoneal bir ketamin / ksilazin enjeksiyonu (100/10 mg/kg) ile anestezi uygulandı. Anterior serebral arteri delmek için internal karotid arterden (ICA) keskinleştirilmiş bir 5-0 monofilament naylon sütün ortalama 17 mm ilerletildi. Kontrol (sham) grupta ise filaman, arter delinmeden ICA yoluyla 5 mm ilerletildi. İşlem sırasında vücut sıcaklığı sabit tutuldu (37.5 ± 0.5 °C).

İlaç Yönetimi

İnsanda kullanılan fraksiyone olmayan domuz heparini (UFH) için subkutan olarak verilen güvenli tedavi dozu 600U/kg/gün olarak rapor edilmiştir. (14) Bu doz kullanılarak fraksiyone olmayan domuz heparini fare başına tedavi dozu 20U SC (subcutan=ciltaltı) (ortalama fare vücut ağırlığı, 33mg) olarak hesaplanmıştır. Ayrıca insanda kullanılan düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH) için SC (subcutan=ciltaltı) olarak verilen güvenli tedavi dozu 200U/kg/gün olarak rapor edilmiştir. (15) Bu doz kullanılarak düşük moleküler ağırlıklı heparin fare başına tedavi dozu 8U SC (ortalama fare vücut ağırlığı, 33mg) olarak hesaplanmıştır. Bu referanslara dayanarak, bu çalışmada SAK indüksiyonundan 2 saat sonra, 10U, 40U fraksiyone olmayan heparin (UFH) (McGuff şirketi Inc., Santa Ana, CA, ABD) ve 4U, 16U dalteparin (Anti-Xa) (dalteparin sodyum; Eisai Inc., Woodcliff Lake, NJ, ABD) cilt altından (SC) uygulandı.

Subaraknoid Kanama Ciddiyeti

Subaraknoid kanamanın ciddiyeti, ötonazi yapıldıktan sonra çok hızlı bir şekilde beyin fare kafa kemiğinden çıkarılıp, yüksek çözünürlüklü fotoğraflar

çekilip her fare hangi gruba ait olduğu bilinmeden (blindly=kör) rastgele şekilde SAK derecelendirme skalası kullanılarak hesaplandı (16). Kısaca SAK derecelendirme sistemi aşağıdaki gibidir: bazal kaide, altı segmente ayrıldı ve her segmentteki subaraknoid kan ve kan pıhtısının miktarına bağlı olarak 0 ila 3 arasında bir puan verildi; **derece 0**, subaraknoid kanama yok; **derece 1**, minimal subaraknoid kan; **derece 2**, fotoğraflara bakıldığında arterler tanımlanabilir, orta derecede kan pıhtısı; ve **derece 3**, segment içindeki tüm arterlerin görünemeyecek şekilde biriken kan pıhtısı. Her hayvan ayrı ayrı altı segmentide değerlendirilip verilen puanlar birbirine eklendikten sonra 0 ila 18 arasında bir toplam puan elde edilip kaydedildi.

Nörolojik Skor ve Mortalite

Nörolojik skor, SAK'dan 24 saat sonra Garcia ve arkadaşlarının (17) modifikasyonlu skorlama sistemine dayanarak her fare hangi gruba ait olduğu bilinmeden (blindly) rastgele daha önce tarif edildiği gibi değerlendirildi. Değerlendirme, 0 ila 3 veya 1 ila 3 arasında puanlanabilen altı testten oluşur. Bu altı test şunları içerir: spontan aktivite; dört uzvun hepsinin hareketinde simetri; ön ayaklarını eşit kaldırma; tırmanma; yana devrilme (felç); ve burun bıyık uyarımına cevap. Hayvanlara 1 puanlık skorlama yapılarak 3 ila 18 arasında bir puan verildi (yüksek puanlar daha iyi nörolojik fonksiyonu gösterir).

Mortalite, SAK'dan 24 saat sonra hesaplandı.

Beyin Suyu İçeriği

Fare beyni kafatası kemiğinden hızla çıkarıldı ve sol ve sağ serebral hemisferlere ayrıldı ve ameliyattan sonra 24. saatte (grup başına n = 8) tartıldı (ıslak ağırlık). Daha sonra beyin örnekleri 105 °C'de bir fırında 72 saat kurutuldu ve tekrar tartıldı (kuru ağırlık). Beyin su içeriği yüzdesi ([ıslak ağırlık-kuru ağırlık] / ıslak ağırlık) % X100 olarak hesaplandı (16).

İstatistik

İstatistiksel farklılıklar Tukey-Kramer post hoc testleri ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edilmiştir. Mortalite farklılıkları

Fisher'in kesin testleri (Fisher's exact test) kullanılarak uygun şekilde test edildi ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

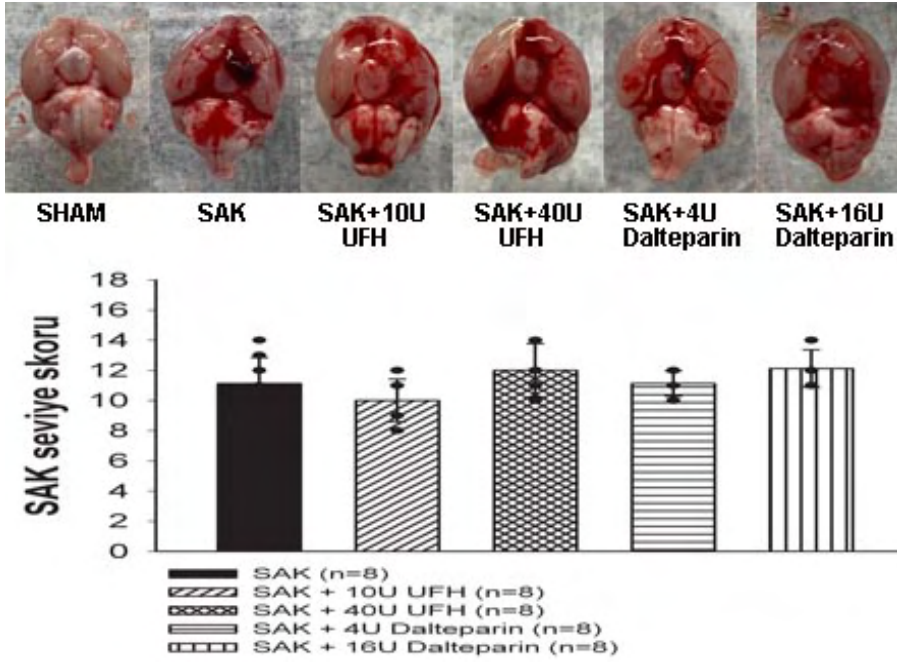
BULGULAR

Mortalite ve Subaraknoid Kanama Ciddiyeti

SAK sonrası tedavi amaçlı kullanılan 10U veya 40U fraksiyone olmayan heparin (UFH) grubu ve 4U veya 16U dalteparin grubu birbiriyle ve SAK grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında fare ölüm oranlarında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü. Kontrol (sham) grubundaki hiçbir hayvan ölmedi. (SAK, 33.3%, 12 farenin 4'ü öldü; SAK + 10U UFH 27.3%, 11 farenin 3'ü öldü; SAK + 40U UFH 38.5%, 13 farenin 5'i öldü; SAK + 4U dalteparin 27.3%, 11 farenin 3'ü öldü; ve SAK + 16U dalteparin 42.8%, 14 farenin 6'sı öldü, sırasıyla). Ayrıca sadece SAK grubu ve tedavi edilen her grup birbiriyle subaraknoid kanama miktar derecesi açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.077$; Şekil 1), bu durum ise bize yaklaşık aynı derecede kanamış hayvan gruplarını önyargı (bias) olmadan nörolojik skor ve beyin su içeriği açısından karşılaştırabilmemize imkan sağladı.

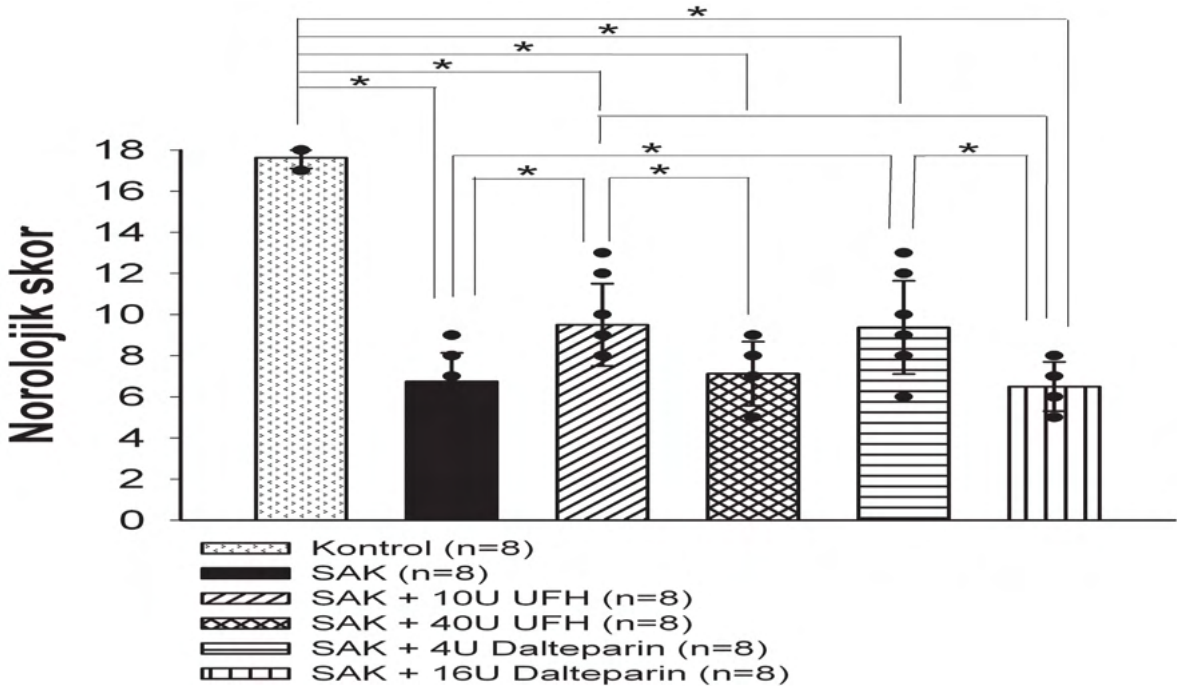
Nörolojik skor ve Beyin su içeriği

Farelerde SAK sonrası nörolojik skor anlamlı olarak daha fazla kötüleşti ancak nörolojik skor 24 saat sonra SAK grubuna kıyasla SAK sonrası 10U fraksiyone olmayan heparin ile tedavi edilmiş grupta ve SAK sonrası 4U dalteparin ile tedavi edilmiş grupta anlamlı bir iyileşme gözlemlendi ($p=0.015$, $p=0.023$; Şekil 2) ancak SAK sonrası 40U fraksiyone olmayan heparin ve 16U dalteparin tedavisi sonrası koruyucu etki görülmedi ($p=0.997$, $p=1.000$; Şekil 2). Ayrıca 24 saat sonra SAK grubuna kıyasla SAK sonrası 10U fraksiyone olmayan heparin ile tedavi grubunda ve SAK sonrası 4U dalteparin tedavi grubunda sol hemisferde beyin su içeriği önemli ölçüde azaldı ($p<0.001$, $p<0.001$; Şekil 3) ancak SAK sonrası 40U fraksiyone olmayan heparin ve 16U dalteparin tedavisi sonrası beyin su içeriği üzerine anlamlı fark görülmedi ($p=0.349$, $p=0.897$;



Şekil 1. Ötonazi yapıldıktan sonra çok hızlı bir şekilde beyin fare kafa kemiğinden çıkarılıp, çekilen yüksek çözünürlüklü fotoğraflardan her bir gruba ait bir örnek sırayla yerleştirilmiştir. Fotoğraflarda subaraknoid kanama, fare beyinlerinin kaidesinde görülmektedir. Kontrol (sham) grubunda kanama görülmemektedir.

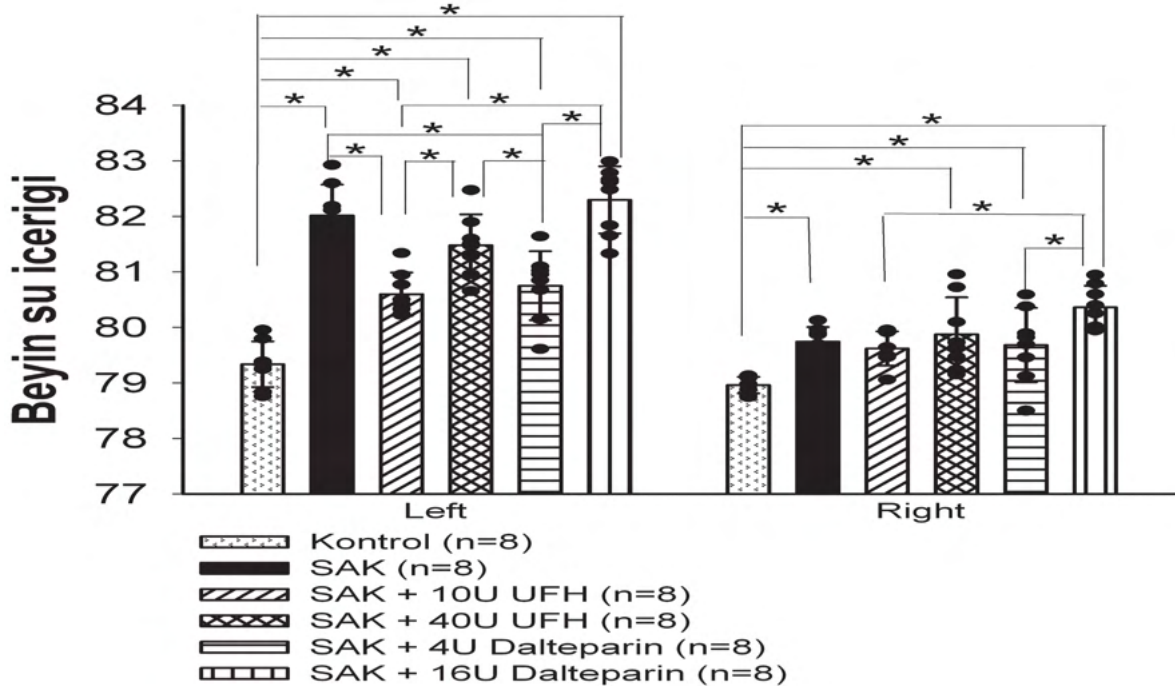
SAK seviye skoru SAK sonrası 24. saatte. Değerler, medyan ± 25th ila 75th persentiller, * $p < 0.05$, Kruskal-Wallis test.



Şekil 2. Nörolojik skor SAK sonrası 24. saatte. Değerler, ortalama ± SD, * $p < 0.05$, ANOVA.

Şekil 3). SAK sonrası 10U fraksiyone olmayan heparin tedavi grubuyla, SAK sonrası 4U dalteparin tedavi grubu nörolojik skor ($p=1.000$; Şekil 2) ve beyin su

içeriği ($p=0.992$; Şekil 3) açısından karşılaştırıldığında aralarında herhangi bir anlamlı fark görülmedi.



Şekil 3. Beyin su içeriği SAK sonrası 24. saatte. Değerler, ortalama ± SD, * $P<0.05$, ANOVA.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Anevrizmaların erken tedavisi ve tedavi protokollerinin geliştirilmesi anevrizmal subaraknoid kanama hastaları için genel morbidite ve mortalitede büyük azalmaya yol açtığı görülmüştür. Subaraknoid kanama, çok sayıda sitokin, kemokin, kompleman, lökosit ve mikroglia içeren önemli bir inflamatuvar yanıtı neden olur ve sistemik inflamatuvar yanıtın, serebral vazospazm ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (18-21). Ek olarak SAK sonrası mikrotrombüs ve vasospazm, özellikle membran P-Selektin ekspresyonunun artması ve nitrik oksit (NO) azalması ile ilişkilendirilmiştir (22). Serebral anevrizma rüptüründen sonraki en erken 48 saat içinde ortaya çıkan erken beyin hasarı, subaraknoid kanamadan sonra gelişen kötü sonuçların ciddiyetini ifade eder

(23). Bu yüzden SAK'tan sonraki en erken dönemde kötü sonuçların ciddiyetini azaltabilecek aday ilaçlar hastalar için çok önemli olacaktır. Bu çalışmada, SAK'dan iki saat sonra erken dönemde düşük doz fraksiyone olmayan heparin (UFH) (10U Heparin) ve düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH) (4U Dalteparin) tedavisi hayvanlarda nörolojik muayeneyi düzeltip, beyin ödemi azalttığı yani 24 saat sonra incelenen hayvanlarda erken beyin yaralanmasını azalttığı ve koruyucu etki sağladığı gösterilmiştir.

Bütün dünyada muhtemelen antikoagülan bir dozun hemorajik komplikasyonlara yatkınlık yaratabileceği endişesi heparin kullanımına beyin cerrahları arasında destek kazandırmamıştır (24). Ancak, literatürde bildirildiğine göre fizyolojik koşullar altında heparin fibrinolitik aktiviteye sahip değildir (25), bizim sonuçlar bize düşük doz UFH

(10U Heparin) ve LMWH'in (4U Dalteparin) stabil bir fibrin pıhtısına zarar veremeyeceği, kanama riskini arttırmayacağını ve ayrıca düşük doz UFH ve LMWH'in sağladığı iyilik halinin başka bir fizyolojik mekanizmanın aktive edilerek gerçekleştirildiğini düşündürmüştür.

Heparin bilinen herhangi bir biyolojik molekül grubu içerisinde en yüksek negatif yük yoğunluğuna sahiptir ve sonuç olarak pozitif yüklü moleküllere ve yüzeylere bağlanma eğilimi yüksektir. Literatürde, çok sayıda plazma proteini, trombositlerden, sitokinlerden, kemokinlerden ve diğer küçük biyolojik olarak aktif moleküllerden ve endotelial hücrelerin kendilerinden salınan proteinleri içeren listede, 100'den fazla heparin bağlayıcı protein tanımlanmıştır (8, 26-29). Klinik olarak heparin neredeyse sadece antikoagülan özellikleri için kullanılmasına rağmen, heparin bağlandığında diğer birçok biyolojik yolları ve mekanizmaları bloke edebilir (30). Fraksiyone olmayan heparin (UFH) ve düşük moleküler ağırlıklı heparin lökositin damar duvarlarından iltihap alanlarına geçişini (leukocyte rolling) aracılık eden yapışma molekülleri P- ve L-selektinin güçlü inhibitörleridir (31, 33). Heparinin antienflamatuar rolü, travmatik beyin hasarı ve kronik nörodejenerasyon araştırmalarından elde edilen kanıtlarla da desteklenmektedir. Nagata ve arkadaşları (34) heparinin erken uygulanmasının travmatik beyin hasarı sonrası inflamasyonda azalma ve bilişsel sonuçların korunması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar ayrıca düşük moleküler ağırlıklı fraksiyone heparin, enoksaparinin rolünü araştıran önceki çalışmalarla da desteklenmiştir (33-35). Bir çalışmada subaraknoid kanama sonrası düşük

moleküler ağırlıklı heparin (LMWH-enoksaparin) ile antikoagülasyonun ümit verici olduğu bildirilmiştir (36), ancak bu bulgu ikinci bir grup araştırmacı tarafından tekrar tespit edilememiştir (37,38). Bu durum bize anevrizmal SAK'lı insan çalışmaları enoksaparinin rolü konusunda karışık sonuçlar varlığını ve düşük moleküler ağırlıklı heparinin faydalı olup olmadığı değerlendirmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, anevrizmal subaraknoid kanaması olan hastalarda gelişen sekonder beyin hasarı yüksek morbidite ve mortalite oranlarına yol açar. Bununla birlikte, kanıta dayalı tedavi stratejileri çok azdır. Heparinin nöroinflamasyon, mikrotromboembolizm ve vazomotor fonksiyon üzerinde çeşitli etkileri olduğundan (39) amacımız heparinin SAK'da mortaliteyi artırıp artırmadığı ve morbiditeyi iyileştirmek için profilaktik ajan olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirlemektir. Ayrıca antikoagülan kullanılan kanserli elektif cerrahi hastalarında kanama oranlarında artma eğilimi yaratmadığı rapor edilmiştir (40). Bizim bu çalışmamızda, subaraknoid kanama sonrası UFH (10U Heparin) ve LMWH (4U Dalteparin) kullanımı, oluşan kanama oranında anlamlı bir artışa neden olmadığı tespit edilmiş ve nörolojik muayenede iyileşme görülmesi mikrokoagülasyon profilaksisinin SAK'lı hasta tedavisinde önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bu deneysel çalışmamız ile heparinin SAK'da etkinliğinin faydası karşılaştırmalı olarak doğrulanmış olup ancak heparinin hangi mekanizmalarla bu etkiyi oluşturduğunu gösteren gelecek deneysel çalışmaların gerekliliğini ve önemini bize ifade etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, çalışma boyunca değerli bilgilerimi benimle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer hocam; Prof Dr John H Zhang ve çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Dr Başak Caner'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Loma Linda Üniversitesi Kaliforniya Hayvan ve Etik İnceleme Komitesi onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 10.11.2011 ve Onay no: 8110029).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Altay O, Suzuki H, Hasegawa Y, Caner B, Krafft PR, Fujii M, et al. Isoflurane attenuates blood-brain barrier disruption in ipsilateral hemisphere after subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke* 2012;43:2513-16.
2. Fujii M, Yan J, Rolland WB, Soejima Y, Caner B, Zhang JH. Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research. *Transl Stroke Res* 2013;4:432-46.
3. Fenton JW., 2nd. Thrombin. *Ann N Y Acad Sci* 1986;485:5-15.
4. Grand, RJ, Turnell AS, Grabham PW. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem. J.* 1996;313:353-68.
5. Strukova, SM. Role of platelets and serine proteinases in coupling of blood coagulation and inflammation. *Biochem. Biokhimiia* 2004;69:1067-81.
6. Ossovskaya VS, Bunnett NW, de Garavilla L, Vergnolle N, Young SH, Ennes H, et al. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004;84:579-621.
7. Zania P, Papaconstantinou M, Flordellis CS, Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE. Thrombin mediates mitogenesis and survival of human endothelial cells through distinct mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C1215-26.
8. Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Mechanism of action and pharmacology of unfractionated heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1094-96.
9. Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe TW. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost* 2008;99:807-818.
10. Wei M, Gao Y, Tian M, Li N, Hao S, Zeng X. Selectively desulfated heparin inhibits p-selectin-mediated adhesion of human melanoma cells. *Cancer Lett.* 2005;229:123-6.
11. Noble S, Spencer CM. Enoxaparin: a review on its clinical potential in the management of coronary artery disease. *Drugs* 1998;56(2):259-72.
12. Cade JF, Buchanan MR, Boneu B, Ockelford P, Cater CJ. A comparison of the antithrombotic and haemorrhagic effects of low molecular weight heparin fractions: the influence of the method of preparation. *Thromb Res* 1984;35(6):613-25.

13. Yanaka K, Spellman SR, McCarthy JB, Oegema TR Jr, Low WC, Camarata PJ. Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. I. Protective mechanism. *J Neurosurg* 1996;85(6):1102-7.
14. Reilly MP, Taylor SM, Hartman NK, Arepally GM, Sachais BS, Cines DB, Poncz M, McKenzie SE. Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIIA. *Blood* 2001;98: 2442-47.
15. Barbour LA, Oja JL, Schultz LK. A prospective trial that demonstrates that dalteparin requirements increase in pregnancy to maintain therapeutic levels of anticoagulation. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(3):1024-9.
16. Altay O, Hasegawa Y, Sherchan P, Suzuki H, Khatibi NH, Tang J. Isoflurane delays the development of early brain injury after subarachnoid hemorrhage through sphingosine-related pathway activation in mice. *Crit Care Med* 2012;40:1908-13.
17. Garcia JH, Liu KF, Ho KL. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke*. 1995; 26:636-42.
18. Friedrich V, Flores R, Muller A, Bi W, Peerschke EI, Sehba FA. Reduction of neutrophil activity decreases early microvascular injury after subarachnoid haemorrhage. *J Neuroinflammation* 2011;8:103.
19. Ishikawa M, Kusaka G, Yamaguchi N, Sekizuka E, Nakadate H, Minamitani H. Platelet and leukocyte adhesion in the microvasculature at the cerebral surface immediately after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 2009; 64:546-54.
20. Provencio JJ, Fu X, Siu A, Rasmussen PA, Hazen SL, Ransohoff RM. CSF neutrophils are implicated in the development of vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care* 2010;12:244-51.
21. Stein SC, Levine JM, Nagpal S, LeRoux PD. Vasospasm as the sole cause of cerebral ischemia: how strong is the evidence? *Neurosurg Focus* 2006;21(3):E2.
22. Sabri M, Ai J, Lakovic K, Ilodigwe D, Macdonald RL. Mechanisms of microthrombi formation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience* 2012;224:26-37.
23. Cahill J, Zhang JH. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? *Stroke* 2009;40: S86-7.
24. Weyer GW, Nolan CP, Macdonald RL. Evidence-based cerebral vasospasm management. *Neurosurg Focus*. 2006; 21(3):E8.
25. Triantaphyllopoulos DC, Triantaphyllopoulos E. Solubility of fibrin clots in solutions of heparin. *Nature*. 1964; 204:1096-8.
26. Coombe DR. Biological implications of glycosaminoglycan interactions with haemopoietic cytokines. *Immunol Cell Biol*. 2008; 86:598-607.
27. Gandhi NS, Mancera RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des*. 2008; 72:455-82.
28. Mulloy B. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. *An Acad Bras Cienc*. 2005; 77:651-64.
29. Young E. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds. *Thromb Res*. 2008; 122:743-52.
30. Lindahl U, Lidholt K, Spillmann D, et al. More to "heparin" than anticoagulation. *Thromb Res*. 1994; 75:1-32.
31. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Kjellén L. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest* 1998;101(4):877-89.
32. Stevenson JL, Choi SH, Varki A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins-correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin Cancer Res* 2005;11(19 Pt 1):7003-11.

33. Stutzmann J-MM, Mary V, Wahl F, Grosjean-Piot O, Uzan A, Pratt J. Neuroprotective profile of enoxaparin, a low molecular weight heparin, in in vivo models of cerebral ischemia or traumatic brain injury in rats: a review. *CNS Drug Rev* 2002;8(1):1-30.
34. Nagata K, Browne KD, Suto Y, Kumasaka K, Cognetti J, Johnson VE. Early heparin administration after TBI: prolonged cognitive recovery associated with reduced cerebral edema and neutrophil sequestration. *J Trauma Acute Care Surg* 2017;83(3):406-12.
35. Župan Ž, Pilipović K, Dangubić B, Frković V, Štutić A, Župan G. Effects of enoxaparin in the rat hippocampus following traumatic brain injury. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35(8):1846-56.
36. Wurm G, Tomancok B, Nussbaumer K, Adelwöhner C, Holl K l. Reduction of ischemic sequelae following spontaneous subarachnoid hemorrhage: a double-blind, randomized comparison of enoxaparin versus placebo. *Clin Neurol Neurosurg*. 2004; 106:97-103.
37. Juvela S, Siironen J, Varis J, Poussa K, Porras M. Risk factors for ischemic lesions following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2005; 102:194-201.
38. Siironen J, Juvela S, Varis J, Porras M, Poussa K, Ilveskero S et al. No effect of enoxaparin on outcome of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Neurosurg*. 2003; 99:953-9.
39. Bruder M, Won SY, Kashefiolasl S, Wagner M, Brawanski N, Dinc N et al. Effect of heparin on secondary brain injury in patients with subarachnoid hemorrhage: An additional 'H' therapy in vasospasm treatment. *J Neurointerv Surg*. 2017 ;9(7):659-63.
40. Baykal C, Al A, Demirtas E, Ayhan A. Comparison of enoxaparin and standard heparin in gynaecologic oncologic surgery: a randomised prospective double-blind clinical study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001; 22:127-30.

Birinci Dünya Savaşı'nda Kafkas Cephesi'nde sağlık hizmetleri ve Erzurum'da ilk tifüs aşısı uygulamaları

Health services on the Caucasian Front in the First World War and the first typhus vaccine applications in Erzurum

Figen KAYSERİLİ ORHAN¹ (ID)

ÖZET

Doğu Cephesi olarak adlandırılan Kafkas Cephesi, Osmanlı tarihinin en büyük yenilgilerinden birinin alındığı yer olup 3. Ordu'daki askerlerimizin bir çoğunu henüz Rus ordusuyla çatışmadan kaybettiğimiz, soğuk ve salgın hastalığın baş düşmanlarımız olduğu bir cephe. Savaş dönemlerinin korkunç afeti olarak tanımlanan tifüs hastalığı, Birinci Dünya Savaşı sırasında toplamda 18 gün süren (22 Aralık 1914 - 9 Ocak 1915) Sankamış Harekâtında, Kafkas Cephesi'ndeki 3. Ordu'yu istila ederek düşmanın başaramadığı genel kırımını yapmış, savaştan çok daha fazla asker ve sivil kayıplarına sebep olmuş ve harp tarihinin bir faciası olarak tarihteki yerini almıştır. Kafkas Cephesi'nde ordu savaşa sürülürken hazırlıklar son derece yetersiz kalmıştır. Sıhhi hizmet ve teşkilat üzerinde durulacak en önemli nokta iken, şiddetli kış ortasında son derece müşkül şartlar altında girilen bu önemli mücadelede sıhhi tertibat tamamen ihmal edilmiştir. Aralık 1914'de Enver Paşa'nın emriyle başlatılan taarruz harekâtı başarısızlıkla sona ermiş, sert kış koşulları altında harekete geçen askerlerin büyük bir kısmı açlığa ve soğuğa yenik düşmüş, geri kalanlarını ise ordu içerisinde salgın halinde seyreden tifüs hastalığı kırıp geçirmiştir. Bütün bu talihsiz

ABSTRACT

The Caucasian Front, which is called the Eastern Front, is one of the biggest defeats in Ottoman history, and it is a front where we lost most of our soldiers in the 3rd Army before fighting with the Russian army and where the cold and epidemic disease are our main enemies. Typhus disease is defined as the terrible disaster of war periods, invaded the 3rd Army in the Caucasian Front during the Sankamış Operation, which lasted 18 days during the World War I (22 December 1914 - 9 January 1915), and made the general massacre that the enemy could not succeed, caused much more soldier and civilian casualties than the war, and took its place in history as a disaster in the history of war. While being driven to war on the Caucasian Front, preparations were extremely inadequate. While the sanitary service and organization was the most important point to focus on, in this important struggle, which was entered under extremely difficult conditions in the middle of the severe winter, the sanitary equipment was completely neglected. The offensive operation launched in December 1914 by the order of Enver Pasha ended unsuccessfully, most of the soldiers who took action under the harsh winter conditions succumbed to hunger and cold, and the rest of them were destroyed by the typhus disease, which was an epidemic

¹Atatürk Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Bölümü, Erzurum



İletişim / Corresponding Author : Figen KAYSERİLİ ORHAN

Atatürk Üni. Sağlık Hizmetleri MYO Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Bölümü Erzurum - Türkiye

E-posta / E-mail : figen.kayserili@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 02.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 30.05.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.70973

Kayserili Orhan F. Birinci Dünya Savaşı'nda Kafkas Cephesi'nde sağlık hizmetleri ve Erzurum'da ilk tifüs aşısı uygulamaları.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(3): 389 - 398

şartlar bir araya gelerek 3. Ordu'da, daha harbin başlangıcında çok fazla askerin kaybına yol açmıştır. Sarıkamış felaketinin sonuçları, memleket, ordu ve cephede uzun zaman sarsıntı ile hissedilmiştir. 32 yaşında iken 3. Ordu'da Sıhhiye Reisi olarak göreve atanan ve üç buçuk sene bu görevde kalan Dr. Tevfik Sağlam, sağlık hizmetlerinde çok önemli başarılarla imza atmıştır. Daha önce Yemen'de karşılaştıklarında tanı koyamadıkları hastalığın 'Tifüs' olduğu sonucuna vararak ilk tifüs aşısı uygulamalarını Erzurum'da (Hasankale) başlatmış ve 'Tifüs salgını' ile oluşabilecek daha büyük felaketlerin önüne geçmiştir. Günümüz olanaklarında COVID-19 pandemisi ile mücadeleimiz sürerken bir asır öncesinde; savaş, yoksulluk ve soğuğa rağmen tifüs salgınını yenmeyi başaran Türk hekimlerimizi bir kez daha takdirle anıyoruz.

Anahtar Kelimeler: Tifüs, Kafkas Cephesi, *Rickettsia prowazekii*, I. Dünya Savaşı, Erzurum

in the army. All these unfortunate circumstances came together and resulted in the loss of too many soldiers in the 3rd Army, even at the beginning of the war. The consequences of the Sarıkamış disaster were felt by the country, the army and in the front for a long time. Dr. Tevfik Sağlam, appointed as the head of the aid in the 3rd Army at the age of 32 and worked at this position for 3 years and a half, started the first typhus vaccine applications in Erzurum (Hasankale) by creating miracles in health services and concluding that the disease they could not diagnose when they encountered in Yemen before was 'Typhus' and prevented even greater disasters that may occur with the 'Typhus epidemic'. While our fight against the COVID-19 pandemic continued in today's possibilities are continuing, we once again commemorate our Turkish physicians who managed to defeat the typhus epidemic a century ago despite war, poverty and cold.

Key Words: Typhus, Caucasian Front, *Rickettsia prowazekii*, World War I, Erzurum

GİRİŞ

Osmanlı'nın Doğu Cephesi olarak adlandırılan Kafkas Cephesi, Osmanlı tarihinin en büyük yenilgilerinden birinin alındığı yer olup, 3. Ordu'daki askerlerimizin birçoğunu henüz Rus ordusuyla çatışmadan kaybettiğimiz, soğğun ve salgın hastalığın baş düşmanlarımız olduğu bir cephedir (1). Ülkemizin yakın tarihinde yaşanmış gerçek bir felaket olan Sarıkamış Muharebesi'nde çok fazla şehit verilmiştir ve muharebenin hemen başında tifüs hastalığı orduyu istilâ ederek ordudaki asker sayısını yarı yarıya azaltmış ve sıhhiye hizmetlerini olumsuz etkilemiştir (2,3).

Bu savaşta Türk askerinin en büyük düşmanı; soğuk-açlık ve giyim kuşam eksikliğinden sonra, tifüs hastalığı olmuştur. Özellikle savaş dönemlerinde orduları istila etmesi sebebi ile "Harp Humması -

Ordu Humması - Ordu Kıran' gibi isimler alan tifüs, Birinci Dünya Savaşı sırasında, 'Lekeli Tifo' adıyla da anılmıştır. Roma İmparatorluğu'ndan beri mevcut olan bu hastalık, tarihte ilk defa Türk Ordusu'na, 1854 Kırım Harbi'nde, yabancı askerlerden bulaşmış ve bundan sonra da savaş ve yoksulluk dönemlerinde insan ölümlerinin en büyük âmillerinden birisi olmuştur (4,5). Hastalık, 3.Ordu'da son derece vahim bir şekilde seyretmiş ve hastalığa yakalananların %70'i hayatını kaybetmiştir (1).

Balkan Savaşı sırasında bu hastalığı geçirmiş olanların dışında, hekimlerin hemen hemen hepsi hastalanmış ya da nekahat dönemine girmişlerdir. Önceden lekeli humma geçirmiş olanlar istisna edilirse hekimlerin tamamına yakınının hasta veya iyileşme döneminde olduğu ifade edilmiştir (6-8).

Savaş sırasında ulaşım imkânlarının kısıtlı olması sebebiyle tıbbî malzemeler çoğu kez depolarda bekletilmiş ve yerine ulaştırılamamıştır. Ameliyat yapmanın imkânsız olması sebebi ile de ağır yaralılar kaderlerine terk edilmek zorunda kalmıştır (1).

Aziz Samih, Hasankale Şehitliği'ni tarif ederken; *“Ordu kumandanına kadar sirayet dairesini genişleten tifüs ve ateşli humma çok adam öldürüyor. Hasankale'nin kuzeyinde uzun ve derin hendekler açılmış. Her gün arabalar bunlara mütemadiyen ölü taşıyor.”* ifadelerini kullanmıştır (9). Bahsedilen günlerde önemli çatışmalar olmadığı halde verilen şehitler, salgın hastalıkların yol açtığı zayıflığın ne kadar büyük olduğunu gözler önüne sermektedir.

3. Ordu'da sıhî haberleşme düzensiz olup, özellikle Sarıkamış Harekâtı sırasında neredeyse hiç işlememiştir. Bu nedenle harekât'ta verilen yaralı, hasta ve donarak ölenlerin sayısı hakkında doğru sayıya ulaşmak da ne yazık ki mümkün olmamıştır (6). Kafkas Cephesi'nde askerlerin yanı sıra çok sayıda hekim ve subayın da tifüs etkeni ile enfekte olarak hayatını kaybettiği bilinmektedir. Enver Paşa'dan sonra bu cephenin ikinci büyük paşası ve aynı zamanda Padişah damadı olan Hafız Hakkı Paşa'da hasta olan erlerle yakın teması sonucu Hasankale'de bu hastalığa yakalanmıştır. 23 Ocak 1915'te yazdığı son günlüğünde ateşinin 37,5 °C'ye yükseldiğini ve hasta olduğunu belirtmiş, 12 Şubat 1915'te ise henüz 36 yaşındayken hayata gözlerini yummuş ve Karskapı Şehitliği'nin ilk misafiri olmuştur (10,11).

O dönem 3. Ordu sıhîye reisi olan Tevfik Salim Sağlam, tifüs hastalığı geçirip iyileşmiş olan hekim ve subayları Süleyman Numan'ın vaat ettiğinin aksine İstanbul'a gönderilmeyip görevlerine devam etmeleri emrini istemeyerek de olsa vermiştir. Çünkü bu hastalığı geçirip iyileşen hekim ve subayların yerlerine yenilerinin getirilmesi demek, yeni gelen hekim ve subayların tifüse yakalanması ve en azından üçte birinin ölmesi demek olacağından, tifüs hastalığı geçirmiş ve bu hastalığa karşı bağışıklık kazanmış olan

subay ve özellikle sıhîye subaylarının görev yerlerini değiştirmeme kararı almıştır. Bu karar hastalığı geçirmiş olanlara ağır bir mahrumiyet yüklemekle beraber, yeniden birçok insanı hastalanmaktan ve ölmekten kurtarmıştır (6, 12).

SAVAŞA HAZIRLIK DÖNEMİ

Savaşa hazırlık döneminde sağlık personeli ve tıbbî malzemenin yetersizliği bakımından oldukça fazla sıkıntı yaşanmıştır. Cephede, salgın hastalıklarla mücadele ve diğer hizmetlerin yürütülebilmesi için ihtiyaç duyulan doktor ve sağlık personeli açığını kapatmak amacıyla, 1 Ağustos 1914 tarihli ve 1097 sayılı Kanun'la 20-45 yaş arasındaki sivil doktor, eczacı ve diş hekimleri ve ardından 15 hizmet yılını doldurmadan istifa eden ya da bu süreyi doldurup görevden ayrılmış olan cerrahlarla eczacılar da ordu emrine alınmıştır (13,14).

Gerek muvazzaf ve gerekse kanunla orduya alınan sivil tabiplerin, askerî sağlık hizmetleri konusunda bilgileri yeterli seviyede değildi. 2 Ağustos 1914'de genel seferberlik ilanından sonra 29 Ekim 1914'de Osmanlı Devleti aniden savaşa girmiş ve bu dönem, bütün ordu için olduğu gibi, sıhîye hizmetleri açısından da büyük ve hızlı bir hazırlık dönemi olmuştur (3).

14 Mart 1915 tarihinde İbrahim Tali Bey'den görevi devralarak Kafkas Cephesi'nde sıhîye reisi olarak göreve atanan Binbaşı Dr. Tevfik Sağlam'a göre, 3. Ordu mıntıkasının çok dağınık olması ve zamana ihtiyacı olması sebebi ile savaşa yeterince hazırlıklı girilememiştir. Seferberlik ilanından, harbin başlangıcına kadar geçen üç aylık sürede göze çarpan en büyük eksiklik 3. Ordu'da cephe gerisi sıhîye hizmetlerinin tertip edilememiş ve özellikle geri sıhîye teşkilatının kurulamamış olmasıdır. Gerek yığınakta ve gerek ilerdeki hareketlerde en büyük yük Erzurum'a yüklenmiş ve ordunun düğüm noktası olmuştur. Tevfik Sağlam'a göre binaların ve iaşe imkanlarının müsait olması sebebi ile cephe gerisinde büyük bir hastane şehri olabilecek durumda olan Erzurum'da, 10.000-12.000 yatağın hazır bulunması

gerekirken savaş başladığı gün sadece 900 yatak bulunmaktaydı ve ayrıca dezenfeksiyon cihazları da hemen hemen yok gibiydi (6).

Sterilizasyonu sağlamak amacı ile 3. Ordu'nun tamamı için; iki sabit (Erzurum ve Trabzon'da) ve iki mobil (Trabzon'da) olmak üzere toplamda sadece dört adet etüv makinası bulunuyordu. Cephede harp paketi eksik olup İstanbul'dan gönderilen miktar (36.700 piyade, 1.794 topçu harp paketi) kâfi olmadığı gibi, bunların büyük bir kısmı da yollarda kalmıştı. Cephenin eksiklerini tamamlamakla meşgul olan sıhhi makamlar ise bu sorunlarla meşgul olacak halde değillerdi (8,15).

TİFÜS SALGINININ BAŞLANGICI

Kafkas Cephesi'ndeki büyük salgın Sarıkamış Harekâtı sonrasında başlamıştır ve tifüs 3. Ordu'nun savaş ortamında baş etmek zorunda kaldığı en büyük belalardan birisi olmuştur. Özellikle savaşın ilk yıllarında artan tehlike doğrultusunda salgının durdurulması için çok çaba sarf edilmiştir. Savaş başlamadan evvel 1914 yılı bahar aylarında doğu vilayetlerinde görülmeye başlayan tifüs, kısa zaman içinde memleketin her tarafını sarmıştır (5,16).

Seferberliğin ilanıyla birlikte Boğazlar Bölgesi'nden sonra en kalabalık kuvvet 3. Ordu'nun bünyesinde toplanmıştır. O yıllarda demiryollarının Ankara ve Ulukışla'da sona ermesi sebebi ile 3. Ordu'nun bulunduğu Kafkas Cephesi'nin ordu karargâhı olan Erzurum'a birçok asker yaya olarak gelmek zorunda kalmıştır. Bu askerler Erzurum'a gelirken güzergâh üzerindeki köylerde konaklayarak, halk ile sıkı bir temas sağlamışlardır. Bu yüzden halk içerisinde görülmekte olan bit, temizlik olanaklarından yoksun askerlerle temasın da etkisiyle hızla yayılmıştır. Kıtalarına ulaşan askerlerin bittin temizlenme imkânlarının olmadığı ve dezenfeksiyon malzemelerinin yok denecek kadar az olduğu bilinmektedir. Bu sebeple ordu bitle geçen hastalıkların büyük bir salgın yaratması için gereken şartlara fazlasıyla sahipti. Erzurum bölgesinde ısı teminine yarayacak malzeme sağlanamadığından ve

iklimin soğuk gidişatından dolayı tifüsle mücadele hayli zor şartlarda yürütülmüştür. Hatta bu dönemde cepheye giden askerlerin hastalığa muhakkak tutulacağı düşünüldüğünden onlar için "kurbanlık koyun" tabirinin kullanıldığı da bilinmektedir (5,8).

Kafkas Cephesi'ndeki büyük tifüs salgını Sarıkamış Harekâtı sırasında başlamış ve harekâtın başarısızlıkla sonuçlanmasını takip eden günlerde Erzurum, cepheden dönen hasta, yaralı ve bitkin askerlerden geçilmez olmuş; sokaklar, ahırlar, hanlar tifüsten hayatını kaybeden askerlerle dolmuştur. Pasinler Ovası'nda bulunan bütün köyler hasta ve bitkin askerlerle dolup taşmıştır. Erzurum'da hastanelerin kapasiteleri hastalara cevap verecek durumda olmadığından, salgın, sivil halk arasında da ciddi şekilde etkisini göstermeye başlamıştır. Hava değişimine gönderilen ve firari durumda olan askerler ise gittikleri her yere hastalığı bulaştırmışlardır (15).

O tarihlerde Erzurum Amerikan Mektebi Hastanesi'nde görev yapan ve kendisi de tifüse yakalanan Dr. Nazım Şakir Bey; "*Harbin başlamasından bir hafta sonra hastanenin 300 yatağı da doldu. Berbat bir bakım ve tedavi örneği verdik. Otoklav olmadığından derhal ve bolca bitlendik. Şehirde harpten evvel de mevcut olan lekeli humma birdenbire alevlendi, bütün evlere ve hastanelere yayıldı. 'Tifüs' bir afet halini aldı. Hastalara yetişemiyorduk. O esnada mektepten yeni çıkan 1914'lü genç doktorlar Erzurum'a geldi. Bunlar çok genç ve tecrübesiz olduklarından bizden evvel tifüse yakalandılar. Hastalık gayet vahim seyrediyor ve %70 öldürüyordu. İyi bakılanlar ve bünyesi pek kuvvetli olanlar kurtulabiliyordu*" demektedir (12). Rus işgaline uğrayan yerlerdeki Müslümanların Erzurum'a doğru göç etmesi salgın yayılmasında önemli rol oynamıştır (16).

SALGININ ÖNÜNE GEÇMEK İÇİN ÖDENEK VE ÇARELER ARANMASI

Erzak ve cephanede kollarında hizmet görürken telef olan binlerce hayvanın gelişi güzel etrafa atılmış ve şehit olan askerlerin defin işlemlerinin rastgele

yapılması sebebi ile bölgede bulunan doktorlar, ilkbahar geldiğinde şehirde hastalıkların yeraltı sularıyla daha fazla yayılarak başta kolera olmak üzere bir takım salgın ortaya çıkmasından endişe duymuşlar ve Belediye'den ödenek istemişlerdir. Ancak Erzurum belediyesi'nin bunları sağlayacak imkânı ne yazık ki olmamıştır (16). Erzurum'da sokaklar, parklar, bahçeler mezarlar ile dolmuştur ve daha sonraki yıllar şehir planlaması ile dağınık haldeki bu mezarlar kaldırılmıştır.

Erzurum'da şiddetli kış şartları hüküm sürerken (Ocak-Şubat 1915) askerî birliklerden günlük 300 ila 400 asker çeşitli şikâyetlerle hastanelere başvurmuştur. Erzurum'da 5.000 hastaya bakmak için 29 hekim vardı. Bunların bir kısmının da idari görevi olduğundan yaklaşık 250 hastaya bir hekim düşüyordu. Hastanelerde hijyen kurallarından ise maalesef söz etmek mümkün değildir (6, 13). Hafız Hakkı Paşa, kime ait olursa olsun hastane olarak kullanılmaya müsait büyük binalara el konulmasını, hastanelerdeki açığa bir an önce son verilmesini, 45 yaşından büyük herkesin hizmetli olarak çalıştırılmasını, görevden kaçmak isteyenlerin idam edilmesini emretmiştir. Bu emir, Erzurum halkını harekete geçirmiş ve Erzurum'un ileri gelenleri kasabalarda ve köylerde Sağlık Seferberliği'ne katılmışlardır (11).

Erzurum'da üzeri kapalı olan her bina hastahane haline getirilmiş; Maarif Müdürü Saip Bey ve Sıhhiye Müdürü Dr. Şerif (Soylu) Bey sayesinde Erzurum Muallim Mektebi ve İdadi öğrencilerinin hasta bakıcı olarak çalışmaları sağlanmıştır. Hekimlerin birçoğu tifüse yakalanmış, Rizeli Dr. Bahaeddin, Dr. Muhiddin, Eczacı İngiliz Kemal beylerin yanında; hasta bakıcılık yapan gerekli eğitimi almamış Erzurum İdadi Okulu öğrencilerinin birçoğu koruyucu tedbirlerin eksikliği nedeniyle tifüse yakalanarak çocuk yaşta hayatlarını kaybetmişlerdir (1,13).

ÜÇÜNCÜ ORDU'DA BAŞ GÖSTEREN TİFÜS SALGINININ SEBEPLERİ

Üçüncü Ordu'da görülen bu büyük tifüs salgınının nedenlerinden biri olarak, sağlık planı ve hazırlığı

olmadan bu savaşa girilmesi, ciddi sağlık önlemleri alınmadan bölgeye büyük bir insan yığınağı yapılması ve seferberlik hazırlıkları süresinde ortaya çıkabilecek tifüs salgınlarına karşı da hemen hemen hiç önlem alınmaması söylenebilir (13).

Üçüncü Ordu, Sarıkamış Taarruzu'na başladığında; bir yandan eksi 40°C'yi bulan kış ve mahrumiyetler, giysi ve gıda eksikliği, uzun yürüyüşler, askerî kıtaları şiddetle yıpratırken, diğer yandan tifüs ve geri gelen 'Ateş salgınları (Humma-yı Racia)' ordumuzu arkadan kuşatmıştır. Lekeli tifo ve Humma-yı racia, Birinci Dünya Savaşı sırasında en çok Doğu Cephe'sinde görülmüştür (3, 6).

TİFÜS ETKENİ

Tifüs yüzyıllar boyunca insanlığı etkileyen ve kitleler halinde ölümlere yol açan 20. yüzyılın başlarında mikrobiyolojinin en önemli araştırma konularından olan bir hastalıktır. Ülkemizde Cumhuriyet'in ilk yıllarına kadar etkisini sürdüren bu hastalık, özellikle kırsal kesimde varlığını daha uzun süre devam ettirmiştir (8, 17).

Birinci Dünya Savaşı'nda Doğu Cephesi'nde çarpışmaların başlamasından hemen sonra Erzurum ve çevresinde tifüs bir epidemi halini almış olup savaşın sonuna kadar varlığını sürdürmüştür (8).

Daha çok fakirlik ve yoksulluk şartlarında ortaya çıkan ve insana bitler aracılığıyla bulaşan bu hastalık, özellikle kış aylarında yaygınlık göstermektedir. Hastalığın yayılmasında; pislik, sefalet ve kötü beslenme etkilidir. 'Epidemik Tifüs (Bit Tifüsü/ Lekeli Humma)' etkeni olan *Rickettsia prowazekii*, insandan insana vücut biti (*Pediculus humanus corporis*) ile bulaşır (5, 18). Vücut bitleri, 28 °C'den aşağı, 32 °C'den yukarı sıcaklıklardan hoşlanmazlar. Ateşli hastaları ve ölüleri hemen terk ederler. Bitler soğuğa oldukça dayanıklı olup - 12 °C'de donar, fakat ölmezler. Isınınca tekrar canlanırlar (7, 19).

Riketsiyalar, Rickettsiaceae ailesinden, Gram negatif, zorunlu hücre içi patojenler olup küçük pleomorfik 0.3-0.5 x 0.8-2 µm boyutlarında

kokobasillerdir. Oldukça kalabalık ve heterojen bir grup olan riketsiya cinsinde 24 tür tanımlanmış olup, benekli ateş ve tifüs grubu olmak üzere iki serolojik gruba ayrılırlar. Tifüs grubu riketsiyalar; insan vücut biti ile bulaşan ve epidemik tifüs etkeni olan *Rickettsia prowazekii* ve pirelerle bulaşan endemik tifüs etkeni olan *Rickettsia typhi* ile ilişkilidirler. Hijyen şartlarının kötü olması enfeksiyon için en önemli predispozan faktördür. Optimal büyüme ısı 35°C'dir ve sadece konak hücrenin sitoplazmasında bulunurlar. *R. prowazekii* vücut bitinin dışkisından bulaşır ve tüm riketsiyalar içinde en virulan tip olup çok sayıda endotel hücrelerini enfekte ederler. Tedaviye rağmen mortalite oranı yüksektir. Mortalite, endemik tifüste yaklaşık %5, epidemik tifüste %40'ların üzerindedir (18). Ancak bu hastalığı geçirenlerde tam bağışıklık sağlanır ve tekrar aynı hastalığa yakalanmazlar. Riketsiyalar bitin bağırsak epiteli hücrelerinde çoğalarak beş gün sonra üredikleri hücreleri patlatmak suretiyle bitlerin sindirim borusuna oradan da dışkıyla dışarıya atılırlar. Bitlerin kan emerken döktükleri tükürük salgısı insanda kaşıntı yapar ve bu kaşınma sırasında bitin dışkıyla çıkardığı tifüs etkeni kan emerken açılan yaradan vücuda girer. Bununla beraber kurumuş toz halindeki bit dışkısının göze veya solunum yoluna kaçmasıyla da hastalığın bulaşması mümkündür (19). Riketsiya türlerinin yol açtığı hastalıklar Tablo 1'de verilmiştir.

Ateşli dönemdeki hastanın kanını taşıyan bitlerin ısırıldığı yerden vücuda giren etken, kapillerlerin ve küçük arterlerin endoteline yerleşir. Epidemik tifüsün kuluçka devri 10 ila 13 gündür. Hastalık; şiddetli baş ağrısı ve üçüncü günde 40-41 °C'ye ulaşan ateş ile birlikte; 4 ila 7. günlerde gövdenin üst kısmından başlayan ve giderek vücuda yayılan makülo-papüler döküntüler (yüz, avuç içi ve ayak tabanları hariç) ve bilinç bulanıklığı, dalgınlık, hezeyan, ajitasyon gibi nörolojik bulguların eşlik ettiği genel toksemi ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanır. Nekahat dönemi genellikle birkaç ay sürer (8, 19,20).

Eski dönemlerde, sinir bozukluklarına neden olduğundan bu hastalık, tifo ve bazen de veba ile karıştırılmıştır. Hatta Balkan Harbi'nde hastalığın adının "Tifüs mü? Tifo mu?" olduğu üzerine tartışmalar dahi yapılmıştır. Gülhane profesörlerinden Tevfik Salim, Abdülkadir Lütfi (Noyan) ve Nazım Şakir bu hususta yaptıkları çalışmalar neticesinde o günlerde 'Tifo (Karahumma)' olarak bilinen salgının gerçekte tifüs salgını olduğunu ortaya çıkarmışlardır (5).

Yedek Subay Faik Tonguç anılarında, bitler karışındaki çaresizliklerini şöyle anlatmaktadır: "Her tarafımızı saran haşarat ayıklamakla bitmiyordu. Dolaklarımın içinde taşıdığım kaşığın sapını ateşte kızdırarak, elbisenin dikiş yerlerine sıvaşmış olan yumurtaları yok etmeye çalışıyordum. Üç aydır çamaşır değiştirmemişim. Birkaç defa çamaşırımı suda ıslatarak kar üstünde bırakmışım. Maksadım,

Tablo 1. Çeşitli riketsiyal hastalıklar ve etkenleri (18,22)

Grup	Etken Mikroorganizma	Hastalık	Vektör	Memeli Rezervuar
Lekeli ateş grubu	<i>R. rickettsii</i> <i>R. akari</i> <i>R. conori</i> Diğer türler	Kayalık dağlar lekeli ateşi Riketsiya çiçeği Akdeniz lekeli ateşi Çeşitli coğrafik isimler	Kene Akar Kene Kene	Kemirgen, köpek Fare Kemirgen, köpek Kemirgen, köpek
Tifüs grubu	<i>R. prowazekii</i> <i>R. typhi</i>	Epidemik (bit) tifüs Endemik (fare) tifüs	Vücut biti Pire	İnsan Kene
Çalılık tifüsü	<i>O. tsutsugamushi</i>	Çalılık tifüsü	Akar	Kemirgen

elbiselerimdeki haşaratın donmasını sağlamak, geçici de olsa bunlardan kurtulmaktı. Fakat bitler donup ölüyor, yumurtalar canlı kalıyordu. Yumurtalar vücut sıcaklığı ile canlanmaya başlayınca, büyüklere aratacak derecede şiddetle küçükük hortumlar faaliyete geçiyor ve canımızı yakıyorlardı. Bit belasından yüksek rütbeli subaylar bile kurtulamıyorlardı” (21).

İLK TİFÜS AŞISI UYGULAMALARI

Epidemik tifüs'ün vektörünün bit olduğunu Fransız hekim Charles Nicolle 1909 Tunus salgını sırasında yaptığı deneylerle kanıtlamış ve bu çalışmasıyla 1928 yılında Nobel Tıp Ödülü'nü kazanmıştır. Esasen Birinci Dünya Savaşı sırasında tıp doktorları, daha önce Yemen'de karşılaştıklarında tanı koyamadıkları hastalığın tifüs olduğu ve bitlerle geçtiği sonucuna varmışlar ve tifüs aşısı uygulaması ilk kez henüz tifüs etkeni tespit edilmeden Türk hekimleri tarafından yapılmıştır (19,23).

Dr. Tevfik Sağlam'ın 3. Ordu'daki mücadelesine ışık tutan aşının deneysel araştırmaları Dr. Reşat Rıza ve Dr. Mustafa Hilmi beyler tarafından 1915'te İstanbul'da gerçekleştirilmiştir. 3. Ordu Sıhhiye Reisi Binbaşı Dr. Tevfik Salim Bey, Dr. Reşat Rıza usulü ile hazırladığı aşığı insanlar üzerinde ilk olarak uygulayan kişi olmuştur (25).

Aşı hazırlanırken tifüsün enfektif ajanı henüz bilinmemesine rağmen kanda mevcut olduğu varsayımı yapıp zamanın tüm bilimsel bilgileri göz önüne alınarak hazırlanmıştır. Aşığı hazırlayanlar amprik bir yöntem olan ve insanlarda denenmeden önce hayvanlarda uzun süre denendikten sonra uygulanması gereken bir yöntem olduğunun farkındaydılar. Ancak bunu uygulamaya ne imkân ne de vakit bulunmaktaydı. Hastalık etkenini kültürde üretmek mümkün olmadığından aşı hazırlamak için tifüsün yüksek ateşli devresindeki hastaların kanının kullanılması düşünülmüştür. Etkenin 55 °C'de 15 dakika tutulmakla hastalık yapma özelliğini kaybettiği bilinmekteydi. Buna göre aşı, diğer aşılarda olduğu gibi hastalık etkeninin öldürülmüş veya zayıflatılmış

bir şekilde vücuda verilerek bağışıklık kazandırılması esasına dayanıyordu (6,8).

Hastalığın en faal devresindeki tifüslü hastalardan alınan 10-20 ml'lik kan örnekleri, cam boncuklar içeren bir cam şişeye alınarak defibrine etmek için 15 dakika çalkalanmıştır. Daha sonra, tamamen suya batırılmış olan şişedeki kan örneği, 58-60 °C'de benmari usulü ile bir saat ısıtılarak inaktive edilmiş ve 5 ml alınıp subkutan olarak enjekte edilmiştir. Aşığı hazırlayanlar tifüs aşısının teorik ve pratik noksanlıklarının farkındaydılar. Bu şekilde hazırlanan ilk tifüs aşılmasının iki ana eksiği vardı. İlki, enjekte edilen kan miktarının ampirik olarak belirlenmiş olması ve içinde bulunan antijen miktarının belli olmaması, ikincisi ise kan örnekleri tifüs ile enfekte olmuş hastalardan alınırken büyük miktarlarda alınmaması ve bir örnek alındıktan sonra bir seferde sadece 2-4 kişinin aşılabilmesidir. Bu gibi sınırlamalar nedeniyle aşı sadece, hastanelerde en çok tehdit altında bulunan hekimler ve hasta bakıcılar gibi sınırlı sayıda sağlık personelinin korunması için uygulanabilirdi (8,23).

Dr. Tevfik Salim (Sağlam) İstanbul'dan ayrılmadan Reşat Rıza Bey'den aşı hazırlamasını öğrenmiş ve Hasankale'ye varır varmaz mevcut imkânlarla hazırladığı aşığı, 28 Mart 1915'te kendi arzuları ile beş hekim ve karargâh subaylarından dört kişi olmak üzere toplam dokuz subaya uygulamıştır (8).

İlk kez aşı uygulaması yapılan bu dokuz kişiden bir hekim ve dört subayda hiçbir sorun olmazken dört hekim aşı sonrası tifüse yakalanmış ve iyileşmişlerdir. Dört hekimin son derece bulaşık olan Hasankale hastanesinde çalışıyor olması ve bitlenmiş olmaları sebebi ile aşılandıkları esnada kuluçka devrinde oldukları sonucuna varılmıştır (6,8).

Aşı uygulamaları 3. Ordu ile sınırlı kalmamıştır. Bağdat'taki 6. Orduda görevli Dr Abdülkadir (Noyan) Ordu Kurmay Başkanı Kâzım Karabekir'in de aralarında bulunduğu 76 subay, 20 doktor ve 20 hemşire de aşılanmıştır. Aşılar yapılırken bazı yabancı kaynaklarda iddia edilen aksine hiçbir şekilde din, dil, meslek ve

rütbe ayrımcılığı gözlenmemiştir (6, 8, 23).

Altıncı Ordu Kumandanı Mareşal Von der Goltz Paşa ve özel hekimi Oberndorfer, henüz tıp literatürüne geçmemiş olan bu aşıya güvenmedikleri için, VI. Ordu Karargâhı'nda görevli ve tifüs aşısı konusunda uzman olan Dr. Abdulkadir (Noyan)'ın aşılama teklifini reddetmişlerdir. Aşılananlardan hiç biri hastalanmazken kumandan (Goltz Paşa) ve özel hekimi Bağdat'ta tifüsten hayatlarını kaybetmişlerdir (14,23).

Salgını söndürmek için yeterli aşı elde edilemediğinden, öncelikle risk grubu olan hekim ve hasta bakıcılar aşıyla korunmaya çalışılmıştır. Aşı uygulamasından önce Erzurum'da 50 hekimin tifüsten öldüğü dikkate alındığında ilk önce hekimlerin korunmasının önemi anlaşılmaktadır (8).

Dr. Tevfik Sağlam'ın dünyada ilk tifüs aşısını 28 Mart 1915'te Hasankale'de uygulamasının ardından, Dr. Hamdi Suat Aknar'da farklı bir yöntemle tifüs aşısını uygulamıştır. Gülhane'deki görevi sırasında, önce 1912'de Balkan Savaşı'nda, daha sonra 1915'te I. Dünya Savaşı'nda Kafkas Cephesi'nde görevlendirilen Dr. Hamdi Suat, bu cephede hem askerî hekim olarak çalışmış, hem de Kızılay adına salgın hastalıklarla, özellikle tifüs ile savaşmıştır (23, 25).

Dr. Hamdi Aknar'da 25 Nisan 1915'te, aşı hazırlanmasında bazı değişiklikler yaparak soğukta antijenlerin bütünlüğünün korumuş olacağını ve daha iyi bağışıklık kazandıracığını düşünerek, kanı fibrinden ayırdıktan sonra 60 °C'de ısıtma yerine, kar ve buz içerisinde -16°C de 24-48 saat bekletip inaktive ederek aşıyı geliştirmiş ve öncelikle kendisine ve birlikte çalıştığı doktor arkadaşlarına uygulamıştır. 'Hamdi Metodu' adıyla anılan bu yöntem, o zaman Alman hekimler tarafından örnek alınarak uygulanmıştır (25).

SAVAŞ SONRASI GELİŞMELER

Tutulan raporlara göre harekât bittikten iki ay sonra, mart ayında bile neredeyse iki askerden biri, (askerin yaklaşık %43'ü) tifüsten yatmaktaydı (1).

Hava değişimi için memleketlerine gönderilen erler, hastalığı her tarafa yayarak felaketin büyümesine neden olmuşlardır. Sağ kurtulanlar da, tifüs hastalığını, enfeksiyonlarla hiç tanışmamış dağ köylerine kadar götürmüşlerdir. Gaziler bu hastalığın postacıları olmuşlar, girdikleri evlerden tifüs ölümlerinin çıkmasına neden olmuşlardır (1, 14).

Savaş sonrası geri çekilme esnasında Köprüköy'de 60, Hasankale'de 162, Korucuk'da 100, nakli kabil olmayan ağır hasta ve yaralı Erzurum'a götürülemeyerek, zorunlu olarak yanlarına bir miktar yiyecek ve ilaç bırakılarak terk edilmiştir. Bu çekilme sırasında Erzurum'a nakledilemeyip düşmana terk edilen hasta ve yaralı sayısı toplam 322'dir (15).

Şubat-Aralık 1915 tarih aralığı Kafkas Cephesi'nde Türk ordusu için salgın hastalıklardan en fazla kayıpların yaşandığı dönem olmuştur. Savaşın bu tarihten sonraki seyrinde yine salgın hastalıklardan kayıplar görülmekle birlikte hiçbir döneminde bu denli etkili olmamıştır. 1918 yılına kadar tifüslü hasta sayısı ve ölüm oranında belirgin bir azalış görülmüştür (5,16).

1917 yılında doktorlar tarafından geliştirilen, kullanımı ve taşınması kolay, 'Buğu Sandığı, Buğu Fıçısı, Buğu Kazanı' gibi dezenfeksiyon cihazlarının kullanıma girmesinden sonra orduyu bittin kurtarmak ancak mümkün olmuştur (6).

SONUÇ

Çaresiz savaş koşulları göz önüne alındığında; askerlerin terk edilmiş evlerde, ahırlarda çok yakın temas ile toplu olarak konakladıkları, -30 °C'deki açık karargâhlarda günlerce yıkanamadıkları, çamaşır değiştiremedikleri düşünülürse, salgın hastalıkların orduda neden bu kadar tahribat yaptığı anlaşılır bir sonuçtur (1).

3. Ordu'nun askeri açıdan dramatik şekilde neticelenen Sarıkamış Harekâtı sonrası asıl facia başlamış, Pasinler Ovası'nda bulunan köyler ile Erzurum ve çevresi, hasta ve bitkin askerlerle dolmuştur. Hastanelerin kapasiteleri hastalara cevap

verecek miktarda olmadığı için tifüs salgınından sadece ordu değil, aynı zamanda sivil halk da etkilenmiştir (26).

Erzurum'da günde 20-30 kişi lekeli tifodan (tifüsten) hayatlarını kaybetmiştir. Hava değişimine gönderilen ve firari durumda olan askerler ise memleketlerine ulaşarak gittikleri yerlere hastalıkları taşımışlardır. Daha sonra hastalığa yakalanan askerler aracılığı ile hastalığın ülkemizin başka yerlerine taşınmasına engel olmak için askerlerin hava değişimine gönderilmesi yasaklanmıştır (12, 15, 26).

Birinci Dünya Savaşı yıllarındaki kayıtlarda 3. Ordu bünyesindeki hastalarda tifüs mortalite oranı %46 olarak kayıt altına alınmıştır. Savaş boyunca Kafkas Cephesinde tifüsten 164 sağlık subayı (125'i hekim, 25 eczacı, 6 cerrah, 1 diş hekimi, 7 tıp öğrencisi) hayatını kaybetmiştir (14, 27).

Kafkas Cephesi'nde çok sayıda cana mal olan tifüs salgını 1915 yılının yaz ayı itibari ile bastırılabilmiştir. Daha sonra cephede yaşanan salgınlar hiçbir evresinde 1915 kışında olduğu kadar etkili olmamıştır. Türk ordusunda görev alan Alman subaylardan 3. Ordu Kurmay Başkanı 'Felix Guze' anılarında, 1917 yılında genel sıhhi durumu ve hasta sevkiyatına ilişkin gözlemlerini dile getirmiş ve Ordunun sıhhi durumunun genel itibariyle memnuniyet verici olduğundan bahsetmiştir (3, 16).

Sonuç olarak; Ordu, Kafkas Cephesi'nde savaşa sürülürken hazırlıklar son derece yetersiz kalmıştır. Sarıkamış Muharebesi'nde sıhhi hizmet ve teşkilat, üzerinde durulacak en önemli nokta iken şiddetli kış ortasında son derece müşkül şartlar altında girilen bu önemli mücadelede sıhhi tertibat tamamen ihmal edilmiştir (15, 16).

Çetin doğa koşulları, askerlerin yeterli gıda alamaması, eksi 30-40°C'ye varan soğuğa uygun giydirilememesi, sağlık durumunu bozan en önemli etkenler olmuştur (14). Askerimiz, karşısındaki düşmana değil çetin doğa koşullarına ve salgın hastalıklara mağlup olmuştur.

Tifüs hastalığı, insandan insana bulaşmayıp bitler aracılığıyla geçtiği için, tifüs ile mücadele hastalığı taşımada aracılık eden vektör bitlerle mücadeleyi gerekli kılmıştır. Kimyasal ilaç sanayisinde meydana gelen gelişmeler, tifüsün sonunu getirmiştir. 1930'lu yıllardan itibaren bit ve zararlı böcekleri öldürmek için DDT (Dikloro Difenil Trikloroetan)'nin etkin kullanımının yaygınlaşması Cumhuriyet'le birlikte tifüsün ölümcül etkisini ortadan kaldırmayı başarmıştır (17).

Tifüs hastalığı'nın insanları kırıp geçirdiği günlerde bu acılara şahitlik edenler, ölüme karşı yaşamı savunmanın bir yolu olmalı diye çaba harcamış ve Türk hekimleri bunu başarmışlardır.

TEŞEKKÜR

"Ayağınıza sıcak bir ayakkabı, sırtınıza kalın bir palto, sofranıza sıcak bir çorba aldığımız zaman lütfen bu insanları hatırlayınız ⁽¹⁾". Prof. Dr. Bingür Sönmez'e çalışmama katkılarından dolayı teşekkür ederim.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Sönmez B, Yıldız R. Ateşe Dönen Dünya: Sarıkamış. 7.Baskı. İstanbul: İkarus Yayınları, 2010.
2. Yergök Z, Sami Önal (Haz.). Tuğgeneral Ziya Yergök'ün Anıları, Sarıkamış'tan Esarete (1915-1920). 5.Baskı. İstanbul: Remzi Kitapevi, 2006.
3. Demireğen Ö, Keskin A, İlhan F. Birinci Dünya Savaşı'nda Doğu Cephesi'nde sağlık hizmetleri. Ankara: Genelkurmay ATASE Başkanlığı Yay., 2011.
4. Cömert H. Kayserili Mustafa Remzi Bey'in Hatıraları (Balkan-Sarıkamış Günlüğü). 1.Baskı. Ankara: Mazaka Yayıncılık, 2013.
5. Özer S. I. Dünya Savaşı'nda Osmanlı Devleti'nde Tifüs (Lekeli Humma) Salgını. Belleten, 2016; 80 (287): 219-260.
6. Gökçe Tİ, Üster SN, Tevfik Sağlam. 1882-1963. 2.Cilt. İstanbul: İsmail Akgün Matbaası, 1968.
7. Kuntman MD. Bir Doktorun Harp ve Memleket Anıları. 2.Baskı. Ankara: Genelkurmay Başkanlığı ATASE, 2010.
8. Karatepe M. I. Dünya Savaşı Yıllarında Tifüs Aşısının Uygulanmasında Türk Hekimlerinin Rolü. Mikrobiyol bül, 2008; 42(2): 301-313.
9. İltar AZ. Birinci Dünya Savaşı'nda Kafkas Cephesi Hatıraları. Ankara: Genelkurmay Askeri Tarih ve Stratejik Etüt Başkanlığı Yayınları, 2007.
10. Konukçu E. Erzurum'da Kars Kapı Şehitliğindeki İki Mezar "Hafız Hakkı Ve Cemal Paşalar (1915,1922). Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2010.
11. Bardakçı M. Hafız Hakkı Paşa'nın Sarıkamış Günlüğü. İstanbul: İş Bankası Kültür Yayınları, 2014.
12. Şakir N. Birinci Cihan Harbinde Erzurum ve sağlık organizasyonu anıları, Çeşitli Yönleri ile Erzurum ve Çevresi. Ankara, Ulusal Verem Savaş Derneği, 1968.
13. Özbay K. Türk Asker Hekimliği Tarihi ve Asker Hastaneleri. Cilt 1. Yörük Basımevi: İstanbul, 1976.
14. Yıldırım N. 1. Dünya Savaşı'nda Tıbbiyeler ve 14 Mart'ın Tıp Bayramı Oluşu. Toplumsal Tarih, 2008; 42-48.
15. Sağlam T. Büyük Harpte 3. Orduda Sıhhi Hizmet. İstanbul: Askeri Matbaa, 1941.
16. Tekir S. Sarıkamış Harekâtı Sonrası Türk Ordusunda Görülen Salgın Hastalıklar Ve Yaşanan Kayıplar. Kafkas Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 2016; 0(2016-Ek): 267-287.
17. Sarıköse ST. XIX. yüzyılda Çukurova'da Doğal Afetler ve Salgın Hastalıklar. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2013.
18. Sütçü M, Somer A. Riketsiyal Enfeksiyonlar. Somer A, Salman N, Yalçın I. Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları. 2.baskı. İstanbul: Akademi yayınevi, 2015: 457-465.
19. Karatepe M. I. Dünya Savaşında Kafkas Cephesinde Tifüsle Mücadele, (Yayınlanmamış Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1999.
20. T.C. Sağlık Bakanlığı. Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliği. Epidemik Tifüs, Resmî Gazete (26537), 2007.
21. Tonguç F. Birinci Dünya Savaşı'nda Bir Yedek Subayın Anıları. 2. Baskı. İstanbul: Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları, 1999.
22. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9th edition. Washington DC: American Society of Microbiology Press, 2007.
23. Başustaoğlu AC, Karakuş SE. The fight against typhus in the Ottoman Army during World War I. Microbiology Australia, 2014; 35(3): 148-152.
24. Oktay S. Gebelerin Grip Aşısı Etkinliği ve Güvenirliği Hakkında Bilgi Düzeyi. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2017.
25. Kurt E. Prof. Dr. Hamdi Suat Aknar ve Bilim Tarihindeki Yeri. Lokman Hekim Journal, 2013;3(1):62-66.
26. Özdemir H. Salgın Hastalıklardan Ölümler 1914-1918.Ankara: Türk Tarih Kurumu Basımevi, 2005.
27. Yurdakul S.E. Kızılay'ın İlk Hastaneleri (1877-1878): Yatan Hastalarda Görülen Enfeksiyonlar ve Mortalite Oranları. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg, 2019; 49(2):104- 112.

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE



HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

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

Makale Türü/Article Type:

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

Makale Başlığı/Article Entitled :

Sayın Editör,

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

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

Dear Editor,

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

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

(...1) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...2) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...3) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...4) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

(...5) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

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

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

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

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

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

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

