



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 77 ■ Sayı/Number 3 ■ Yıl/Year 2020

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

**Fatih KARA, Genel Müdür (General Director)**

### EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Hasan IRMAK

### EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

Demet CANSARAN-DUMAN

Hülya ŞİMŞEK

Pınar KAYNAR

### YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Hanefi ÖZBEK

Fatih BAKIR

Selin NAR-ÖTGÜN

Cemile SÖNMEZ

Dilek YAĞCI-ÇAĞLAYIK

Fehminaz TEMEL

Can Hüseyin HEKİMOĞLU

Şule ŞENSES-ERGÜL

Arsun ESMER

Gülsen TOPAKTAŞ

### TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Utku ERCÖMERT

Zeynep KÖSEOĞLU

Selahattin TAŞOĞLU

Gülay GÜLTAY

**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 - 2020 / September - 2020

# 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

Ahmet KART, 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, Ankara

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Çorum

Banu ÇAKIR, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Ankara

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

Gülnur TARHAN, Adıyaman

Hakan ABACIOĞLU, İzmir

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

Hanefi ÖZBEK, İstanbul

Hasan IRMAK, Ankara

Hasan TEZER, Ankara

Hayrettin AKDENİZ, Bolu

Hilal ÖZDAĞ, Ankara

Hülya ŞİMŞEK, Ankara

Hürrem BODUR, Ankara

Işıl MARAL, İstanbul

İ. Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir

İpek MUMCUOĞLU, Ankara

İrfan EROL, Ankara

İrfan ŞENCAN, Ankara

İsmail CEYHAN, Ankara

Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara

Koray ERGÜNAY, Ankara

Levent AKIN, Ankara

Mahinur AKKAYA, Ankara

Mehmet Ali ONUR, Ankara

Mehmet Kürşat DERİCİ, Çorum

Mestan EMEK, Antalya

Metin KORKMAZ, İzmir

Mithat ŞAHİN, Kars

Muhsin AKBABA, Adana

Murat DİZBAY, Ankara

Mustafa AKSOY, Ankara

Mustafa ERTEK, Ankara

Mustafa Necmi İLHAN, Ankara

Mustafa Kasım KARAHOCAGİL, Kırşehir

Mustafa Kemal BAŞARALI, Ankara

Mustafa KAVUTÇU, Ankara

Mükerrem KAYA, Erzurum

Nazan YARDIM, Ankara

Nazime MERCAN, Denizli

Nazmi ÖZER, Ankara

Nilay ÇÖPLÜ, Ankara

Nur AKSAKAL, Ankara

Nur Münevver PINAR, Ankara

Nuran ESEN, İzmir

Oğuz GÜRSOY, Denizli

Orhan BAYLAN, İstanbul

Orhan YILMAZ, Ankara

Özlem KURT AZAP, Ankara

Pınar KAYNAR, Ankara

Pınar OKYAY, Aydın

Rahmet GÜNER, Ankara

Recep AKDUR, Ankara

Recep KEŞLİ, Afyonkarahisar

Recep ÖZTÜRK, İstanbul

Rıza DURMAZ, Ankara

S. Aykut AYTAÇ, Ankara

Saime ŞAHİNÖZ, Gümüşhane

Sami AYDOĞAN, Kayseri

Sarp ÜNER, Ankara

Seçil ÖZKAN, Ankara

Seda KARASU YALÇIN, Bolu

Seda TEZCAN, Mersin

Selçuk KAYA, Trabzon

Selçuk KILIÇ, Ankara

Selim KILIÇ, Ankara

Selin NAR ÖTGÜN, Ankara

Sema BURGAZ, Ankara

Semra Ayşe GÜREŞER, Çorum

Sercan ULUSOY, İzmir

Sultan ESER, İzmir

Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa

Sümer ARAS, Ankara

Şule SENSES ERGÜL, Ankara

Tevfik PINAR, Kırıkkale

Turan BUZGAN, Ankara

Yeşim ÖZBAŞ, Ankara

Yunus Emre BEYHAN, Van

Zafer ECEVİT, Ankara

Zafer KARAER, Ankara

Zati VATANSEVER, Kars

Zeynep GÜLAY, İzmir

# TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

Dergide yayımlanmak üzere gönderilen yazılar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yazım kurallarına göre hazırlanmalıdır. Başvurular [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org) adresinden "Çevrimiçi Makale Gönder, Takip Et, Değerlendir Programı" aracılığıyla on line olarak yapılabilir.

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallara uyum aranır. Kurallara uymayan yazılar daha ileri bir inceleme gerektirmeksizin yazarlarına iade edilir.

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

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

a. Yazının başlığı kısa olmalı ve 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 belirtilmelidir.

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

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

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

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

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

7. Metnin tamamı 12 punto Times New Roman karakteri ile çift aralıklı yazılmalı ve sayfa kenarlarından 2,5 cm boşluk bırakılmalıdır.

8. Yazarlar araştırma ve yayın etiğine uymalıdır. Klinik araştırmalarda, çalışmaya katılanlardan bilgilendirilmesi olur alındığının gereç ve yöntem bölümünde belirtilmesi gerekmektedir. Gönüllü ya da hastalara uygulanacak prosedürlerin özelliği tümüyle anlatıldıktan sonra, kendilerinin bilgilendirilip onaylarının alındığını gösterir bir cümle bulunmalıdır. 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 uymalı ve "Etik Kurul Onayı"ni göndermelidir.

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

10. Hasta kimliğini tanıttıkça fotoğraf kullanıldığında, hastanın yazılı onayı gönderilmelidir.

## 11. 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.

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

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

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

d) **Giriş:** Araştırmanın amacı ve gerekçesi güncel literatür bilgisi ile desteklenerek iki sayfaya 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 araştırmaların 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.

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

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

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

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

**Kitap:** Yazar(lar)ın soyadı adının baş harf(ler)i. Kitabın adı. Kaçıncı 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. Kaçıncı baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı: Bölümün ilk ve son sayfa numaraları.

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

**Web adresi:** Eğer doğrudan "web" adresi referans olarak kullanılacaksa adres ile birlikte parantez içinde bilgiye ulaşılan tarih de belirtilmelidir. Web erişimli makalelerin referans olarak metin içinde verilmesi gerektiğinde DOI (Digital Object Identifier) numarası verilmesi şarttır.

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

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

j) **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.

k) **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.

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

13. Derleme türü yazılarda tercih edilen yazar sayısı ikiden fazla olmamalıdır. Yazar(lar) daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olmalı; bu deneyimlerini derleme yazısında tartışmalı ve kaynak olarak göstermelidir. Derlemelerde Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet (en az 250, en fazla 400 kelime içermelidir) ve anahtar kelimeler bulunmalıdır. Derleme türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 60 olmalıdır.

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

15. 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.

16. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

17. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

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

Articles should be prepared according to the rules of the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology. Submissions can be made online at the address [www.turkhiyjen.org](http://www.turkhiyjen.org) through the Online "Manuscript Submission, Tracking, Evaluation Program".

Manuscripts are checked according the following rules. If the rules are not adhered to, manuscripts will be returned to the author.

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, short title, author name(s), names of institutions and the departments of the authors, full address, telephone numbers (landline and mobile) and e-mail address should be given:

- The title should be short and written in lower case.
- The short title should not exceed 40 characters.
- The study supported by a fund or scientific organisation must be mentioned in a footnote or in the acknowledgements.
- 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". Importance should be given to use pure Turkish language and as many as Turkish references.

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

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

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

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

8. The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology expects the authors to comply with the ethics of research and publication. In human research, a statement of the informed consent of those who participated in the study is needed in the section of the "Materials and 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 the authors do not have a local ethics committee, the principles outlined in the "Declaration of Helsinki" should have been followed. Authors should declare that they have followed the internationally accepted latest guidelines, legislation and other related regulations and should send "Approval of the Ethics Committee".

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

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

### 11. 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).

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

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

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

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

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

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

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

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

i) References: Authors are responsible for supply complete and correct references. References should be numbered according to the order used in the text.

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

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

- Example of standard journal article: Demirci M, Unlü M, Sahin U. A case of hydatid cyst diagnosed by kinyoun staining of lung bronco-alveolar fluid. *Türkiye Parazitol Derg*, 2001; 25 (3): 234-5.
- Example of an article with authors unknown: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J*, 1981; 283:628.
- Example of journal supplement: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: Demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood*, 1979; 54 (Suppl 1): 26a.

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

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

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

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

Congress papeyars: Entrala E, Mascaró 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.

j) 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)".

k) 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.

12. Research articles should have up to 40 references.

13. 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.

14. Case reports should have a maximum of seven pages of text.

Case report should have a Turkish and English title, abstract, keyword(s) and also introduction, case description and discussion sections should be given. Number of references should be maximum 20.

15. 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.

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

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

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

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

INDEX COPERNICUS  
INTERNATIONAL

DOAJ DIRECTORY OF  
OPEN ACCESS  
JOURNALS



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); DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, ResearchGate, 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 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 DOAJ (Directory of Open Access Journals), 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

ResearchGate

Scopus

GENAMICS™  
...research from your desktop

medoanet  
Mediterranean Open Access Network

## İLETİŞİM

## CORRESPONDENCE

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

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

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

Tel: 0312 565 55 79

Faks: 0312 565 55 91

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

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

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



## ■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. **Contact tracing management of the COVID-19 pandemic**  
**COVID-19 pandemisinde fiyasyon ve temaslı yönetimi**  
 Asiye Çiğdem ŞİMŞEK, Ates KARA, Fatma Nur BARAN-AKSAKAL, Mehmet GÜLÜM, Bahattin İLTER, Levent ENDER, Yunus Emre BULUT, Hasan GUL, Hasan IRMAK, Kerime ALTUNAY, Nilüfer TAVUKÇU, Deniz ÇAKMAK, Ercüment TOSUN, Enver Cihangir GULEGEN, Avni AYDOĞMUŞ, Muhittin DEMİRKASIMOĞLU  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.80688 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 269 - 280 
2. **An investigation of antifungal susceptibilities of the *Candida* species isolates from blood cultures using the Sensititre YeastOne microdilution method**  
**Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin antifungal duyarlılıklarının Sensititre YeastOne mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılması**  
 Raif KARAASLAN, Esin AKTAŞ, Figen ORHAN  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.42650 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 281 - 288 
3. **Atık sudan izole edilen *Pseudomonas* spp. suşları ile kurşun ve nikel ağır metallerinin giderimi**  
**Removal of the lead and nickel heavy metals with *Pseudomonas* spp. strains which isolated from waste water**  
 Berrin KELOĞLU, Şahlan ÖZTÜRK, Süleyman YALÇIN  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.78095 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 289 - 300 
4. **Sanitation control of some equipments used in poultry slaughterhouse line**  
**Kanatlı kesim hattında kullanılan bazı alet ve ekipmanlarda sanitasyon işleminin kontrolü**  
 Nilgun ÇETİNKAYA, Gökhan Kürşad İNCİLİ, Ali ARSLAN  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.93275 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 301 - 310 
5. **Assessment of the anti-quorum sensing effect of *Lactobacillus* sp. metabolites on expression levels of QS-related genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**  
***Pseudomonas aeruginosa* PAO1'de QS ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin anti-quorum sensing etkilerinin belirlenmesi**  
 DideM KART, Suna Sibel GÜRPINAR, Müjde ERYILMAZ  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.57873 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 311 - 318 
6. **Anti-HCV tarama testi eşik değerinin HCV-RNA ve Line Immunoassay testi ile belirlenmesi**  
**Determination of Anti-HCV Scanning Test cut-off value by HCV-RNA and Line Immunoassay Test**  
 Alper SARIBAŞ, Altan AKSOY  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.67778 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 319 - 324 
7. **Üriner kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonlarında ölüm ile ilişkili faktörlerin incelenmesi**  
**Investigation of death related factors in urinary catheter-associated urinary tract infections**  
 Can Hüseyin HEKİMOĞLU, Selda ŞAHAN  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.13549 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 325 - 332 
8. **Lipopolisakkarit'in neden olduğu bağırsak toksisitesine karşı biyosentetik gümüş nanopartiküllerin etkisi**  
**The effect of biosynthetic silver nanoparticles against intestinal toxicity caused by lipopolysaccharide**  
 Fatma ÖZTÜRK-KÜP, Burçin KOÇAK, Ali Tuğrul AKIN, İsrail DOĞANYIĞIT, Aslı OKAN, Emin KAYMAK, Züleyha DOĞANYIĞIT  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.52386 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 333 - 342 
9. **Sivas'ta akarsu çevresinden toplanan yumuşakçalarda trematod larval dönemlerinin araştırılması**  
**Investigation of trematode larval stages in molluscs collected from surrounding the river in Sivas**  
 Fatih AKYILDIZ, Serpil DEĞERLİ  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.69346 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 343 - 348 
10. **Encephalitozoonosis in rabbits under different care conditions**  
**Farklı bakım koşullarındaki tavşanlarda encephalitozoonosis**  
 Hakan TÜFEK, Özcan ÖZKAN  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.18784 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 349 - 354 
- **Derleme / Review**
11. **Epidemiological and clinical aspects of the COVID-19 pandemic and world common experiences in treatment: Turkey experience**  
**COVID-19 pandemisinin epidemiyolojik ve klinik yönleri ve tedavide dünyanın ortak deneyimleri: Türkiye deneyimi**  
 Hasan GARAGEÇİLİ, Zuhul YILDIRIM  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.95914 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 355 - 366 
12. **Küresel bir tehdit: *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları, antimikrobiyal dirençte güncel durum ve alternatif tedavi yaklaşımları**  
**A global threat: *Acinetobacter baumannii* infections, current condition in antimicrobial resistance and alternative treatment approaches**  
 Aybala TEMEL, Bayri ERAÇ  
 Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.04764 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 367 - 378 



# Contact tracing management of the COVID-19 pandemic

## COVID-19 pandemisinde filyasyon ve temaslı yönetimi

Asiye Çiğdem ŞİMŞEK<sup>1</sup>, Ateş KARA<sup>2</sup>, Fatma Nur BARAN-AKSAKAL<sup>3</sup>, Mehmet GÜLÜM<sup>1</sup>, Bahattin İLTER<sup>1</sup>, Levent ENDER<sup>1</sup>, Yunus Emre BULUT<sup>1</sup>, Hasan GÜL<sup>1</sup>, Hasan IRMAK<sup>4</sup>, Kerime ALTUNAY<sup>1</sup>, Nilüfer TAVUKÇU<sup>1</sup>, Deniz ÇAKMAK<sup>1</sup>, Ercüment TOSUN<sup>1</sup>, Enver Cihangir GÜLEGEN<sup>1</sup>, Avni AYDOĞMUŞ<sup>1</sup>, Muhittin DEMİRKASIMOĞLU<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Objective:** The new type of Corona virus (SARS-CoV-2) is the most important item on the agenda, currently affecting our world. The number of cases has exceeded millions and the number of dead has exceeded hundreds of thousands. The precautions to be taken by societies and individuals, especially states, will undoubtedly be the most important task at the end of this epidemic. In our study, analyzes the data and consequences regarding COVID-19, making use of worldwide experiences and national statistics. In the report writing process, evidence-based and scientific tables and charts were used. In these times when most citizens have just begun to encounter the word pandemic, this report has been prepared using the data and scientific facts of the Ministry of Health of the Republic of Turkey. In this study, it was aimed to evaluate "contact tracing management" (detection, referral and follow-up) studies for positive cases with COVID-19 test results and their contacts in Ankara.

**Methods:** With the Laboratory Information Management System (LBYS), Public Health Management System (HSYS), Contact Tracing and Isolation Tracking System (FITAS) and the Family Medicine Information

### ÖZET

**Amaç:** Pandeminin toplum düzeyindeki etkisi virüsün bulaştırıcılığına, hastalık oluşturma yeteneğine, toplumdaki bireylerin bağışıklık durumuna, bireyler arası temas ve toplumlar arası ulaşım özelliklerine, risk faktörlerinin varlığına, sunulan sağlık hizmetlerine ve iklime bağlı olarak değişiklik göstermektedir. COVID-19 pandemisinin başlangıcından itibaren ülkeler kapasiteleri ve mevcut sağlık altyapılarının durumuna göre değişik stratejiler yürütmüştür. Türkiye'de ilk COVID-19 vakası 11 Mart 2020 tarihinde görülmüş ve salgın başlangıcından itibaren vaka görülen ülkelere karşılıklı uçuşların durdurulması, okulların kapatılması, evden çalışma olanaklarının sağlanmasına yönelik yasal düzenlemeler, 65 yaş ve üstü ile 20 yaş ve altı kişiler için sokağa çıkma kısıtlaması, topluma yönelik süreli sokağa çıkma uygulaması gibi önlemler alınmıştır. Bir yandan sağlık kurum ve kuruluşlarının güncellenmiş pandemi hazırlık planları kapsamında yataklı tedavi kurumlarının "pandemi hastanesi" yaklaşımı ile ikinci ve üçüncü basamak hizmet sunumu devam ederken bir yandan da birinci basamak sağlık hizmetleri dahilinde salgın kontrolüne yönelik olarak sahada vaka bulma ve temaslı takibi amacıyla "filyasyon çalışmaları" planlanmış ve

<sup>1</sup>Ankara Provincial Health Directorate, Ankara

<sup>2</sup>Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara

<sup>3</sup>Gazi University Faculty of Medicine, Ankara

<sup>4</sup>T.C. Ministry of Health, General Directorate of Public Health, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Asiye Çiğdem ŞİMŞEK

Ankara İl Sağ. Müd., Halk Sağ. Hiz. Bşk. Eski Numune Hast. Yerleşkesi, B Blok Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : cigdemsimsek2000@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 19.06.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 07.09.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.80688

Şimşek AÇ, Kara A, Baran-Aksakal FN, Gülüm M, İlder B, Ender L, Bulut YE, Gül H, Irmak H, Altunay K, Tavukçu N, Çakmak D, Tosun E, Güleğen EC, Aydoğmuş A, Demirkasimoğlu M. Contact tracing management of the Covid-19 pandemic. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 269-280

System (AHBS) prepared by our Ministry, the COVID-19 test results in Ankara were directed towards the “the Our study, which aims to evaluate contact tracing management” (detection, referral and follow-up) studies, is a descriptive study. Within the scope of the research, the studies between March 11, 2020 and May 31, 2020 were examined. In order to use the data in the study, permission was obtained from the General Directorate of Public Health of the Ministry of Health of the Republic of Turkey.dated 06/12/2020 and numbered 119016548.

**Results:** In Ankara, the number of contacts per case is 4.07 and the number of contact tracing per case is 4.05. With a total of 398 “Field Contact Tracing Teams” consisting of 1 doctor and 2 health care personnel throughout the city, the average of 50 ± standard deviations reached 99.4% within hours.

**Conclusion:** The most effective way to prevent the spread of the virus; the epidemic is expected to be brought under control by public health interventions such as mask use, social distance, hand washing, hygiene rules, infection prevention activities such as indoor ventilation and contact management made through “Field Contact Tracing Teams” and Family Medicine providing service across the country with GPS-based mobile application FITAS.

**Key Words:** COVID-19, COVID-19 pandemic control, contact tracing

yürütülmüştür. Ankara ilinde COVID-19 test sonucu pozitif bulunan vakalar ile onların temaslarına yönelik “filyasyon” (tespit, sevk ve takip) çalışmalarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Sağlık Bakanlığı tarafından hazırlanan Laboratuvar Bilgi Yönetim Sistemi (LBYS), Halk Sağlığı Yönetim Sistemi (HSYS), Filyasyon ve İzolasyon Takip Sistemi (FITAS) ve Aile Hekimliği Bilgi Sistemi (AHBS) ile Ankara ilinde COVID-19 test sonucu pozitif vakalar ile onların temaslarına yönelik “temaslı izleme yönetimi” (tespit, sevk ve takip) çalışmalarını değerlendirmeyi amaçlayan araştırmamız tanımlayıcı bir çalışmadır. Araştırma kapsamında 11 Mart 2020 ile 31 Mayıs 2020 tarihleri arasındaki çalışmalar incelenmiştir. Çalışmanın yapılması ve yapılan çalışmanın bilimsel dergilerde yayımlanması amacıyla T.C.Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğünden 12/06/2020 tarihli ve 119016548 sayılı izin alınmıştır.

**Bulgular:** Ankara’da ilk vakanın konfirme edildiği 13 Mart 2020 ile 31 Mayıs 2020 arasında toplam 190.823 PCR testi yapılmış ve 7231 pozitif vaka tanımlanmıştır. Pozitiflik oranı %3.78’dir. Ankara’da vaka başına ortalama temaslı kişi sayısı 4,07 olup vaka başına kişi takibi sayısı ise 4,05’tir. İl genelinde 1 doktor ve 2 sağlık personelinde oluşan toplam 398 “Filyasyon Ekibi” ile saatte ortalama 50± standart sapma %99.4’e ulaşılmıştır.

**Sonuç:** Virüsün yayılmasını önlemek için en etkili yöntemler olan maske kullanımı, sosyal mesafe, el yıkama, hijyen kuralları, iç mekan ortam havalandırması gibi enfeksiyon önleme çalışmaları ve GPS tabanlı mobil uygulama FITAS ile ülke genelinde hizmet sunan Saha Filyasyon Ekipleri ve Aile Hekimleri aracılığıyla yapılan temaslı yönetimi gibi halk sağlığı müdahaleleriyle salgının kontrol altına alınması beklenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, COVID-19 pandemi kontrolü, filyasyon

## INTRODUCTION

The impact of a pandemic at the community level varies depending on the infectiousness of the virus, the ability to cause disease, the immune status of individuals in the society, inter-individual contact and inter-communal transportation characteristics, the presence of risk factors, the health services provided and the climate (1,2).

Since the beginning of COVID-19 Pandemic, countries have carried out different strategies according to their capacities and the status of their existing health infrastructures.

The first observed case of COVID-19 in Turkey was on March 11, 2020 and measures such as halting flights to and from countries where cases had occurred since the beginning of the epidemic, closing schools, legal regulations for the provision of work from home, a curfew for people 65 years old and over as well as those 20 years old and under, and a curfew of a limited timeframe for the general society was taken. An updated pandemic preparation plan for the health institutions, inpatient institutions under the “hospital pandemic” approach was planned and conducted while continuing to provide secondary and tertiary care services (they are also in the field of epidemic control within the primary health care services, case finding, and contact tracing studies: “Contact Tracing Management”).

Contact tracing management is a field study aimed at determining the agent and the source of the agent, that is, to reveal the chain of infection. In other words, it is the search for resources. The word contact tracing refers to study done in medicine to find the cause of the first occurrence of the disease, particularly the source of an infectious disease.

As a result of these studies, important information such as whether the danger still exists and whether other people are at risk can be obtained (1-4).

The guidelines for combating infectious diseases on the official website of the Republic of Turkey,

Ministry of Health, General Directorate of Public Health define contact tracing management/field review as: conducting studies to determine the source and the agent, and/or taking protection and control measures, including contacts.

Contact tracing management is the most classic strategy of “controlling the epidemic” in order to fight infectious diseases. It is a field study aimed at determining the source, i.e. the chain of infection, or “number of contacts in the home environment and workplace environment”.

The screening of all people who have come into contact with the cases is to determine from who the case has gotten the infection and who the case has further infected (2).

In this study, it was aimed to evaluate “contact tracing management” (detection, referral and follow-up) studies for positive cases with COVID-19 test results and their contacts in Ankara.

## MATERIAL and METHOD

With the Laboratory Information Management System (LBYS), Public Health Management System (HSYS), the Filiation and Isolation Tracking System (FITAS) and the Family Medicine Information System (AHBS) prepared by our Ministry, the COVID-19 test results in Ankara were directed towards “the Our study, which aims to evaluate contact tracing management” (detection, referral and follow-up) studies, is a descriptive study. Within the scope of the research, the studies between March 11, 2020 and May 31, 2020 were examined. In order to use the data in the study, permission was obtained from the Republic of Turkey General Directorate of Public Health of the Ministry of Health dated 06/12/2020 and numbered 119016548.

## Timeline

**World Health Organization (WHO):** There was an announcement on December 31, 2019, by WHO China Country Office. After reporting that there are many unknown cases of pneumonia in Wuhan, Hubei province of China, WHO first announced that the cause of these complaints was a new type of coronavirus (2019-nCoV).

The Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) was held in Geneva on January 29-30, 2020 for the second time after meeting on January 23, 2020 for the first time on the issue of 2019-nCoV. It recommended that imported cases are expected in various countries, so all countries should actively carry out surveillance, early detection, isolation and case management, monitor contacts and prevent the spread of 2019-nCoV infection. The general manager of WHO declared this outbreak, the “COVID-19 Pandemic,” on March 11, 2020, and “in the past two weeks, the number of cases outside China has increased by thirteen times, and the number of affected countries has tripled. In the coming days and weeks, we expect an increase in the number of cases, the number of deaths and the number of affected countries.” After the announcement, the epidemic spread to many countries, especially in the Asian region, and became international, affecting the world (5).

**Republic of Turkey:** In Turkey, pandemic preparedness and planning has been ongoing since 2004 in order to prepare a national preparedness plan for the influenza pandemic and to increase cooperation between institutions, representatives of the Ministry of Health, academics, related field experts, and other ministry representatives. The national pandemic preparedness plan was completed and published as part of a Prime Ministry circular in 2006 and according to this plan, “Provincial Pandemic Plans” were prepared in all provinces. In light of the experience gained from the Influenza A(H1N1)pdm09 pandemic in 2009, “National Preparedness Plan

for Pandemic Influenza” was updated, taking into account the recommendations made by WHO and European Centre for Disease Prevention and control (ECDC). In 2019, a “national pandemic preparedness plan preparation committee” was established and workshops were held with the participation of Ministry of Health representatives, academics, field experts, and other relevant ministry representatives. The final version of the National Preparedness Plan for pandemic Influenza was approved by the president of Turkey and published as “Global Influenza Pandemic Plan” in the Official Gazette dated April 13, 2019 (6).

Initially, on January 10, 2020, the Turkish Ministry of Health established the COVID-19 Science Committee, which includes the academics who are working in public health, infectious diseases, microbiology, virology, internal medicine, pulmonary diseases, and intensive care after the announcement of the first case of COVID-19 on January 7th, 2020. The COVID-19 science board has been meeting at every stage, making necessary decisions, preparing guides, algorithms, posters and brochures, and updating studies following all developments.

**Ankara:** In Ankara, in accordance with the “Global Flu Outbreak (Pandemic) Circular” and “Pandemic Influenza National Preparation Plan” prepared by the Ministry of Health and approved by the President of Turkey, the “Pandemic Influenza Ankara Preparation Plan” was prepared and presented to the Ankara Provincial Pandemic Coordination Board on July 4, 2019. In order to facilitate following up on the process, the developments in Ankara in this part of the article are presented chronologically (7).

**24th January 2020:** From a group of 30 people consisting of 28 Chinese tourists, guides and drivers in a hotel in the Kızılcahamam district, which is 70 km away from the city of Ankara, a person was sent to the Ankara Training and Research Hospital Infectious Diseases Clinic upon the information that a Chinese citizen had a high fever, and an nasopharyngeal swab was taken. The other people in the group were



examined by 3 doctors and two health personnel in Kızılcahamam District, and they were allowed to go to their country after PCR test result was negative and the person referred to the hospital was negative.

**1st February 2020:** Turkey sent a plane to Wuhan with 19 staff from January 31, 2020, 42 people (27 Turkish, 6 Azarbaijani, 4 Turkish dual citizen of China, 3 Georgians, 1 Bulgarians and of 1 Albanians) was brought to Turkey and a total of 61 people were followed for 14 days in quarantine at the Ankara Training and Research Hospital Zekai Tahir Burak (ZTB) Quarantine Hospital. The development of symptoms wasn't observed, and they were discharged February 14, 2020 after the test results received on the discharge day were negative.

**4th February 2020:** A meeting was held regarding the new coronavirus disease with the chief physicians and infection specialists of public, university and private hospitals of Ankara Province, and the current information about measures to be taken was shared.

**25th February 2020:** As the cases continued to increase in the city of Kum in Iran, since February 19, 2020, our citizens in Tehran were brought back to Turkey as follows: 17 passengers with fever symptoms were isolated each in individual ambulances, and 30 passengers without any symptoms were sent in shared ambulances to Ankara Training Research Hospital ZTB Quarantine Hospital, and the crew of 85 passengers was transported to the Bilkent Clinic Guesthouse. They were followed up in quarantine for 14 days, and they were discharged on March 10th, 2020 due to the absence of symptom development and negative results on the day of discharge.

**28th February 2020:** Ankara Public Health Coordination Center (APHCC/Turkish abbreviation-HASKOM) was established. The center, where doctors and other assistant health personnel serve 24 hours a day, 7 days a week, has been working as a kind of call center to help our citizens, primary care workers, and district health directorates' staffs solve their questions and problems related to the COVID-19

pandemic process. Since its establishment, it has been distributing virocult swab and rapid diagnosis kits to all public, university and private healthcare institutions in coordination and the employees of the Directorate have been providing a nasopharyngeal swab service.

**29th February 2020:** As of this date, 295 people residing in Ankara until March 10, 2020 came to Esenboğa Airport on different days, health personnel were welcomed, their fever was measured, insulation was provided at home and followed by telephone for 14 days. 15 people who developed symptoms during the telephone follow-up period, especially in the last group, were taken to the hospital by ambulance and were treated with a COVID-19 diagnosis.

**13th March 2020:** Three days after the first confirmed case of COVID-19, diagnosed on March 11, 2020 in our country, Ankara Provincial Directorate of Health started the epidemic process management because the first confirmed case in Ankara was on March 13, 2020, five days ago.

**15th March 2020:** The last group coming into the country, were those who were coming from Umrah. A total of 3247 were kept in quarantine in different places, Gölbaşı (3,067 persons) and Haymana (180 persons), and were placed under observation in the dormitories of The Credit Dormitories Institution (CDI/Turkish abbreviation-KYK) and their quarantine process was initiated. 373 of them who tested positive for PCR at different times were treated in our hospitals.

As a second center, A "COVID-19 Case and Contact Tracing Management Center" was established within the Public Health Directorate of Ankara Provincial Health Directorate, and 12 doctors and 39 health personnel were assigned.

### The Operation of the COVID-19 Case and Contact Tracing Management Center

The nasopharyngeal swab, taken at health institutions on the suspicion of Covid-19, is considered

by Polymerase Chain Reaction (PCR), and the results of the evaluation are entered into the laboratory information system. Then, Laboratory Information Management System (LIMS/ Turkish abbreviation-LBYS) delivers the results to the Public Health Management System (PHMS/ Turkish abbreviation-HSYS).

The employees of the center communicate as soon as possible with the person they see on the HSYS screen as a positive case and exchange information about their health status first, and add it to HSYS by asking about the accuracy of the family contact information they see on the HSYS screen, who they have contact with other than those in the system, and of any workplace contacts. An ambulance is then sent for the patient to go to the hospital and the transfer is carried out immediately.

**20th March 2020:** The COVID-19 Case and Contact Tracing Management Center is contacted by the “Crisis Coordination Centre” as a third centre to carry out the transfer.

This center is a 24/7 operating center consisting of personnel from the presidencies of the Emergency Medical Services, Public Health Services, Health Services and public hospitals. It does what is necessary to carry out the process of sending all positive cases to the hospital by ambulance if necessary.

### Management of Contact Tracing Applications

Another important task of the Case and Contact Tracing Management Center is to identify the cases and carry out the necessary referral process, and to ensure the organization and coordination of the transportation and follow-up of the District Health Directorates and contact execution as soon as possible.

While determining the contacts, in the week prior to the occurrence of the symptoms, contact persons are identified and their information is entered into HSYS to be followed up for 14 days.

The first follow-up of the contacts, District Health Directorates, are made by visiting “Field Contact Tracing Teams” at their homes and necessary inspection

procedures are carried out. In this context, as of May 31, 2020, 6890 “Field Contact Tracing Teams” consisting of doctors, nurses, and other health personnel in a group of 3 people, and 398 involved in “Contact Tracing” in Ankara conduct field contact tracing activities.

With the Contact Tracing and Isolation Tracking System (CTITS/Turkish abbreviation-FITAS) by our ministry, all field contact tracing teams providing services throughout the country are notified using their mobile phones of the contacts closest to their location and are provided to follow up and log in to the system.

The information obtained with FITAS is transferred to the Integrated Systems HSYS and Family Medicine Information System (FMIS//Turkish abbreviation-AHBS). The information transferred to AHBS is examined by the family doctor who is registered with the case and the contact person, and every day for 14 days, they are called and information about their health status is received.

If any of the symptoms of the COVID-19 disease are reported by the family doctors in the case follow-up and Case and Contact Tracing Management Center and sent to the hospital by ambulance under the Coordination of the Crisis Coordination Center.

## RESULTS

Our city, Ankara, is the second largest city and the capital of the Republic of Turkey. It is home to all foreign embassies as the headquarters of the Republic of Turkey. It is located in central Anatolia region. Its population is 5.639.076 and it has a total of 25 districts (Table 1).

In Ankara, a total of 190.823 PCR tests were performed between March 13, 2020 and May 31, 2020, and 7231 were identified as positive cases. The percentage of positivity is 3.78%. In Ankara, the number of contacts per case is 4.07 and the number of contact tracing per case is 4.05. With a total of 398 “Field Contact Tracing Teams” consisting of 1 doctor and 2 health care personnel throughout the city, the average of  $50 \pm$  standard deviations reached 99.4% within hours (Figure 1).

Table 1. General information about Turkey and Ankara

| Info                               | Ankara    | Turkey     |
|------------------------------------|-----------|------------|
| Area (km <sup>2</sup> )            | 25.632    | 814.578    |
| District Number                    | 25        | 973        |
| Population of TUIK (2019)          | 5.639.076 | 83.154.997 |
| Population Growth Rate (thousands) | 10,8      | 14,7       |
| Rough Birth Rate (thousands)       | 13,3      | 15,3       |
| Rough death Rate (thousands)       | 4,7       | 5,3        |

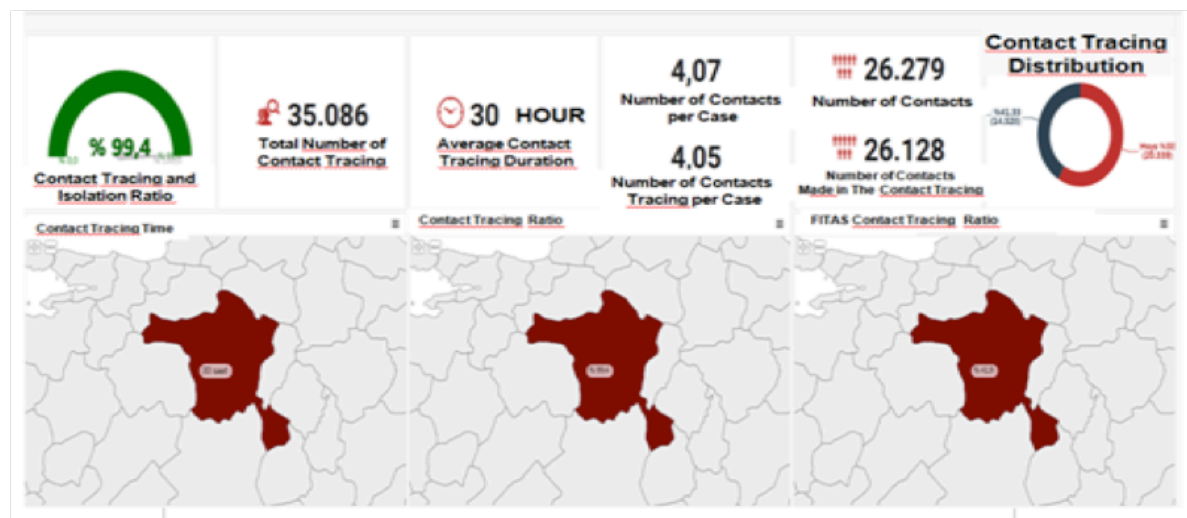


Figure 1. Evaluation of the Field Contact Tracing Teams Work in Ankara, May 31, 2020

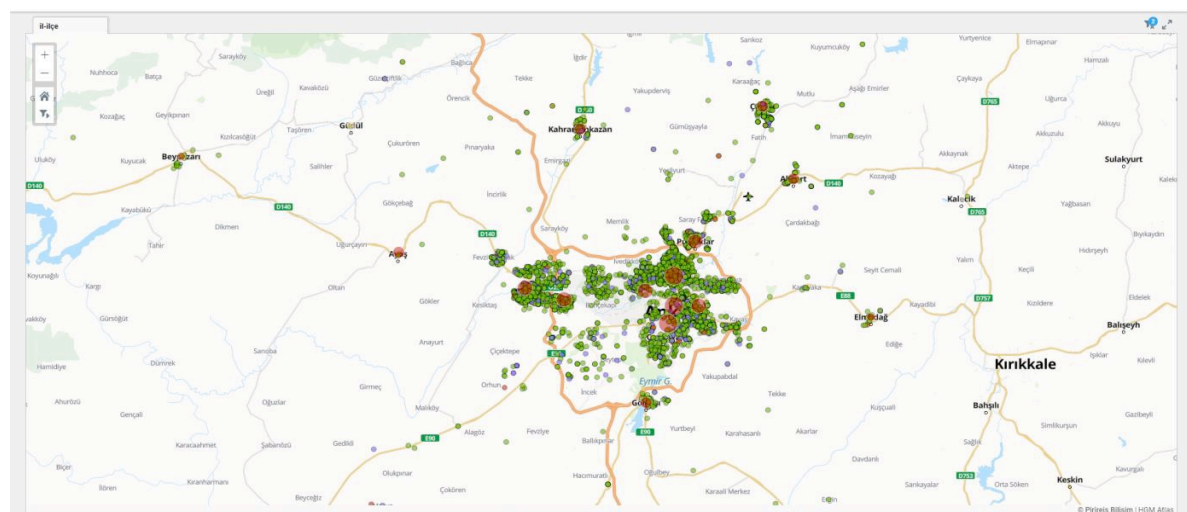


Figure 2. Number of Contacts in Ankara Province by District, May 31, 2020

According to the districts of Ankara Province, Keçiören, Sincan, Çankaya and Yenimahalle Districts the numbers of cases and contacts are highest in (Figure 2, Table 2).

**Table 2.** Number of Case Contacts by Districts of Ankara Province, May 31, 2020

| Districts       | Population (2019) | Contact Isolation Continues (FITAS+HSYS) | Contact Isolation Finished (FITAS+HSYS) | Contact Total (FITAS+HSYS) |
|-----------------|-------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| Akyurt          | 36.123            | 57                                       | 212                                     | 269                        |
| Altındağ        | 389.510           | 570                                      | 1347                                    | 1917                       |
| Ayaş            | 13.900            | 10                                       | 25                                      | 35                         |
| Bala            | 30.280            | 32                                       | 109                                     | 141                        |
| Beypazarı       | 48.371            | 14                                       | 236                                     | 250                        |
| Çamlıdere       | 9.825             | 3                                        | 5                                       | 8                          |
| Çankaya         | 944.609           | 678                                      | 2484                                    | 3162                       |
| Çubuk           | 90.764            | 72                                       | 532                                     | 604                        |
| Elmadağ         | 45.557            | 44                                       | 242                                     | 286                        |
| Etimesgut       | 587.052           | 339                                      | 2562                                    | 2901                       |
| Evren           | 3.097             | 0                                        | 6                                       | 6                          |
| Gölbaşı         | 138.944           | 463                                      | 98                                      | 561                        |
| Güdül           | 8.892             | 0                                        | 6                                       | 6                          |
| Haymana         | 30.930            | 132                                      | 156                                     | 288                        |
| Kahramankazan   | 54.806            | 60                                       | 382                                     | 442                        |
| Kalecik         | 13.234            | 2                                        | 17                                      | 19                         |
| Keçiören        | 939.161           | 747                                      | 3763                                    | 4510                       |
| Kızılcahamam    | 28.350            | 9                                        | 296                                     | 305                        |
| Mamak           | 665.978           | 1420                                     | 406                                     | 1826                       |
| Nallıhan        | 27.579            | 0                                        | 64                                      | 64                         |
| Polatlı         | 125.075           | 270                                      | 226                                     | 496                        |
| Pursaklar       | 150.488           | 211                                      | 784                                     | 995                        |
| Sincan          | 535.637           | 433                                      | 3487                                    | 3920                       |
| Şereflikoçhisar | 33.821            | 2                                        | 107                                     | 109                        |
| Yenimahalle     | 687.093           | 578                                      | 2430                                    | 3008                       |
| Total           | 5.639.076         | 6146                                     | 19.982                                  | 26.128                     |

45.909 people who came to our city from tracing by the provincial health directorate (Table 3). international and from intercity were in contact

**Table 3.** Number of international/intercity incoming people monitored by districts of Ankara Province

| Districts       | Ongoing Follow-up<br>(International/<br>Intercity) | Followed Up<br>(International/<br>Intercity) | Total         |
|-----------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------|
| Akyurt          | 16                                                 | 77                                           | 93            |
| Altındağ        | 639                                                | 1355                                         | 1994          |
| Ayaş            | 18                                                 | 28                                           | 46            |
| Bala            | 36                                                 | 95                                           | 131           |
| Beypazarı       | 34                                                 | 93                                           | 127           |
| Çamlıdere       | 0                                                  | 6                                            | 6             |
| Çankaya         | 454                                                | 16004                                        | 16458         |
| Çubuk           | 79                                                 | 433                                          | 512           |
| Elmadağ         | 79                                                 | 383                                          | 462           |
| Etimesgut       | 407                                                | 4272                                         | 4679          |
| Evren           | 2                                                  | 26                                           | 28            |
| Gölbaşı         | 666                                                | 2130                                         | 2796          |
| Güdül           | 8                                                  | 12                                           | 20            |
| Haymana         | 39                                                 | 254                                          | 293           |
| Kahramankazan   | 75                                                 | 221                                          | 296           |
| Kalecik         | 47                                                 | 36                                           | 83            |
| Keçiören        | 846                                                | 4205                                         | 5051          |
| Kızılcahamam    | 61                                                 | 102                                          | 163           |
| Mamak           | 954                                                | 2255                                         | 3209          |
| Nallıhan        | 21                                                 | 41                                           | 62            |
| Polatlı         | 152                                                | 464                                          | 616           |
| Pursaklar       | 134                                                | 578                                          | 712           |
| Sincan          | 763                                                | 1620                                         | 2383          |
| Şereflikoçhisar | 24                                                 | 251                                          | 275           |
| Yenimahalle     | 687                                                | 4727                                         | 5414          |
| <b>Total</b>    | <b>6241</b>                                        | <b>39.668</b>                                | <b>45.909</b> |

In Ankara city, between March 13, 2020 and May 31, 2020, a total of 7231 COVID-19 cases with a PCR positive result were detected, and a total of 26.128 contacts belonging to these cases were reached, and a follow-up of 19.982 contacts was completed. Apart from the case contacts, a total of 45.909 people coming from international and from intercity within the scope of the contact tracing were followed up with their contacts, and the follow-up of 39.688 was completed. The follow-up of 53.540 contacts in total has been completed. According to the PCR test results of all the contacts, 2549 new cases were detected, and the overall secondary clinical attack rate was calculated to be 5.04% (95% CI).

## DISCUSSION

In this study, the contact tracing studies carried out following the first incident of COVID-19 on March 13, 2020 in the capital Ankara are presented. For health care personnel was prepared and website of the Ministry of Health published by the Scientific Committee on COVID-19 on the on guides, algorithms, training materials (banners, brochures), hygiene rules, hand washing, mask use, isolation measures, social distance. The Scientific Committee has issued a number of guidelines on diagnosis, treatment, infection control, quarantine and social distancing, and periodically updates these guidelines.

The review article prepared by Demirbilek et al., one of the first publications on the subject in our country, is very valuable in this regard (8).

In the study of Nussbaumer-Streit B et al., it was stated that quarantine practices are important in reducing the incidence of COVID-19 and mortality from it, and it is important to ensure the effectiveness of quarantine application in combination with other public health measures (9). In the study of Boccia et al., standard hygienic measures, one of the effective public health interventions, were not adopted early in some regions of Italy and are likely to affect the prevalence of infection.

Therefore, the implementation of conditions such as home insulation has probably been difficult (10).

The quarantine of those coming from countries with COVID-19 cases before and after the incident occurred in Turkey and especially in Ankara province is one of the most important measures taken in this regard. In the study of Anelli et al., it was noted that the use of protective equipment by health workers is both essential for disease control and a crucial factor for continuing to provide care to patients (11). Our field contact tracing teams use medical masks, gloves, eye protection and wear protective equipment during home visits as recommended by the WHO (12).

In order to eventually succeed in controlling the outbreak, reducing the reproduction number of COVID-19 to less than one, methods such as contact tracing, quarantine, testing, isolation, social distancing and school closure are critical. In the early stages of the COVID-19 outbreak when imported cases from China and their linked cases were identified, the KCDC actively performed contact tracing, quarantined the contacted persons, and diagnosed and isolated the COVID-19 cases as soon as possible, which was reported to be effective (13).

In the description of Cha V. et al., two months after the first confirmed case, South Korea managed to control the outbreak with protection control studies, such as diagnostic tests, frequent public information, meticulous contact follow-ups, patient surveys, and meticulous contact mapping through GPS-based mobile apps (14). With the GPS-based mobile application FITAS prepared by our Ministry, all Field Contact Tracing Teams providing service across the country are informed by following the closest contacts to their mobile phones and entering it in the system. In this way, case investigation work was carried out without wasting time (15).

The overall secondary attack rate is calculated to be 5.04% (95% GA) in our study in Ankara. A remarkable report from Taiwan described the use of contact tracing and virologic PCR testing to assess the transmission dynamics of COVID-19 in the country's initial 100 confirmed cases. Among 2761 close contacts of the 100 cases, confirmed between January 15 and March 18, 2020, Cheng et al report that there were 22 paired-index secondary cases and an overall

secondary clinical attack rate of 0.7% (95% CI, 0.4%-1.0%). The overall secondary clinical attack rate in the present study is much higher than that reported in Taiwan. This may be due to closer contact within our country or the study period coinciding with the peak period of the outbreak in Ankara and in Turkey. Besides, viral shedding studies and epidemiological investigations suggest that in the household, around 40% of transmission occurs before symptom onset, the live virus is shed for at least 1 week after symptom onset, and there is high spreading in asymptomatic individuals (16-18). Although a report by Salathé et al focuses on the epidemiological aspects of testing, it also states that there are economic and social benefits to a liberal testing strategy. The costs of increased testing, contact tracing, and self-isolation are high in the short term. In the longer term, however, more rapid control will reduce the economic and social costs of social-distancing measures that adversely affect businesses, communities, and individuals (19). Although the exact proportion of household among the contacts is not known in our study, it is likely to be high and this may be one of the contributors to the high attack rate.

Findings show the public health need for accurate and comprehensive contact tracing and testing. Testing only those people who are symptomatic will miss many infections and render contact tracing less effective.

It has been found that asymptomatic people and those with minimal or fewer symptoms early in infection are those most likely to transmit COVID-19. Maintaining social distancing and having people wear face masks to reduce the potential for transmission should support contact tracing activities. Solely isolating patients symptomatic with COVID-19 will fail to control transmission during the infected but asymptomatic stage. So close monitoring and keeping isolation for at least 14 days for all the contacts with or without symptoms is essential (20). Turkey is on the eve of the “reopening” of society like many

other countries. It is important to continue sufficient testing and contact tracing in order to control possible outbreaks that may inevitably occur as social restrictions are removed. While containing the infections, and during “reopening,” social distancing throughout society and the wearing of face masks should be maintained to the maximum extent possible until there is a vaccine or effective treatment.

## CONCLUSION

After the COVID-19 disease was defined, it was not limited to the region where it was located, and the number of cases gradually increased and turned into a huge pandemic that caused disease and a loss of life affecting the whole world.

Since the time when COVID-19 disease was identified, scientists have been making great efforts to determine the characterization of the new coronavirus and to develop antiviral therapies and vaccines. The most appropriate treatment for patients under observation, diagnosed with COVID-19 is still unknown. Clinical and vaccine studies are continuing rapidly. Nevertheless, the pathogenesis of the virus is still unknown, and new studies are needed (21). Therefore, the most effective way to prevent the spread of the virus; the epidemic is expected to be brought under control by public health interventions such as mask use, social distance, hand washing, hygiene rules, infection prevention activities such as indoor ventilation and contact management made through Field Contact Tracing Teams” and Family Medicine providing service across the country with GPS-based mobile application FITAS.

Although the rapid and sustained responses to control the COVID-19 outbreak could slow its spread, this outbreak could last for a long time with the risk of an unexpected surge again. Case finding and contact tracing will be the key in responding to any possible resurgence.

## REFERENCES

1. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Rehberi, 14 Nisan 2020, Ankara.
2. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Bulaşıcı Hastalıklar İle Mücadele Rehberi, 2017, Ankara.
3. Halk Sağlığı Temel Bilgiler, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2006, Sayfa: 865-87, Ankara.
4. Temel Epidemiyoloji, Sabahat Güven Tezcan, Hipokrat Yayınevi, 2017, Sayfa: 190-209, Ankara.
5. World Health Organization (2020). Coronavirus Disease (COVID-19) events as they happen [online]. Website: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen> [accessed 28 April 2020].
6. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Pandemi İnfluenza Ulusal Hazırlık Planı, 2019, Ankara.
7. Ankara İl Sağlık Müdürlüğü, İl Pandemi Planı, 2019, Ankara.
8. Demirbilek Y, Pehlivan Türk G, Özgüler Z, Alp Meşe E. COVID-19 Outbreak control, example of Ministry of Health of Turkey, Turkish Journal of Medical Sciences (2020) 50: 489-94.
9. Nussbaumer-Streit B at all, Quarantine alone or in combination with other public healthmeasures to control COVID-19: a rapid review, Cochrane Database of Systematic Reviews.
10. Boccia S., Ricciardi W., Ioannidis J., What other countries can learn from Italy during the COVID-19 Pandemic, JAMA Intern Med. Published online April 7, 2020. doi:10.1001/jamainternmed.2020.1447.
11. Anelli F. at all. Italian doctors call for protecting healthcare workers and boosting community surveillance during Covid-19 outbreak, BMJ 2020;368:m1254 doi:10.1136/bmj.m1254 (Published 26 March 2020).
12. World Health Organization (WHO), Rational use of personal protective equipment for coronavirus disease (COVID-19): interim guidance, 27 February 2020.
13. Choi JY. Covid-19 in South Korea. Postgrad Med J. 2020 May 4. pii: postgradmedj-2020-137738. doi: 10.1136/postgradmedj-2020-137738. [Epub ahead of print].
14. Cha V. A Timeline of South Korea's response to COVID-19, March 27, 2020. <https://www.csis.org/analysis/timeline-south-koreas-response-covid-19>.
15. Hao-Yuan Cheng, MD, MSc,1 Shu-Wan Jian, DVM, MPH,1 Ding-Ping Liu, PhD,1 Ta-Chou Ng, BSc,2 Wan-Ting Huang, MD,3 and Hsien-Ho Lin, MD, ScD, Contact tracing assessment of COVID-19 transmission dynamics in Taiwan and risk at different exposure periods before and after symptom onset, JAMA Intern Med. 2020 May 1 : e202020.
16. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature. 2020 doi: 10.1038/s41586-020-2196-x. published online April 1. [CrossRef] [Google Scholar].
17. He X, Lau EHY, Wu P. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. Nat Med. 2020 doi: 10.1038/s41591-020-0869-5. published April 15. [CrossRef] [Google Scholar].
18. Ferretti L, Wymant C, Kendall M. Quantifying SARS-CoV-2 transmission suggests epidemic control with digital contact tracing. Science. 2020 doi: 10.1126/science.abb6936. published online March 31. [CrossRef] [Google Scholar].
19. Salathé M, Althaus C, Neher R, Stringhini S, Hodcroft E, Fellay J, Zwahlen M, Senti G, Battegay M, Wilder-Smith A, Eckerle I, Egger M, Low N. COVID-19 Epidemic in Switzerland: On the Importance of Testing, Contact Tracing and Isolation. Swiss Med Wkly. 2020;150:w202205, oi:10.4414/smw.2020.20225.
20. Steinbrook R. Contact Tracing, Testing, and Control of COVID-19—Learning From Taiwan JAMA Intern Med. Published online May 1, 2020. doi:10.1001/jamainternmed.2020.2072, doi: 10.1001/jamainternmed.2020.2020 [Epub ahead of print].
21. COVID-19 Situational Assessment Report (COVID-19 Pandemi Değerlendirme Raporu), Turkish Academy of Sciences, March 17, 2020. Ankara.



# An investigation of antifungal susceptibilities of the *Candida* species isolates from blood cultures using the Sensititre YeastOne microdilution method

## Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin antifungal duyarlılıklarının Sensititre YeastOne mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılması

Raif KARAASLAN<sup>1</sup>, Esin AKTAŞ<sup>2</sup>, Figen ORHAN<sup>3</sup>

### ABSTRACT

**Objective:** Invasive fungal infections caused by *Candida* species have increased significantly. Therefore, rapid and correct identification to the species level and susceptibility testing have become important, especially in cases involving invasive infections. The Sensititre YeastOne method, based on the microdilution method, is an alternative to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) reference method for antifungal susceptibility testing. Sensititre YeastOne is a method for determining the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values of *Candida* isolates with wells containing lyophilized antifungals. In our study, the aim was to determine the antifungal drug sensitivity of *Candida* isolates from blood cultures by using a Sensititre YeastOne colorimetric system.

**Methods:** Fifty candida isolates, each isolated from blood cultures of different patients in the Medical Microbiology Laboratory of Atatürk University Faculty of Medicine, were included in the study (16 *Candida albicans*, 14 *Candida tropicalis*, 8 *Candida parapsilosis*, 10 *Candida glabrata*, 2 *Candida kefyr*) and two quality control strain (*Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019) were included in the study. The

### ÖZET

**Amaç:** *Candida* türlerinin neden olduğu invaziv fungal enfeksiyonlar önemli ölçüde artmıştır. Bu nedenle türlerin hızlı ve doğru tanımlanması ve duyarlılık testleri, özellikle fırsatçı enfeksiyonları içeren vakalarda oldukça önemlidir. Mikrodilüsyon esasına dayanan Sensititre YeastOne yöntemi, antifungal duyarlılık testi için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü referans yöntemine uygun bir alternatiftir. Sensititre YeastOne liyofilize halde antifungal içeren kuyucuklara sahip olup *Candida* izolatlarının Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesi için geliştirilen bir yöntemdir. Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilmiş *Candida* izolatlarının Sensititre YeastOne kolorimetrik sistem kullanılarak antifungal ilaç duyarlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmaya Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda her biri farklı hastalara ait kan kültürlerinden izole edilen 50 *Candida* izolatu (16 *Candida albicans*, 14 *Candida tropicalis*, 10 *Candida glabrata*, 8 *Candida parapsilosis*, 2 *Candida kefyr*) ve iki adet kalite kontrol suşu (*Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019) dahil edilmiştir. Türlerin antifungal duyarlılıkları, kolorimetrik

<sup>1</sup>Combat Air Force Command, Eskişehir

<sup>2</sup>Ankara Yıldırım Beyazıt University, School of Medicine, Medical Microbiology Department, Ankara

<sup>3</sup>Atatürk University Health Services Vocational School, Erzurum



İletişim / Corresponding Author : Figen ORHAN

Atatürk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Erzurum - Türkiye

E-posta / E-mail : figen.kayserili@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 21.08.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 15.08.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.42650

Karaaslan R, Aktaş E, Orhan F. An investigation of antifungal susceptibilities of the *Candida* species isolates from blood cultures using the sensititre yeastone microdilution method. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 281-288

antifungal susceptibilities of the species were tested by the microdilution method using a colorimetric method, Sensititre YeastOne (Trek Diagnostic Systems, USA).

**Results:** For all *Candida* species, MIC ranges were as follows: 0.12-2 µg/ml for amphotericin B; 0.12-256 µg/ml for fluconazole; 0.008-8 µg/ml for voriconazole; 0.015-0.5 µg/ml for caspofungin; 0.015-2 µg/ml for anidulafungin; 0.008-2 µg/ml for micafungin; 0.006-8 µg/ml flucytosine; 0.008-8 µg/ml for posaconazole and 0.015-16 µg/ml for itraconazole.

**Conclusion:** Considering the low MIC values obtained, it was concluded that anidulafungin, micafungin, caspofungin, flucytosine, posaconazole, voriconazole, itraconazole and amphotericin B may be effective against *Candida* species and may be used as alternative drugs for the treatment of infections caused by fluconazole-resistant species.

**Key Words:** Antifungal, Microdilution method, Sensititre YeastOne, *Candida*

bir sistem olan Sensititre YeastOne (Trek Diagnostic Systems, ABD) mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır.

**Bulgular:** Çalışma sonunda *Candida* izolatlarının tamamında MİK aralıkları; amfoterisin B için 0,12-2 µg/ml, flukonazol için 0,12-256 µg/ml, vorikonazol için 0,008-8 µg/ml, kaspofungin için 0,015-0,5 µg/ml, anidulafungin için 0,015-2 µg/ml, mikafungin için 0,008-2 µg/ml, flusitozin için 0,006-8 µg/ml, posakonazol için 0,008-8 µg/ml, itraconazol için 0,015-16 µg/ml olarak belirlenmiştir.

**Sonuç:** Elde edilen düşük MİK değerleri göz önüne alındığında anidulafungin, mikafungin, kaspofungin, flusitozin, posakonazol, vorikonazol, itraconazol ve amfoterisin B'nin *Candida* izolatlarına karşı etkin olabileceği ve flukonazole dirençli suşlarla oluşan enfeksiyonların tedavisinde alternatif ilaç olarak kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Antifungal, Mikrodilüsyon yöntemi, Sensititre YeastOne, *Candida*

## INTRODUCTION

*Candida* spp. stands in the fourth-place cause of among the most common agent in blood circulation infections. Currently, there has been a rapid increase observed in the incidence of fungal infections linked to the increase in patient number with suppressed immune systems, the increase in the use of large surgical interventions and more than one broad-spectrum antibiotic, higher observation of patients with poor general status in intensive care units the popularity of artificial prosthesis use (1,2).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), ensuring standardization of antifungal susceptibility tests, have developed standard microdilution methods for antifungal susceptibility tests. However, in practice

there is a search for alternative methods that are easy to apply in routine laboratories due to these standard methods involving technical difficulties and subjective visual assessment (3). The Sensititre YeastOne method is an easy and rapid method to test 9 antifungal drugs at the same time and offers clinicians many antifungal treatment choices in the early period (4).

Our study aimed to test the susceptibilities of 50 *Candida* species isolated from blood cultures against anidulafungin, micafungin, caspofungin, flucytosine, posaconazole, voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin-B using a microdilution-based colorimetric panel called the Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems, USA).

## MATERIAL and METHOD

Sensititre YeastOne is a microdilution method containing 9 lyophilized antifungal drugs, which aids in the determination of qualitative and quantitative MIC results. The appropriate dilutions of antifungal agents and colorimetric indicator were added to each well on the plate and results were determined by identifying the lowest antifungal concentration inhibiting growth.

### The isolation of the Clinical Samples

The study included 50 *Candida* isolates collected from blood cultures of different patients and isolated with the BACTEC 9120 system (Becton-Dickinson, USA). After isolation in our laboratory, isolates were stored in stock medium at -80 °C, then dissolved in a refrigerator to +4 °C and purified by two passages on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Merck/Germany) medium. Then the growth *Candida* isolates were assessed according to the germ tube test, microscopic morphology on Corn Meal Agar with Tween-80 (Oxoid) agar and colony color on chromogenic medium and the species level was determined. The identification was supported using the API 20 C AUX system (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France).

### Antifungal Susceptibility Test

The procedures were done according to the manufacturer's Sensititre YeastOne protocol. *Candida* isolates had a certain sample taken from 24-hour pure

cultures and suspensions were prepared in sterile water (T3339) and adjusted to 0.5 McFarland standards. To obtain  $1.5 \times 10^3$  kob/ml inoculum, 20 µl suspension was transferred into 11 ml YeastOne inoculum broth (Y3462).

Of the prepared suspension, 100 µl samples were transferred to each well of a 96-well YeastOne plate and all the wells were covered with sterile adhesive band and left for incubation for 24 hours. To test the accuracy and purity of 0.5 McFarland setting, a 10 µl sample was taken from the positive control well on the inoculated plates and inoculated on SDA medium and panels incubated at 35°C for 24 to 48 hours in a non-CO2 incubator. Plates with growth of 10-80 pure colonies were taken for assessment (5).

### The Assessment of the Test Results

The plates were examined at the end of 24 hour-incubation. Yeast growth was evident as a result of color change from blue (negative, no growth) to red (positive, growth) was observed. The positive control well on the plates was noted and if this well was completely red in color, the final values for the antifungals began to be read. The first well without color change (first blue) was determined as the MIC value (Figure 1). Plates with blue or faintly purple positive control wells were assessed as having weak growth and examined again after another 24 hours of incubation. Interpretation of MIC results was performed according to the CLSI criteria as recommended by the Sensititre YeastOne method (Table 1)(5).



Figure 1. The appearance of the plates inoculated with yeast for 24 hours

**Table 1.** MIC interpretative criteria for *Candida* species as per CLSI M27<sup>5</sup>

| Antifungal Agent | Susceptible | Dose-dependent susceptible | Intermediate | Resistant |
|------------------|-------------|----------------------------|--------------|-----------|
| Fluconazole      | ≤8          | 16 - 32                    |              | ≥64       |
| Itraconazole     | ≤0.125      | 0.25 - 0.5                 |              | ≥1        |
| Flucytosine      | ≤4          |                            | 8 - 16       | ≥32       |
| Voriconazole     | ≤1          | 2                          |              | ≥4        |

\*All units are microgram/milliliter

## RESULTS

The wells with turbidity appearance on the plates after growth were not assessed. The wells without growth had no color change observed and in this situation the isolate was recorded as susceptible to the lowest concentration of the antifungal. For the wells with an observed color change, the isolate was recorded as greater than (>) the highest

concentration of the antifungal. In one of the samples, contamination was observed on the SDA medium for purity and sterility control from the positive control well, and the strain was not included in the study. The number of colonies between 15-80 was counted after the breeding to test the number of colonies and the accuracy of the 0.5 McFarland setting was confirmed. All MIC values were in the expected range in plaques where quality control strains were tested (Table 2).

**Table 2.** MIC interval, MIC 50 and MIC 90 values for susceptibility identified with the microdilution method for *Candida* species

| Antifungal     | <i>C. albicans</i> (n=16) |             | <i>C. tropicalis</i> (n=14) |           | <i>C. glabrata</i> (n=10) |           | <i>C. parapsilosis</i> (n=8) |             |
|----------------|---------------------------|-------------|-----------------------------|-----------|---------------------------|-----------|------------------------------|-------------|
|                | MIC interval              | MIC 50/90   | MIC interval                | MIC 50/90 | MIC interval              | MIC 50/90 | MIC interval                 | MIC 50/90   |
| Anidulafungin  | 0.015                     | 0.015/0.12  | 0.015-2                     | 0.03/1    | 0.015-0.12                | 0.06/0.06 | 1-2                          | 1/2         |
| Micafungin     | 0.008-1                   | 0.008/0.03  | 0.015-1                     | 0.03/1    | 0.015-0.5                 | 0.12/0.5  | 0.5-2                        | 1/2         |
| Caspofungin    | 0.015-0.5                 | 0.03/0.06   | 0.015-0.5                   | 0.03/0.25 | 0.015-0.5                 | 0.06/0.12 | 0.25-0.5                     | 0.5/0.5     |
| Flucytosine    | 0.06                      | 0.06/0.06   | 0.06-1                      | 0.06/0.25 | 0.06-2                    | 0.5/1     | 0.06-0.25                    | 0.12/0.25   |
| Posaconazole   | 0.008-8                   | 0.015/0.03  | 0.015-0.5                   | 0.025/0.5 | 0.12-2                    | 0.12/0.5  | 0.015-0.06                   | 0.03/0.03   |
| Voriconazole   | 0.008-8                   | 0.008/0.008 | 0.008-0.25                  | 0.12/0.25 | 0.015-0.5                 | 0.03/0.06 | 0.008-0.015                  | 0.008/0.015 |
| Itraconazole   | 0.015-16                  | 0.015/0.06  | 0.015-0.5                   | 0.25/0.5  | 0.06-1                    | 0.12/0.25 | 0.03-0.06                    | 0.06/0.06   |
| Fluconazole    | 0.12-256                  | 0.25/0.5    | 0.25-4                      | 2/4       | 1-32                      | 2/4       | 0.25-0.5                     | 0.5/0.5     |
| Amphotericin-B | 0.25-1                    | 0.5/1       | 0.12-1                      | 0.5/1     | 0.12-2                    | 0.5/1     | 0.5                          | 0.5/0.5     |

\* All units are microgram/milliliter

## DISCUSSION

The most common risk factors for invasive candidiasis include major surgery, especially involving the abdomen, immunosuppression and supportive care measures used in the critically ill patients, such as long term broad spectrum antimicrobial therapy, central venous catheters, total parenteral nutrition, and renal replacement therapies. These factors explain, in part, the continuing high prevalence of *Candida* infections in transplant, cancer and intensive care units. Additionally in recent years, increased resistance to antifungal drugs has been a cause of concern in the treatment of the invasive fungal infections (6).

There are over 20 species of *Candida* yeasts that can cause infection in humans, the most common of which is *C. albicans* (7). Though *C. albicans* in the most common strain observed in both mucocutaneous and systemic infections, there is increasing incidence of non-*albicans Candida* species. The clinical findings of infections caused by non-*albicans Candida* strains cannot generally be differentiated and these strains are naturally resistant or gain resistance to commonly used antifungal drugs, as a result the definition of the species level of *Candida* isolates in clinical samples and the accurate and timely determination of in vitro susceptibility profiles are important for antifungal treatment protocols (8).

The CLSI broth microdilution method is still accepted as the gold standard for the assessment of susceptibility of *Candida* strains against antifungal agents. However, this method is expensive and difficult and challenges such as lack of expert personnel, new commercial systems with more practical and appropriate use. The most important problem with these systems is to ensure standardization of these new systems. Three commercial systems recommended for use include the E-test (AB Biodisk Solna, Sweden), Sensititre YeastOne Colorimetric System (TREK Diagnostic Systems, USA) and VITEK 2

Yeast Susceptibility Test (BioMerieux, Inc, Durham, NC) (9,10).

The Sensititre YeastOne method is based on the CLSI reference method and is stated to show high compliance with the CLSI method. It is a simple method for antifungal susceptibility tests in routine laboratory use. As it provides perfect results in terms of accuracy and repeatability compared to the CLSI reference method, it is commonly used in both clinical and research laboratories (11,12).

Due to being easy to obtain commercially, the ability to test many antifungals at the same time and ease of application, the Sensititre YeastOne method was chosen in our study to show resistance limit values for *Candida* species against renewed fluconazole and caspofungin.

Gültekin et al. (13), used the Sensititre YeastOne system on 46 *Candida* isolates from blood cultures and identified that all strains were susceptible to amphotericin B, voriconazole, posaconazole and caspofungin. While the *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* strains were susceptible to fluconazole, three of the five *C. glabrata* isolates were identified to be resistant to itraconazole while other strains were susceptible to itraconazole.

In our study, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* were susceptible to caspofungin and amp-B, with one *C. albicans* strain showing resistance to voriconazole. Fluconazole resistance was identified in one *C. glabrata* and one *C. albicans* strain. Itraconazole resistance was identified in one *C. albicans* and one *C. glabrata* strain, while one *C. tropicalis* strain was found to have dose-dependent susceptibility to itraconazole.

Three echinocandins (anidulafungin, caspofungin, and micafungin) have been licensed for intravenous treatment and prevention of invasive *Candida* infections (including candidemia). CLSI has established standard conditions for testing the susceptibilities of *Candida* spp. to the three echinocandins including species-specific breakpoints (BPs) for echinocandin

MIC interpretation (14). The isolates we studied did not show any resistance to these antifungal drugs.

In our study, multiazol resistance was determined for isolate number eight of *C. albicans* strain. Additionally, this isolate was identified to have susceptibility of >8 µg/ml posaconazole, >8 µg/ml voriconazole, >16 µg/ml itraconazole and >256 µg/ml fluconazole.

Cretella et al. (15), commercially available three antifungal susceptibility testing methods (Etest, Vitek 2 and Sensititre) were compared with the CLSI reference test method broth microdilution method and they reported the Sensititre YeastOne method was the system that provided closest results to the reference method.

In a study by Quindos et al. (16), reported the Sensititre YeastOne method showed perfect correlation with the E-test method. This correlation was better for voriconazole, with some incompatibility for fluconazole and *C. glabrata*.

A study conducted by Farina et al. (17), compared the Sensititre YeastOne method and VITEK 2 susceptibility system in seven different laboratories. They performed susceptibility tests for four different antifungals (amp-B, fluconazole, flucytosine and voriconazole) and reported that VITEK 2 susceptibility test system was more compliant compared to the Sensititre YeastOne. They observed the compliance between the two methods varied from 81.4% to 88.6%.

Siqueira et al. (9), compared the susceptibility of 80 *Candida* isolates using the VITEK 2 and Sensititre YeastOne systems with the gold standard fluid dilution method. They concluded that both methods performed well and were reliable as antifungal susceptibility tests. However, they recommended careful interpretation when the activity of *C. krusei* and *C. glabrata* against caspofungin was tested with the Sensititre YeastOne method due to low observations.

Flusrand et al. (10), reported that Sensititre

YeastOne method showed good correlation with standard susceptibility tests for amphotericin B and triazoles, but that interpretation for echinocandins was more complicated (9).

A study by Avolio et al. (18), aimed to determine MIC values for yeasts as rapidly and accurately as possible. They compared values for 40 candidemia cases determined by the colorimetric Sensititre YeastOne system with the CLSI values. The results of the comparison found no major error, only four minor errors. The results of the study reported the Sensititre YeastOne colorimetric system accurate antifungal MIC determination and saving an average time of 24 hours compared with the time required for the standard procedures traditionally used.

In our study, there were small errors linked to inability to clearly determine the color change in the final wells, but these were not on a scale to change the susceptibility and resistance status.

The study by Bertout et al. (4), compared the Sensititre YeastOne commercial system with the CLSI reference broth microdilution test method. They studied two quality control strains and 102 *Candida* isolates with the antifungal agents, such as fluconazole, itraconazole, ketoconazole, posaconazole, voriconazole, flucytosine, Amp-B and caspofungin. They identified the compliance between the CLSI reference method and Sensititre YeastOne varied from 70.6% to 92.2%.

In our study, for fluconazole there was dose-dependent susceptibility for one *Candida* strain (MIC value 32 µg/ml) and resistance identified in another *Candida* strain (MIC value  $\geq$  256 µg/ml). The dose-dependent susceptible strain was identified as *C. glabrata*, while the resistant strain was determined to be *C. albicans*. The MIC intervals for all *Candida* strains were determined as 0.12-2 µg/ml for Amp-B, 0.12-256 µg/ml for fluconazole, 0.008-8 µg/ml for voriconazole, 0.015-0.5 µg/ml for caspofungin, 0.015-2 µg/ml for anidulafungin, 0.008-2 µg/ml for micafungin, 0.006-8 µg/ml for flucytosine, 0.008-

8 µg/ml for posaconazole, and 0.015- 16 µg/ml for itraconazole.

We think identification of resistance at different rates for all antifungal tests, and continuous strain identification and susceptibility studies in treatment of *Candida* infections will contribute to determining antifungal use protocols in our own hospital and will be beneficial to prepare comprehensive treatment protocols for the country in general. Additionally, we think the Sensititre antifungal susceptibility test is a useful method for being easy to obtain, simultaneous testing of nine antifungal agents and compliant

results with the CLSI reference values.

Considering the low MIC values obtained, it was concluded that anidulafungin, micafungin, caspofungin, flucytosine, posaconazole, voriconazole, itraconazole and Amp-B can be effectively used against *Candida* strains, while they can be used as alternative drug for treatment of infections caused by strains resistant to fluconazole.

Note: This study was presented as a poster at the 10th Balkan Congress of Microbiology 2017 in Sofia, Bulgaria.

## REFERENCES

- Hancı SY, Derici YK, Şirin MC, Şamloğlu P, Bayram A, Ağuş N. et al. Üçüncü basamak bir hastanede, geriatrik olgularda izole edilen kandida türlerinin tiplendirilmesi ve kanda üreyen mayalarda antifungal duyarlılık. *Dicle Med J*, 2015; 42 (4): 438-44.
- Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç AN. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve amfoterisin B ve flukonazole in vitro duyarlılıkları. *Selçuk Tıp Derg*, 2012; 28(3): 149-51.
- Hazırolan G. Albicans-dışı *Candida* türlerinin flukonazol, itrakonazol, vorikonazole in vitro duyarlılığının referans sıvı mikrodilüsyon yöntem ile araştırılması: yeni türe özgü klinik direnç sınır değerleri ve epidemiyolojik eşik değerlerinin uygulanması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2018; 48(1): 38-44.
- Bertout S, Dunyach C, Drakulovski P, Reynes J, Mallie M. Comparison of the Sensititre YeastOne dilution method with the clinical laboratory standards institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains. *Pathol Biol*, 2011; 59(1): 48-51.
- Trek Diagnostic System. Sensititre search tool. [www.trekds.com/techinfo](http://www.trekds.com/techinfo). (Erişim tarihi: 24 Mart 2018).
- Küçükates E, Gültekin NN, Alisan Z, Hondur N, Öztürk R. Identification of *Candida* species and susceptibility testing with Sensititre YeastOne microdilution panel to 9 antifungal agents. *Saudi Med J*, 2016; 37(7): 750-7.
- <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html>. (Erişim tarihi: 04.04.2019).
- Sav H, Demir G, Atalay MA, Koç AN. Aksu N. Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2013; 70(4): 175 - 80.
- Siqueira RA, Doi AM, de Petrus Crossara PP, Koga PCM, Marques AG, Nunes FG, et al. Evaluation of two commercial methods for the susceptibility testing of *Candida* species: Vitek and Sensititre YeastOne. *Rev Iberoam Micol*, 2018; 35(2):83-7.
- Furustrand Taffin U, Clauss M, Hauser PM, Bille J, Meis JF, Trampuz A. Isothermal microcalorimetry: a novel method for real-time determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus* species. *Clin. Microbiol. Infect*, 2012; 18(7): 241-245.
- Santhanam J, Yahaya N, Aziz MN. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species: is low susceptibility to itraconazole a trend in Malaysia? *Med J Malaysia*, 2013; 68(4):343-7.

12. Cantón E, Pemán J, Iñiguez C, Hervás D, Lopez-Hontangas JL, Pina-Vaz C, et al. Epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for six *Candida* species as determined by the colorimetric Sensititre YeastOne method. *J Clin Microbiol*, 2013; 51(8): 2691-5.
13. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın N. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarında antifungal duyarlılığın ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması ve RAPD-PCR ile Genotiplendirilmesi. *Mikrobiol Bul*, 2011; 45(2):306-17.
14. Espinel-Ingroff A, Alvarez-Fernandez M, Cantón E, Carver PL, Chen SC-A, Eschenauer G, et al. Multi-center study of epidemiological cutoff values and detection of resistance in *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin and micafungin using the Sensititre YeastOne colorimetric method. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015; 59(11): 6725-32.
15. Cretella D, Barbe KE, King ST, Stover KR. Comparison of susceptibility patterns using commercially available susceptibility testing methods performed on prevalent *Candida* spp. *J Med Microbiol*, 2016; 65(12): 1445-51.
16. Quindos G, Sanchez-Vargas LO, Villar-Vidal M, Eraso E, Alkorta M, Hernandez-Almaraz JL. Activities of fluconazole and voriconazole against bloodstream isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a 14-year study in a Spanish tertiary medical centre. *Int J Antimicrob Agents*, 2008; 31(3): 266-71.
17. Farina C, Manso E, Andreoni S, Conte M, Fazii P, Lombardi G, et al. Interlaboratory evaluation of VITEK2 system and sensititre yeastOne for antifungal susceptibility testing of yeasts isolated from blood cultures against four antifungal agents. *New Microbiol*, 2011; 34(2): 195-201.
18. Avolio M, Grosso S, Bruschetta G, Rosa R.D, Camporese A. Direct antifungal susceptibility testing of positive *Candida* blood cultures by Sensititre YeastOne. *New Microbiol*, 2009; 32(2): 179-84.



# Atık sudan izole edilen *Pseudomonas* spp. suşları ile kurşun ve nikel ağır metallerinin giderimi

## Removal of the lead and nickel heavy metals with *Pseudomonas* spp. strains which isolated from waste water

Berrin KELOĞLU<sup>1</sup>, Şahlan ÖZTÜRK<sup>2</sup>, Süleyman YALÇIN<sup>3</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Son yıllarda endüstriyel ve teknolojik gelişmelerden kaynaklanan atıkların çevreye olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak veya azaltmak için atık su arıtımında kullanılan klasik yöntemlerin yerine biyoteknolojik yöntemler tercih edilmektedir. *Pseudomonas* spp. suşları çevresel biyoteknoloji çalışmalarında çevre kirliliğine neden olan kirletici faktörleri yok etme kabiliyetleri nedeniyle tercih edilmektedir. Bu çalışmada, atık sudan izole edilen 40 adet *Pseudomonas* cinsi bakteri kullanılarak insanlar ve diğer canlı organizmalar için toksik olan kurşun ve nikel metallerinin giderim mekanizması incelenmiştir. Bu çalışma ile endüstriyel ve evsel atık sulardaki ağır metallerin canlı mikroorganizmalar ile giderimi çalışmalarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Bu çalışma için atık su arıtma tesisinin çeşitli havuzlarından izole edilen toplam 40 adet *Pseudomonas* spp. ile kurşun ve nikel metallerine olan direnç ve tolerans tespiti çalışmaları yapılmıştır. Belirlenen LC50 değerleri ile hücre yüzeyine tutunma ve hücre içine alımın olmak üzere biyobirikim deneyleri gerçekleştirilmiştir.

### ABSTRACT

**Objective:** In recent years, biotechnological methods are preferred instead of classical methods used in wastewater treatment in order to eliminate or reduce the negative effects of wastes on the environment arising from industrial and technological developments. *Pseudomonas* spp. are preferred in environmental biotechnology studies because of their ability to remove pollutant factors that cause serious environmental pollution. In this study, the removal mechanism of lead and nickel metals which are toxic for humans and other living organisms were investigated with 40 *Pseudomonas* genus bacteria which isolated from waste water. With this study, it is aimed to contribute to the removal works of heavy metals in industrial and domestic wastewater by living microorganisms.

**Methods:** 40 *Pseudomonas* spp. which were isolated from the pools of wastewater treatment plant, have tolerance and resistance tests for lead and nickel. Bioaccumulation tests were performed using the determined LC50 values and the removal of metal ions by the *Pseudomonas* spp. was evaluated as cell uptake and cell surface involvement.

<sup>1</sup>Nevşehir Halk Sağlığı Laboratuvarı, Nevşehir

<sup>2</sup>Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Nevşehir

<sup>3</sup>Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Berrin KELOĞLU

15 Temmuz Mahallesi Halk Sağlığı Laboratuvarı Nevşehir - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 19.03.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 03.11.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.78095

Keloğlu B, Öztürk Ş, Yalçın S. Atık sudan izole edilen *Pseudomonas* spp. suşları ile kurşun ve nikel ağır metallerinin giderimi  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 289-300

**Bulgular:** İzolatlardan 22 tanesi *P. aeruginosa*, 11 tanesi *P. stutzeri*, yedi tanesi de *P. mendocina* olarak tanımlanmıştır. Suşların 50 ppm metal içeren besiyerlerinde 37°C'deki inkübasyonu sonrası, üreme yoğunlukları doğrultusunda her bir metal için en dirençli beş adet izolat belirlenmiştir. *Pseudomonas* spp.'ler metal toleranslarının tespiti amacıyla 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm ve 400 ppm kurşun ve nikel içeren ayrı besiyerlerinde 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılarak % ölüm ve LC50 değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda; en dirençli suşlar Pb (+2) için *P. aeruginosa* BK14, Ni (+2) için *P. stutzeri* BK23 olarak belirlenmiştir. LC50 değerlerinde metal içeren besiyerlerinde 37°C'de tekrar inkübasyona bırakılan BK23 ve BK14 suşlarında sırası ile 10. ve 30. dakikalarda ve 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 ve 24. saatlerde biyobirikim deneyleri yapılmıştır. Metallerin giderimi, hücre yüzeyine adsorbsiyon ve hücre içine alınım şeklinde gerçekleşmiştir. *P. aeruginosa* BK14 suşu ile 204,30 ppm Pb (+2)'nin %56'sı hücre yüzeyinde olmak üzere % 84 giderim; *P. stutzeri* BK23 suşu ile 186,21 ppm Ni (+2)'in %47'si hücre yüzeyinde olmak üzere toplamda %76 giderim gerçekleşmiştir.

**Sonuç:** Elde edilen sonuçlara göre her iki metal için de giderim daha çok hücre yüzeyine tutunma yolu ile olmuştur. Bu çalışma ile ilk defa kurşun ve nikel dirençli canlı *Pseudomonas* spp.'ler ile ağır metal giderim mekanizması hücre yüzeyine tutunma ve hücre içine alınım şeklinde mukayeseli olarak değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kurşun, nikel, ağır metal, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*

**Results:** 22 isolates were identified as *P. aeruginosa*, 11 were *P. stutzeri* and seven were *P. mendocina*. After incubation of bacteria strains at 37°C for 24 hours in media containing 50 ppm metal, the most resistant five isolates were determined for each metal. For determination of metal tolerances, *Pseudomonas* spp. are incubated at 37°C for 24 hours on separate media containing 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm and 400 ppm lead and nickel and the % of death and LC50 values were calculated. According to results of this study, it was determined that isolates highest metal tolerance for Pb (+2) is *P. aeruginosa* BK14 and for Ni (+2) is *P. stutzeri* BK23. Bioaccumulative assays were performed at 10, 30 minutes and at the 1st, 2nd, 4th, 8th, 12th, 16th, 20th and 24th hours, respectively. Removal of the metals was carried out on the cell surface by adsorption and cell uptake. *P. aeruginosa* BK14 strain removed 84 % of 204,30 ppm Pb (+2) in total, as which 56 % of on the cell surface and *P. stutzeri* BK23 strain removed the 76 % of 186,21 ppm Ni (+2) in total, as which 47 % of on the cell surface.

**Conclusion:** According to the results obtained, the removal of both metals was mostly due to the attachment to the cell surface. In this study, the heavy metal removal mechanism with live *Pseudomonas* spp. which resistant to lead and nickel was evaluated as comparative to cell surface attachment and cell uptake for the first time.

**Key Words:** Lead, nickel, heavy metal, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*

## GİRİŞ

Su bütün canlılar için hayati öneme sahiptir. Dünyadaki hızlı nüfus artışı, endüstriyel kuruluşların artması ve tarımsal faaliyetler sonucu temiz su kaynaklarında ciddi bir azalma yaşanmaktadır. Yapılan araştırmalar bugünkü koşulların değişmeden devam etmesi durumunda, dünyadaki temiz ve

kullanılabilir su kaynaklarının tükeneceğini; şu anda dahi dünya nüfusunun %40'ını barındıran 80 ülkenin temiz su sıkıntısı çektiğini göstermiştir (1). Özellikle ağır metal endüstrilerinin atıkları ile toprağın ve suyun kirlenmesi, havaya karışan zararlı maddelerin yağmurlarla suya ve toprağa karışması,

evsel atık suların doğaya karışması, denize dökülen petrol ve katı atıkların artması ve buna benzer birçok örnek, su kirliliğinin artık doğanın dengesini bozuyor olduğunun birer kanıtıdır. Gelecekteki su yoksunluğuna önlem olması ve doğanın dengesini korumak için, su arıtımının verimli şekilde yapılması gerekmektedir. Birçok canlı için toksik olan ağır metallerin atık sudan gideriminde farklı yöntemler kullanılmaktadır (2). Sudan metal gideriminde kullanılan çöktürme, buharlaştırma, iyon değişimi ve membran yardımı ile ayırma gibi yöntemlerin pahalı ve zahmetli olması bu alanda kullanılacak alternatif çözüm arayışına neden olmaktadır (3). Son yıllardaki endüstriyel ve teknolojik gelişmeler sonucu ortaya çıkan atık maddelerin çevreye olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak veya azaltmak için, atık maddelerin gideriminde kullanılan klasik yöntemler yerine biyoteknolojik yöntemler tercih edilmektedir. Bu uygulamalar ile atık maddelerin geri kazanımı, çevre dostu teknolojilerin temel hedefi haline gelmiştir. Bu şekilde; hem endüstriyel atık maddelerin biyoteknolojik yöntemler ile geri kazanılması ve tekrar ham madde olarak kullanılması gerçekleştirilecek; hem de tarım, kozmetik, sağlık, petrol endüstrisi ve çevre teknolojisi gibi alanlarda değerlendirilmesi sağlanmış olacaktır (4). Yaşayan veya yaşamayan mikroorganizmalar, seçici olarak, atık sulardaki inorganik iyonları biriktirme ve ayırmada yüksek bir potansiyele sahiptirler (5). Toprakta ve atık suda yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakteriler ise çevre kirliliği bakımından risk oluşturan kirletici faktörlerin giderimindeki kabiliyetleri sebebiyle çevre biyoteknolojisine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu çalışmada da atık su arıtma tesisinden alınan su örneklerinin genel florasında yoğun olarak bulunduğu tespit edilen *Pseudomonas* spp. suşları ile insanlar ve diğer canlılar için toksik etkiye sahip olan kurşun ve nikel metallerinin giderimi ve biyobirikim mekanizmaları incelenmiş; ağır metaller ile kirlenen suların canlı mikroorganizmalar ile arıtımı çalışmalarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### İzolatların Tespiti ve Tanımlanması:

Nevşehir Hacıbektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü bünyesinde yüksek lisans tezi olarak 2016 yılında gerçekleştirilen çalışmada, Nevşehir Atık Su Arıtma Tesisinde bulunan arıtma işlemlerinin her bir basamağına ait havuzlardan su numuneleri alınmıştır. Numuneler her bir petri kutusuna 1 mL olacak şekilde dökme plak yöntemiyle *Pseudomonas* Agar (Merck KGaA) besiyerine ekilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrasında olası *Pseudomonas* spp. kolonilerinin Nutrient Agar (Merck KGaA) besiyerine tek koloni yöntemiyle ekimi yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında Gram negatif ve saf olduğu tespit edilen suşlar VITEK 2 Compact 30 (Biomérieux) cihazında biyokimyasal olarak tanımlanmıştır.

### İzolatların Metal Toleranslarının Tespiti:

Çalışma kurşun ve nikel metalleri için ayrı olarak aynı yöntemlerle yürütülmüştür. Mc Farland cihazı (DensiCHEK™ PLUS, Biomérieux) ile biyokütle yoğunlukları 1 (bir) değerine eşitlenen sıvı besiyerindeki (Nutrient broth, Merck KGaA) izolatların herbiri 50 ppm nikel (Merck Nickel-II-chloride hexahydrate) ve 50 ppm kurşun (Sigma-Aldrich Lead-II-chloride) derişimine 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Kurşun ve nikel maruz kalan izolatların biyokütle yoğunlukları inkübasyon sonrası 630 nm'de mikroplate okuyucuda (Ivyman 2100-c) tespit edilmiştir. Belirlenen değerler ve herbir izolatın metalsiz olarak aynı hacimlerdeki inkübasyonu sonrasındaki kontrol ekimlerinin biyokütle yoğunluk değerleri kullanılarak % ölüm değerleri hesaplanmıştır. Her bir metal için en dirençli beş izolat ile çalışmaya devam edilmiştir.

### Seçilen İzolatların Belirlenen Metal Derişimindeki Direnç Tespiti ve LC50 Değerlerinin Hesaplanması:

En düşük ölüm değerine sahip olan beşer izolat seçilerek 50-100-200-400 ppm nikel ve kurşun içeren

besiyeri ortamlarında 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20. ve 24. saatlerinde herbir izolata ait besiyerinden numuneler alınarak 630 nm'de mikropate okuyucu ile örneklerin biyokütle yoğunlukları ölçülmüştür. Bu değerler ve metalsiz besiyeri ortamında çoğalan mikroorganizma yoğunluk değerleri kullanılarak, % ölüm değerleri hesaplanmıştır. Canlı hücrelerin % 50'sini öldüren metal dozları (LC50), % 95 güven sınırlarında probit analizleri ile tespit edilmiştir (6, 7).

En yüksek LC50 değerine sahip izolat ile çalışmaya devam edilmiş; biyobirikim deneylerinde bu değer esas alınarak besiyeri ortamları hazırlanmıştır (8).

### Biyobirikim Deneyleri:

Kurşun metalinde biyobirikim çalışmaları *P. aeruginosa* BK14 izolatı ile nikel metalinde biyobirikim çalışmaları *P. stutzeri* BK23 izolatı ile yapılmıştır. *P. aeruginosa* BK14 izolatı 204,3 ppm kurşun içeren besiyeri ortamında, *P. stutzeri* BK23 izolatı 186,2 ppm nikel içeren besiyeri ortamında 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalarda canlı organizmalar ile metal gideriminin ilk dakikalarda yoğun olduğu belirtildiğinden inkübasyonun 10. dakikasında, 30. dakikasında ve sırası ile 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20. ve 24. saatlerinde besiyeri ortamından numuneler alınarak metal birikiminin yeri ve miktarı belirlenmiştir (9, 10). Biyobirikim deneyleri Matsunaga ve arkadaşları ile Öztürk Ş.'nin çalışmaları model alınarak gerçekleştirilmiştir (8, 11).

### Besiyerinde Kalan Metal Miktarı:

Besiyeri ortamında kalan metal miktarının tespiti için belirtilen saat dilimlerinde, kurşun ve nikel için hazırlanan kültür ortamlarından örnekler alınmış; 10 000 rpm devirde 10 dakika santrifüj (Nüve NF 048) edilerek üstte kalan sıvıdan filtre ve dilüsyon işlemi sonrası ICP-MS (Perkin Elmer Nexion 300D) cihazında metal tayini yapılmıştır.

### Hücre Yüzeyinde Emilim-Tutunma:

Hücre dışı birikimi belirlemek için; santrifüj işlemi sonrasında çökelen hücrelerin üzerine 1 mL 10 mM EDTA (Merck) çözeltisi eklenerek 2500 devirde 3 dakika vortekslenmiş (IKA MS1); hücre yüzeyine tutunan metallerin desorbsiyonu sağlanmıştır. Numuneler 10 000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvıdan filtre ve dilüsyon işlemi sonrası ICP-MS cihazında metal tayini yapılmıştır.

### Hücre İçinde Birikim

Hücre içine alınan metal birikiminin belirlenmesi için bir önceki aşamada santrifüj sonrasında dibe çöken hücrelerin üzerine 1 mL 1M HNO<sub>3</sub>(Merck) ilave edilerek 2.500 devirde 3 dakika vortekslenmiş; 10.000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvıdan filtre ve dilüsyon işlemi sonrası ICP-MS cihazında metal tayini yapılmıştır.

### İstatistiksel Analizler

Çalışmalar sonunda elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 21,0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler, uygun tanımlayıcı istatistiklerle (sayı, yüzde olarak) sunulmuştur. Tüm deneyler iki paralel olarak çalışılmış ve ortalama sonuçlar verilmiştir.

## BULGULAR

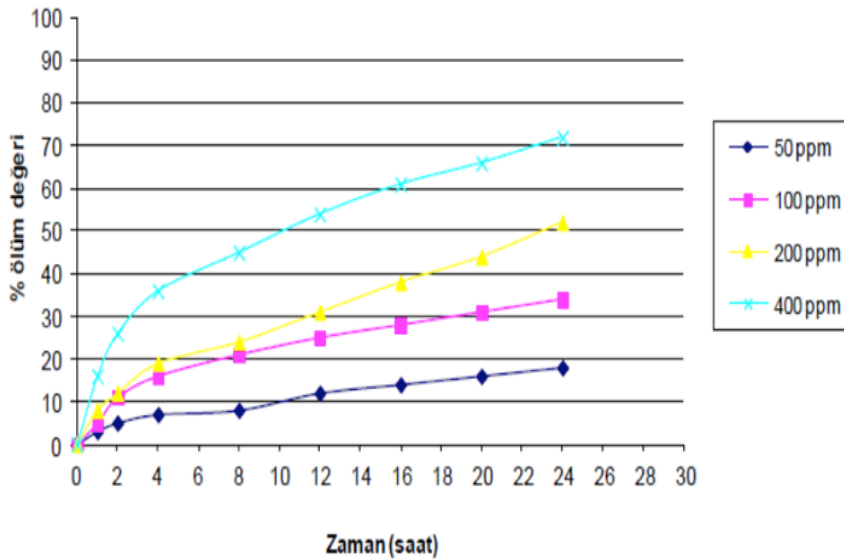
Bu çalışma için atık su arıtma tesisinden alınan numunelerden 40 adet *Pseudomonas* spp. izolatı tanımlanmıştır. Tanımlanan 40 izolatın 22 tanesinin *P. aeruginosa*, 11 tanesinin *P. stutzeri*, 7 tanesinin de *P. mendocina* olduğu tespit edilmiştir. İzolatların metale olan dirençlerini belirlemek üzere yapılan çalışmalarda kurşun için *P. aeruginosa* BK1, *P. aeruginosa* BK3, *P. aeruginosa* BK4, *P. aeruginosa* BK14, *P. stutzeri* BK37; nikel için *P. stutzeri* BK8, *P. aeruginosa* BK21, *P. stutzeri* BK23, *P. stutzeri* BK32, *P. aeruginosa* BK40 metal toleransı açısından en dirençli izolatlar olmuştur.

Bu izolatlar ile yapılan eşit biyokütle yoğunluğunda ayrı besiyerlerinde 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm metal derişimlerindeki inkübasyon sırasında 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20. ve 24. saatlerde numuneler alınarak biyokütle yoğunlukları belirlenmiş; % ölüm değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler kullanılarak elde edilen LC50 değerleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

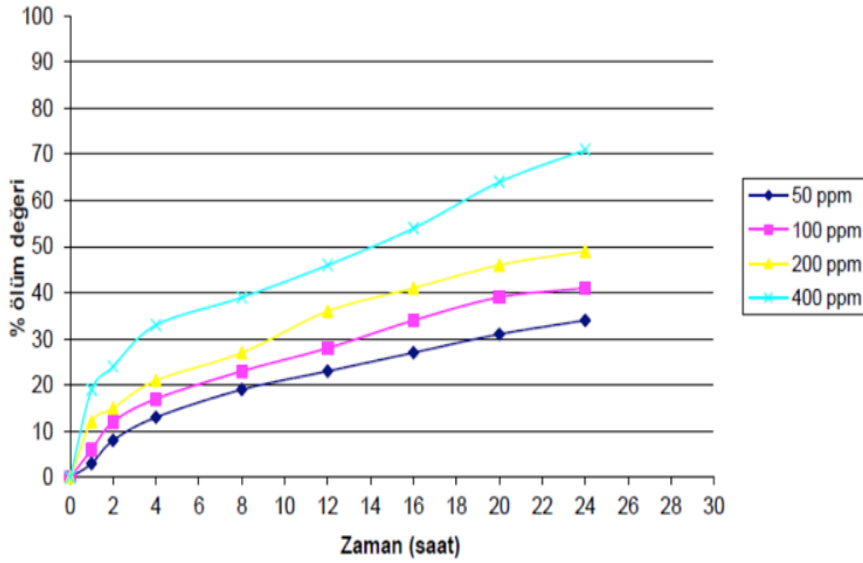
Bu sonuçlara göre 24 saat içinde mevcut bakterilerin yarısını öldüren en yüksek kurşun konsantrasyon değerine sahip olan izolat *P. aeruginosa* BK14, nikelde ise *P. stutzeri* BK23 olmuştur. Biyobirikim deneyleri bu iki izolat ile yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda nikel ve kurşun metaline maruz bırakılan bu izolatların % ölüm değerlerinin zamana göre değişimleri sırasıyla Şekil 1 ve Şekil 2’de sunulmuştur.

Tablo 1. Kullanılan metallere göre izolatlara ait LC50 değerleri

| Kullanılan Metaller | İzolat                    | LC50 değeri (ppm) |
|---------------------|---------------------------|-------------------|
| Kurşun              | <i>P. aeruginosa</i> BK1  | 154,06±6,93       |
|                     | <i>P. aeruginosa</i> BK3  | 147,95±6,11       |
|                     | <i>P. aeruginosa</i> BK4  | 181,55±7,93       |
|                     | <i>P. aeruginosa</i> BK14 | 204,30±9,20       |
|                     | <i>P. stutzeri</i> BK37   | 174,59±7,74       |
| Nikel               | <i>P. stutzeri</i> BK8    | 133,64±4,18       |
|                     | <i>P. aeruginosa</i> BK21 | 158,9±6,12        |
|                     | <i>P. stutzeri</i> BK23   | 186,21±8,43       |
|                     | <i>P. stutzeri</i> BK32   | 137,96±5,06       |
|                     | <i>P. aeruginosa</i> BK40 | 129,13±3,81       |



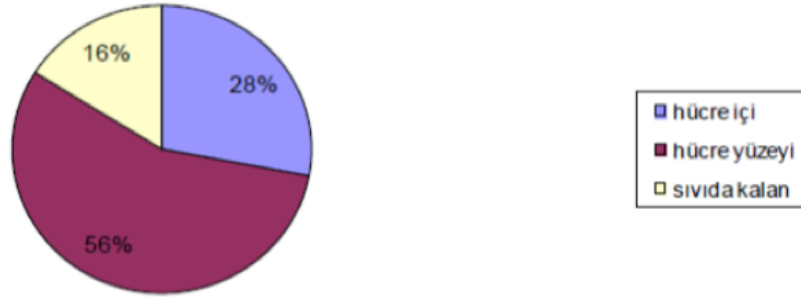
Şekil 1. Farklı konsantrasyonlarda nikel maruz bırakılan *P. stutzeri* BK23 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi



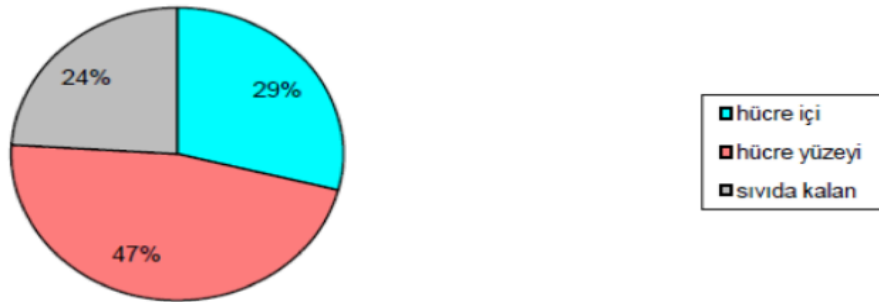
**Şekil 2.** Farklı konsantrasyonlarda kurşuna maruz bırakılan *P. aeruginosa* BK14 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi

Biyobirikim deneylerinde LC50 değeri esas alınarak metal içeren besiyerleri hazırlanmıştır. 24 saatin sonunda besiyerine ilave edilen kurşun miktarının % 16'sı [32,68 ppm Pb (+2)] besiyerinde kalmış, % 84'ü [171,61 ppm Pb (+2)] mikroorganizma tarafından giderilmiştir. Besiyerinde bulunan metal miktarı ilk on dakika içinde hızla azalmıştır. Besiyerine ilave edilen kurşun giderimi iki şekilde gerçekleşmiştir. İlk mekanizma olan hücre yüzeyine adsorbsiyon sırasında hücre yüzeyindeki metal miktarının % 56'sı [114,40 ppm Pb (+2)] hücre yüzeyine adsorbe olmuştur. İlk 20 saat boyunca hücre yüzeyine tutunan metal miktarında artma olmuş; sonrasında ise sabit kaldığı tespit edilmiştir. Yüzeye tutunan metal miktarının yarısından fazlası ilk 10 dakika içinde adsorbe olmuştur. İkinci mekanizma olan hücre içine alınım ise absorblanan kurşun miktarında ilk 20 saat boyunca artış gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre toplam metal miktarının % 28'i hücre içine alınmıştır. Hücre içine alınımın yaklaşık yarısı ilk yarım saat içinde gerçekleşmiştir. Kurşun biyobirikiminde bölgesel oranlar Şekil 3'de verilmiştir.

Nikel biyobirikimi çalışması için seçilen BK23 *P. stutzeri* izolatı, 186,21 ppm Ni (+2) konsantrasyonu içeren besiyerinde 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Çalışmada besiyerine eklenen toplam nikel miktarının % 24'ü [44,69 ppm Ni (+2)] besiyerinde kalmıştır. Besiyerinde kalan metal miktarında ilk 16 saatte azalma gerçekleşmiş sonrasında ise sabit kaldığı izlenmiştir. İlk on dakika içinde azalma hızlı bir şekilde olurken sonrasında daha yavaş seyretmiştir. 24 saatin sonunda besiyerine ilave edilen nikelin % 47'si [87,51 ppm Ni (+2)] bakteriler tarafından hücre yüzeyine tutunma yoluyla giderilmiştir. Adsorbsiyon ilk 16 saat boyunca artmış; sonra sabit kalmıştır. İnkübasyonun ilk on dakikasında tutunma oldukça hızlıdır. Hücre içine nikel alınımı ise inkübasyonun ilk yarım saatinde daha hızlı gerçekleşmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından toplam metal miktarının % 29'u [54 ppm Ni (+2)] hücre içine alınmıştır. İlk 16 saat alınım devam etmiş; sonra durmuştur. Nikel biyobirikiminin bölgesel oranları Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Kurşun biyobirikiminin bölgesel oranları



Şekil 4. Nikel biyobirikiminin bölgesel oranları

## TARTIŞMA

Su hayatın her alanında temel ihtiyaçtır ve temiz su vazgeçilmez bir kaynaktır. Tüm dünyada olduğu gibi hızla gelişmekte olan ülkemizde de su arıtımına olan gereksinim her geçen gün artmaktadır. Yüzyılın en önemli konusu olan su yönetimi sürecinde değerlendirilebilen atık sular arıtılmalı ve ilgili yönetmelikler doğrultusunda izin verilen kirlilik düzeyine eriştikten sonra çevreye deşarj edilmelidir.

Bu çalışmada, canlılar için toksik etkiye sahip kurşun ve nikel metalleri ile atık suda giderim ve biyobirikim deneyleri yapılmıştır. Atık sudan ağır

metal gideriminin biyobirikim ile gerçekleşmesinde mikroorganizmalar tercih edilmekte; hızlı üremeleri, biyokütle yoğunluğunun fazla olması ve olumsuz koşullara olan dirençleri sebebi ile de özellikle bakteriler kullanılmaktadır. *Pseudomonas* cinsi bakteriler ise kirliliğe ortamlarda canlılığını devam ettirebilme kabiliyeti ve ürettikleri ikincil metabolitler ile tercih edilmektedir (12, 13). Ceylan Ö. ve arkadaşlarının (14) *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* ilişkili cinsler ile 8 ağır metal kullanarak yaptıkları dirençlilik çalışmasında da ifade edildiği üzere bu cins bakterilerin sahip oldukları plazmidler ve hücre duvar yapıları gibi

özellikleri değerlendirildiğinde ağır metal giderimi için uygun özellikte olduğu açıktır.

Metale maruz kalan mikroorganizmaların metale maruz kalmayanlara oranla daha uzun süre canlılığını korudukları yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (15). Srinath ve ark. (16), Cr (VI) ile kirlenmiş sulardan bakteri izole etmişler ve laboratuvar ortamında bu bakterilerin Cr (VI) giderimini incelemişlerdir. Kirli sulardan izole ederek tanımladıkları izolatların diğerlerine nazaran kroma daha çok direnç gösterdikleri ve bu dirençli izolatların krom biyobirikimlerinin de yüksek olduğu rapor edilmiştir. Sun ve Shao (15), Pasifik okyanusunun sedimentlerinden izole ettikleri Pb (+2)'ye yüksek oranda dirençli olan *Penicillium* spp. Psf-2 izolatının laboratuvar ortamında da Pb (+2)'ye yüksek oranda hücre yüzeyine ve hücre içerisine aldığı rapor ederek, ağır metal gideriminde metale toleranslı mikroorganizmaların kullanımının önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bu veriler değerlendirilerek atık su arıtma tesisine ulaşan kirli sulardan alınan örnekler ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Su numunelerinin ön incelemesinde çalışmada kullanılan metallerin ve *Pseudomonas* spp. suşlarının baskın olarak varlığının tespit edilmesiyle birlikte, öncesinde metale maruz kalmış mikroorganizmalar olmaları sebebi ile de çalışmada tespit edilen metal dirençliliği yüksek olmuştur. *P. aeruginosa* BK14 izolatında kurşun için LC50 değeri 204,30 ppm, *P. stutzeri* BK23 izolatında nikel için LC50 değeri 186,21 ppm olarak tespit edilmiştir. Yılmaz (17), *Synechocystis* sp. ile yaptığı çalışmada , nikel için LC50 değerini 17,41 ppm, kurşun için ise 126,90 ppm olarak tespit etmiştir. *Gleocapsa* spp. ile yapılan çalışmada ise kurşun için LC50 değerini 1,16 ppm olarak, *Aulosira fertilissima* ile yapılan çalışmada ise nikel için LC50 değerini 0,1 ppm olarak bulmuşlardır (18, 19). Yapılan çalışmalardaki organizmalar ile kıyaslandığında bu çalışmada kullanılan *Pseudomonas* cinsinin metale dirençliliğinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Yılmaz (17) ve Öztürk (8)'ün *Synechocystis* sp. ile yaptığı çalışmalarda Ni (+2)'in % 51 oranında hücre yüzeyine, Pb (+2)'nin % 68 oranında hücre yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışmalarda kullanılan organizmalar farklı olsa da kurşunun hücre yüzeyine adsorbsiyonunun nikel oranla daha fazla olması, organizmaların hücre duvarında ortak bulunan fonksiyonel protein gruplarının Pb (+2) iyonuna bağlanma yeteneği ile ilişkilendirilebilir. Çünkü metabolizmadan bağımsız olarak ağır metal katyonları ile hücre duvarı arasındaki etkileşimle bakır, nikel, krom, kurşun, çinko ve kobalt gibi birçok metalin toplandığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (20).

Metallerin hücre zarından taşınarak hücre içinde birikmesi, mikroorganizmanın metabolizmasına bağlı bir biyosorpsiyon yoludur (20). Bueno ve ark. (20), *Rhodococcus opacus*'u kurşun, krom ve kobalt metallerine maruz bırakarak, metallerin hücre üzerine etkisini elektron mikroskopu ile incelemişler ve hücrede bulunan elementlerin analizlerini yapmışlardır. Element analizlerinin sonuçlarına göre kontrol hücrelerinde tespit edilen K (potasyum) elementine metale maruz kalan hücrelerde rastlanılmamıştır. Hücre yüzeyinde bulunan K'nın metallerle yer değiştirmiş olabileceğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, kullanılan metallerin hücre içine alınımı, hücre yüzeyine tutunumu ve besiyerinde kalan miktarları karşılaştırılmıştır. Buna göre kurşun metalinin hücre yüzeyine tutunumu da , hücre içine alınımı da nikel oranla daha fazla olmuştur. Acar (21)'in *Desmodesmus armatus* ile yaptığı çalışmada da sucul ortamda kurşun gideriminin nikel göre daha fazla olduğunu tespit etmiştir. Bu veriler doğrultusunda *Pseudomonas* spp.'nin hücre yüzeyinde bulunan proteinlerin kurşun metaline afinitesinin nikel oranla daha yüksek olduğu ya da Pb (+2) iyonlarının daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi hücrede bulunan



elementlerle yer değiştirdiği söylenilebilir. Bununla birlikte hücre içine alınımın hücre yüzeyine tutunma ile paralellik gösterdiği sonucuna da varılmıştır.

Biyosorpsiyonda önemli çevresel etkenlerden biri ortamın pH değeridir. Ağır metallerin uzaklaştırılmasında ve metal-canlı etkileşmesinde optimum pH değerinin tespit edilmesinin önemli olduğu bildirilmiştir (21). Çalışmada kullanılan besiyeri ortamının pH değeri kurşun içeren çözeltide 6,5, nikel içeren çözeltide 6 olarak tespit edilmiştir. Acar (21), yaptığı çalışmada kurşun içeren kültürlerde pH değerinin 6-7 arasında olduğu günlerde *Desmodesmus armatus*'un kurşunu tutma kapasitesinin %25 oranında arttığını saptamıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, uygun pH değerinin sağlanmış olmasının yüksek metal tutunumunu olumlu etkilediği düşünülmektedir.

Metal alınımında dikkat edilmesi gereken önemli bir faktör de zamandır. Yapılan çalışmalar başlangıçta metal alınımının hızlı olduğunu; sonrasında biyosorbent yüzeyindeki doygunluk nedeniyle yavaşladığını göstermiştir (9, 10). Doygunluk, biyokütle artışı ile metal bağlanma bölgelerinin birbirinin üzerine gelmesi veya agregasyon oluşturmamasından kaynaklanmaktadır (22). Ancak, bu durum metalin ve mikroorganizmanın çeşidine ve mikroorganizma yüzeyinde bulunan metal bağlanma bölgelerinin çeşidine ve sayısına göre farklılık göstermektedir. Bu çalışmada, kurşun metalinin hücre yüzeyine adsorplanan miktarının (% 56'sının) yarıdan fazlası (% 34'ü) ilk 10 dakika içinde hücre yüzeyine tutunmuştur. Nikel metalinin de ilk 10 dakika içinde % 27'si hücre yüzeyine tutunmuştur. Yapılan bir çalışmada, hızlı metal alınımının biyokütlenin atık suların arıtımında kullanılabilmesi için en önemli kriter olduğu bildirilmiştir (23). Bu çalışmada yer alan *Pseudomonas* spp.'nin hızlı metal adsorpsiyonu ve absorpsiyonu avantajları ile arıtım çalışmalarında kullanım için uygun olduğu söylenebilir.

Hücre yüzeyine tutunmada hücre duvarında bulunan fonksiyonel grupların ve ekzopolisakkaritlerin (EPS) önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Toksik maddelere ve kurumalara karşı bakterileri koruyan EPS üretimi topraktan izole edilen *Pseudomonas* spp.'lerde çalışılmış ve EPS üreten bu mikroorganizmaların toksik bileşiklere yüksek toleransı ve direncinin seçici avantajlar sağladığına dikkat çekilmiştir (24, 25). Yalçın (26) , atık sudan izole edilen *Pseudomonas* spp. suşlarına 5 ppm ve 15 ppm aralığında uygulanan Cr(VI) konsantrasyonlarındaki artış ile EPS üretiminin de arttığını bildirmiştir. Raungsomboon ve ark. (18), *Gleocapsa gelatinosa*'nın EPS'sini saflaştırarak Pb (+2) giderimini araştırmışlar ve EPS'nin monomer yapısını aydınlatmışlardır. Buna göre ksiloz, riboz, ramnoz, galaktoz, glikoz, mannoz ve fruktoz şekerlerinden oluşan EPS yapının yüksek oranda Pb (+2)'u adsorbladığını bildirmişlerdir. Bu veriler doğrultusunda çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarında yüksek metal tutunumu ile birlikte EPS üretiminin de arttığı ve bu durumun *P. aeruginosa* BK14 ve *P. stutzeri* BK23 izolatlarının seçilimdeki avantajlarından biri olduğu sonucuna varılabilir.

Metalin hücre içerisine alınımında ise düşük moleküler ağırlıklı tiyoller ve aktif transport mekanizmasının da rol oynadığı rapor edilmiştir (22, 26). Diğer bir hücre içi alınım şeklinin de metalotiyonein gibi şelatlayıcı proteinlere tutunarak endositoz yolu ile alınım olduğu gösterilmiştir (24, 25). Biyobirikim mekanizmalarının kullanılan mikroorganizma ve metal çeşidine göre değiştiği birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir (23). Bu çalışmada, *Pseudomonas* cinsi bakterilerin metal iyonlarının hücre içine alınımını gerçekleştirmiş olması, hücre duvarında bulunan ve endositozdan sorumlu proteinlerin Pb (+2) ve Ni (+2)'e olan bağlanma kabiliyetlerini göstermektedir.

Sonuç olarak, suyun kullanıldıktan sonra geri dönüşümünün her geçen gün önem kazanmasıyla

birlikte, evsel ve endüstriyel atık suların mikroorganizmalar yardımıyla arıtım prosesinde *Pseudomonas* spp.'lerin değerlendirilmesi için uygun potansiyele sahip oldukları; tutulan metallerin geri eldesinin mümkün olmasının endüstriyel açıdan fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, ağır metal iyonlarının çeşitli mikroorganizmalarca biyobirikimi değişik türlerden bakteriler, algler, mantarlar ve mayalar kullanılarak yapılmıştır (16, 27). Daha öncesinde metale maruz kalmış ve bizzat atık suyun kendi florasından elde edilen, bu sebeple etkin verim sağlayacağı düşünülen *Pseudomonas* spp. ile yapılmış, nikel ve kurşun giderimi ve biyobirikim mekanizmasının araştırıldığı bu çalışmanın öncü ve önemli çalışmalar arasında yer aldığı söylenebilir. Metallerin izolatlardaki birikim bölgelerinin tespiti

ve birikim miktarları, metallerin geri dönüşümü prosesi için de önemli bir gösterge niteliğindedir. Bu çalışma ile, ulusal ve uluslararası platformlarda yürütülen su yönetimi politikalarının atık su arıtımı ile ilgili olan çalışmalarına katkı sağlandığı düşünülmektedir.

Yapılan deneysel ve istatistiksel çalışmalar sonucunda, ağır metallerin mikroorganizmalarca gideriminin mümkün olduğu ve en çok hücre yüzeyine tutunma yolu ile giderimin gerçekleştiği, öncesinde metale maruz kalan organizmaların bu konuda etkin oldukları tespit edilerek, *P. aeruginosa* BK14 ile *P. stutzeri* BK23 izolatlarının hızlı metal tutunumu özellikleri nedeniyle de atık sudan ağır metal gideriminde etkin bir şekilde değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya olan katkı ve destekleri için Nevşehir Hacıbektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir Atık Su Arıtma Tesisi ve Nevşehir Halk Sağlığı Laboratuvarı yetkililerine teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Özdemir K. Meyvesuyu Fabrikası Atıksularının Elektrokimyasal Olarak Arıtılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.
2. Özer A, Özer D. Nikel (II) iyonlarının iki kademeli kesikli kapta *Cladophora crispata* ile giderilmesi. Turk J Eng Environ Sci, 1998, 22: 305-13.
3. Wilde EW, Beneman JR. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. Biotechnol Adv, 1993, 11: 781-812.
4. Tefloncu A. Biyoteknoloji. Bornova/İzmir:Ege Üniversitesi Yayınları: 1995.
5. İleri R. Çevre Biyoteknolojisi. Adapazarı: Değişim Yayınları, 2000.
6. OECD (Organization for the Economic Cooperation and Development), OECD Guideline for testing of chemical: Alga, growth inhibition test, 1984.
7. APHA, AWWA, WPCF, Standart Methods for the examination of water and wastewater, Washington, 1971.
8. Öztürk Ş. Çeşitli tatlı sulardan izole edilen bazı *Synechocystis* sp. izolatlarına Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerinin etkisi ve giderimi: metal gideriminin protein ve tiyoller açısından değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
9. Fusconi R, Godinho MJL. Screening Exopolysaccharide-Producing Bacteria From Sub-Tropical Polluted Groundwater. Braz. J. Biol., 2002, 62: 363-9.
10. Robertson EB and Firestone MK. Relationship Between Desiccation and Exopolysaccharide Production in soil *Pseudomonas* spp. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 1284-1291.
11. Matsunaga T, Takeyama H, Nakao T, Yamazawa A, Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater, J. Biotechnol., 1999, 70:33-8.
12. King EO, Ward MK, and Raney DE. Two Simple Media for The Demonstration of Pyocyanin and Fluoresci. J. Lab. Clin. Med., 1954, 44: 301-7.
13. Asthana S, Rusin P and Gerba CP. Influence of hydrocarbons on the virulence and antibiotic sensitivity associated with *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Environ Health Research, 1997, 7: 277-87.
14. Ceylan Ö, Uğur A, Bio-Monitoring of Heavy Metal Resistance in *Pseudomonas* and *Pseudomonas* Related Genus, J Biol Environ Sci, 2012, 6(18), 233-42.
15. Sun F, Shao Z. Biosorption and bioaccumulation of lead by *Penicillium* sp. Psf-2 isolated from the deep sea sediment of the Pacific Ocean. Extremophiles, 2007, 11: 853-8.
16. Srinath T, Verma T, Ramteke PW, Garg SK. Chromium(VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. Chemosphere, 2002, 48 (4): 427-435.
17. Yılmaz EŞ. Siyanobakterilerle ağır metallerin giderimi ve bunu etkileyen faktörlerin araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
18. Raungsomboon S, Chidthaisong A, Bunnag B, Inthorn D, Harvey NW. Production, composition and Pb (+2) adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*. Water Res., 2006, 40:3759-66.
19. Banerjee M, Mishra S, Chatterjee J. Scavenging of nickel and chromium toxicity in *Aulosira fertilissima* by immobilization: Effect on nitrogen assimilating enzymes. Electron J Biotechnol, 2004, 7:3- 15.

20. Bueno BYM, Torem ML, Molina F, de Mesquita LMS. Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies. *Miner Eng*, 2008, 21: 65-75.
21. Acar Ç. Kurşun (Pb+2) ve Nikel (Ni+2) İyonlarının *Desmodesmus armatus* ile Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2017.
22. Bajguz A. Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide. *Plant Physiol Biochem*, 2000, 38: 797-801.
23. Kumar YP, King P, Prasad VSR. Adsorption of zinc from aqueoussolution using marine green algae-*Ulva fasciata* sp., *Chem Eng J*, 2007,129: 161-6.
24. Van Ho A, Ward DM, Kaplan J, Transition metal transport in yeast, *Ann Rev Microbiol*, 2002, 56: 237-61.
25. Zalups RK, Ahmad S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia, *Toxicol Appl Pharmacol*,2003, 186: 163-88.
26. Yalçın S, Öztürk Ş, Keloğlu B. Atık Sulardan İzole Edilen *Pseudomonas Spp.*' lerin Ekzopolisakkarit Üretimine Bazı Ağır Metallerin Etkisi, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi* 2018, 7 : 223-39.
27. Kumar KS, Dahms HU, Won EJ, Lee JS, Shin KH. Mikroalgae - A Promising Tool for Heavy Metal Remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 113, 329-52.

# Sanitation control of some equipments used in poultry slaughterhouse line

## Kanatlı kesim hattında kullanılan bazı alet ve ekipmanlarda sanitasyon işleminin kontrolü

Nilgün ÇETİNKAYA<sup>1</sup>, Gökhan Kürşad İNCİLİ<sup>1</sup>, Ali ARSLAN<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Objective:** Microbial contamination of chicken meat varies depending on various processes applied during production, slaughtering and processing. This study was carried out to investigate the effectiveness of sanitation (cleaning+disinfection) implemented in a commercial poultry slaughterhouse in Elazığ.

**Methods:** For this purpose, swab samples from defeathering machine fingers, outlet band of water cooling tank, outlet band of air cooling and end product band of diet department were taken to analyze the number of total mesophilic aerobic bacteria (TMAB), coliforms, *Enterobacteriaceae* and the prevalence of *Salmonella* spp. before sanitation and at the 20 and 30 minutes after sanitation process.

**Results:** Total mesophilic aerobic bacteria numbers of the samples taken from fingers of mechanical defeathering machine before sanitation and at the 30 minutes after sanitation process were  $5.69 \pm 0.83$ , and  $4.64 \pm 0.83$  log<sub>10</sub>cfu/cm<sup>2</sup>, and the differences between before and after sanitation were significant ( $p < 0.05$ ). In addition, it was determined that the differences of the total mesophilic aerobic bacteria counts between before and after sanitation in the water cooling

### ÖZET

**Amaç:** Tavuk etinin mikrobiyal kontaminasyonu üretim, işleme ve kesimhane aşamalarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu çalışma, Elazığ'da bulunan ticari bir kanatlı kesimhanesinde uygulanan sanitasyon (temizlik+dezenfeksiyon) işleminin etkinliğini incelemek amacıyla yapıldı.

**Yöntem:** Bu amaçla mekanik tüy yolma makinesi parmakları, su soğutma tankı çıkış bandı, hava soğutma çıkış bandı ve diyet bölümü son ürün dizme bandında sanitasyon öncesi, sanitasyon sonrası 20. ve 30. dakikalarda swap örnekleri alınarak toplam mezofilik aerob bakteri, koliform grubu bakteri ve *Enterobacteriaceae* sayıları ile *Salmonella* spp. prevalansı yönünden araştırıldı.

**Bulgular:** Sanitasyon öncesi ile sanitasyon sonrası 30. dakikalarda toplam mezofilik aerob bakteri sayılarının tüy yolma parmağında sırasıyla;  $5,69 \pm 0,83$ , ve  $4,64 \pm 0,83$  log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> olduğu ve sanitasyon öncesi ile sonrası arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Ayrıca, toplam mezofilik aerobik bakteri sayılarının su soğutma çıkış bandında, hava soğutma çıkış bandında ve diyet bölümü son ürün bandında sanitasyon öncesi ile sonrası arasındaki

<sup>1</sup>Firat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology



İletişim / Corresponding Author : Gökhan Kürşad İNCİLİ

Firat Üni., Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü 23100 Elazığ - Türkiye

E-posta / E-mail : gkincili@firat.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 20.12.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 09.11.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.93275

Çetinkaya N, İncili GK, Arslan A. Sanitation control of some equipments used in poultry slaughterhouse line  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 301-310

outlet band, air cooling outlet band and the diet product final product band were significant ( $p<0.05$ ). *Enterobacteriaceae* numbers of the samples taken from fingers of mechanical defeathering machine before sanitation and at the 20 and 30 minutes after sanitation process were  $4.00\pm 2.09$ ,  $2.43\pm 0.58$  and  $3.27\pm 0.69$  log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup>, in the samples taken from outlet band of water cooling tank were  $2.74\pm 0.82$ ,  $1.47\pm 1.35$  and  $0.32\pm 0.86$  log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup>, respectively. Coliform bacteria number of the samples taken from end product band of diet department before sanitation and at the 20 min after sanitation process were  $2.44\pm 0.81$  and  $1.65\pm 1.43$  log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup>, respectively, no coliform bacteria was detected at the 30 min after sanitation process. The prevalence of *Salmonella* spp. in the samples taken from defeathering machine fingers before sanitation and at the 20 and 30 minutes after sanitation process were 66.67%, 33.33% and 16.67%, respectively. *Salmonella* spp. was detected in 8.33% of the samples taken from outlet band of water cooling tank and air cooling. *Salmonella* spp. was not detected in the samples taken from the end product band of diet department at any time.

**Conclusion:** As a result, it can be speculated that the cleaning and sanitation process implemented in the related establishment is satisfactory, however, extending shelf life of the products and eliminating the poultry meat-borne pathogenic microorganisms that threaten public health, performing better sanitation process may be recommended.

**Key Words:** *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp., sanitation, slaughterhouse, poultry

farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). *Enterobacteriaceae* sayısı sanitasyon öncesi ve sonrası 20. ile 30. dakikalarda tüy yolma parmağında sırasıyla;  $4,00\pm 2,09$ ,  $2,43\pm 0,58$  ve  $3,27\pm 0,69$  log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup>, su soğutma çıkış bandında sırasıyla;  $2,74\pm 0,82$ ,  $1,47\pm 1,35$  ve  $0,32\pm 0,86$  log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edildi. Diyet bölümü son ürün bandında sanitasyon öncesi ve sonrası 20. dakikada sırasıyla;  $2,44\pm 0,81$ ,  $1,65\pm 1,43$  log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> olarak saptanırken sanitasyon sonrası 30. dakikada koliform grubu bakteriye rastlanmadı. *Salmonella* spp. prevalansı ise sanitasyon öncesi tüy yolma parmağında örneklerin %66,67'sinde, sanitasyon sonrası 20. dakikada %33,33'ünde ve 30. dakikada örneklerin %16,67'sinde, sanitasyon öncesi su soğutma çıkış ve hava soğutma çıkış bantlarında örneklerin %8,33'ünde *Salmonella* spp. tespit edildi. Diyet bölümü son ürün bandında ise hiçbir aşamada *Salmonella* spp. varlığına rastlanmadı.

**Sonuç:** Sonuç olarak, daha iyi bir hijyenin sağlanması, üretilen ürünlerin daha uzun raf ömrüne sahip olması ve kanatlı eti kaynaklı halk sağlığını tehdit edici mikroorganizmaları elemine etmek için sanitasyonun daha etkili bir şekilde yapılması önerilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. kanatlı, kesimhane, sanitasyon

## INTRODUCTION

Microbial contamination of chicken meat vary depending on various processes applied during production, slaughtering and processing (1, 2). In spite of slaughtering hygiene, contamination of poultry meat with microorganisms can not be completely prevented. Many factors influence the microflora

of poultry meat. These factors include water, air, breeding conditions, transport, slaughterhouse process, packaging, and distribution conditions (3). Due to the factors effecting on poultry microflora, poultry and poultry meat can contain numerous and various microorganisms. Among these microorganisms,

pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Clostridium* spp. may be present (4, 5). Many studies have shown that *Salmonella* spp., *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus* and pathogenic *Escherichia coli* strains are the main responsible microorganisms of chicken meat-borne infections (6-9).

The only one possibility of extending the shelf life of fresh chicken meat and inactivating pathogenic microorganisms is the implementation of an appropriate hygiene and sanitation program during operation. For this purpose, a number of studies have been carried out on the sanitation applications at different stages of the slaughter process. It has been reported that the hygiene and sanitation processes which are applied according to the product flow chart in the slaughtering process can reduce or increase the level of microorganisms on the final products (10-12). The prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* are found to be increased in the carcasses, especially after carcass cooling process, and it was reported that this increase is caused by cross contamination (13). The disinfectants which are applied to prevent cross-contamination in many slaughterhouse differ, due to their application dose and effectiveness. It is emphasized that sanitization applications are applied at more than one point (defeathering, crop removal, inner-outer bird washing, pre-cooling) or only in the last stage of the slaughtering process in the forms of immersion (pre-cooling water) or spraying (air cooling) (9, 14).

There are many chemical substances which antimicrobial effects have been investigated, and their effectiveness have been compared in many studies (6- 8, 11, 15). The most commonly used chemicals are organic acids (13), trisodium phosphate (15), chlorinated disinfectants (11), acidified sodium chloride (6), acetic acid (9), and cetylpyridiniumchloride (16). The antimicrobial effect of the used chemical substances depends on disinfectant, concentration, pH, temperature,

application time and application method. Applied chemical substances generally have a capacity of reducing *Salmonella* spp. up to 2-3 log<sub>10</sub> (9). Although there are many studies in the literature conducted on the microbial quality of poultry carcasses and carcass parts (17-22), there have been limited number of studies regarding the efficacy of disinfectant application on surfaces which have directly contact with the carcasses or carcass parts.

The present study was conducted to investigate the antimicrobial effect of the sanitation process, performed in a commercial slaughterhouse, on rubber fingers of mechanical defeathering machine, outlet band of water chilling tank, outlet band of air cooling band and the final product band.

## MATERIAL and METHOD

### Cleaning and Disinfection Process Applied in Slaughterhouse

The cleaning-disinfection operations in the slaughterhouse where the samples were taken, start with the physical cleaning using pressurized hot water at 50-60 °C. Subsequently, detergent (alkaline foam cleaning product at minimum 2% (v/v) concentration) is added to the system by automatic dispensing system and then foam application is performed. Afterwards, the brushing process is performed manually (minimum 20 minutes), and the cleaning step is completed by washing with hot water at 50-60 °C. Disinfection is applied after the cleaning phase. For disinfection application, at least 0.2% (v/v) solution of a commercial disinfectant containing minimum 30% (v/v) hydrogen peroxide solution, is prepared and applied to the defeathering machine by manually.

The disinfectant used for the outlet band of water chilling, outlet band of air cooling, and final product bands is prepared at minimum 2% (v/v) concentration by using a commercial disinfectant including C12-

C14-alkyldimethyl (quaternary salt and amphoteric substance), disodium tetraborate decahydrate, betains, quaternary ammonium alkaloids, quaternary salt and amphotericine, N-(3-aminopropyl), dodecylpropane-1,3-diamine (amine functionalized biocidal amine effective against Gram negative and Gram positive bacteria), and applied. Approximately 45 minutes after the disinfection process, rinsing is carried out using pressurized hot water at 50-60 °C. The qualitative residue control of disinfectants which are applied during slaughterhouse sanitation is carried out using test strips.

### Samples Collection

Swab samples were collected from 4 different points including defeathering machine fingers (DF), water chilling outlet band (WC), air cooling outlet band (AC) and final product band (diet section) (DS) (before sanitation and at the 20 and 30 minutes after sanitation process). In a total 36 samples (4 sampling point x 3 samples for each sampling points x 3 sampling times) were collected in each sampling day, The study was repeated 4 times and a total of 144 swab samples were examined.

Samples were taken from 10x10 cm<sup>2</sup> area of the water chilling tank outlet band, air cooling outlet band and diet section by swab method. Swab samples of the mechanical defeathering machine were taken from the rubber fingers (~137 cm<sup>2</sup>). Total number of mesophilic aerobic bacteria (TMAB), *Enterobacteriaceae*, coliform group bacteria counts, and *Salmonella* spp. prevalence were determined.

### Microbiological Analysis

Plate Count Agar medium (PCA) (Merck, Darmstadt/Germany) was used for total mesophilic aerobic bacteria counts, and petri plates incubated at 35 °C for 24-48 hours. Colonies were counted at the end of the incubation period (23). Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD) (Merck, Darmstadt/Germany) medium was used to detect count of *Enterobacteriaceae*. After the first layer of medium solidification, the second

layer of VRBD was added to the petri plates and plates were incubated at 37 °C for 24 hours. At the end of the incubation period, colonies with a red color of 1-2 mm in diameter and a ring shape around them were evaluated as a suspect colony of *Enterobacteriaceae*. At least 5 of the suspected colonies were taken and tested for oxidase and then total numbers were determined (24). Violet Red Bile Agar (Merck, Darmstadt/Germany) medium was used for coliform bacteria counts and petri plates were incubated for 24 hours at 37 °C. After the incubation period, all red colored colonies in petri dishes were counted as coliform bacteria (25).

*Salmonella* spp. samples were analyzed with the Mini Vidas at the slaughterhouse laboratory. For *Salmonella* spp. analysis the samples were taken with sterile sponges (10x10 cm<sup>2</sup>, sponges weight approximately 25 g). Sponges were incubated at 41.5 °C for 18-24 hours in 225 ml buffered peptone water containing 1 ml *Salmonella* supplement (Biomerieux, France) for the pre-enrichment step. After the pre-enrichment step, 0.5 ml of samples were added to the wells of the Vidas up *Salmonella* test kits and heated on the Vidas heat&go for 5 minutes. Subsequently, the results were evaluated after 48 minutes. Manufacturer's guidelines were followed during *Salmonella* spp. analysis (BioMerieux, France).

### Statistical Analysis

In this study, the microbiological data were converted to log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup> and statistical analyzes were performed. For this purpose, conformity to the assumption of normality from the prerequisites of the parametric tests was performed using the Shapiro-Wilk test and the homogeneity of the variances were checked with the Levene "test and then parametric tests were used. Analysis of variance (ANOVA) test was performed determine the differences between the groups and post-hoc Tukey test was used for comparisons of the groups. The Kruskal Wallis test was used for the analysis of variance of the groups with no normality assumption, and pairwise comparisons of the groups were evaluated with the Mann Whitney U test.



All statistical analyzes were performed using the SAS (Statistical Analysis System) package program (26). The statistical significance level was accepted as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Total Mesophilic Aerobic Bacteria (TMAB) Results

The TMAB counts on the defeathering machine fingers were 5.69, 4.55, and 4.64  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> before sanitation, 20 min and 30 min after sanitation, respectively (Table 1). The differences between TMAB counts before, 20 and 30 min after sanitation were significant ( $p < 0.05$ ). The differences in TMAB number before and after sanitation on the water chilling outlet band were not significant ( $p > 0.05$ ). TMAB counts on air cooling outlet band were significant between before and 20 and 30 min after sanitation ( $p < 0.05$ ). In the diet section, the difference between before sanitation and 20 minutes after sanitation was insignificant ( $p > 0.05$ ), while the difference between before sanitation and 30 minutes after sanitation was significant ( $p < 0.05$ ).

Before sanitation, the differences between the TMAB counts of defeathering machine fingers and other sampling points were significant ( $p < 0.05$ ). A

significant difference was found between the water chilling and air cooling outlet bands, while there were not found any differences between the water chilling and air cooling outlet bands at 20 minutes after the sanitation ( $p < 0.05$ ). 30 min after sanitation, the TMAB numbers were 4.64  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> in defeathering machine fingers, while the water chilling output, the air cooling output and the diet section final product bands were 0.47, 0.19, and 0.09  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>, respectively. The differences between the defeathering stage and other sampling points were significant ( $p < 0.05$ ).

### Enterobacteriaceae Results

The difference between pre-sanitation and 20 min post-sanitary counts of *Enterobacteriaceae* was statistically significant ( $p < 0.05$ ), while the difference between before sanitation and 30 min after sanitation was insignificant ( $p > 0.05$ ). The difference between before sanitation, 20 and 30 min after sanitation in the water chilling outlet band was significant ( $p < 0.05$ ). *Enterobacteriaceae* counts in the air cooling outlet band, before sanitation and 20 min after sanitation were 2.60, 1.46  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> respectively, while

**Table 1.** The mean numbers of total mesophilic aerobic bacteria of the swab samples ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>±SD), (n: 12)

| Sampling Points | Sampling Time (min)     |                          |                         |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                 | Before Sanitation       | 20 min After Sanitation  | 30 min After Sanitation |
| DF              | 5.69±0.83 <sup>ax</sup> | 4.55±1.22 <sup>ay</sup>  | 4.64±0.83 <sup>ay</sup> |
| WC              | 0.32±0.86 <sup>cy</sup> | 1.91±1.65 <sup>bx</sup>  | 0.47±0.93 <sup>by</sup> |
| AC              | 3.45±0.5 <sup>bx</sup>  | 1.52±1.64 <sup>by</sup>  | 0.19±0.38 <sup>bz</sup> |
| DS              | 3.03±0.4 <sup>bx</sup>  | 3.11±2.13 <sup>abx</sup> | 0.09±0.31 <sup>by</sup> |

abc: The numbers in the same column with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

xyz: The numbers in the same row with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

DF: Defeathering machine fingers; WC: Water chilling outlet band; AC: Air chilling outlet band; DS: Diet section.

*Enterobacteriaceae* was not detected 30 min after sanitation. The differences between before and after sanitation (20 and 30 min) were significant ( $p < 0.05$ ). The differences between 20 min and 30 min after sanitation in diet section was significant ( $p < 0.05$ ).

Although, *Enterobacteriaceae* counts differences between the defeathering machine fingers and water chilling output band were insignificant ( $p > 0.05$ ), it was found that the differences among the defeathering machine fingers and other sampling points were significant ( $p < 0.05$ ). It was determined that the difference between sampling points 20 min after sanitation was not significant ( $p > 0.05$ ) and 30 min difference between defeathering machine fingers and other sampling points was significant ( $p < 0.05$ ) (Table 2).

### Coliform Bacteria Results

Coliform bacteria counts in the defeathering machine fingers were found as 4.16, 2.72, and 3.37 log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup> before sanitation, 20 min after sanitation, and 30 min after sanitation, respectively. Coliform bacteria count differences between before sanitation and 20 min after sanitation on defeathering machine fingers were significant ( $p < 0.05$ ). The differences among before sanitation, 20 min, and 30 min after sanitation on the water chilling outlet

band were significant ( $p < 0.05$ ), while the differences on the air cooling outlet band were insignificant ( $p > 0.05$ ). The difference between the before sanitation and 20 min after sanitation in the dietary section final product line was insignificant ( $p > 0.05$ ). However, the difference between before sanitation and 30 min after sanitation was significant ( $p < 0.05$ ). The differences among the defeathering step and other sampling points were significant before and 30 min after sanitation ( $p < 0.05$ ) (Table 3).

### Salmonella spp. Results

While 30 min after sanitation *Salmonella* spp. was not found in the diet section outlet band and air chilling outlet band, *Salmonella* spp. prevalences before sanitation in defeathering machine fingers, water chilling outlet band and air cooling outlet band were found as 66.67%, 8.33% and 8.33%, respectively. 20 min after sanitation, *Salmonella* spp. prevalence in defeathering machine fingers was found as 33.33%, while on water chilling, air cooling and diet section were not detected. The prevalences of *Salmonella* spp. in defeathering machine finger and water chilling outlet band 30 min after sanitation were found as 16.67% and 8.33%, respectively. *Salmonella* spp. was not detected on the air cooling outlet band and the diet section (Table 4).

Table 2. The mean numbers of *Enterobacteriaceae* of the swab samples (log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup>±SD), (n: 12)

| Sampling Points | Sampling Time (min)      |                         |                          |
|-----------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                 | Before Sanitation        | 20 min After Sanitation | 30 min After Sanitation  |
| DF              | 4.00±2.09 <sup>ax</sup>  | 2.43±0.58 <sup>ay</sup> | 3.27±0.69 <sup>axy</sup> |
| WC              | 2.74±0.82 <sup>abx</sup> | 1.47±1.35 <sup>ay</sup> | 0.32±0.86 <sup>bz</sup>  |
| AC              | 2.60±0.49 <sup>bx</sup>  | 1.46±1.46 <sup>ay</sup> | 0.00±0.00 <sup>bz</sup>  |
| DS              | 2.57±0.86 <sup>bx</sup>  | 1.55±1.36 <sup>ay</sup> | 0.00±0.00 <sup>bz</sup>  |

ab: The numbers in the same column with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

xyz: The numbers in the same row with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

DF: Defeathering machine fingers; WC: Water chilling outlet band; AC: Air chilling outlet band; DS: Diet section.

## DISCUSSION

This study was conducted to investigate the effectiveness of the sanitation (cleaning + disinfection) treatment applied in poultry slaughterhouses with the samples taken from steps with different levels of pollution, which can be the source for cross contamination in slaughterhouses. Although there are many studies on poultry meat, carcass parts and decontamination materials (6-8, 11, 15, 17-22), a very limited number of literature regarding effectiveness of sanitization are available. Results of these studies summarized below.

Rasschaert et al. (27) investigated the slaughtering process for *Salmonella* contamination in 3 different broiler slaughterhouses located in Belgium and applying the same production procedure. There had been analysed samples for *Salmonella* spp. which were taken one hour before the starting slaughter and a few hours after the cleaning-disinfection process from defeathering machine, which was selected as an important equipment for contamination, and it stated that the defeathering machine was risky for *Salmonella* spp. contamination. They detected *Salmonella* spp. in the first slaughterhouse, 24 samples were tested and 17

**Table 3.** The mean numbers of coliform bacteria of the swab samples ( $\log_{10}$  cfu/cm $^2$ ±SD), (n: 12)

| Sampling Points | Sampling Time (min)     |                          |                          |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                 | Before Sanitation       | 20 min After Sanitation  | 30 min After Sanitation  |
| DF              | 4.16±1.53 <sup>ax</sup> | 2.72±0.55 <sup>ay</sup>  | 3.37±0.75 <sup>axy</sup> |
| WC              | 2.76±0.59 <sup>bx</sup> | 1.40±1.44 <sup>aby</sup> | 0.46±1.00 <sup>by</sup>  |
| AC              | 0.47±0.93 <sup>cy</sup> | 0.99±1.35 <sup>bx</sup>  | 0.00±0.00 <sup>by</sup>  |
| DS              | 2.44±0.81 <sup>bx</sup> | 1.65±1.43 <sup>abx</sup> | 0.00±0.00 <sup>by</sup>  |

abc: The numbers in the same column with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

xy: The numbers in the same row with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

DF: Defeathering machine fingers; WC: Water chilling outlet band; AC: Air chilling outlet band; DS: Diet section.

**Table 4.** *Salmonella* spp. prevalences of the swab samples (%) (Positive samples/Total samples), (n: 12)

| Sampling Points | Sampling Time (min) |                         |                         |
|-----------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|
|                 | Before Sanitation   | 20 min After Sanitation | 30 min After Sanitation |
| DF              | 66.67% (8/12)       | 33.33% (4/12)           | 16.67% (2/12)           |
| WC              | 8.33% (1/12)        | 0.00% (0/12)            | 8.33% (1/12)            |
| AC              | 8.33% (1/12)        | 0.00% (0/12)            | 0.00% (0/12)            |
| DS              | 0.00% (0/12)        | 0.00% (0/12)            | 0.00% (0/12)            |

DF: Defeathering machine fingers; WC: Water chilling outlet band; AC: Air chilling outlet band; DS: Diet section.

(70.83%) of them received from the clamps, conveyor belts and wheels of the defeathering machine, from the fingers and between the fingers were positive in means of *Salmonella* spp., in the 2nd slaughterhouse 12 samples were tested and 7 (58.3%) of them taken from out of the bands among the conveyor belt, wheels and fingers were positive. *Salmonella* spp. was not detected in the samples taken from the third slaughterhouse. They emphasized that transport vessels and the slaughterhouse environment could also be contamination source for the final products. In our study, *Salmonella* spp. was detected in 66.7% of the samples taken from the defeathering machine in pre-sanitation stage.

In a study conducted in the poultry slaughterhouse in South Africa 7.7 log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup> TMAB count was reported on the defeathering machine fingers (28). In this study, TAMB was found 5.69 log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup> before the sanitation. The reason of the lower number of detected TMAB, because of the differences in the sampling methods between the studies, and the poultry slaughtered at different times also may have different microbial loads.

Geornaras et al. (28), was found the number of TMAB more than 6 log<sub>10</sub> cfu /25 cm<sup>2</sup> and the number of *Enterobacteriaceae* more than 4 log<sub>10</sub> cfu/25 cm<sup>2</sup> in swabs taken from a band in the packaging section. In our study, the TMAB numbers of the 2 different bands (air cooling and final product bands) in the packaging area of the slaughterhouse were 3.45 and 3.03 log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup> respectively; while the number of *Enterobacteriaceae* were 2.60 and 2.57 log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup>, respectively.

Arnold (29) determined the number of TMAB in the rubber fingers of three different slaughterhouse as 2.98 log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup> for the first slaughterhouse, 3.70 log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup> for the second slaughterhouse, and 5.57 log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup> for the third slaughterhouse. In our study, number of total mesophilic aerobic bacteria were detected as 5.69 log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup> at the defeathering machine finger. The number of total

mesophilic bacteria that was found in the other two slaughterhouse by Arnold (29) were considerably lower than our findings, although there is a similarity between the TMAB count of the third slaughterhouse and the number of TMAB counts we found in our current study.

Abu-Ruwaida et al. (30) investigated the microbial contamination of equipment and containers in two different poultry slaughterhouse in Kuwait and found that in the first and second slaughterhouse of 10-20 cm<sup>2</sup> of chicken pick-up band, one of the surfaces chosen from packaging area had 5.4 and 5.3 log<sub>10</sub> TMAB, respectively. In the present study, 3.45 log<sub>10</sub> TMAB were detected in each cm<sup>2</sup> in the swab result of pre-sanitation from the air-cooling outlet band. The reasons of the differences between these studies and our findings, may be the sampling method, the water temperature used in scalding, the chemical decontaminants added to the scalding water, the duration of scalding, the outer surface pollution ratings of the poultry, the amount of water entering the water chilling tanks, the type and amount of disinfectants used in the water chilling, the cleaning, disinfection, and hygiene program applied in the slaughtering process.

In this study, the number of microorganisms detected in samples that were taken at 20 and 30 min after sanitation in the same places were higher than the pre-sanitation values, this can be due to cracks, deformations or roughness of the fingers or finger surfaces where swabs were taken. Effective sanitation does not take place in these areas due to the fact that both sanitary and disinfectant substances can not sufficiently affect in these sites. There is no criteria for hygienic condition of tools and equipments in the Turkish Codex Alimentarius, Regulation on Microbiological Criteria Annex-2 In production hygiene criteria (31), there is only microbial criteria for broiler and turkey carcasses. However, in our study, it was determined that the *Salmonella* spp. prevalence reduced as passing from

the dirty area to the clean area, and it was evaluated as a positive result that *Salmonella* spp. was not detected in the final product band.

In conclusion, microorganisms from the environment after the cleaning process can multiply rapidly in the food production enterprises and cause contamination in the next production. In addition to, some of the microorganisms during cleaning process can be removed by the water and spreaded to other surfaces. For this reason, a disinfection process must be performed after the cleaning process. The disinfection process, must completely destroy or reduce level of microorganisms that do not cause harmful effects. Equipment, tools, conveyor belts etc. used in operation should not be deformed, torn, cracked, rough or worn. Due to this, to change the

defective, and problematic tools and equipments at the end of every working day or taking the necessary precautions by taking control of the slaughter line are very important for hygiene. Effective hygiene procedures are also essential for effective hygiene measures (including an effective hygiene program, appropriate water use, appropriate disinfectant selection and replacement at regular intervals, appropriate dosage, appropriate duration of effect, personnel training, etc.). In addition, it is extremely important for product hygiene that the necessary hygiene measures (an effective hygiene program, the appropriate use of water, appropriate disinfectant selection and replacement at regular intervals, appropriate dose, appropriate duration of effect, personnel training etc.) should be applied effectively.

## ACKNOWLEDGEMENT

This study was summarized from the master's thesis and supported by the Firat University Scientific Research Projects Unit (Project number: VF.16.15).

## REFERENCES

1. Buncic S, Sofos J. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Res Int*, 2012; 45(2):641-55.
2. Rajan K, Shi Z, Ricke SC. Current aspects of *Salmonella* contamination in the US poultry production chain and the potential application of risk strategies in understanding emerging hazards. *Crit Rev Microbiol*, 2017; 43(3):370-92.
3. Rouger A, Tresse O, Zagorec M. Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics. *Microorganisms*, 2017; 5(3):50.
4. Chang YH. Prevalence of *Salmonella* spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. *J Food Prot*, 2000; 63(5):655-8.
5. Del Rio E, Panzio-Moran M, Prieto M, Alonso-Calleja C, Capita R. Effects of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *Int J Food Microbiol*, 2007; 115(3):268-80.
6. Bolder NM. Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends Food Sci Technol*, 1997; 8(7):221-7.
7. Dinçer AH, Baysal T. Decontamination techniques of pathogen bacteria in meat and poultry. *Crit Rev Microbiol*, 2004; 30(3):197-204.
8. Ellerbroek L, Lienau JA, Alter T, Schlichting D. Effectiveness of different chemical decontamination methods on the *Campylobacter* load of poultry carcasses. *Fleischwirtschaft*, 2007; 4:224-7.
9. Loretz M, Stephan R, Zweifel C. Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: A literature survey. *Food Control*, 2010; 21:791-804.
10. Gonzalez-Fandos E, Dominguez JL. Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Food Control*, 2007; 18:842-6.

11. Northcutt J, Smith D, Ingram KD, Hinton AJ, Musgrove M. Recovery of bacteria from broiler carcasses after spray washing with acidified electrolyzed water or sodium hypochlorite solutions. *Poult Sci*, 2007; 86(10):2239-44.
12. Sinhamahapatra M, Biswas S, Das AK, Bhattacharyya D. Comparative study of different surface decontaminants on chicken quality. *Br Poult Sci*, 2004; 45(5):624-30.
13. Smulders FJ, Greer GG. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *Int J Food Microbiol*, 1998; 44(3):149-69.
14. Kim JW, Slavik MF. Cetylpyridinium chloride (CPC) treatment on poultry skin to reduce attached *Salmonella*. *J Food Prot*, 1996; 59(3):322-6.
15. Capita R, Alonso-Calleja C, del Camino García-Fernández M, Moreno B. Activity of trisodium phosphate compared with sodium hydroxide wash solutions against *Listeria monocytogenes* attached to chicken skin during refrigerated storage. *Food Microbiol*, 2002; 19(1):57-63.
16. Şener A, Temiz A. Tavuk kesimhane ve işletmelerinde kullanılan ticari dezenfektanlar ve etkinlikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Derg*, 2004; 10:1-28.
17. Benli H, Sanchez-Plata MX, İlhak Oİ, Nunez De Gonzalez MT, Keeton JT. Evaluation of antimicrobial activities of sequential spray applications of decontamination treatments on chicken carcasses. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2015; 28(3):405-10.
18. Escudore-Gilete ML, Gozalez-Miret ML, Hredia FJ. Multivariate study of the decontamination process as function of time, pressure and quantity of water used in washing stage after evisceration in poultry meat production. *J Food Eng*, 2005; 69(2):245-51.
19. James C, James SJ, Hannay N, Purnell G, Barbedo-Pinto C, Yaman H, Araujo M, et al. Decontamination of poultry carcasses using steam or hot water in combination with rapid cooling, chilling or freezing of carcass surfaces. *Int J Food Microbiol*, 2007; 114(2): 195-203.
20. Musavian HS, Krebs NH, Nonboe U, Corry JE, Purnell G. Combined steam and ultrasound treatment of broilers at slaughter: A promising intervention to significantly reduce numbers of naturally occurring *Campylobacters* on carcasses. *Int J Food Microbiol*, 2014; 176: 23-8.
21. İlhak Oİ, İncili GK, Durmuşoğlu H. Evaluation of effect of thymol combined with lactic acid or sodium lactate on psychrophilic bacteria and *Salmonella* spp. on chicken drumstick. *Ann Anim Sci*, 2017; 17(1): 271-80.
22. İlhak Oİ, İncili GK, Durmuşoğlu H. Effect of some chemical decontaminants on the survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* with different attachment times on chicken drumstick and breast meat. *J Food Sci Technol*, 2018; 55(8):3093-7.
23. United States Department of Agriculture/ Food Safety and Inspection Service- USDA/FSIS: Microbiology Laboratory Guidebook. Metot 3.01, Quantitative analysis of bacteria in foods as sanitary indicators. 2011.
24. International Organization for Standardization (ISO) 21528-2:2004: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae-Part 2: Colony-count method.
25. International Organization for Standardization (ISO) 4832:2006 (E): Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration on coliforms-Colony-count technique. 2006.
26. Statistical Analysis System (SAS).Version 8.0. SAS Institute. Cary, North Caroline, USA. 1999.
27. Rasscahert G, Houf K, De Zutter L. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *J Appl Microbiol*, 2007; 103:333-41.
28. Geornaras I, de Jesus A, Van Zyl E, von Holy A. Microbiological survey of South African poultry processing plant. *J Basic Microbiol*, 1995; 35(2):73-82.
29. Arnold JW. Bacterial contamination on rubber picker fingers before, during and after processing. *Poult Sci*, 2007; 86(12):2671-5.
30. Abu-Ruwaida AS, Savaya WN, Dashti BH, Murad M, Al-Otman HA. Microbial quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. *J Food Prot*, 1994; 57(10):887-92.
31. Turkish Codex Alimentarius: Turkish Codex Alimentarius, Regulation on Microbiological Criteria Annex-2, In production hygiene criteria Regulation No:28157, December 29, 2011, Ankara, Turkey.

# Assessment of the anti-quorum sensing effect of *Lactobacillus* sp. metabolites on expression levels of QS-related genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1'de QS ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin anti-quorum sensing etkilerinin belirlenmesi

Didem KART<sup>1</sup>, Suna Sibel GÜRPINAR<sup>2</sup>, Müjde ERYILMAZ<sup>2</sup>

## ABSTRACT

**Objective:** *Pseudomonas aeruginosa* is an important pathogen associated with nosocomial infections and its pathogenicity is mostly linked with the quorum sensing (QS) system. The aim of this study was to evaluate the anti-QS activity of the metabolites of vaginal *Lactobacillus* isolates and to investigate the effect of these metabolites on transcriptional regulation of QS related genes in *P. aeruginosa* PAO1.

**Methods:** In this study, 13 *Lactobacillus* isolates that were previously identified by 16S rRNA gene sequence analysis were used. Metabolites of these isolates were assessed for the anti-QS activity by using *Chromobacterium violaceum* CV12472. The influence of metabolites on the expression of QS related genes was also examined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

**Results:** All tested metabolites exhibited anti-QS activity with the appearance of a non-pigmented zone of *C. violaceum*. All tested quorum sensing-related genes (*lasI*, *lasR*, *rhlR* and *mvfR*) in *P. aeruginosa* PAO1 showed significant down-regulation after treating with the metabolites.

## ÖZET

**Amaç:** *Pseudomonas aeruginosa* hastane enfeksiyonları ile ilişkili önemli bir patojen olup patojenitesi çoğunlukla quorum sensing (QS) sistemi ile ilişkilidir. Bu çalışmanın amacı, vajinal *Lactobacillus* izolatlarının metabolitlerinin anti-QS aktivitelerinin değerlendirilmesi ve metabolitlerin *P. aeruginosa* PAO1'in QS ilişkili genlerinin transkripsiyonel regülasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

**Yöntem:** Çalışmamızda daha önce 16S rRNA gen dizi analizi ile tanımlanmış olan 13 adet *Lactobacillus* izolatı kullanılmıştır. Bu izolatların metabolitlerinin, *Chromobacterium violaceum* CV12472 suşu kullanılarak anti-QS aktiviteleri değerlendirilmiştir. Metabolitlerin QS ile ilişkili genlerin ekspresyonları üzerindeki etkisi kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu RT-qPCR ile araştırılmıştır.

**Bulgular:** Test edilen tüm metabolitler *C. violaceum*'un şeffaf zon bölgesi görünümü ile karakterize edilen anti-QS aktivite göstermişlerdir. Metabolitlerle temas sonrasında *P. aeruginosa* PAO1'de, test edilen tüm quorum sensing ilişkili genler (*lasI*, *lasR*, *rhlR* ve *mvfR*) anlamlı bir down-regülasyon göstermişlerdir.

<sup>1</sup>Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Ankara

<sup>2</sup>Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Didem KART  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi 06100 Ankara - Türkiye  
E-posta / E-mail : dturk@hacettepe.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 19.09.2019  
Kabul Tarihi / Accepted : 03.12.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.57873

Kart D, Gürpınar SS, Eryılmaz M. Assessment of the anti-quorum sensing effect of *Lactobacillus* sp. metabolites on expression levels of QS-related genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 311-318

**Conclusion:** New anti-infection agents from natural resources with a different mode of action are necessary due to the increasing occurrence of antibacterial resistance. Our study highlights the possible usage of *Lactobacillus* metabolites as an anti-QS agent against *P. aeruginosa* biofilm cells in vitro.

**Key Words:** anti-quorum sensing activity, *Lactobacillus* sp., metabolites, RT-qPCR. *Pseudomonas aeruginosa*

**Sonuç:** Antibakteriyel direncin artması nedeniyle farklı etki mekanizmasına sahip doğal kaynaklardan köken alan, enfeksiyonlara karşı yeni ajanlar gerekmektedir. Çalışmamız, in vitro *Pseudomonas* biyofilmlerinin kontrolünde *Lactobacillus* metabolitlerinin olası anti-QS ajanı olarak kullanılabilirliklerini vurgulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** anti-quorum sensing aktivitesi, *Lactobacillus* sp., metabolitler, RT-qPCR, *Pseudomonas aeruginosa*

## INTRODUCTION

*Pseudomonas aeruginosa* is one of the significant opportunistic pathogens which causes numerous chronic infections such as severe burn infections, urinary tract infections, blood circulation and nosocomial infections (1). *P. aeruginosa* communicates and coordinates with other cells in a microbial population using small signaling molecules such as acyl-homoserine lactones (AHLs) known as quorum sensing (QS), contributing to its pathogenicity by regulating multiple virulence properties (2). QS system controls the expressions of various virulence genes depending on cell density and also triggers the biofilm formation which is one of the most important virulence factors of *P. aeruginosa* (3). *P. aeruginosa* has two QS systems known as *lasR/II* and *rhlI/R*, which use AHL signaling molecules. *LasI* is necessary for the synthesis of N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) and *LasR* is a transcriptional regulator of virulence genes (4, 5). Among *rhlI/rhIR* synthase proteins, *rhlI* mediates the synthesis of the N-butyryl-homoserine lactone (c4-HSL) signaling molecule and *RhIR* is a transcriptional regulator (6). The synthesis of various virulence factors such as elastase, protease, exotoxin A, pyocyanin pigment production, rhamnolipids and biofilm formation which play an important role in cellular cytotoxicity

and acute infections of *P. aeruginosa* are controlled by *lasR/II* and *rhlI/R* (7, 8).

QS inhibitors (QSIs) do not inhibit the growth of the pathogenic microorganism but lead to suppression of pathogenicity by decreasing virulence properties (9). Unlike conventional antibiotics targeting the cellular metabolic processes of the microorganism, QSIs inhibit the communication between the biofilm cells without exerting selective pressure for the development of resistance (3). Hence, inhibitor agents blocking the QS system in bacteria are considered as the possible options to fight with the infections caused by *P. aeruginosa*. The existence of bacterial persistence in chronic infections and increases in reduced susceptibility profiles to antimicrobials indicate the necessity of further investigations on anti-QS agents, especially from natural sources (5).

*Lactobacillus* species are normal flora members of mucosal surfaces in humans and some metabolites of *Lactobacillus* spp. such as lactic acid, acetic acid, hydrogen peroxide, and bacteriocin have the preservative property (10, 11). In the literature, the anti-biofilm effects of *Lactobacillus* spp. against *Staphylococcus aureus* and *P. aeruginosa* resistant strains were reported and many researchers have



focused on their use as alternative agents in the treatment of biofilm-associated infections (12-14).

The main objectives of this study were to investigate the anti-QS activity of the metabolites of vaginal *Lactobacillus* isolates and to evaluate the effect of these metabolites on the expression profile of QS-related genes in *P. aeruginosa* PAO1.

## MATERIAL and METHOD

### *Lactobacillus* isolates

In this study, metabolites of one *L. helveticus*, one *L. fermentum*, one *L. jensenii*, six *L. gasseri*, two *L. vajinalis*, and two *L. crispatus* vaginal isolates which were previously identified at the species-level by analyzing the 16S rRNA gene sequence were used (11).

### Obtaining metabolites

A total of 13 *Lactobacillus* isolates were grown on Rogosa Agar for 24-48 hours following the inoculation into tubes containing 5mL of De Man-Rogosa Sharpe (MRS) Broth (pH 6.5) (Merck, Germany), under anaerobic conditions for 72 hours at 37°C. After the incubation period, the cells were removed by centrifugation at 12000 g, for 10 min, at 4°C. Cell-free supernatants (CFS) of the cells were filtered for the sterilization (0.45 µm pore size) (Minisart, Germany) (11, 15).

### Biofilm formation

*P. aeruginosa* PAO1 was incubated for 24 hours at 37°C in Brain Heart Infusion (BHI) Broth. After the incubation period, final inoculum suspensions containing ~10<sup>6</sup> cfu/ml of *P. aeruginosa* were prepared in BHI. For each test condition, 100 µl of the inoculum suspensions were added to the wells of 96-well microtiter plates following the incubation for 4 hours at 37 °C. At the end of 4 hours, the wells were washed with phosphate buffer saline (PBS) three times in order to remove the non-adherent cells. After the washing step, the plates

were incubated for an additional 20 hours to form mature biofilms (16).

### Treating of the biofilm cells with the metabolites of *Lactobacillus* isolates

The metabolite of each isolate (100 µl) was transferred into the wells containing mature *P. aeruginosa* biofilms and the plates were incubated for 24 hours at 37 °C. After incubation time, the plates were vortexed for 5 minutes and then sonicated 3 times for 5 minutes. Biofilm cells were then transferred into a sterile tube and evaluated for anti-QS activity.

### Detection of anti-QS activity

The agar well diffusion method was performed against reporter bacteria *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. One hundred microliters of the metabolites were loaded onto the wells (8 mm diameter) made on Luria Bertani Agar plates, pre-inoculated with *C. violaceum*. The plates were observed for the presence of zone of violacein inhibition after 24 hours of incubation at 30 °C (3). The appearance of clear zone of *C. violaceum* around the well loaded with the metabolites of *Lactobacillus* sp. isolates indicated the potential anti-QS activity.

### Gene expression analysis

*P. aeruginosa* biofilms were grown and harvested and incubated with *Lactobacillus* sp. metabolites as described above. The mRNA expression changes of QS-related genes including *rhIR*, *rhII*, *lasR*, *lasI* and *mvfR* in *P. aeruginosa* biofilms were assessed using quantitative polymerase chain reaction qPCR. Total RNA was extracted by RNA Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (Roche Life Science). Total RNA was quantified in each sample using a NanoDrop spectrophotometer (BioDrop, Cambridge, UK). First-strand cDNA was synthesized by Evoscript Universal cDNA Master according to the manufacturer's instructions (Roche Life Science). To quantify cDNA, primers that correspond to *P. aeruginosa* genes were used (17). The sequences of the primers are presented

in Table 1. Real-time PCR (LightCycler 96 Instrument) was carried out with the Faststart Essential DNA Green Master (Roche Life Science) in 96-well plates in Roche LightCycler 96 Instrument (Roche, USA). Five  $\mu$ l of 1:2 diluted cDNA samples and 20  $\mu$ l of master mix (containing the primers) were added to each well. The parameters for real-time PCR reactions included a single cycle of 95°C for 5 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The formula, fold change =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , was used to calculate the expression levels of tested genes (18). For the calculations of relative gene expression levels, these normalized data were used. Each test data from independent experiments were repeated at least three times.

### Statistical analysis

Statistical data analysis was performed using the SPSS program (Version 23, SPSS, Chicago, IL, USA). All data are expressed as mean  $\pm$  standard error. Student's t-test was used for comparisons between the *Lactobacillus* spp. metabolites treated and untreated groups. P values <0.05 were considered significant.

## RESULTS

### Anti-QS activity of *Lactobacillus* sp. metabolites

The QS inhibitory activity was determined by the presence of transparent inhibition zones around the

wells that were filled with the metabolites. All tested metabolites showed anti-QS activity (indicated as A in Figure 1).

Additionally, the supernatants of *P. aeruginosa* cells were treated with the metabolites of *Lactobacillus* isolates in the biofilm environment which were examined for their anti-QS activity. Anti-QS effects of the metabolites of *Lactobacillus* isolates and the metabolites obtained after contact with *P. aeruginosa* biofilm cells were determined. Our results showed that there were decreases in the radius of inhibition zones of violacein pigment after exposure to the biofilm cells indicating that the biofilm environment leads to a decrease in the anti-QS activities of the *Lactobacillus* spp. metabolites (indicated as B in Figure 1).

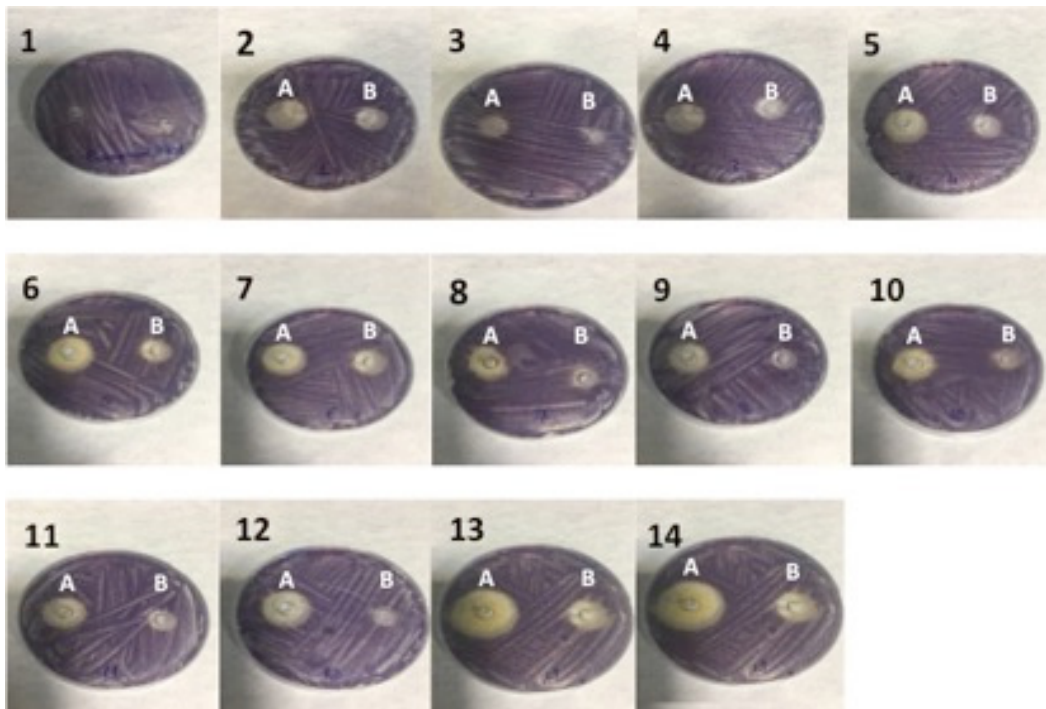
### Expression of QS genes in *P. aeruginosa*

The metabolites of isolates were tested on *P. aeruginosa* biofilms and their effects on the expression levels of genes encoding QS signal molecules that were responsible for the communications between the cells in biofilms were determined. The mRNA expression results of tested genes in *P. aeruginosa* were shown in Figure 2. Compared with the non-treated biofilm cells, mRNA levels of *rhlR*, *lasR*, *lasI* and *mvf* were significantly down-regulated in all treated biofilm cells of *P. aeruginosa* ( $p < 0.05$ ).

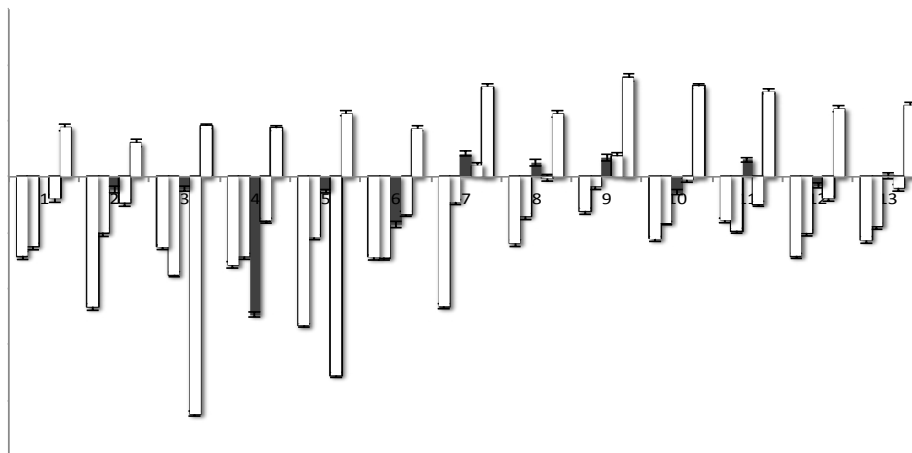
Table 1. Primers used in this study

| Genes        | Forward              | Reverse              |
|--------------|----------------------|----------------------|
| <i>mvf</i>   | AACCTGGAAATCGACCTGTG | AACCTGGAAATCGACCTGTG |
| <i>lasR</i>  | ACGCTCAAGTGAAAATTGG  | GTAGATGGACGGTTCCAGA  |
| <i>lasI</i>  | CTACAGCCTGCAGAACGACA | ATCTGGGTCTTGGCATTGAG |
| <i>rhlR</i>  | AGGAATGACGGAGGCTTTTT | CCCGTAGTTCTGCATCTGGT |
| <i>proC*</i> | GCGTATTTCTTCTGCTGA   | CCTGCTCCACTAGTGCTTCG |

\*Housekeeping gene.



**Figure 1.** (A) QS inhibitory activity of the metabolites of *Lactobacillus* isolates (B) QS inhibitory activity of the *P. aeruginosa* biofilm supernatants treated with the metabolites of *Lactobacillus* isolates 1: MRS broth as negative control 2: *L. helveticus* 1; 3: *L. fermentum* 1; 4: *L. jensenii* 1; 5: *L. gasseri* 1; 6: *L. gasseri* 2; 7: *L. gasseri* 3; 8: *L. gasseri* 4; 9: *L. gasseri* 5; 10: *L. vajinalis* 1; 11: *L. crispatus* 1; 12: *L. vajinalis* 2; 13: *L. crispatus* 2; 14: *L. gasseri* 6.



**Figure 2.** Relative expression results of QS-related genes of *P.aeruginosa* PAO1.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. 1: *L.helveticus* 1; 2: *L. fermentum* 1; 3: *L. jensenii* 1; 4: *L. gasseri* 1; 5: *L. gasseri* 2; 6: *L. gasseri* 3; 7: *L. gasseri* 4; 8: *L. gasseri* 5; 9: *L. vajinalis* 1; 10: *L. crispatus* 1; 11: *L. vajinalis* 2; 12: *L. crispatus* 2; 13: *L. gasseri* 6.

## DISCUSSION

*P. aeruginosa* is one of the pathogens leading to chronic and persistent infections, usually caused by biofilms controlled by QS system (19). Current chemical agents are inadequate for the eradication of biofilms, hence new strategies that can be effective are needed. Results from several studies suggest that targeting the QS system in *P. aeruginosa* may be a new strategy to struggle against biofilm-related *P. aeruginosa* infections (20, 21). Activation of the QS system may lead to increases in virulence of pathogens such as *P. aeruginosa* and agents particularly inhibiting this system are called anti-QS inhibitors (22). The present study is particularly important in terms of investigating the anti-QS activity of bacterial metabolites of vaginal flora member *Lactobacillus* sp. which have attracted the attention of researchers in recent years. Our results show that suppression of QS-mediated violacein production of *C. violaceum*, when threatened with the metabolites of 13 different *Lactobacillus* isolates, is a preliminary indicator that these strains have anti-QS property. The inhibition zones of violacein around the wells separately filled with both the metabolites of *Lactobacillus* isolates only and with the metabolites obtained after contact with *P. aeruginosa* biofilm cells were determined as anti-QS activity in both conditions. Our results suggest that the interaction with *P. aeruginosa* biofilm cells leads to decreases in the anti-QS activity of the isolates by a yet unknown mechanism.

In a study, antibiofilm effects of *L. pentosus* and *L. plantarum* metabolites isolated from fermented dairy products on *P. aeruginosa* and *Bacillus cereus* biofilms were reported (23). In another study, *L. rhamnosus* EMCC 1105 and *L. gasseri* EMCC 1930 strains were reported to be effective against *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *S. aureus* biofilms (24). Melo et al. showed that the metabolites of *L. fermentum* TCUESCO1 and *L. plantarum* TCUESCO2 which were isolated from cocoa fermentation had antibiofilm

effect on the biofilm of a resistant *S. aureus* CCMB 262 strain (13). In the study of Shokri et al., different metabolites such as lactic acid, acetic acid and formic acid produced by *L. fermentum* isolates showed an anti-biofilm effect on 80 *P. aeruginosa* isolates with multi-drug resistance. The usage of *L. fermentum* isolates as possible therapeutic agents in the control of resistant strains of *P. aeruginosa* has also been proposed in the same study (14).

Gene expression analysis results of anti-biofilm-specific agents have shown that they inhibit biofilm formation by causing a decrease in the expression of QS-related genes (17). The majority of virulence factors such as lasA-elastase, lasA-staphylolytic protease, toxA-exotoxin A, and aprA-alkaline protease produced by *P. aeruginosa* are synthesized through the rhl quorum sensing system that plays an important role in the irreversible attachment phase of the biofilm and the las system which positively controls the rhl system (25). In our study, we determined the transcription levels of QS-related genes such as *lasR/I*, *rhlR/I* and *mvfR* in order to evaluate the possible relationship between the inhibitory effect of *Lactobacillus* supernatants and the QS system. Significant reductions in mRNA levels of *lasR/I*, *rhlR/I* and *mvfR* genes were obtained for all tested *Lactobacillus* supernatants, which explains the anti-biofilm effect of these strains on *P. aeruginosa* biofilms that were observed in our previous study (12).

Soheili et al. have determined the effect of natural antimicrobial compound 3-Phenyllactic acid (PLA) produced by *Lactobacillus* spp. on biofilm formed by *P. aeruginosa* PAO1 and on QS system by using in vitro and in silico analysis. The results of the study showed that pyocyanin, hemolysin, protease, rhamnolipid and swarming activity were decreased and Rhl and Pqs related QS system was suppressed in the biofilm cells treated with PLA (26). Li et al. showed the bacteriocin-mediated antimicrobial effect of *L. plantarum* AB-1 and *L. casei* strains on

*Shewanella baltica*, the specific spoilage organism of the refrigerated shrimp. It was also concluded in the study that this antimicrobial effect was regulated by the AI-2 / LuxS-mediated QS system (27).

## CONCLUSION

Many virulence genes may be overexpressed through the QS system in microorganisms following the transformation into more pathogenic forms. The

discovery of new antimicrobial compounds targeting the QS system will result in inhibition of bacterial communication, thereby showing its activity without selective pressure on microorganisms. In our study, the metabolites of *Lactobacillus* vaginal isolates have been shown to have anti-QS activity. These natural compounds, alone or in combination with antibiotics, maybe future candidates for the treatment of *P. aeruginosa* biofilms in clinics.

## REFERENCES

- Gomez MI, Prince A. Opportunistic infections in lung disease: Pseudomonas infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol*, 2007; 7(3): 244-51. doi:10.1016/j.coph.2006.12.005. 2007.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum Sensing in Bacteria - the Luxr-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *J Bacteriol*, 1994; 176(2): 269-75.
- Rajkumari J, Borkotoky S, Reddy D, Mohanty SK, Kumavath R, Murali A, et al. Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of 5-hydroxymethylfurfural against Pseudomonas aeruginosa PAO1: Insights from in vitro, in vivo and in silico studies. *Microbiol Res*, 2019; 226: 19-26. doi:10.1016/j.micres.2019.05.001.
- Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard A, Iglewski BH, et al. Structure of the Autoinducer Required for Expression of Pseudomonas-Aeruginosa Virulence Genes. *P Natl Acad Sci USA*, 1994; 91(1): 197-201. doi: 10.1073/pnas.91.1.197.
- Sankar Ganesh P, Ravishankar Rai V. Attenuation of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation by medicinal plants against antibiotic resistant Pseudomonas aeruginosa. *J Tradit Complement Med*, 2018; 8(1): 170-7. doi:10.1016/j.jtcme.2017.05.008.
- Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92(5): 1490-4. doi:10.1073/pnas.92.5.1490.
- Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of Pseudomonas aeruginosa las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol*, 1997; 179(18): 5756-67. doi:10.1128/jb.179.18.5756-5767.1997.
- Sawa T, Ohara M, Kurahashi K, Twining SS, Frank DW, Doroques DB, et al. In vitro cellular toxicity predicts Pseudomonas aeruginosa virulence in lung infections. *Infect Immun*, 1998; 66(7): 3242-9.
- Shukla V, Bhatena Z. Broad Spectrum Anti-Quorum Sensing Activity of Tannin-Rich Crude Extracts of Indian Medicinal Plants. *Scientifica*, 2016. doi:582301310.1155/2016/5823013.
- Davoodabadi A, Dallal MMS, Lashani E, Ebrahimi MT. Antimicrobial Activity of Lactobacillus spp. Isolated From Fecal Flora of Healthy Breast-Fed Infants Against Diarrheagenic Escherichia coli. *Jundishapur J Microb*, 2015; 8(12). doi: e2785210.5812/jjm.27852.

11. Eryilmaz M, Gurpinar SS, Palabiyik IM, Guriz H, Gerceker D. Molecular Identification and Antimicrobial Activity of Vaginal *Lactobacillus* sp. *Curr Pharm Biotechno*, 2018; 19(15): 1241-7. doi:10.2174/1389201020666190110164123.
12. Eryilmaz M, Kart D, Gürpinar SS. Investigation of Antibiofilm Activities of *Lactobacillus* sp. Metabolites Isolated from Vaginal Flora. *Journal of Turkish Society of Microbiology*, 2019; 49(3): 169-74.
13. Melo TA, dos Santos TF, de Almeida ME, Fontes LAG, Andrade EF, Rezende RP, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiol*, 2016. doi:25010.1186/s12866-016-0871-8.
14. Shokri D, Khorasgani MR, Mohkam M, Fatemi SM, Ghasemi Y, Taheri-Kafrani A. The Inhibition Effect of *Lactobacilli* Against Growth and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics Antimicro*, 2018; 10(1): 34-42. doi:10.1007/s12602-017-9267-9.
15. Stoyancheva G, Marzotto M, Dellaglio F, Torriani S. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Arch Microbiol*, 2014; 196: 645-53.
16. Kart D, Tavernier S, Van Acker H, Nelis HJ, Coenye T. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, 2014; 30(3): 377-83. doi:10.1080/08927014.2013.878333.
17. Qu L, She PF, Wang YX, Liu FX, Zhang D, Chen LH, et al. Effects of norspermidine on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and eradication. *Microbiologypopen*, 2016; 5(3): 402-12. doi:10.1002/mbo3.338.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 2001; 25(4): 402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
19. Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals*, 2014; 42(1): 1-7. doi:10.1016/j.biologicals.2013.11.001.
20. Brackman G, Hillaert U, Van Calenbergh S, Nelis HJ, Coenye T. Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*. *Res Microbiol*, 2009; 160(2): 144-51. doi:10.1016/j.resmic.2008.12.003.
21. Musk DJ, Hergenrother PJ. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: Effective compounds and promising targets. *Curr Med Chem*, 2006; 13(18): 2163-77. doi:10.2174/092986706777935212.
22. Abraham SVPI, Palani A, Ramaswamy BR, Shunmugiah KP, Arumugam VR. Antiquorum Sensing and Antibiofilm Potential of *Capparis spinosa*. *Arch Med Res*, 2011; 42(8): 658-8. doi:10.1016/j.arcmed.2011.12.002.
23. Khiralla GM, Mohamed EAH, Farag AG, Elhariry H. Antibiofilm effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* cell-free supernatants against some bacterial pathogens. *J Biotech Res*, 2015; 6: 86-95.
24. Ganchev I. Antibiofilm activity of *Lactobacillus* strains. *Sci J Chem*, 2018; 6(5):77-82. doi.org:10.11648/j.sjc.20180605.11.
25. Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiol-Sgm*, 2002; 148: 87-102. doi:10.1099/00221287-148-1-87.
26. Soheili V, Tajani AS, Ghodsi R, Bazzaz BSF. Anti-PqsR compounds as next-generation antibacterial agents against *Pseudomonas aeruginosa*: A review. *Eur J Med Chem*, 2019; 172: 26-35. doi:10.1016/j.ejmech.2019.03.049.
27. Li JP, Yang XY, Shi GC, Chang J, Liu ZY, Zeng MY. Cooperation of lactic acid bacteria regulated by the Al-2/LuxS system involve in the biopreservation of refrigerated shrimp. *Food Res Int*, 2019; 120:679-87. doi:10.1016/j.foodres.2018.11.025.

## Anti-HCV tarama testi eşik değerinin HCV-RNA ve Line Immunoassay testi ile belirlenmesi

### Determination of Anti-HCV scanning test cut-off value by HCV-RNA and Line Immunoassay tests

Alper SARIBAŞ<sup>1</sup>, Altan AKSOY<sup>2</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Anti-HCV yalancı pozitif test sonuçlarını azaltabilmek ve gereksiz ek test isteminin önüne geçebilmek için ülkemize en uygun anti-HCV eşik değerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmaya 202 hastaya ait anti-HCV pozitif örnek dahil edilmiştir. HCV antikorlarının tespiti için Architect anti-HCV kitleri kullanılmıştır ve  $\geq 1$  kesme noktası (S/CO) değerine sahip numuneler reaktif kabul edilmiştir. Ayrıca örneklerin HCV-RNA ve Line immunoassay testleri (LIA) çalışılmıştır.

**Bulgular:** Anti-HCV pozitif 202 örneğin 60 (%29,7)'i HCV-RNA pozitif ve 124 (%61,4)'ünde LIA pozitif bulunmuştur. Anti-HCV S/CO düzeyi 1-5 arasında olan 84 (%41,6), 5-10 arasında olan 29 (%14,4) ve 10'un üstünde olan 89 (44,1) kişi çalışmaya alınmıştır. Anti-HCV seropozitifliği açısından yaş grupları arasında en yüksek oran 40 yaş üzeri (%73,8) grupta tespit edilmiştir. HCV-RNA negatif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (3,2), HCV-RNA pozitif olan grubun medyan anti-HCV düzeyine (13,7) göre anlamlı oranda daha düşük bulunmuştur. LIA pozitif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (13,3) ile karşılaştırıldığında LIA negatif olan grup (2,1) arasındaki fark istatistiksel

#### ABSTRACT

**Objective:** In this study, we aimed to determine optimal anti-HCV cut-off value in our country to reduce anti-HCV false positive test results and prevent unnecessary additional testing.

**Methods:** The study group consisted of samples of 202 anti-HCV positive patients. Detection of HCV antibodies was performed with Architect anti-HCV kits and samples with  $\geq 1$  S/CO were considered as reactive. Samples were also studied with HCV-RNA and Line Immunoassay (LIA) tests.

**Results:** The anti-HCV (S/CO) levels of 84 patients (41.6 %) were between 1 and 5, 29 patients (14.4 %) were between 5 and 10, 89 patients (44.1 %) were more than 10. Among anti-HCV positive 202 patients, total number of HCV-RNA positive patients and total number of LIA positive patients were 60 (29.7 %) and 124 (61.4 %), respectively. The highest rate of anti-HCV seropositivity (73.8 %) was found in the above 40 years age group. The median of the anti-HCV levels (3.2 S/CO) of the HCV-RNA negative patients was significantly lower than the median of the anti-HCV levels (13.7 S/CO) of the HCV-RNA positive patients. The difference between the median of anti-HCV levels of LIA negative patients

<sup>1</sup>Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara  
<sup>2</sup>Ankara Şehir Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Altan AKSOY  
SBÜ Ankara Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği Ankara - Türkiye  
E-posta / E-mail : aksoyalta@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 20.03.2019  
Kabul Tarihi / Accepted : 05.01.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.67778

Sanbaş A, Aksoy A. Anti-HCV tarama testi eşik değerinin HCV-RNA ve Line Immunoassay testi ile belirlenmesi  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 319-324

olarak anlamlı bulunmuştur. ROC analizi sonucunda, Architect anti-HCV testi için en iyi S/CO değeri 7,8 olarak belirlenmiştir ve bu durumda duyarlılık %98,3, özgüllük %68,3, pozitif tahmini değer %56,7, negatif tahmini değer %99 ve doğruluk %77,2 olarak hesaplanmıştır.

**Sonuç:** Anti-HCV seropozitifliği yaş ile birlikte anlamlı oranda artmıştır. Anti-HCV eşik değerine yakın sonuçlara HCV-RNA ve LIA pozitifliği genellikle eşlik etmemiştir. Architect anti-HCV tarama testi için eşik değeri 7,8 olarak belirlendiğinde çok az örneğin doğrulama gerektireceği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hepatit C virüs, eşik değer, anti HCV, Line Immunoassay

(2.1 S/CO) and the median of anti-HCV levels of the LIA positive patients (13.3 S/CO) was statistically significant. By ROC analysis, the best cut-off value for the Architect anti-HCV test was determined as 7.8 S/CO and with this calculated cut-off value, sensitivity (98.3%); specificity (68.3%); positive (56.7%) and negative (99%); predictive value and the accuracy (77.2%) were calculated.

**Conclusion:** Anti-HCV seropositivity increases significantly with age. HCV-RNA and LIA positivity generally do not accompany the results minimally above anti-HCV cut-off values. A few samples will require verification if the cut-off value for Architect anti-HCV screening test is determined as 7.8.

**Key Words:** Hepatitis C virus, cut-off, anti HCV, Line Immunoassay

## GİRİŞ

Hepatit C virüsü (HCV) Flaviviridae ailesinden pozitif polariteli bir RNA virüsüdür(1). Enfeksiyon genellikle asemptomatik bir seyir izlediğinden enfekte kişilerin yaklaşık %70'inde persistan hale gelmekte ve bu durum kronik karaciğer hastalığına ve hepatosellüler karsinoma yol açabilmektedir(1, 2).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünya nüfusunun yaklaşık 71 milyonunun kronik HCV hastası olduğunu belirtmiş ve 2030 yılına kadar enfekte olguların %90'ının tanı almasını amaçlamıştır. Türkiye'de ise yaklaşık 514.000 (%0,7) kişinin HCV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir(2).

HCV enfeksiyonlarının tanısında ilk basamağı anti-HCV antikorlarının enzim immünoassay (EIA) veya kemilüminesan immünoassay yöntemle tespiti oluşturmaktadır. Anti-HCV sonuçlarının yorumlanmasında reaktivite eşikleri olarak, test örneğinin optik dansitesinin cut-off'a oranıyla elde edilen S/CO değeri kullanılmaktadır(3,4). DSÖ, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ve Amerikan Sağlık

Enstitüsü gibi kuruluşlar anti-HCV sonucunun yüksek pozitif, düşük pozitif ve negatif olarak bildirilmesini önermektedir (4). Ancak ülkemizde ortak bir tanısal algoritma bulunmamaktadır.

Hepatit C virüsüne karşı oluşan antikorları tarayan testler, ülkemizin de içinde yer aldığı HCV prevalansının düşük olduğu toplumlarda yüksek oranda yalancı pozitif sonuçlar vermektedir(2,3). Anti-HCV testlerinde sınır (cut-off) değere yakın pozitif sonuçlar rutin tanı laboratuvarları için ciddi sorunlar doğurmaktadır. Dolayısıyla tanının doğrulanması için oldukça maliyetli bir test olan HCV-RNA yöntemine başvurulmak zorunda kalınmaktadır. Fakat HCV-RNA varlığı, sınır değere yakın veya düşük anti-HCV pozitifliklerine çoğu zaman eşlik etmemektedir (5).

Bu çalışmada, Anti-HCV yalancı pozitif test sonuçlarını azaltabilmek ve gereksiz ek test isteminin önüne geçebilmek için ülkemize en uygun anti-HCV eşik değerini tespit etmek amaçlanmıştır.



## GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına 1 Haziran 2012- 28 Şubat 2013 tarihleri arasında gönderilen 90 (%44,6)'ı kadın, 112 (%55,4)'si erkek olmak üzere toplam 202 hastaya ait anti-HCV pozitif örnek çalışmaya dahil edildi. Örneklerin HCV-RNA sonuçları kaydedildi ve -80°C'de saklanan plazma örnekleri daha sonra 3. Kuşak LIA kiti (INNO-LIA, HCV Score, InnogeneticsGhent, Belgium) ile test edildi. Çalışma grubu, sağlıklı donörler ile Enfeksiyon hastalıkları ve diğer kliniklere ait anti-HCV'si pozitif ve HCV-RNA'ları çalışılmış hasta örnekleri olmak üzere iki grup halinde oluşturuldu.

### Anti HCV Tespiti:

HCV antikorlarının tespiti kemilüminesan mikropartikül enzim immunoassay (CMIA) yöntemi ile çalışan Architect anti-HCV (Abbott, ABD) kitleri ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı. <1 S/CO değerine sahip numuneler non reaktif kabul edilirken  $\geq 1$  S/CO değerine sahip numuneler ise reaktif kabul edildi. Başlangıçta reaktif tespit edilen örnekler tekrar çalışıldı. Test tekrarı sonucu reaktif bulunan numuneler anti-HCV için pozitif olarak nitelendirildi.

### HCV-RNA'nın Kantitatif Tespiti:

HCV Rotor- Gene RT PCR (Qiagen, Hilden, Germany) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı. Kitin alt saptama sınırı 44 kopya/ml idi.

### LineImmunoAssay (LIA):

Anti-HCV pozitif örnekler HCV genomunun C1, C2, E2, NS3, NS4, NS5 bölgelerini içeren 3. Kuşak LIA HCV Score (InnogeneticsGhent, Belgium) test kitleri ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı.

Değerlendirmede HCV antikorları için negatif kabul, tüm HCV antijen bantlarının negatif reaktivite derecesinde olması veya NS3 hariç, diğer HCV antijen bantlarından birinin  $\pm$  reaktiviteye sahip olması durumudur.

HCV antikorları için pozitif kabul, en az iki HCV antijen bandında  $\pm$  ya da daha yüksek reaktiviteye sahip olması durumudur.

HCV antikorları için belirsiz (indeterminate) kabul, herhangi bir HCV antijen çizgisi 1+ ya da daha yüksek reaktivite derecesine sahip veya NS3 bandı  $\pm$  ya da daha fazla reaktiviteye sahipken tüm diğer antijen çizgilerinin negatif olması durumudur.

### İstatistiksel Analiz:

Verilerin analizi "SPSS for Windows 11.5" paket programında yapıldı. Sürekli değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Kolmogorov Smirnov testi ile araştırıldı. Gruplar arasında medyan değerler yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann Whitney U testi ile ikiden fazla grup arasındaki farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testi ile incelendi. Kruskal Wallis test istatistiği sonucunun önemli bulunması halinde farka neden olan durumları tespit etmek amacıyla Conover'in çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Kategorik değişkenler Pearson'un Ki-Kare testiyle değerlendirildi.

HCV-RNA ve LIA sonuçlarına göre olguları ayırt etmede anti-HCV ölçümlerinin belirleyici olup olmadığı ROC analizi ile değerlendirildi. Eğri altında kalan alanın önemli bulunması halinde en iyi kesim noktası Youden İndeks kullanılarak saptandı.

$p < 0,05$  için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmamıza, anti-HCV S/CO düzeyi 1- 5 arasında olan 84 (%41,6), 5- 10 arasında olan 29 (%14,4) ve 10'un üstünde olan 89 (44,1) kişi olmak üzere toplam 202 kişi dahil edilmiştir. Anti-HCV pozitif 202 örneğin 60 (%29,7)'i HCV-RNA pozitif ve 124 (%61,4)'ü LIA pozitif saptanmıştır. LIA testi belirsiz olanlarda ise HCV-RNA sonuçlarının tamamı negatif bulunmuştur.

Anti-HCV antikorları pozitif olan kişilere ait medyan S/CO düzeyi ile yaş, cinsiyet, HCV-RNA ve

LIA sonuçları arasındaki ilişki Tablo 1’de belirtilmiştir. Buna göre 0- 20 yaş arasındaki grubun medyan anti-HCV düzeyi 21- 40 ve 40 yaş üstü gruplara göre anlamlı olarak daha düşüktür. Cinsiyet ile anti-HCV düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki yoktur. HCV-RNA negatif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (3,2) ile HCV-RNA pozitif olan grubun medyan anti-HCV düzeyine (13,7) göre anlamlı oranda daha düşüktür. LIA pozitif olan grup ile karşılaştırıldığında LIA negatif olan ve LIA belirsiz olan grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

HCV-RNA açısından ROC analizi sonucunda anti-HCV için 7,8 S/CO değeri kullanıldığında HCV-RNA

pozitif ve HCV-RNA negatif grupları ayırt etmede anti-HCV’nin istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyici olduğu görülmüştür ( $p<0,001$ ). Anti-HCV için 7,8 S/CO değerlerinde, duyarlılık %98,3 özgüllük %68,3 pozitif tahmini değer %56,7 negatif tahmini değer %99 ve doğruluk %77,2 olarak hesaplandı (Tablo 2).

LIA açısından ROC analizi sonucunda, LIA belirsiz olan olgular negatif kabul edildiğinde, LIA pozitif ve negatif grupları ayırt etmede anti-HCV için S/CO değeri 7,2 (%95 güven aralığında) olarak belirlendi. >7,2 S/CO değerlerinde, duyarlılık %85,5, özgüllük %98,7, pozitif tahmini değer %99,1, negatif tahmini değer %81,1 ve doğruluk %90,6 olarak hesaplandı.

**Tablo 1.** Demografik ve klinik değişkenlere göre ortalama anti-HCV düzeyleri

| Değişkenler      | Olgu Sayısı | Anti-HCV S/co düzeyi<br>mean (min- max) | P değeri |
|------------------|-------------|-----------------------------------------|----------|
| <b>Yaş</b>       |             |                                         |          |
| 0-20             | 8           | 1,68 (1,1-12,9)                         |          |
| 21-40            | 45          | 4,22 (1-17,35)                          | 0,004    |
| >40              | 149         | 9,25 (1,2-17,8)                         |          |
| <b>Cinsiyet</b>  |             |                                         |          |
| Erkek            | 112         | 7,77 (1,1-17,8)                         | 0,625    |
| Kadın            | 90          | 9,04 (1-17,5)                           |          |
| <b>Gruplar</b>   |             |                                         |          |
| Sağlıklı donör   | 57          | 2,09 (1-17,3)                           | <0,001   |
| Enf. H. ve diğer | 145         | 11,61 (1,2-17,8)                        |          |
| <b>HCV-RNA</b>   |             |                                         |          |
| Pozitif          | 60          | 13,74 (6-17,8)                          | < 0,001  |
| Negatif          | 142         | 3,24 (1-17,5)                           |          |
| <b>INNO LIA</b>  |             |                                         |          |
| Pozitif          | 124         | 13,34 (1,3-17,8)                        |          |
| Negatif          | 63          | 2,14 (1-8,4)                            | < 0,001  |
| Belirsiz         | 15          | 1,87 (1,1-6,2)                          |          |

**Tablo 2.** HCV- RNA'ya ve INNO-LIA'ya göre negatif ve pozitif olguların ayırt edilmesinde anti-HCV'nin tanısıl performans düzeyleri

| Göstergeler                 | HCV-RNA     | INNO-LIA    |
|-----------------------------|-------------|-------------|
| Eğri Altında Kalan Alan     | 0,827       | 0,941       |
| %95 Güven Aralığı           | 0,773-0,882 | 0,908-0,975 |
| En İyi Kesme Noktası (S/CO) | 7.8         | 7.2         |
| Olgu Sayısı                 | 202         | 202         |
| Duyarlılık (%)              | 98,3        | 85,5        |
| Seçicilik (%)               | 68,3        | 98,7        |
| PTD (%)                     | 56,7        | 99,1        |
| NTD (%)                     | 99          | 81,1        |
| Doğruluk (%)                | 77,2        | 90,6        |
| p değeri                    | < 0,001     | < 0,001     |

PTD: Pozitif Tahmini Değer, NTD: Negatif Tahmini Değer.

## TARTIŞMA

Çalışmamızda anti-HCV seropozitifliği açısından yaş gruplarına bakıldığında en yüksek oran 40 yaş üzeri (%73,8) grupta tespit edilmiştir. Tunç ve ark.'nın (6) yaptığı çalışmada anti-HCV pozitif kişilerin yaş ortalaması 48 olarak bulunmuştur. Asan ve ark.'nın (7) yapmış olduğu çalışmada anti-HCV seropozitif olan kişilerin %54'ünü 50 yaş ve üzeri grubun oluşturduğu saptanmıştır. Bizim sonuçlarımızla uyumlu olan bu çalışmalardaki sonuçlara göre anti-HCV pozitifliği ileri yaşlarda daha fazla görülmektedir.

Çalışmamızda anti-HCV seropozitifliğinin cinsiyete göre farklılık göstermediği tespit edildi. Bazı araştırmacılar anti-HCV seropozitifliğinin cinsiyete göre dağılımında farklılıklar gösterdiğini ifade etmişlerse de bazı araştırmacılar saptadığımız sonuçlarla uyumlu olarak cinsiyete göre dağılımda anlamlı bir farklılığın olmadığını ifade etmiştir (8).

Çalışmamızda, HCV-RNA negatif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (3,2 S/CO) HCV-RNA pozitif

olan gruba (13,7 S/CO) göre daha düşük bulundu. LIA pozitif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (13,3 S/CO) LIA negatif (2,1 S/CO) ve LIA belirsiz (1,9 S/CO) gruplara göre daha yüksek bulundu. Buna göre medyan anti-HCV S/CO değerinin artırılması halinde LIA pozitifliği ve HCV-RNA pozitifliğinin yakalanma oranının da artacağı söylenebilir.

CDC, Architect anti-HCV tarama testi için eşik değerini  $\geq 5$  S/CO olarak belirlemiştir. CDC verilerine göre her ülke tarama testleri için kendi S/CO oranlarını belirlediğinde çok az örneğin doğrulama gerektireceğini ve bu durumun gelişmekte olan ülkeler için daha ekonomik olacağını belirtmiştir (9).

Amerikan Kızılhaç'ı ve Amerika Kan Merkezi tarafından yapılan bir çalışmada, 47.041 anti-HCV pozitif örneğin, sadece %49,3'ünde RIBA ile pozitiflik ve bunlarında %79,2'sinde HCV-RNA pozitifliği saptanmıştır (10). Benzer şekilde Çin'de yapılan çok merkezli bir çalışmada, anti-HCV pozitif örneklerin, sadece %39'unda RIBA veya NAT ile gerçek pozitiflik saptanmıştır (11). Ülkemiz verilerine bakacak

olursak, Emektaş ve ark.'nın (12) yaptıkları çok merkezli bir çalışmada 10.050 anti-HCV tekrarlayan pozitif örneğin %67'si RIBA ile doğrulanmıştır. Bizim anti-HCV pozitif örneklerin %61'inde LIA pozitifliği ve %30'unda HCV-RNA pozitifliği tespit ettik. Bu sonuçlara ek olarak çalışmamızda elde ettiğimiz HCV-RNA negatif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (3,2) ile HCV-RNA pozitif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (13,7) istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur. Elde edilen veriler ışığında anti-HCV sınırda pozitifliklerinde yalancı pozitiflik oranının oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Alter ve ark. (13) tarafından yapılan ve CDC tarafından yayınlanan, 24.700 hastayı içeren ve HCV prevalansı düşük olan grupta HCV-RNA pozitifliği %42, RIBA pozitifliği %66 olarak bulunmuştur. Tarama

testleri ile ortalama S/CO oranı  $\geq 3,8$  olduğunda HCV-RNA pozitifliği %80'e RIBA pozitifliği ise %97'ye yükselmiştir. Seo ve ark.'nın (4) anti-HCV testi (Abbott) pozitif 661 hasta ile yaptıkları çalışmada viremi varlığını belirlemede en uygun cut-off değerini 10,9 tespit etmişler ve bu durumda duyarlılığın %94,4'e çıktığını belirlemiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, HCV-RNA açısından ROC analizi sonucunda, HCV-RNA pozitif ve HCV-RNA negatif grupları ayırt etmede anti-HCV için S/CO değeri 7,8 (%95 güven aralığında) olarak belirlenmiştir. Bu değer üstündeki S/CO değerleri için klinik durum göz önüne alınarak ileri bir doğrulama testinin istenmesi uygun bir yaklaşım olacaktır. Her ülkenin kendine en uygun S/CO değerini belirlemesi kit sarfiyatını ve hasta maduriyetini azaltacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Tozun N, Ozdogan O, Cakaloglu Y, İdilman R, Karasu Z, Akarca U, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections and risk factors in Turkey: a fieldwork TURHEP. Study. Clin Microbiol Infect, 2015;21: 1020-6.
2. World Health Organization. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. 2018.
3. cdcinfo@cdc.gov. The guide to comprehensive hepatitis C counseling and testing.
4. Seo YS, Jung ES, Kim JH, Jung YK, Kim JH, An H, et al. Significance of anti-HCV signal-to-cut off ratio in predicting hepatitis C viremia. Korean J Intern Med, 2009;24 (4): 302-8.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus (anti-HCV). MMWR 2003; 52 (RR3): 1-13.
6. Tunç N, Eraydın H, Çetinkaya E, Oduncu MK, Toy Ş. Siirt Devlet Hastanesi'ne Başvuran Hastalarda HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV ve Anti-HIV Seroprevalansı. Viral Hepat J, 2011; 17(1): 7-11.
7. Asan A, Akbulut A, Saçar S, Turgut H. Tunceli Devlet Hastanesine Başvuran Kişilerde HBsAg ve Anti-HCV Seroprevalansının Değerlendirilmesi. Viral Hepat J, 2011; 17: 52-6.
8. Turan DB, Kuruoğlu T, Gümüş D, Kalaycı F, Şerefhanoglu K. Seroprevalence of HBsAg and anti-HCV for patients who admitted to third step hospital: Six year retrospective data. Ege Tıp Derg, 2019; 58(2): 149- 53.
9. Memikoğlu KO, Arabacı H, Azap A, Yeşilkaya A, Birengel S, Balık İ, Türkiye'de Hepatit C Tanısı: Nasıl Yardımcı Olur? Viral Hepat J, 2007; 12(2): 68- 72.
10. Kleinman SH, Stramer SL, Brodsky JP, Caglioti S, Busch MP. Integration of nucleic acid amplification test results in to hepatitis C virus supplemental serologic testing algorithms: implications for donor counseling and revision of existing algorithms. Transfusion, 2006; 46: 695- 702.
11. Nelson KE, Shan HUA. Confirmatory testing of hepatitis C virus positive enzyme immuno assay results in limited- resource countries: should it be attempted? Transfusion, 2008;48: 1239- 44.
12. Emektas G, Çavuşlu S, Öncül O, Artuk Ç, Aksoy A. Trends in hepatitis B and hepatitis C virus among blood donors over 16 years in Turkey. Eur J Epidemiol, 2006;21(4): 299- 305.
13. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L; Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep, 2003;52(No. RR3): 1- 15.

# Üriner kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonlarında ölüm ile ilişkili faktörlerin incelenmesi

## Investigation of death related factors in urinary catheter-associated urinary tract infections

Can Hüseyin HEKİMOĞLU<sup>1</sup>, Selda ŞAHAN<sup>2</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Sağlık hizmeti ile ilgili en yaygın enfeksiyonlardan biri olan üriner kateter ile ilişkili idrar yolu enfeksiyonları (ÜKİ-ÜSE), morbidite, mortalite, hastanede kalış süresi ve maliyetini artırır. 2008 yılından 2017 yılına kadar Türkiye’de ÜKİ-ÜSE hızında % 70’lik bir azalma meydana gelmiştir. Ancak 2017 yılında surveyas verilerine göre Türkiye’de sağlık hizmeti ile ilişkili en sık görülen enfeksiyonlardan biri ÜSE idi ve bunların % 77.9’u üriner kateter ile ilişkili idi. Bu çalışmada yoğun bakım ünitelerinde ÜKİ-ÜSE gelişen hastalarda ölüm üzerine ilişkili faktörlerin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Bu retrospektif kohort çalışmasının evreni, Türkiye’de 2015-2017 yılları arasında 18 yaşın üzerinde ÜKİ-ÜSE tanısı konan yoğun bakım ünitesi hastalarıdır. Veriler, Türkiye’deki tüm hastanelerde yürütülen aktif ve ileriye dönük Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveysi kapsamında enfeksiyon kontrol hemşireleri tarafından toplanmıştır. Çalışmanın bağımlı değişkeni hastaneden çıkış şekli olup taburcu ve ölüm olmak üzere iki kategoride ele alınmıştır. Çalışmadaki bağımsız değişkenler yaş, cinsiyet, hasta günü, entübasyon, diyabet, böbrek yetmezliği, sekonder kan dolaşımı enfeksiyonudur. Bağımlı değişken üzerine

### ABSTRACT

**Objective:** Catheter-associated urinary tract infections (CAUTI), one of the most common healthcare-related infections, increase morbidity, mortality, length of hospital stay and cost. From 2008 to 2017, CAUTI rates decreased 70% in Turkey. However according to the surveillance data in 2017 one of the most common health care-associated infections in Turkey was urinary tract infection and 77.9% of them were urinary catheter-associated. The aim of this study was to investigate the factors related to mortality in patients with CAUTI in intensive care units.

**Methods:** The universe of this retrospective cohort study is the intensive care unit patients diagnosed with CAUTI over the age of 18 in Turkey in 2015-2017. The data were collected by infection control nurses in all hospitals in Turkey in the context of the National Healthcare-associated Infection Surveillance which is active and prospective. The dependent variable of the study was the type of discharge from the hospital and was evaluated in two categories as discharge and death. The independent variables in the study were age, gender, patient day, intubation, diabetes, renal failure, secondary bloodstream infection. Multivariate logistic

<sup>1</sup>Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Bulaşıcı Hastalıklar Dairesi Başkanlığı, Ankara

<sup>2</sup>Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Tehditleri Erken Uyarı ve Cevap Dairesi Başkanlığı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Can Hüseyin HEKİMOĞLU

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 19.10.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 26.01.2020

etkili faktörlerin etkisinin eş zamanlı incelenmesi için çok değişkenli lojistik regresyon analizi yapılmıştır. Regresyon modelini doğrulamak için bootstrap yeniden örnekleme yöntemi kullanılmıştır.

**Bulgular:** Yoğun bakım ünitelerinde ÜKİ-ÜSE gelişmiş hastalarda ölüm üzerine etkili bağımsız faktörler, yaş grubu, hasta günü, diyabet varlığı, böbrek yetmezliği varlığı, entübasyon uygulanmış olması ve sekonder kan dolaşımı enfeksiyonu gelişimi olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** ÜKİ-ÜSE gelişen hastalarda ölüm üzerine nedensel etkili faktörlerin ve bu faktörler arasındaki ilişkilerin yapısını anlamak ve belirlemek oldukça zordur ancak bu yapının karmaşık olduğu açıktır. Bu risk faktörlerini modifiye edebilmenin gücü yanı sıra bu risk faktörlerini modifiye etmenin de ölüm üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle bu hasta grubunda ölümlerin azaltılmasına yönelik en akılcı ve verimli yaklaşım ÜKİ-ÜSE gelişiminin önlenmesidir.

**Anahtar Kelimeler:** Üriner sistem enfeksiyonu, yoğun bakım ünitesi, süreyans

regression analysis was performed to investigate the effect of the factors affecting the dependent variable simultaneously. The bootstrap resampling method was used to confirm the regression model.

**Results:** Independent factors related mortality in patients with CAUTI in ICUs were found to be age group, patient day, presence of diabetes, presence of renal failure, intubation, and development of secondary bloodstream infection.

**Conclusion:** In conclusion, it is difficult to understand and determine the structure of causal factors and the relationships between these factors in patients with UTI-UTI, but it is clear that this structure is complex. In addition to the difficulty of modifying these risk factors, the effect of modifying these risk factors on death is not known. Therefore, the most rational and efficient approach to reduce deaths in this patient group is to prevent the development of CAUTI.

**Key Words:** Urinary tract infection, intensive care unit, surveillance

## GİRİŞ

Üriner kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonları (ÜKİ-ÜSE) artmış morbidite, mortalite, maliyete ve uzamış hastanede yatışa neden olması ve en sık görülen sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlardan (SHİE) biri olması nedeniyle büyük bir öneme sahiptir (1). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2011 yılı verilerine göre yoğun bakım ünitesi (YBÜ) türüne göre değişimle birlikte ÜKİ-ÜSE hızı 1000 üriner kateter günü başına 1.2 ile 4.1 arasında; servislerde ise 1.3 ile 1.5 arasında değişmektedir (2). Türkiye'de ise 2017 yılı ulusal süreyans verilerine göre ÜKİ-ÜSE hızı YBÜ türüne göre değişimle birlikte 0.1 ile 3.4 arasında değişmektedir (3). 2008 yılından 2017 yılına kadar Türkiye'de ÜKİ-ÜSE hızında % 70'lik bir azalma meydana gelmiş; 2016 yılı verilerinde standardize hızlara bakıldığında 2017 yılında öngörülenden %16

daha az ÜKİ-ÜSE saptanmıştır (3-5). Buna rağmen 2017 yılında ÜSE Türkiye'de en yüksek genel hızı sahip 3. enfeksiyon olup, %77.9'u üriner kateter ilişkilidir (6). ABD hastanelerinde 2002'de yapılan çalışmada en fazla sayıda saptanan ve mortalitesi en fazla olan SHİE, ÜKİ-ÜSE olurken; 2011 yılında çok merkezli bir çalışmada ÜKİ-ÜSE en sık bildirilen 4. SHİE olmuştur (7.8). Bakteriüri hastaların <%5'inde bakteriyemi gelişiyor olsa da hastanelerde sekonder kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık nedeni ÜKİ-ÜSE'dir (9). Ayrıca kanıta dayalı uygulamalarla ÜKİ-ÜSE'lerin %17-69 oranında önlenabilir kabul edilmesi ÜKİ-ÜSE'lerin önemini daha da artırmaktadır (10).

Türkiye'de "Yataklı Tedavi Kurumları Enfeksiyon Kontrol Yönetmeliği"nin 2005 yılında yürürlüğe girmesiyle birlikte YBÜ'lerde invaziv araç ilişkili

enfeksiyonların bildirimi zorunlu tutulmuş olup, aynı zamanda enfeksiyon bildirilen hastaların taburculuk şekli de kayıt altına alınmaktadır. Üriner kateter kullanım oranları ve ÜKİ-ÜSE hızları yataklı tedavi kurumlarında ve ulusal düzeyde takip edilmektedir. Bu çalışmada YBÜ'lerde ÜKİ-ÜSE gelişen hastalarda ölüm ile ilişkili faktörlerin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Veri Toplama

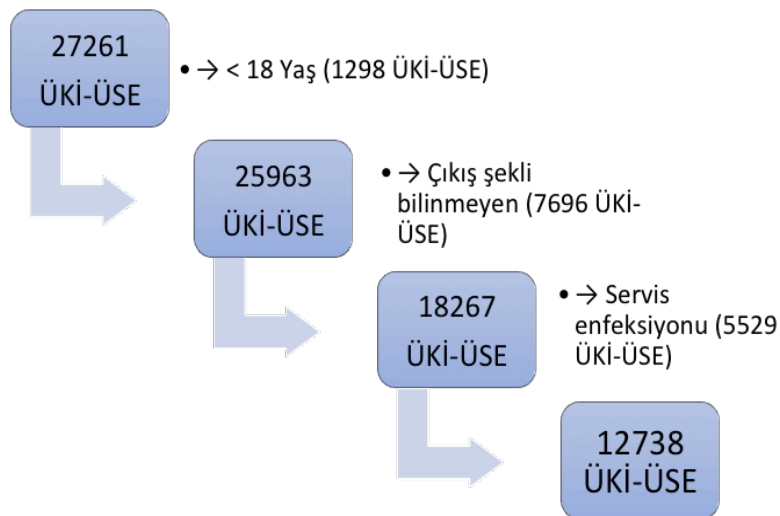
Bu retrospektif kohort çalışmasının evreni Ocak 2015 - Aralık 2017 arasında Türkiye'deki YBÜ'lerde yatarak tedavi görmüş ve ÜKİ-ÜSE tespit edilmiş 18 yaş üstü hastalardan oluşmaktadır. Araştırmaya tüm hastalar dahil edilmiş, örnekleme yapılmamıştır. Hasta günü iki gün ve daha az olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. ÜKİ-ÜSE tanısı almış hastaların dahil edilmesi için tanı tarihi temel alınmıştır. Birden fazla ÜKİ-ÜSE tanısı olanların ilk kayıtları çalışmaya dahil edilmiş ve mükerrer kayıtlar dışlanmıştır. 01.01.2015 ile 31.12.2017 tarihleri arasında ÜKİ-ÜSE tanısı alan hastalardan 18 yaşın altında olanlar, serviste yatarak tanı alanlar ve çıkış şekli bildirilmemiş, başka

hastaneye veya başka servise sevk edilmiş hastalar analize alınmamıştır (Şekil 1).

Veriler yataklı tedavi kurumlarındaki enfeksiyon kontrol hemşireleri tarafından Ulusal SHİE Sürveyansı kapsamında toplanmış olup Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA)'na kaydedilmiştir. Çalışma verilerinin kullanımı için Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nden izin alınmıştır.

### Değişkenler

Çalışmanın bağımlı değişkeni çıkış şekli olup taburcu ve ölüm olmak üzere iki kategoride ele alınmıştır. Çalışmadaki bağımsız değişkenler yaş, cinsiyet, hasta günü, entübasyon, diyabet, böbrek yetmezliği, sekonder kan dolaşımı enfeksiyonudur. Yaş değişkeni analizlere hem sürekli değişken olarak hem de 18-64, 65-79, ≥80 yaş olmak üzere üç kategorili olarak alınmıştır. Yaş değişkeni tanı tarihinden doğum tarihi çıkarılarak elde edilmiştir. Cinsiyet değişkeni kadın ve erkek olmak üzere iki kategorilidir. Hasta günü değişkeni çıkış tarihinden yatış tarihi çıkarılarak hesaplanmış ve sürekli değişken olarak analize alınmıştır. Entübasyon, diyabet, böbrek yetmezliği ve sekonder kan dolaşımı enfeksiyonu (KDE) değişkenleri var / yok şeklinde iki kategorili değişkenlerdir.



Şekil 1. Olguların çalışmaya dahil edilme diyagramı

Enfeksiyon kaydındaki risk faktörlerinde entübasyon işaretli olanlar entübe (var), işaretli olmayanlar entübe değil (yok) olarak kabul edilmiştir. Altta yatan hastalık ve yatış tanısında diyabet işaretli olanlar diyabet var, böbrek yetmezliği işaretli olanlar böbrek yetmezliği var olarak kabul edilmiştir.

#### Analiz

Tek değişkenli analizlerde sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında bağımsız gruplarda t testi ve tek yönlü varyans analizi, kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki kare testi kullanılmıştır. Çıkış şekli üzerine etkili faktörlerin etkisinin eş zamanlı incelemesi için çok değişkenli lojistik regresyon analizi

yapılmıştır. Regresyon modelini doğrulamak için bootstrap yeniden örnekleme yöntemi kullanılmıştır. Veriler SPSS 20.0 paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm testler için önemlilik sınırı (p değeri) 0.05 olarak alınmıştır.

#### BULGULAR

Analize alınan toplam 12738 kişinin yaş ortalaması 70.9 ( $\pm 15.8$ ) yıl ve hasta günü ortalaması 58.2 ( $\pm 66.9$ ) gündür. Çalışma grubunda değişkenlerin dağılımı Tablo 1'de özetlenmiştir. Hasta günü, diyabet, böbrek yetmezliği, sekonder KDE, yaş grubu ve entübasyon

Tablo 1. Çalışma grubunda değişkenlerin dağılımı

| Değişkenler                       |              | n     | %    |
|-----------------------------------|--------------|-------|------|
| Cinsiyet                          | Kadın        | 6949  | 53.8 |
|                                   | Erkek        | 5889  | 46.2 |
| Yıl                               | 2015         | 4292  | 33.7 |
|                                   | 2016         | 4227  | 33.2 |
|                                   | 2017         | 4219  | 33.1 |
| Yaş Grubu                         | 18-<65 yaş   | 3435  | 27   |
|                                   | 65-<80 yaş   | 5214  | 40.9 |
|                                   | <=80 yaş     | 4089  | 32.1 |
| Diyabet                           | Var          | 2471  | 19.4 |
|                                   | Yok          | 10267 | 80.6 |
| Böbrek Yetmezliği                 | Var          | 1839  | 14.4 |
|                                   | Yok          | 10899 | 85.6 |
| Sekonder Kan Dolaşımı Enfeksiyonu | Var          | 1361  | 10.7 |
|                                   | Yok          | 11377 | 89.3 |
| Entübasyon                        | Var          | 7439  | 58.4 |
|                                   | Yok          | 5299  | 41.6 |
| Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ) Branşı  | Karma YBÜ    | 4903  | 38.5 |
|                                   | Anestezi YBÜ | 2881  | 22.6 |
|                                   | Dahili YBÜ   | 3447  | 27.1 |
|                                   | Cerrahi YBÜ  | 1507  | 11.8 |
| Çıkış şekli                       | Ölüm         | 9200  | 72.2 |
|                                   | Taburcu      | 3538  | 27.8 |



değişkenlerinin ölüm ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişkili olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Değişkenler arasındaki tek değişkenli analizlerle elde edilen p değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Tek değişkenli analizlerle istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunan ilişkilerin karmaşık yapısı Şekil 2'de

şematik olarak özetlenmektedir.

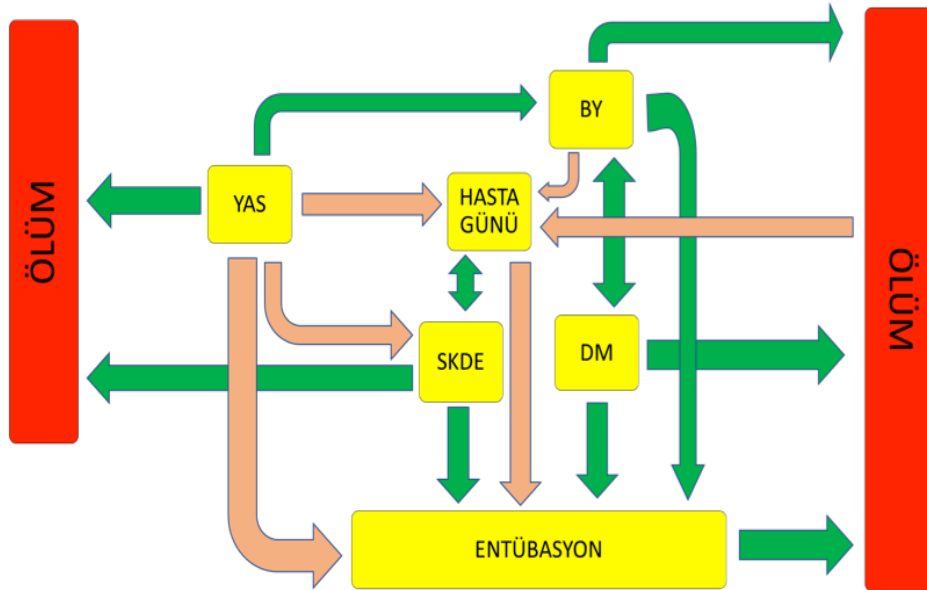
Çok değişkenli lojistik regresyon analizi Tablo 3 ve bootstrap yeniden örnekleme yöntemi ile doğrulanmış sonuçlar Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 2. Tek değişkenli analizlerle elde edilen p değerleri

| Değişkenler       | Hasta günü | Diyabet | Böbrek Yetmezliği | SKDE*  | Yaş grubu | Entübasyon | Ölüm   |
|-------------------|------------|---------|-------------------|--------|-----------|------------|--------|
| Hasta günü        |            | 0.209   | <0.000            | <0.000 | <0.000    | <0.000     | <0.000 |
| Diyabet           | 0.209      |         | <0.000            | 0.911  | 0.790     | 0.039      | <0.000 |
| Böbrek Yetmezliği | <0.000     | <0.000  |                   | 0.656  | <0.000    | <0.000     | <0.000 |
| SKDE              | <0.000     | 0.911   | 0.656             |        | <0.000    | 0.008      | <0.000 |
| Yaş grubu         | <0.000     | 0.790   | <0.000            | <0.000 |           | <0.000     | <0.000 |
| Entübasyon        | <0.000     | 0.039   | <0.000            | 0.008  | <0.000    |            | <0.000 |
| Ölüm              | <0.000     | <0.000  | <0.000            | <0.000 | <0.000    | <0.000     |        |

\* Sekonder Kan Dolaşımı Enfeksiyonu

¥ Mavi hücreler, p değeri > 0.05 olan karşılaştırmaları; yeşil hücreler, p değeri < 0.05 ve Odds Ratio (OR)'su > 1.0 olan karşılaştırmaları; kırmızı hücreler, p değeri < 0.05 ve OR'si < 1.0 olan karşılaştırmaları ifade etmektedir.



Şekil 2. Tek değişkenli analizlerle anlamlı bulunan ilişkilerin şematik gösterimi.

\* Yeşil oklar pozitif yönde ve pembe oklar negatif yöndeki ilişkiyi ifade etmektedir

Tablo 3. Çok değişkenli lojistik regresyon analizi sonuçları

| Değişken                          | Kategori    | B        | Standart Hata | p değeri | Odds Ratio | %95 Güven Aralığı |           |
|-----------------------------------|-------------|----------|---------------|----------|------------|-------------------|-----------|
|                                   |             |          |               |          |            | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| Sabit                             | -           | -0.327   | 0.050         | <0.001   | 0.721      | -                 | -         |
| Hasta günü                        | -           | 0.002    | 0.000         | <0.001   | 1.002      | 1.001             | 1.003     |
| Diyabetes Mellitus                | Yok         | Referans |               |          | 1.000      | -                 | -         |
|                                   | Var         | 0.146    | 0.054         | 0.007    | 1.157      | 1.04              | 1.287     |
| Böbrek Yetmezliği                 | Yok         | Referans |               |          | 1.000      | -                 | -         |
|                                   | Var         | 0.51     | 0.066         | <0.001   | 1.665      | 1.464             | 1.893     |
| Sekonder Kan Dolaşımı Enfeksiyonu | Yok         | Referans |               |          | 1.000      | -                 | -         |
|                                   | Var         | 0.597    | 0.076         | <0.001   | 1.816      | 1.566             | 2.106     |
| Yaş grubu                         | 18- <65 yaş | Referans |               |          | 1.000      | -                 | -         |
|                                   | >= 65 - <80 | 0.547    | 0.050         | <0.001   | 1.729      | 1.569             | 1.905     |
|                                   | >=80        | 0.898    | 0.054         | <0.001   | 2.454      | 2.206             | 2.73      |
| Entübasyon                        | Yok         | Referans |               |          | 1.000      | -                 | -         |
|                                   | Var         | 0.98     | 0.042         | <0.001   | 2.664      | 2.455             | 2.891     |

Tablo 4. Bootstrap yeniden örnekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

| Değişken                          | Kategori    | B        | Bootstrap |               |          |                   |           |  |
|-----------------------------------|-------------|----------|-----------|---------------|----------|-------------------|-----------|--|
|                                   |             |          | Bias      | Standart Hata | p değeri | %95 Güven Aralığı |           |  |
|                                   |             |          |           |               |          | Alt Sınır         | Üst Sınır |  |
| Sabit                             | -           | -0.327   | 0.001     | 0.055         | 0.001    | -0.438            | -0.224    |  |
| Hasta günü                        | -           | 0.002    | 0.000     | 0.000         | 0.001    | 0.001             | 0.003     |  |
| Diyabetes Mellitus                | Yok         | Referans |           |               |          |                   |           |  |
|                                   | Var         | 0.146    | -0.002    | 0.055         | 0.009    | 0.035             | 0.253     |  |
| Böbrek Yetmezliği                 | Yok         | Referans |           |               |          |                   |           |  |
|                                   | Var         | 0.51     | 0.002     | 0.064         | 0.001    | 0.391             | 0.639     |  |
| Sekonder Kan Dolaşımı Enfeksiyonu | Yok         | Referans |           |               |          |                   |           |  |
|                                   | Var         | 0.597    | -0.001    | 0.077         | 0.001    | 0.453             | 0.748     |  |
| Yaş grubu                         | 18- <65     | Referans |           |               |          |                   |           |  |
|                                   | >= 65 - <80 | 0.547    | -0.001    | 0.05          | 0.001    | 0.444             | 0.645     |  |
|                                   | >=80        | 0.898    | 0.001     | 0.056         | 0.001    | 0.791             | 1.011     |  |
| Entübasyon                        | Yok         | Referans |           |               |          |                   |           |  |
|                                   | Var         | 0.98     | 0.001     | 0.04          | 0.001    | 0.902             | 1.064     |  |

## TARTIŞMA

Dünyada en sık görülen ve morbidite ve mortalitede artışa neden olan sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlardan biri ÜKİ-ÜSE'lerdir. Ancak ÜKİ-ÜSE'lerin hastaların ölüm riski üzerine doğrudan etkisi olup olmadığı tartışmalıdır. Gilen ve arkadaşlarının kardiyak operasyon yapılan ve ÜKİ-ÜSE gelişen hastalarda risk faktörlerini araştırdıkları çalışmada; ileri yaş, kadın cinsiyet, diyabetes mellitus varlığı, yoğun bakım ünitesinde yatış süresi ÜKİ-ÜSE gelişimi üzerine etkili faktörler olarak belirlenmiştir (11). Ancak cerrahi üzerine en sık etkili olan değişkenler kontrol edildiğinde, ÜKİ-ÜSE'nin mortalite ile ilişkili olmadığı saptanmıştır. ÜKİ-ÜSE tespit edilen hastaların diğer komorbid durumlardan veya komplikasyonlardan dolayı öldüğü vurgulanmıştır (11). Çeşitli çalışmalarda ÜKİ-ÜSE'nin ölüm riski üzerine etkili bağımsız bir risk faktörü olmadığı gösterilmiştir (12-14). Buna karşılık 10 yıllık bir zaman diliminde toplam 8785 hastayı kapsayan 10 adet çalışmanın ele alındığı bir metaanalizde ÜKİ-ÜSE'nin mortaliteyi artırdığı saptanmıştır (15).

Bu çalışmada sekonder KDE gelişiminin, ÜKİ-ÜSE gelişmiş hastalarda hastaneden çıkış şeklinin ölüm olması üzerine etkili faktörlerden biri olduğu bulunmuştur. ÜKİ-ÜSE'ye sekonder gelişen KDE'lerin morbidite, mortalite ve maliyeti artırdığı düşünülen ve ÜKİ-ÜSE'ye sekonder KDE'lerde risk faktörlerini belirlemek için yapılan bir çalışmada; özellikle karaciğer, böbrek hastaları ve nötropenik hastalarda ölüm riskin daha fazla olduğu bulunmuştur (16). ÜKİ-ÜSE gelişen ve bu risk faktörlerinin olduğu hastalarda mortaliteyi azaltmak için sekonder KDE gelişiminin önlenmesi özellikle önemlidir. Bunun için de başta el hijyeni olmak üzere enfeksiyon kontrol önlemlerine uyuma dikkat edilmelidir.

Diyabetes mellitusu olan hastaların diyabetin immün sistemdeki etkilerinden dolayı genel olarak enfeksiyon gelişimine yatkın oldukları bilinmektedir. (16). Bu çalışmada saptanan bir diğer risk faktörü diyabetes mellitus varlığıdır. ÜKİ-ÜSE gelişen diyabetes mellitusu olan hastalarda mortalitenin azaltılması için diyabetin takibi önemli olabilir. ÜKİ-ÜSE gelişen hastalarda diyabete bağlı mortalite artışının nedeni

bilinmemekle birlikte; diyabetes mellitusun kronik komplikasyonlarının mortalite artışına katkısı olması muhtemeldir. Bu nedenle diyabetin hastane yatışı sırasındaki kontrolünün ÜKİ-ÜSE gelişen hastalarda ÜKİ-ÜSE'ye mortaliteyi azaltıp azaltmadığı incelenmelidir. Ayrıca yaşlı diyabetik hastalarda üriner sistem enfeksiyonunun mortaliteyi arttırdığı gösterilmiştir (17).

Bu çalışmada ÜKİ-ÜSE gelişmiş hastalarda mortalite üzerine etkili diğer faktörler yaş grubu, hasta günü, böbrek yetmezliği varlığı ve entübasyon uygulanmış olması olarak bulunmuştur. Çok değişkenli lojistik regresyon analizine göre hasta gününde 1 günlük artış ölüm riskini %0.2 kat artırmaktadır. YBÜ'de yatış süresinin ÜKİ-ÜSE gelişen hastalarda mortalite üzerine etkisi gösterilmemiş olsa da, ÜKİ-ÜSE gelişimini artırdığı bilinmektedir (11,12,15). Bu nedenle YBÜ'de yatış sürelerinin kısıtlanması ÜKİ-ÜSE gelişiminin azalmasına ve dolayısıyla ÜKİ-ÜSE'ye bağlı mortalitenin azalmasına katkı sağlayacaktır. İleri yaş, entübasyon uygulanması, diyabetes mellitus ve böbrek yetmezliği gibi faktörler ise değiştirilemez veya değiştirilmesi çok güç faktörlerdir. Ayrıca diyabetes mellitus ve böbrek yetmezliği gibi kronik hastalıkların hastaneye yatıştan sonra modifiye edilmesinin etkisi bilinmemektedir.

Bulguların yorumlanmasında çalışmanın kısıtlılıkları göz önünde bulundurulmalıdır. Değişkenlere ait verilerin Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyansı kapsamında toplanmış olması nedeniyle hastanelerde yürütülen sürveyansın duyarlılığındaki farklılıklardan etkilenmiş olabilir. Bazı hastanelerin ÜKİ-ÜSE gelişen hastaları daha duyarlı bir şekilde tespit ederken, diğerlerinin ise daha düşük bir duyarlılıkla saptıyor olması beklenmektedir. Çalışmada ÜKİ-ÜSE tanısının sürveyans tanı kriterlerine göre konulmuş olduğu da akılda bulundurulmalıdır. Ayrıca özellikle bağımlı değişken başta olmak üzere değişkenlere ait eksik verilerin de taraf tutmaya yol açması beklenebilir. 2018 yılında ülke genelinde uygulanmakta olan sürveyans tanı kriterleri düşünüldüğünde aslında ÜKİ-ÜSE gelişmiş ancak idrar kültürü alınmadığı için bildiri yapılmamış hastalar olabilir. Ayrıca bazı hastalarda idrar kültürü sonucu kontamine olmuş ve bu hastalarda idrar kültürü tekrar edilmeden taburcu olmuş veya ölmüş olabilirler. Daha çok ölmüş hastalar

veya taburcu edilmiş hastalar ise sistematik hata ortaya çıkmış olabilir. Ancak tüm bu nedenlerden kaynaklanan taraf tutmanın sonuçları önemli ölçüde etkilemesi beklenmemektedir. Çünkü çalışmaya alınan veriler bir yılın tamamını ve ülkemizdeki hemen tüm hastaneleri kapsamaktadır. Bunun dışında ülkemizde yürütülen sürveyansın aktif, prospektif ve hastaya dayalı olması da bulgulara güvenilirliği artırmaktadır. Elde edilen veri tabanının büyüklüğü de düşünüldüğünde sonuçların yol gösterici olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak ÜKİ-ÜSE gelişen hastalarda mortalite üzerine nedensel etkili faktörlerin ve bu faktörler arasındaki ilişkilerin yapısını anlamak ve belirlemek oldukça zordur ancak bu yapının karmaşık olduğu açıktır. Olası risk faktörlerini modifiye edebilmenin güçlüğünün yanı sıra risk faktörlerini modifiye etmenin de mortalite üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle bu hasta grubunda mortalitenin azaltılmasına yönelik en akılcı ve verimli yaklaşım ÜKİ-ÜSE gelişiminin önlenmesidir.

### KAYNAKLAR

1. CDC. Urinary Tract Infection (Catheter-Associated Urinary Tract Infection [CAUTI] and Non-Catheter-Associated Urinary Tract Infection [UTI] and other Urinary System Infection [USI]) Events. 2019.
2. Dudeck MA, Horan TC, Peterson KD, Allen-Bridson K, Morrell G, Anttila A, et al. National Healthcare Safety Network report, data summary for 2011, device-associated module. *Am J Infect Control*. 2013; 41(4):286-300. doi: 10.1016/j.ajic.2013.01.002.
3. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Özet Raporu 2017.
4. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı. Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) Raporu Özet Veri, 2008-2009.
5. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye'de Yoğun Bakım Ünitelerinde İnvaziv Araç İlişkili Enfeksiyonlarda Standardize Enfeksiyon Oranı ve Kümülatif Atfedilebilir Fark özet Raporu 2017.
6. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Etken Dağılımı ve Antibiyotik Direnç Raporu 2017.
7. Lo E, Nicole L, Classen D, Arias KM, Podgorny K, Anderson DJ, et al. Strategies to prevent urinary catheter-associated urinary tract infections in acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008; 29(Suppl 1):41-50.
8. Magill S, Edwads JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumayati G, Kainer MA, et al. Multistate point prevalence survey of health care associated infections. *N Engl J Med*, 2014;370(13):1198-208. Doi: 10.1056/NEJMoa1306801.
9. Gould C, Umscheid C, Agarwal R, Kuntz G, Pegues DA and the Healthcare Infections Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009.
10. Umscheid C, Mitchell M, Doschi J, Agarwal R, Williams K, Brennan PJ. Estimating the proportion of infections that are reasonably preventable and related mortality and cost. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2011;32(2):101-14. doi: 10.1086/657912.
11. Gillen JR, Isbell JM, Michaels AD, Lau CL, Sawyer RG. Risk factors for urinary tract infections in cardiac surgical patients. *Surg Infect*, 2015;16(5):504-8. Doi: 10.1089/sur.2013.115.
12. Bagshaw SM, Laupland KB. Epidemiology of intensive care unit-acquired urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis*, 2006;19(1):67-71. Doi: 10.1097/01.
13. van der Kooi TI, de Boer AS, Mannien J, Wille JC, Beaumont MT, Mooi BW, et al. Incidence and risk factors of device-associated infections and associated mortality at the intensive care in the Dutch surveillance system. *Intensive Care Med*, 2007;33(2):271-8. Doi: 10.1007/s00134-006-0464-33.
14. Clech C, Schwebel C, Français A, Toledano D, Fosse JP, Garrouste-Orgeas M, et al. Does catheter-associated urinary tract infection increase mortality in critically ill patients? *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007;28(12):1367-73. Doi: 10.1086/523279.
15. Li F, Song M, Xu L, Deng B, Zhu S, Li X. Risk factors for catheter-associated urinary tract infection among hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Adv Nurs*, 2019;75(3):517-27. Doi: 10.1111/jan.13863.
16. Greene MT, Chang R, Kuhn L, Rogers MA, Chenoweth CE, Shuman E, et al. Predictors of hospital-acquired urinary tract-related bloodstream infection. *Infect Control Hosp epidemiol*, 2012;33(10):1001-7. Doi: 10.1086/667731.
17. Kakde P, Redkar NN, Yelale A. Urinary tract infection in elderly: clinical profile and outcome. *J Assoc Physicians India*, 2018;66(6):14-7.

# Lipopolisakkarit'in neden olduğu bağırsak toksisitesine karşı biyosentetik gümüş nanopartiküllerin etkisi

## The effect of biosynthetic silver nanoparticles against intestinal toxicity caused by lipopolysaccharide

Fatma ÖZTÜRK-KÜP<sup>1</sup>, Burçin KOÇAK<sup>2</sup>, Ali Tuğrul AKIN<sup>1</sup>, İsrail DOĞANYİĞİT<sup>2</sup>, Aslı OKAN<sup>3</sup>,  
Emin KAYMAK<sup>3</sup>, Züleyha DOĞANYİĞİT<sup>3</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Nanopartiküller, sahip oldukları üstün fiziksel özellikleri nedeniyle biyoteknoloji, farmakoloji, tıp, sensörler, bilişim ve iletişim, elektronik, savunma, tekstil, makine ve inşaat sanayileri de dahil olmak üzere bir çok alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Biyolojik sentez yöntemleri toksik kimyasallar kullanılmadığından dolayı farmasötik ve diğer biyomedikal uygulamalar için çevre dostu özellikleri nedeniyle son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar ve bitki ekstraktları ile nanopartiküllerin biyolojik sentezi ile ilgili çalışmalar günümüzde hızla artmıştır. Bitki orijinli polifenolik bileşikler son zamanlarda çalışmalarda yoğun şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan bağırsak hasarı ve apoptozis üzerine üzüm çekirdeği ekstresi ile hazırlanan biyosentetik gümüş nanopartiküllerin etkisinin araştırılması amaçlandı.

**Yöntem:** Çalışmada 80 adet Wistar albino türü yetişkin erkek sıçanlar; kontrol grubu, LPS uygulama grubu, üzüm çekirdeği ekstresi grubu, gümüş nanopartikül (AgNP) grubu, Ag iyonu grubu ve LPS+ Ag iyonu grubu, LPS+ AgNP grubu, LPS+ üzüm çekirdeği özütü grupları olmak üzere rastgele sekiz eşit gruba ayrıldı. Hayvanlardan alınan

### ABSTRACT

**Objective:** Nanoparticles have been used in many fields including biotechnology, pharmacology, medicine, sensors, informatics and communications, electronics, defense, textile, machinery and construction industries due to their superior physical properties. Biological synthesis methods have been widely used in recent years due to their environmentally friendly properties for pharmaceutical and other biomedical applications since toxic chemicals are not used. Studies on the biological synthesis of microorganisms and plant extracts and nanoparticles have increased rapidly today. Plant origin polyphenolic compounds have been used extensively in recent studies. In this study, it was aimed to investigate the effect of biosynthetic silver nanoparticles prepared with grape seed extract on intestinal damage and apoptosis caused by lipopolysaccharide (LPS).

**Methods:** In the study, 80 rats of Wistar albino were male rats; control group, LPS group, grape seed extract group, silver nanoparticle (AgNP) group, Ag ion group and LPS + Ag ion group, LPS + AgNP group, LPS + grape seed extract groups were randomly divided into eight groups. Apoptotic cell counts were evaluated

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri

<sup>3</sup>Yozgat Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yozgat



İletişim / Corresponding Author : Züleyha DOĞANYİĞİT

Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Erdoğan Akdağ Kampüsü 66100 Yozgat - Türkiye

E-posta / E-mail : zuleyha.doganyigit@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 11.02.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 26.03.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.52386

Öztürk-Küp F, Koçak B, Akın AT, Doğanyigit İ, Okan A, Kaymak E, Doğanyigit Z. Lipopolisakkarit'in neden olduğu bağırsak toksisitesine karşı biyosentetik gümüş nanopartiküllerin etkisi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 333-342

bağırsak dokularında histopatolojik değerlendirme ve TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre sayıları değerlendirildi.

**Bulgular:** Çalışmanın sonucunda LPS uygulamasının bağırsaklarda nekrotik villuslarda lümen dökülme, villuslarda dejeneratif değişiklikler ve kanamaya neden olduğu, Ag iyonu, üzüm çekirdeği özütü ve AgNP'lerin LPS ile birlikte uygulanması ile bu değişikliklerin hafiflediği görülmüştür. Ayrıca LPS apoptotik hücre sayısını da diğer gruplara göre anlamlı derecede artırmış ve Ag iyonu, üzüm çekirdeği ekstresi ve AgNP'lerin LPS ile birlikte uygulanması ise apoptotik hücre sayısı üzerine istatistiksel olarak olumlu etki göstermiştir.

**Sonuç:** Sonuç olarak biyosentetik AgNP'lerin LPS'nin neden olduğu toksisiteyi azaltacak potansiyele sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bu çalışma bundan sonraki çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

**Anahtar Kelimeler:** LPS, biyosentetik gümüş nanopartikül, üzüm çekirdeği ekstresi, bağırsak, TUNEL

by histopathological evaluation and TUNEL method in intestinal tissues from animals.

**Results:** As a result of the study, it has been observed that LPS application causes lumen pouring in necrotic villi in the intestines, degenerative changes and bleeding in villi, and these changes are alleviated with the application of Ag ion, grape seed extract and AgNPs together with LPS. In addition, LPS significantly increased the number of apoptotic cells compared to other groups, and the application of Ag ions, grape seed extract and AgNPs together with LPS showed a statistically positive effect.

**Conclusion:** As a result, It can be said that biosynthetic AgNPs have the potential to reduce the toxicity caused by LPS. This study will shed light on future studies.

**Key Words:** LPS, biosynthetic silver nanoparticle, grape seed extract, intestine, TUNEL

## GİRİŞ

Nanoteknoloji, moleküler düzeydeki nanomateryallerin manipülasyonu ile ilgilenen ve fizik, kimya, biyoloji ve çeşitli mühendislik dallarıyla iç içe olan uygulamalı bir bilim dalıdır (1). Nanopartiküllerin kullanım alanları arasında ev aletleri ve ürün kaplamaları (2), biyomedikal uygulamalar (3, 4) mücevhercilik (5), elektrokimyasal sensörler ve biyosensör uygulamaları (6-9), tıp (10-12) gibi pek çok alan bulunmaktadır.

Son yıllarda gümüş nanopartiküller (AgNPs) üzerinde yeni optik, katalitik, antibakteriyel, antiviral ve antifungal özellikleri, geniş yüzey alanı ve yüksek reaktiviteleri nedeniyle çeşitli araştırmalar yapılmıştır (13). Gümüş ve diğer metal nanoparçacıkları hazırlamak için kullanılan kimyasal ve fiziksel teknolojiler oldukça pahalıdır ve yan ürünleri ve atıkları çevre için toksik ve zararlıdır

(14-16). Bu nedenle araştırmacılar nanopartiküllerin kimyasal ve fiziksel teknolojilere özgü bir alternatif olarak maya, mantarlar, bakteriler, meyve ve bitki özleri gibi çeşitli biyolojik sistemleri kullanarak sentezini önermektedir (17,18). Biyolojik sentez yöntemleri toksik kimyasallar kullanılmadığından farmasötik ve diğer biyomedikal uygulamalar için çevre dostudur.

Üzüm bitkisinin zengin bir proantosiyenin kaynağı olduğu bilinmektedir ve bu nedenle birçok araştırmacı üzüm ve yan ürünlerinin tanımlanması ve biyoaktivitelerinin değerlendirilmesi üzerine araştırmalar yapmaktadırlar. Üzüm çekirdeği özütü, esas olarak monomerik kateşin, epikateşin, gallik asidin yanında polimerik ve oligomerik proantosiyeninler açısından oldukça zengindir (19).

Lipopolisakarit (LPS), Gram negatif bakterilerde

hücre duvarlarının toksik bir bileşenidir. Gram negatif bakteri hücre duvarı; içte peptidoglikan tabaka, dışta LPS, proteinler ve fosfolipitlerden oluşur. LPS tabakada bulunan endotoksin molekülü, hücre membranında kaldığı sürece inaktiftir. Hücrenin hızlı büyümesi veya hücre yıkımı sırasında açığa çıkan endotoksin sepsis/endotoksemide olaylar dizisini başlatan anahtar moleküldür. LPS iyi bilinen bir bakteriyel enfeksiyon modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılır (20).

Biz de bu çalışmada bağırsaklarda LPS ile oluşan histopatolojik hasara ve apoptoza karşı üzüm çekirdeği ekstresi ile biyolojik olarak sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin etkilerini araştırdık.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Gümüş Nanopartiküllerinin Biosentezi ve Karakterizasyonu

Gümüş nanopartiküllerinin hazırlanmasında indirgeyici ajan olarak Üzüm (*Vitis vinifera*) bitkisinin çekirdek ekstresi kullanılmıştır. Kullanılan üzüm çekirdeği ekstresi Sepe Natural Organik Ürünler Sanayii ve Ticaret A.Ş tarafından kapsül şeklinde ticari olarak temin edilmiştir. İçeriğinde %95 oranında oligomerik proantosiyanidin bulunmaktadır. Biosentetik gümüş nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterizasyonu önceki çalışmamızda belirtildiği gibidir (21).

### Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için kullanılacak olan deney prosedürü Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 16/058 nolu karar ile onaylanmıştır. Çalışmada kullanılan 8-12 haftalık *Wistar albino* türü yetişkin erkek sıçanlar Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilmiştir. Günün normal düzeninde 21 °C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamda su ve besin ihtiyacı karşılanan 80 adet sıçan aşağıda belirtilen şekilde 8 eşit gruba ayrılmıştır (n=10):

**1. Grup 1 (Kontrol grubu):** Bu gruptaki sıçanlara başlangıçta ve 30 dk. sonra olmak üzere deney süresi

boyunca ikişer kez serum fizyolojik (SF) (%0,9 NaCl sol.) 0,1 ml intraperitoneal (i.p.) yolla uygulanmıştır (SF+SF) (n=10).

**2. Grup 2 (LPS grubu):** Bu gruba i.p. yolla SF verildikten 30 dk. sonra yine i.p. yolla LPS (*Escherichia coli* LPS, serotip 0127: B8; Sigma Aldrich) (30 mg/kg) uygulanmıştır (SF+LPS) (n=10) (22).

**3. Grup 3 (LPS + AgNP):** Bu gruptaki sıçanlara LPS verildikten 60 dk. sonra AgNP oral yolla uygulanmıştır (200 mg/kg) (n=10) (23).

**4. Grup 4 (LPS + Üzüm Çekirdeği Özütü):** Bu grupta LPS (30 mg/ kg) verilen hayvanlara 60 dk. sonra üzüm çekirdeği ekstresi oral yolla verilmiştir (200mg/kg) (n=10).

**5. Grup 5 (LPS+ Ag):** Bu gruptaki LPS (30 mg/kg) verilen hayvanlara 60 dk. sonra AgNO<sub>3</sub> oral yolla verilmiştir (200mg/ kg) (n=10).

**6. Grup 6 (Üzüm çekirdeği özütü):** Bu gruptaki sıçanlara SF verildikten 30 dk. sonra üzüm çekirdeği ekstresi oral yolla verilmiştir (200 mg/kg) (n=10) (24).

**7. Grup 7 (AgNP):** Bu gruba SF verildikten 30 dk. Sonra AgNP oral yolla verilmiştir (200 mg/kg) (n=10).

**8. Grup 8 (Ag iyonu):** Bu grupta SF (30 mg/kg) verilen sıçanlara 30 dk. sonra AgNO<sub>3</sub> oral yolla verilmiştir (200 mg/ kg n=10).

Tüm i.p. enjeksiyonlar günün aynı saatinde yapılmış ve deney sonunda ketaminehydrochloride (50 mg/kg i.m/i. p) ve %2 xylazinehydrochloride (10 mg/kg i.m/i.p) ile anestezi altına alınarak bağırsak dokuları çıkarılan ratların yaşamlarına son verilmiştir. Elde edilen bağırsak dokuları %4'lük formaldehit içerisinde fikse edilerek rutin doku takibinden sonra, histopatolojik değerlendirme ve TUNEL analizi için parafin bloklar içerisine gömülmüştür.

### Histolojik Analiz

%4'lük formaldehit solüsyonu ile fikse edilen ve rutin histolojik doku takibinden geçirildikten sonra parafine gömülen dokulardan alınan 5µm

kalınlığındaki kesitler Harris Hematoksilen ve Eozin ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelendi (Olympus BX53). Bağırsak kesitlerinde histopatolojik değerlendirme amacıyla nekrotik villusun bağırsak lümenine dökülmesi, kanama ve villustaki dejeneratif değişiklikler gibi kriterler kullanıldı. Her kategorideki histopatolojik sonuçlar 0 = yok, 1= hafif, 2 = orta ve 3 = şiddetli şeklinde skorlanmıştır. Sonuçlar Image J yazılım programı ile değerlendirilmiştir.

### TUNEL Yöntemi

Bağırsak doku kesitlerine apoptoz tespiti amacıyla TUNEL metodu (In-situ Cell Death Detection Kit, Florescein Kit -Roche-, kit içerisinde önerilen işlem sırasına göre uygulandı. Öncelikle 5-6 µm kalınlığındaki barsak kesitleri deparaffinize edildi, daha sonra rehidre edilen kesitler PBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra, antijen geri kazanımı için dokular 0.01 M Sodyum Sitrat tampon içerisine koyuldu ve mikrodalga fırında 5 dk. boyunca 300-350 °C'ye maruz bırakıldı. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan dokular daha sonra kit içerisinde bulunan TUNEL reaksiyonu enzim karışımı ile karanlık ortamda 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yıkanan dokuların üzerine 4,6-diamidinde-2'-phenylindol (DAPI) damlatıldı ve üzeri kapatılan dokular üzerinde floresan mikroskop (Olympus BX51) altında 450-500 dalga boyunda apoptotic hücre tayini gerçekleştirildi.

Apoptotik indeks için toplamda 20X objektifte 50 farklı alandaki apoptotik hücreler sayıldı ve sonuçlar Image J yazılım programı ile değerlendirildi.

### İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada kullanılan istatistiksel veriler, SPSS 22.0 (SPSS Inc, USA) paket programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hocTukey testi ile değerlendirildi. Ayrıca yapılan istatistiksel analizlerin doğrulanması ve grafiklerin elde edilmesi amacıyla GraphpadPrism7.0 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). P<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

### BULGULAR

#### Biyosentetik Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

UV-VIS spektrofotometre kullanımı metalde var olan lokalize yüzey plazmon rezonansını uyararak, bir elektrik alan oluşturup belirli bir dalga boyunda rezonans meydana getirir ki o dalga boyunda güçlü ışın saçılmasına neden olmaktadır. Bu sayede spektrofotometrik ölçümlerin değerlendirilmesi farklı dalga boylarında renksel ya da kolorimetrik olarak kullanılan skala değerlendirmesi yapılır. Üzüm çekirdeği ekstresi AgNP kompleksindeki Ag<sup>+</sup> iyonunun Ag<sup>0</sup> iyonuna indirgenmesi, yüzey plazmon rezonansının uyarılmasını sağlamıştır ve sonuç olarak UV-Vis spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. UV-Vis ölçümlerine göre 420-470 nm dalga boyunda AgNP oluşması beklenir. Yapılan ölçüm sonucunda üzüm çekirdeği ekstraktının ~278 nm'de, biyosentetik AgNP'nin ise ~446 nm de absorbans piki verdiği belirlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu analizi ile AgNP'lerin küresel şekilli ve ortalama olarak büyüklüklerinin de 67.20 ± 5 nm olduğu belirlenmiştir (21). AgNP'lerin elektriksel yükü zeta analizi ile belirlenmiştir. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre AgNP elektriksel yükü -30,4 olarak tespit edilmiştir. Yüzey yükünün negatif olması negatif-negatif itme kuvvetinden dolayı AgNP'lerde yüksek dağılım, uzun süreli kararlılık ve iyi kolloidal yapının oluştuğunu göstermektedir (21).

#### Histopatolojik Analizler

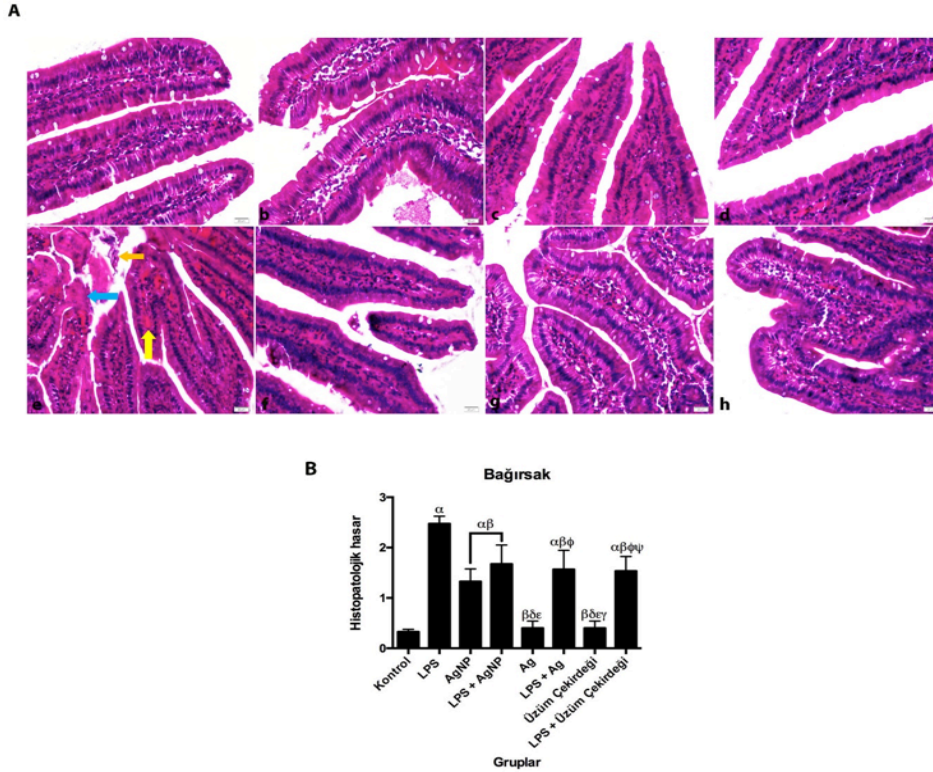
Biyosentetik AgNP'lerin LPS ile oluşturulan bağırsak toksisitesine karşı herhangi bir etkisinin olup olmadığı, fareler üzerinde yapılan in vivo çalışmalar sonucunda histolojik ve immunohistokimyasal analizler ile belirlenmeye çalışılmıştır.

Yapılan histolojik incelemeler sonucunda Ag ve üzüm çekirdeği uygulanan gruplara ait bağırsak dokularının, histolojik olarak kontrol grubuna benzer bir yapı gösterdiği belirlendi (Şekil 1A). LPS uygulanan



bağırsak dokusunda kanama (sarı ok), nekrotik villusun bağırsak lümenine dökülmesi (turuncu ok), ve villustaki dejeneratif değişiklikler (mavi ok) gözlenmektedir. Şekil 1B' de gösterilen histopatolojik skorlamaya göre; istatistiksel olarak LPS, AgNP, LPS + AgNP, LPS + Ag ve LPS + Üzüm çekirdeği gruplarının kontrol grubundan farklı olduğu gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). LPS' de gözlenen histopatolojik hasarın diğer tüm gruplardan yüksek olduğu görülmüştür ( $P<0.05$ ). AgNP ve LPS + AgNP grupları LPS grubuna göre hasar oranı

azalmıştır ( $P<0.05$ ). Ag ve üzüm çekirdeği uygulanan gruplardaki hasarın LPS + AgNP ve LPS + Ag gruplarına göre daha az olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Sadece Ag uygulanan grupta gözlenen hasarın LPS + Ag grubuna göre daha az olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Son olarak, LPS + Ag grubu ile LPS + Üzüm çekirdeği grubu arasında değerlendirilen hasar miktarının birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Kontrol, Ag ve Üzüm çekirdeği uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık olmadığı gösterilmiştir.



**Şekil 1A.** Kontrol grubu (a), AgNP grubu (b), Ag grubu (c), Üzüm çekirdeği grubu (d), LPS grubu (e), LPS + AgNP grubu (f), LPS + Ag grubu (g) ve LPS + Üzüm çekirdeği (h) grubu bağırsak dokularının H&E boyama yöntemi ile histopatolojik olarak değerlendirilmesi. Büyütme 20X, bar = 50  $\mu$ m.

**Şekil 1B.** Histogram grafiğinde gösterilen histopatolojik skor verileri ort. $\pm$  SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü ANOVA varyans analizi ve TUKEY post hoc çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır ( $\alpha P<0.05$  kontrol grubundan farklı;  $\beta P<0.05$  LPS grubundan farklı;  $\delta P<0.05$  AgNP grubundan farklı;  $\epsilon P<0.05$  LPS + AgNP grubundan farklı;  $\phi P<0.05$  Ag grubundan farklı;  $\psi P<0.05$  LPS + Ag grubundan farklı;  $\chi P<0.05$  Üzüm çekirdeği grubundan farklı)

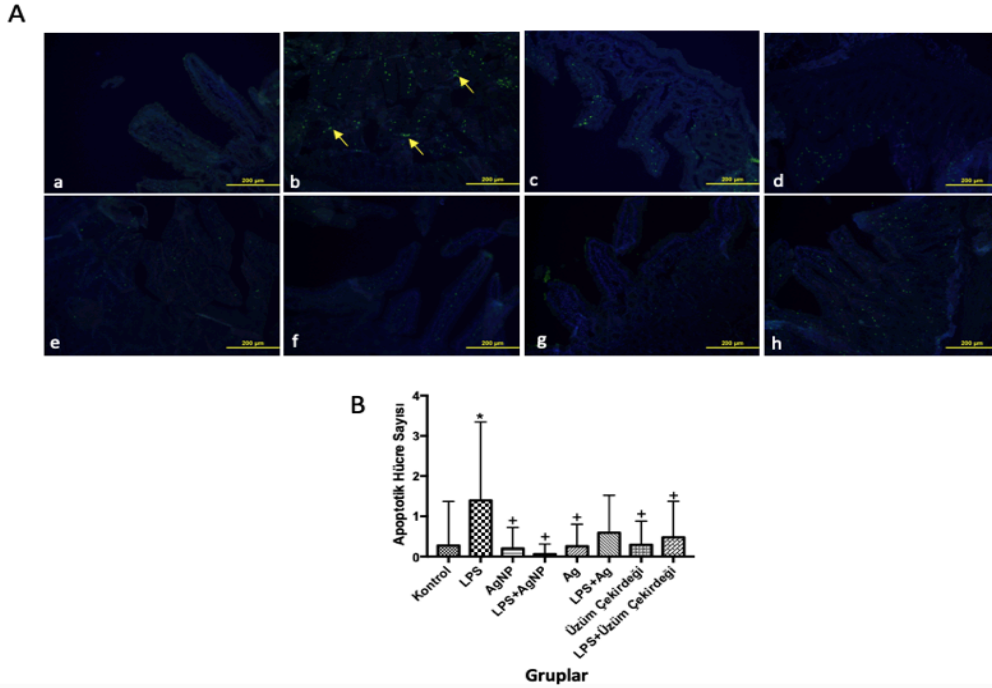
## Apoptotik Analizler

TUNEL metodu uygulanan kesitlerde yeşil renkli ışığa sergileyen hücreler sarı ok ile gösterilmiştir (Şekil 2A). Şekil 2B’de gerçekleştirilen apoptotik hücre sayısı tayini sonucunda LPS grubunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu anlamlılık ‘\*\*’ ile gösterilmiştir. Ayrıca LPS grubu ile kıyaslandığında AgNP, Ag, Üzüm çekirdeği, LPS+AgNP, LPS+Üzüm çekirdeği gruplarındaki apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde az olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). LPS grubu ile bu gruplar arasındaki anlamlı farklılık ise ‘+’ işareti ile gösterilmiştir. Kontrol grubu ile LPS+Ag grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir

farklılık gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). Buna rağmen LPS grubu ile LPS+Ag grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ( $p > 0.05$ ).

## TARTIŞMA

Nanoteknoloji, nanomateryal uygulamalarının yanı sıra bu materyallerin sentezi ve karakterizasyonu ile de ilgilenmektedir. Nanopartiküller eşsiz özellikleri sayesinde son yıllarda birçok bilim insanının dikkatini çekmiş ve çok çeşitli alanlarda uygulanma imkânı bulmuşlardır. Farmakolojinin nanoteknoloji ile birleştirilmesi gittikçe artan ilaca dirençli mikroorganizmaları kontrol etmek için yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine yardımcı olmuştur. Gümüş, altın, titanyum dioksit



**Şekil 2A.** Kontrol grubu (a), AgNP grubu (b), Ag grubu (c), Üzüm çekirdeği grubu (d), LPS grubu (e), LPS + AgNP grubu (f), LPS + Ag grubu (g) ve LPS + Üzüm çekirdeği (h) grubu bağırsak dokularının TUNEL yöntemi ile değerlendirilmesi. Sarı oklar apoptotik hücreleri göstermektedir.

**Şekil 2B.** Apoptotik indeks histogram grafiğinde gösterilmektedir.

vb. antimikrobiyal metaller ve magnezyum oksit gibi metal oksit nanopartikülleri en iyi bilinenler arasındadır. Bunun yanı sıra, son yıllarda bitkisel kaynaklı polifenolik bileşiklerin nanopartiküller ile birleştirilerek yeni stratejiler geliştirilmesi yaygın hale gelmiştir (25).

Üzüm çekirdeği ile yapılan çalışmalar zengin proantosiyanin içeriğinin serbest radikalleri temizleyebildiği ve oksidatif stres ile ilişkili miyokardial infarktüs, ateroskleroz, ilaç ile indüklenmiş akciğer, karaciğer ve böbrek hasarı (26-28) ve prenatal dönemde valproik asit maruziyetine bağlı olarak geliştirilen serebral korteks defektine karşı etkili olduğunu göstermektedir (29).

Üzüm çekirdeğinin dokularda inflamasyona bağlı meydana gelen oksidatif hasara karşı olumlu etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir. Wang ve ark. (30) farelerde yaptıkları çalışmada arsenik trioksit (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ile indüklenen renal inflamasyonda, üzüm çekirdeğinin NF- $\kappa$ B sinyal yolağının aktivasyonunu inhibe ederek inflamatuvar sitokinlerin salınımını baskıladığını bildirmiştir.

Bakteriyel LPS sepsisi ve septik şoku tetikleyen bir endotoksindir ve immün hücreleri tarafından Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-10 gibi pro- ve anti-inflamatuvar sitokinlerin salınımı ile sonuçlanan inflamatuvar cevabın oluşturulmasına neden olmaktadır (22).

Pallares ve ark. (31) ratlarda LPS ile endotoksitemi modeli oluşturmuş ve bu endotoksiteminin belirli doku ve organlardaki etkilerini gözlemek amacıyla kan plazması, eritrositler, dalak ve karaciğerde üzüm çekirdeği ekstresinin etkilerini incelemiştir. Çalışmanın sonucunda LPS ile indüklenen endotoksitemi modelinde üzüm çekirdeği ekstresinin kan plazmasında, eritrositlerde, dalakta ve karaciğerde artan NO<sub>x</sub> proinflatuvar markırı ekspresyonunu azalttığını bulmuşlardır. Ayrıca üzüm çekirdeği ekstresinin IL-6 ve iNOS ekspresyonlarını da ciddi şekilde azalttığını belirlemiştir.

Nanopartiküller içerisinde en yaygın kullanıma

sahip olanlardan biri olan AgNPs çok güçlü antimikrobiyal özelliklere sahiptir ve gıda, tıbbi ürünler ve endüstriyel kaplama gibi birçok alanda yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Fakat tüm yararlı özelliklerine rağmen, nihayetinde metal olan bu parçacıkların beslenme, hava veya su yoluyla vücuda alınması ile karaciğer, böbrek, akciğer ve beyin gibi çeşitli organlarda fazla miktarda birikmesi ciddi sonuçlara yol açabileceğinden dikkatli olunmalıdır. Nitekim AgNP ile yapılan çalışmalar, bu nanopartiküllerin balıklarda, farelerde ve insanlarda hücre içerisinde biriktiği ve tüm vücuda dağılabildiği belirlenmiştir (32-34).

Elle ve ark. (35) yapmış oldukları çalışmada, oral yolla verilen AgNPs'nin kalp ve karaciğer dokusunda oksidatif stresi arttırdığını ve kan plazmasında proinflatuvar sitokinlerin artışına sebep olduğunu bulmuşlardır.

AgNPs birçok hayati doku ve organda (karaciğer, dalak, beyin, böbrek, kalp, akciğer) birikme özelliğine sahiptirler (36-38). Adeyemi ve Faniyan, AgNP'nin çeşitli dokularda lipid peroksidasyonuna neden olabileceğini ve eser miktardaki uygulamalarının antioksidan özelliğe sahip olmasına rağmen bu özelliğini oksidatif stres indükleyicisi olarak değiştirebildiğini bildirmişlerdir (39). AgNP'nin biyolojik etkileri üzerine yapılan birçok çalışma, bu nanopartiküllerin doku ve organlardaki toksik etkilerinin oksidatif strese dayandığını bildirmişlerdir (36, 40).

Bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) birçok doku ve organda inflamasyona sebep olmakta ve sistemik inflamasyonu tetikleyerek sepsise neden olabilmektedir. Zong ve ark. (41) yaptıkları çalışmada LPS ile indüklenmiş ince bağırsak hasarı üzerine domuz lactoferrin-türevli peptid LFP-20'nin etkisini incelemiştir. Çalışmada LPS'nin ince bağırsakta mukozal lezyonların oluşumuna ve apoptozise sebep olduğunu ve özellikle ileumda makrofajların çoğaldığını ve bölgede nötrofil infiltrasyonunun ciddi şekilde arttığını gözlemlemiştir. Yaptığımız

çalışmada, LPS uygulanan bağırsak dokusunda hemoraji, bağırsak lümeninde gözlenen nekrotik villuslar ve genel villus yapısındaki dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir. Bu değişikliklere bağlı olarak gerçekleştirilen doku hasarı skorlamasına göre LPS grubunda kontrol grubuna oranla ciddi bir histopatolojik hasar belirlenmiştir. Ag ve Üzüm çekirdeği ekstresi uygulanan gruplarda bağırsak histolojisinin kontrole yakın bir doku morfolojisi sergilediği, AgNP uygulanan grupta ise histopatolojik hasarın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde artmış olduğu fakat LPS grubundaki histopatolojik hasardan da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde az olduğu belirlenmiştir. Ayrıca LPS+AgNP, LPS+Üzüm çekirdeği ekstresi ve LPS+Ag gruplarındaki histopatolojik hasarın LPS grubundan anlamlı bir şekilde az olduğu gözlenmiştir.

İntestinal mukoza vücudun ilk savunma hattı olarak görev yapmaktadır ve antijenlere karşı dirençli bir bariyer sağlamaktadır. Enfeksiyon sırasında, intestinal mukozanın bütünlüğü apoptoz ve nekrozdan önemli ölçüde etkilenir ve intestinal mukozal bariyerin bozulmasına neden olur (42).

Zhou ve ark. yaptıkları çalışmada, ratlarda LPS ile indüklenmiş immün stresin intestinal mukoza hücrelerindeki apoptozis üzerine visfatinin etkisini

incelemişlerdir. Apoptozisi belirlemek amacıyla ELISA ve Western Blot yöntemleri ile pro-caspase-3 ve caspase-3 ifadelerindeki değişiklikleri incelemiş ve TUNEL yöntemi aracılığıyla da apoptotik hücre tayini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda, visfatinin LPS ile indüklenmiş intestinal mukoza hücrelerindeki artan apoptozisi azalttığı ve olumlu bir etki gösterdiği belirtilmiştir (42). Yaptığımız çalışmada, TUNEL yöntemi uygulanan kesitlerde belirlenen apoptotik indeks ışığında LPS'nin sıçanlarda ciddi bir inflamasyona neden olduğunu ve apoptotik hücre sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını belirledik. Ayrıca apoptotik hücre sayısının LPS grubunda, Ag, AgNP, LPS+AgNP, Üzüm çekirdeği ve LPS+Üzüm çekirdeği gruplarına göre de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazla olduğunu gözledik.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada LPS'nin sıçanların bağırsak mukozasında meydana getirdiği histopatolojik hasara karşı uygulanan biyosentetik AgNP ve üzüm çekirdeği ekstresinin tedavi edici etkilere sahip olduğunu belirledik. Ayrıca biyosentetik AgNP ve üzüm çekirdeği ekstresinin bağırsak mukozasında artan apoptozisi azalttığı ve mukozayı inflamasyona bağlı apoptozisin zararlı etkilerinden koruduğunu söyleyebiliriz.

## TEŞEKKÜR

Biyosentetik nanopartiküllerin karakterize edilmesinde SEM, Zeta potansiyel ölçümleri ve UV analizlerinin yapılmasında yardım ve destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (ERNAM)'ne ve çalışmayı FYL-2016-6769 numaralı proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Sahoo D, Dill DL, Tibshirani R, Plevritis SK. Extracting binary signals from microarray time-course data. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(11):3705-12. DOI: 10.1093/nar/gkm284.
2. Hanks NA, Caruso JA, Zhang P. Assessing *Pistia stratiotes* for phytoremediation of silver nanoparticles and Ag(I) contaminated waters. *J Environ Manage.* 2015;164:41-5. DOI: 10.1016/j.jenvman.2015.08.026.
3. Stone RC, Fellows BD, Qi B, Trebatoski D, Jenkins B, Raval Y, et al. Highly stable multi-anchored magnetic nanoparticles for optical imaging within biofilms. *J Colloid Interface Sci.* 2015;459:175-82. DOI: 10.1016/j.jcis.2015.08.012.
4. Uskoković V. When 1+1>2: Nanostructured composites for hard tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;57:434-51. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.050.
5. Asztemborska M, Steborowski R, Kowalska J, Bystrzejewska-Piotrowska G. Accumulation of Platinum Nanoparticles by *Sinapis alba* and *Lepidium sativum* Plants. *Water Air Soil Pollut.* 2015;226(4):126-. DOI: 10.1007/s11270-015-2381-y.
6. Haverkamp RG, Marshall AT, van Agterveld D. Pick your carats: nanoparticles of gold-silver-copper alloy produced in vivo. *Journal of Nanoparticle Research.* 2007;9(4):697-700.
7. Li H, Qiao Y, Li J, Fang H, Fan D, Wang W. A sensitive and label-free photo electrochemical aptasensor using Co-doped ZnO diluted magnetic semiconductor nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics.* 2016; (77): 378-84. DOI: 10.1016/j.bios.2015.09.066.
8. Yamada K, Choi W, Lee I, Cho B-K, Jun S. Rapid detection of multiple foodborne pathogens using a nanoparticle-functionalized multi-junction biosensor. *Biosensors and Bioelectronics.* 2016;77:137-43.
9. Yu Y, Guo M, Yuan M, Liu W, Hu J. Nickel nanoparticle-modified electrode for ultra-sensitive electrochemical detection of insulin. *Biosensors and Bioelectronics.* 2016;77:215-9. DOI: 10.1016/j.bios.2015.09.036.
10. Göbel G, Lange R, Hollidt J-M, Lisdat F. Development of a fast and simple test system for the semiquantitative protein detection in cerebrospinal liquids based on gold nanoparticles. *Talanta.* 2016;146:49-54.
11. Schwaminger SP, Garcia PF, Merck GK, Bodensteiner FA, Heissler S, Günther S, et al. Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C.* 2015;119(40):23032-41.
12. Zhu K, Wu M, Lai H, Guo C, Li J, Wang Y, et al. Nanoparticle-enhanced generation of gene-transfected mesenchymal stem cells for in vivo cardiac repair. *Biomaterials.* 2016;74:188-99. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.010.
13. Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S, Are view on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *J. Adv. Res.* 2016(7) 17-28.
14. Yu DG, Formation of colloidal silver nanoparticles stabilized by Na<sup>+</sup>-poly(-glutamic acid)-silver nitrate complex via chemical reduction process, *J. Colloids Surf. B* 2007;(59): 171-8.
15. Mallick K, Witcomb MJ, Scurrella MS, Self-assembly of silver nanoparticles in a polymer solvent: formation of a nanochain through nanoscale soldering. *Mater. Chem. Phys.* 2005;(90):221-4.
16. Smetana AB, Klabunde KJ, Sorensen CM, Synthesis of spherical silver nanoparticles by digestive ripening, stabilization with various agents, and their 3-D and 2-D superlattice formation, *J. Colloid Interface Sci.* 2005;(284):521-6.
17. Senapati S, Ahmad A, Khan MI, Sastry M, Kumar R, Extracellular biosynthesis of bimetallic Au-Ag alloy nanoparticles, *Small* 2005;(1):517-520.
18. Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi AA, Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: anovel biological approach, *Process Biochem.* 2007;(42):919-23.
19. Rodriguez-Perez C, Garcia-Villanova B, Guerra-Hernandez E, Verardo V. Grape Seeds Proanthocyanidins: An Overview of In Vivo Bioactivity in Animal Models. *Nutrients.* 2019;11(10).doi: 10.3390/nu11102435.
20. Fısgın NT. Sepsis. *OMÜ Tıp Dergisi.* 2004;21(2):100-9.
21. Doğanıyğit, Z., Öztürk Küp, F., Kaymak, E., Okan, A., Koçak, B., Akin, AT., Gümüş Nanopartiküllerinin ve Üzüm Çekirdeği Ekstraktının Endotoksik Kalp Dokusundaki Histolojik Değişikliklere ve TNF- $\alpha$  ve BNP Ekspresyonuna Etkisi. *Bozok Tıp Dergisi*, 2019; (9):87-96.

22. Doganyigit Z, Kup FO, Silici S, Deniz K, Yakan B, Atayoglu T. Protective effects of propolis on female rats' histopathological, biochemical and genotoxic changes during LPS induced endotoxemia. *Phytomedicine*. 2013;20(7):632-9. doi: 10.1016/j.phymed.2013.01.010.
23. Ragab GMA, El-Denshary ES, Hassan AM, Abdel-Azeim SH, Hassan NS, Mannaa FA, et al. Grape (*Vitis vinifera*) seed extract inhibits the cytotoxicity and oxidative stress in liver of rats treated with carbon tetrachloride. *Global J Pharmacol*. 2013;7(3):258-69.
24. Atasever A, Yaman D. The effects of grape seed and colchicine on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2014;66(8):361-5. doi: 10.1016/j.etp.2014.04.008.
25. Gharpure S, Akash A, Ankamwar B. A Review on Antimicrobial Properties of Metal Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020;20(6):3303-39.
26. Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(2):71-83. doi: 10.1007/s00403-009-1001-3.
27. Yadav M, Jain S, Bhardwaj A, Nagpal R, Puniya M, Tomar R, et al. Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. *J Med Food*. 2009;12(3):473-84. doi: 10.1089/jmf.2008.0096.
28. Hu Y, Wei M, Niu Q, Ma R, Li Y, Wang X, et al. Grape seed proanthocyanidin extract alleviates arsenic-induced lung damage through NF- $\kappa$ B signaling. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(3):213-26. <https://doi.org/10.1177/1535370219829881>.
29. Arafat EA, Shabaan DA. The possible neuroprotective role of grape seed extract on the histopathological changes of the cerebellar cortex of rats prenatally exposed to Valproic Acid: animal model of autism. *Acta Histochem*. 2019;121(7):841-51. doi: 10.1016/j.acthis.2019.08.002.
30. Wang C, Li J, Song GL, Niu Q, Xu SZ, Feng GL, et al. Grape Seed Procyranidin Extract Reduces Arsenic-Induced Renal Inflammatory Injury in Male Mice. *Biomed Environ Sci*. 2017;30(7):535-9. doi: 10.3967/bes2017.071.
31. Pallares V, Fernandez-Iglesias A, Cedo L, Castell-Auvi A, Pinent M, Ardevol A, et al. Grape seed procyranidin extract reduces the endotoxic effects induced by lipopolysaccharide in rats. *Free Radic Biol Med*. 2013;60:107-14. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.007.
32. Li Y, Bhalli JA, Ding W, Yan J, Pearce MG, Sadiq R, et al. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology*. 2014;8 Suppl 1:36-45. doi: 10.3109/17435390.2013.855827.
33. Sarhan OM, Hussein RM. Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1505-17. doi: 10.2147/IJN.S56729. eCollection 2014.
34. Vrcek IV, Zuntar I, Petlevski R, Pavicic I, Dutour Sikiric M, Curlin M, et al. Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. *Environ Toxicol*. 2016;31(6):679-92. doi: 10.1002/tox.22081.
35. Elle Ebabe R, Gaillet S, Vide J, Romain C, Laurent C, Rugani N, et al. Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats: effects on oxidative stress and inflammation. *Food Chem Toxicol*. 2013;60:297-301. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.071.
36. Ahamed M, Alsalthi MS, Siddiqui MK. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1841-8. doi: 10.1016/j.cca.2010.08.016.
37. Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect*. 2001;109 Suppl 4(Suppl 4):547-51. DOI: 10.1289/ehp.01109s4547.
38. Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, et al. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol*. 2009;9(8):4924-32. DOI: 10.1166/jnn.2009.1269.
39. Adeyemi OS, Faniyan TO. Antioxidant status of rats administered silver nanoparticles orally. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2014;9(3):182-6. doi: 10.3892/etm.2019.8108.
40. Klein S, Dell'Arciprete ML, Wegmann M, Distel LY, Neuhuber W, Gonzalez MC, et al. Oxidized silicon nanoparticles for radiosensitization of cancer and tissue cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434(2):217-22. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.042.
41. Zong X, Cao X, Wang H, Zhao J, Lu Z, Wang F, et al. Porcine lactoferrin-derived peptide LFP-20 modulates immune homeostasis to defend lipopolysaccharide-triggered intestinal inflammation in mice. *Br J Nutr*. 2019;121(11):1255-63. doi: 10.1017/S0007114519000485.
42. Zhou Y, Yuan HR, Cui L, Ansari AR, Xiao K, Luo Y, et al. Effects of visfatin on the apoptosis of intestinal mucosal cells in immunological stressed rats. *Acta Histochem*. 2017;119(1):26-31. doi: 10.1016/j.acthis.2016.11.002.

# Sivas'ta akarsu çevresinden toplanan yumuşakçalarda trematod larval dönemlerinin araştırılması

## Investigation of trematode larval stages in molluscs collected from surrounding the river in Sivas

Fatih AKYILDIZ<sup>1</sup>, Serpil DEĞERLİ<sup>2</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Trematodlar, hem insan hem de hayvan sağlığı için önemli olan parazitlerin yassı solucanlar sınıfındandır. Ülkemizdeki trematodlar üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, trematodların larva şekillerine ev sahipliği yapan yumuşakçalar üzerinde çok az çalışma olduğu görülmektedir. Çalışmamızda, tıbbi öneme sahip yumuşakçaların bulunabileceği akarsu etrafından toplanan yumuşakçaların tür ayrımının yapılması, bu türlerde yerleşim gösteren trematod larval şekillerinin araştırılması amaçlanmış ve bölgenin risk düzeyinin ortaya konması hedeflenmiştir.

**Yöntem:** Çalışma, Nisan ve Haziran 2019 tarihleri arasında Sivas ilinin yaklaşık 5 km kuzeyinde, doğal kaynak sularıyla beslenen ve derinliği maksimum 50 cm olarak ölçülen, bitki örtüsü bakımından zengin, bol ağaçlı bir akarsu etrafında gerçekleştirilmiştir. Yumuşakça örnekleri çalışma alanına haftada iki kez gidilmek sureti ile toplanmıştır. Toplanan örnekler temiz suyla şişelere alınarak laboratuvara getirilmiş ve mikroskop altında incelenmiştir. Yumuşakça türlerini tanımlamak için tür teşhis anahtarları kullanılmıştır. Türler kabuk yapısı ve anatomik özellikleri dikkate alınarak belirlenmiştir. Yumuşakçalar kesilerek içlerindeki larva aşamalarının

### ABSTRACT

**Objective:** Trematodes are a class of flatworms with parasites that are important for both human and animal health. When the studies on trematodes in our country are examined, it is seen that there are very few studies on the molluscs with intermediate host of trematodes and larval shapes. In our study, it was aimed to determine the types of gastropod samples collected from the stream where the molluscs of medical importance can be found, and to investigate the trematode larval shapes located in these species and to determine the risk level of the region.

**Methods:** The study was carried out between April and June 2019, approximately 5 km north of Sivas province, around a river which is fed with natural spring waters and whose depth is measured as maximum 50 cm, with abundant trees, rich in vegetation. Mollusca samples were collected twice a week by visiting the study area. Collected samples were taken into bottles with clean water and brought to laboratory and examined under microscope and keys were used to identify mollusca species. Species were determined by considering the crust structure and anatomical features. Then, the molluscs were crushed and the

<sup>1</sup>Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas  
<sup>2</sup>Cumhuriyet Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Sivas



**İletişim / Corresponding Author :** Fatih AKYILDIZ  
Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas - Türkiye  
**E-posta / E-mail :** akyildizfatih2020@hotmail.com

**Geliş Tarihi / Received :** 20.02.2020  
**Kabul Tarihi / Accepted :** 10.04.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.69346

Akyıldız F, Değerti S. Sivas'ta akarsu çevresinden toplanan yumuşakçalarda trematod larval dönemlerinin araştırılması  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 343-348

incelenmesi ışık mikroskobu altında yapılmıştır. Nehrin mineral analizi, İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yumuşakçaların temel ihtiyaçları dikkate alınarak analiz edilmiştir.

**Bulgular:** Çalışmada, 165 *Lymnaea truncatula*, 1650 *Planorbis intermixtus* ve 657 *Oxyloma elegans* olmak üzere üç farklı salyangoz türü saptandı. Diseke edilen türler içerisinde, 165 *Lymnaea truncatula*'nın 16 (%10)'sında, 1650 *Planorbis intermixtus*'ünün 332 (%20)'sinde larval trematodlar bulundu. Akarsuyun analizinde çözülmüş oksijen miktarının DSÖ'nün saptadığı verilerden yüksek olduğu ve kalsiyum miktarının Avrupa birliği standartlarının üzerinde olduğu saptanmıştır.

**Sonuç:** Trematodların ara konakları olan tatlı su salyangozları, hayvanlarda ve insanlarda sağlık tehlikelerine neden olabilir. Bu salyangozların prevalansının belirlenmesi, yaşadığımız coğrafyanın trematod hastalıklarının risk haritasını belirlemek açısından önemlidir. Sonuç olarak yumuşakçaların tür tayininin yapılması ve yaygınlığının araştırılmasının, ülkemizdeki trematod hastalıklarının risk haritasının belirlenmesi açısından önemli olduğu kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Lymnaea, Oxyloma, Planorbis, tıbbi malakoloji, trematoda

examination of the larval stages inside them was performed under a light microscope. Mineral analysis of the river was analyzed by considering the basic needs of molluscs in Advanced Technology Research and Application Center.

**Results:** In the study, three different snail species, 165 *Lymnaea truncatula*, 1650 *Planorbis intermixtus* and 657 *Oxyloma elegans*, were detected. Among the dissected species, larval trematodes were found in 16 (10%) of 165 *Lymnaea truncatula* and 332 (20%) of 1650 *Planorbis intermixtus*. It was determined in the water analysis that the amount of dissolved oxygen and calcium amount were above the standards.

**Conclusion:** Freshwater snails, as the intermediate hosts of trematodes, can cause health hazards in animals and humans. Determining the prevalence of these snails is important for determining the risk map of trematode diseases of our geography. It has been concluded that determining the species and investigating the prevalence of these molluscs is important for determining the risk map of trematode diseases.

**Key Words:** Lymnaea, Oxyloma, Planorbis, medical malacology, , trematoda

## GİRİŞ

Trematodlar, helmintlerin (solucanlar) *Platyhelminthes* (Yassı solucanlar) şubesi içerisinde yer alan ve insan sağlığı açısından önemli parazitlerin bulunduğu bir gruptur. Bu gruptaki parazitlerin gelişimi en az bir ara konakta gerçekleşir. Birinci ara konak her zaman bir yumuşakça (gastropod) veya çok nadiren bir anneliddir. Birçok tür, yaşam döngülerinde ikinci ve hatta üçüncü bir ara konak içerir. Trematodlara ara konaklık edebilen yaklaşık 350 yumuşakça türünün muhtemel tıbbi veya veteriner öneme sahip olduğu bilinmektedir (1,2).

İnsan vücuduna yerleşerek hastalık oluşturan trematodların ara konakları olarak, *Fasciola*

türleri için *Lymnaea* cinsi tatlı su salyangozları, *Dicrocoelium* türleri için *Helicella* ve *Zebrina* cinsi kara salyangozları, *Schistosoma* türleri için ise *Biomphalaria*, *Bulinus* ve *Oncomelania* cinsi tatlı su salyangozları rapor edilmiştir (3). Farklı türdeki salyangozların yaşam habitatlarını çevrenin değişik dinamikleri belirlemektedir. Sudaki kalsiyum oranı, sıcaklık, oksijen konsantrasyonu ve pH özellikle sulcul yumuşakça habitatları için çok önemlidir (3-5).

Trematodlar insan vücudunda erişkin halde bulunurlar ve safra yolları, karaciğer, akciğer ve dolaşım sistemine yerleşirler (6).

Çalışmamızda tıbbi öneme sahip yumuşakçaların



bulunabileceği yerler saptanarak öncelikle türlerin belirlenmesi yoluna gidilmiş daha sonra da bu türlerde yerleşim gösteren trematod larval şekillerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu şekilde trematod hastalıklarının en önemli zincir halkası olan yumuşakçaların yer ve yoğunluk tespitinin yapılarak bölgenin risk düzeyinin ortaya konması hedeflenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma coğrafi olarak Sivas ilinin yaklaşık olarak 5 km kuzeyinde (Şekil 1), doğal kaynak suları ile beslenen, derinliği azami 50 cm olarak ölçülen, etrafı bol ağaçlı, bitki örtüsü bakımından zengin, ulaşımı kolay bir alan etrafında yapılmıştır. Çalışma alanının doğal halini gösterebilmek için fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 1).

Çalışma Nisan- Haziran 2019 tarihleri aralığında yapılmıştır. Alana haftada iki kez gidilmek sureti ile akarsuda bulunan taş, kaya, sucul bitkiler gibi çeşitli maddelere tutunarak yaşayan örnekler, çizme giyilerek pens, elek seti, numune kabı, küçük fırçalar gibi gereçler kullanılarak toplanmış ve toplanan örnekler temiz cam şişelere su içinde alınarak laboratuvara getirilmiştir. Akarsudan toplanıp canlı olarak laboratuvara getirilen her bir yumuşakça, fotoğrafları çekilip, kabuk yapıları not edildikten

sonra serum fizyolojik bulunan plastik kutulara alınmıştır. Yumuşakçalar tür teşhisi yapıldıktan sonra, diseksiyon malzemeleri kullanılarak öncelikle kabukları kırılmak suretiyle çıkartılarak, %0,6'lık fizyolojik su bulunan petri kapı içerisine alınmıştır. Salyangozun iç organları iğne yardımıyla parçalanmış ve mevcut trematodlara ait yaşam evrelerinin tamamen dağılmaları için bir süre beklenilmiştir. Karışımı oluşturan sudan mikropipet yardımı ile bir damla lam üzerine alınarak ışık mikroskopunun çeşitli büyütmelerinde incelenmiştir.

Yumuşakça türlerini tanımlamak için literatür de bulunan tür teşhis anahtarlarından faydalanılmıştır (7). Sarkaryaları tanımlamak için göz lekelerinin varlığı, kuyruk tipi, çekmenlerin pozisyonu gibi morfolojik özellikleri kullanılmıştır. Çalışmamızda tek çekmeni olan türler monostome sarkarya, iki çekmen içeren türler distome sarkarya, kuyruksuz sarkaryalar ise cercarium sarkarya olarak sınıflandırılmıştır. Çalışma alanında *L. (Galba) truncatula*, *P. intermixtus* ve *O. elegans* olmak üzere üç adet yumuşakça türü saptanmıştır.

Akarsuyun mineral analizi yumuşakçaların temel ihtiyaçları olan veriler göz önünde bulundurularak İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde, çözünmüş oksijen tayini ise kamu kurumlarına ait laboratuvarlarda yaptırılmıştır.



Şekil 1. Çalışma alanını gösteren harita



Şekil 2. Çalışma alanının görüntüsü (Orijinal)

## BULGULAR

Çalışma alanımızda *L. truncatula*, *P. intermixtus* ve *O. elegans* olmak üzere üç farklı salyangoz türü saptanarak toplamda 2472 örnek incelenmiştir (Şekil 3). Disekte edilen türler içerisinde bulunan trematod larval şekillerinin varlığının araştırmak üzere yapılan çalışmada *L. truncatula* ve *P. intermixtus* türleri içerisinde larvalara rastlanırken *O. elegans* türleri içerisinde herhangi bir larval form saptanmamıştır. (Tablo 1). Saptanan yumuşakça türleri Şekil 3'te yer almaktadır.

*P. intermixtus* türü yumuşakça içerisinde trematodlara ait larval yapılardan redi ve iki farklı türde serkarya görülmüştür (Şekil 4-5).

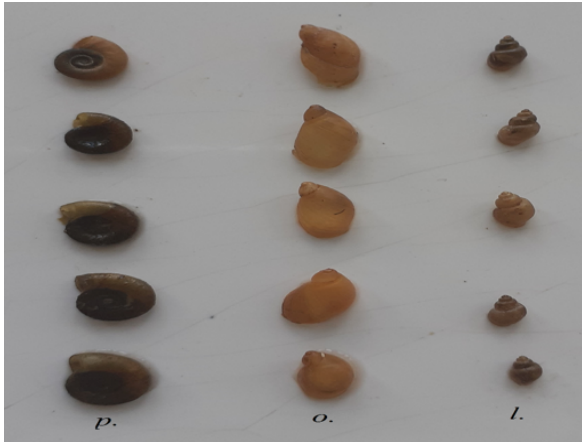
*L. truncatula* türü yumuşakça içerisinde trematodlara ait larval yapılardan üç farklı tipte serkarya görülmüştür (Şekil 6).

Farklı yumuşakça türlerinde yapılan çalışmalarda aynı zamanda farklı serkarya türlerinin olduğu saptanmıştır (Tablo 2).

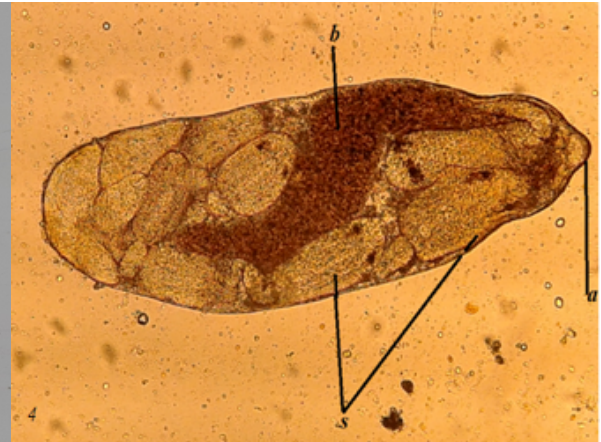
Suda yaşayan canlılar için su kalitesi oldukça önemli bir parametre olup çalışma yapılan akarsuda çözülmüş oksijen miktarının yüksek olması kaliteli sular grubunda olduğunu gösteren bir değer iken, Kalsiyum miktarının Avrupa birliği standartlarının üzerinde olduğu diğer değerlerin normal aralıkta olduğu görülmüştür (8) (Tablo 3).

**Tablo 1.** Çalışma alanında saptanan yumuşakçalar ve trematod larvaları ile enfekte olma durumu

| Saptanan türler                   | Toplanan yumuşakça sayısı | Serkarya rastlanan örnek sayısı | %Yaygınlık |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------------|------------|
| <i>Planorbis intermixtus</i>      | 1650                      | 332                             | % 20       |
| <i>Oxyloma elegans</i>            | 657                       | 0                               | % 0        |
| <i>Lymnaea (Galba) truncatula</i> | 165                       | 16                              | % 10       |
| Toplam                            | 2472                      | 348                             | % 14       |



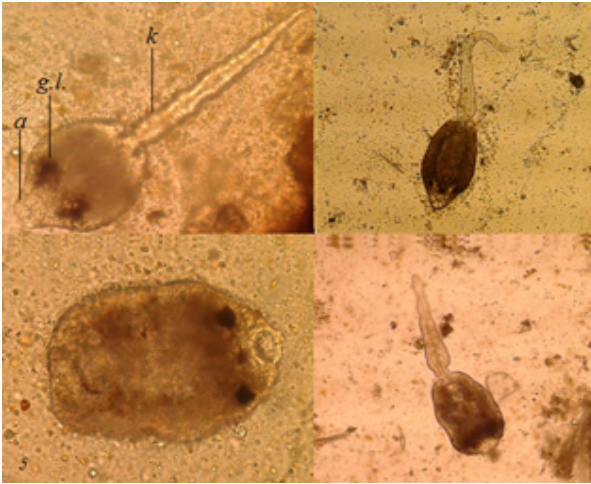
**Şekil 3.** Yumuşakça türleri (Orjinal)  
p: *P. intermixtus*, o: *O. elegans*, l: *L. truncatula*



**Şekil 4.** Redi (Orjinal x10)  
a: ağız çekmeni, b: bağırsak, s: serkarya

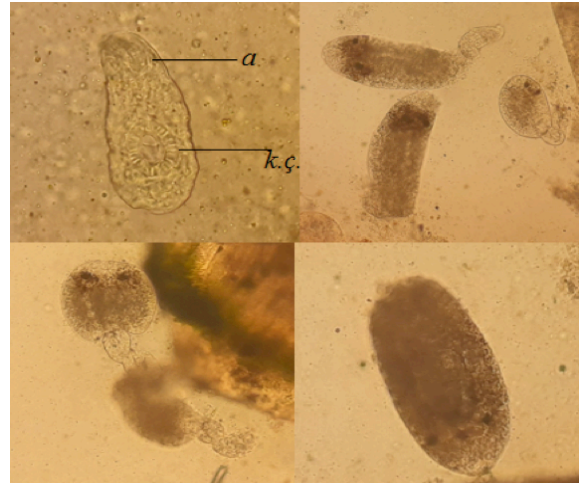
**Tablo 2.** Yumuşakçalar içerisinde bulunan serkarya tiplerinin dağılımı

| Yumuşakça türü/Serkarya tipi      | Monostome serkarya | Distome serkarya | Cercarium serkarya |
|-----------------------------------|--------------------|------------------|--------------------|
| <i>Lymnaea (Galba) truncatula</i> | 8                  | 2                | 6                  |
| <i>Planorbis intermixtus</i>      | 212                | -                | 120                |
| Toplam                            | 220                | 2                | 126                |



Şekil 5. *P. intermixtus* türü içerisinde bulunan serkarya türleri (Orjinal x10-40)

k: kuyruk, g.l. : göz lekeleri, a: ağız çekmeni



Şekil 6. *L. truncatula* türü yumuşakça içerisinde trematodlara ait larval yapılar.

a: Ağız çekmeni, k.ç : karın çekmeni

Tablo 3. Yumuşakçaların saptandığı akarsuyun mineral analizi

| Ort.Sıcaklık °C | pH  | Çözülmüş oksijen mg/l | Ca(mg/l) | Na(mg/l) | Mg(mg/l) | K(mg/l) |
|-----------------|-----|-----------------------|----------|----------|----------|---------|
| 20              | 6.0 | 7.41                  | 110.2    | 10.74    | 16.17    | 6.6     |

## TARTIŞMA

Trematodlar hem insan hem de hayvan sağlığı bakımından öneme sahip olan parazitlerin bulunduğu yassı solucanların bir sınıfıdır. Ülkemizde trematodlarla ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında trematodların anakonağı olabilen yumuşakçaların yaygınlığı üzerine az sayıda çalışma bulunmasına rağmen, bu canlıların vücudunda gelişim gösteren trematod larval şekillerinin araştırılması üzerine yapılan bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda bir akarsudaki bulunan yumuşakça türleri araştırılmış *L. truncatula*, *P. Intermixtus* ve *O. elegans* türleri saptanmıştır. Ayrıca bu yumuşakçaların ara konaklık yaptığı trematod larval şekilleri araştırılmış ve farklı serkarya tipleri saptanmıştır. Aynı yaşam alanını kullanmalarına rağmen *Oxyloma* türlerinin trematod larval şekillerini taşımadığı saptanmıştır Bu sonuç trematodların ara konaklık seçiciliğini bir kez daha göstermiştir. Nisan ve Mayıs ayında toplanan *L. tranculata* örneklerinde serkaryalara rastlanmazken

Haziran ayında topladığımız örneklerde serkaryalar görülmeye başlanmıştır. Hava sıcaklığının artması ile larvaları ara konak vücudunda gelişmesi arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamız Sivas ilinde trematodlara ara konaklık yapabilecek yumuşakçaların saptanması ve bunlar içerisinde trematod larval formlarının araştırılması bakımından önemlidir. Ülkemizde tatlı su yumuşakçaların trematod parazitlerine ait çalışmaya rastlanılmamıştır. Dünya genelinde yapılan çalışmalara baktığımızda ise;

Tayland da Tatlısu Salyangozları üzerinde yapılan bir çalışmada 46 çalışma alanından 14 salyangoza türüne ait toplam 2.869 salyangoz örneği incelenmiştir. Bulunan salyangoz türleri içerisinde serkarya, megalurous serkarya, echinostome serkarya, furcocercous serkarya, parapleurolophocercous serkarya, virgulate serkarya ve xiphidiocercariae olarak gruplandırılan 7 tip serkarya saptanmıştır. (2).

Almanya'da Ruhr Nehri çalışma alanında üç yıl içinde toplam 3691 planorbid salyangoz (3270 *G. albus*; 421 *S. nitida*) toplanmış ve her iki gastropodda dört aileye

ait 13 trematod türünden aynı zamanda yedi tanesi ise Almanya'dan ilk defa bildirilmiştir (9).

Hindistan, Rajasthan'da tatlı su salyangoz konakları ve larva trematod parazitleri araştırması sırasında, on beş salyangoz türüne ait Amphistom, echinostome serkarya, furcocercous serkarya, gymnocephalous, monostome serkarya, transversotrematid ve xiphidiocercous olmak üzere toplam yedi tip serkarya türü tespit edilmiştir (10).

Nijerya'da 2013 yılında, Kaduna eyaletinde 6 çalışma bölgesinde *Melanoides tuberculata*, *Biomphalaria pfeifferi*, *Bulinus globosus*, *Lymnaea natalensis*, *Physa sp*, *Cleopatra bulimoides*, *Bellamyia unicolor* ve *Lanistes varicus* türlerine ait 23823 salyangoz toplanmış olup, Brevifurcate-apharyngeate distome, Amphistome, Gymnocephalus, Longifurcate-pharyngeate monostome, Longifurcate-pharyngeate distome, serkarya türleri tespit edilmiştir (11). Farklı bölgelerde yapılan çalışmalar farklı yumuşakça türlerinin ve larval

trematodlarının varlığını göstermiştir. Yumuşakçalar kendi yaşam koşullarını sağlayan coğrafyalarda varlığını gösterir. Aynı zamanda yumuşakçaların trematodların larval dönemleri ile ilişkisi göz önüne alındığında, ara konakları bulunan yerlerde trematod larval dönemlerini de görmek mümkün olmaktadır. Yapılan çalışmalarda farklı türde yumuşakçaların varlığı ve bilinen türlere ilaveten yeni türde serkaryalar da saptandığı belirtilmiştir.

Sonuç olarak, tatlı su salyangozları, insan sağlığı açısından trematodlara ara konaklık yapması nedeniyle büyük önem arz etmektedir. Bu yumuşakçaların yaygınlığının tespit edilmesi ülkemizdeki trematod hastalıklarının risk haritasının belirlenmesi açısından önemlidir. Çalışmamız, Sivas'taki yumuşakça türlerinin ve taşıdıkları trematod larval formlarının belirlenmesine katkıda bulunacak yeni bilgiler içermektedir. Elde ettiğimiz bu bulguların hem dünya hem de ülke literatürüne katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Taylan Özkan A, Korkmaz M, Kuman A, Ayçiçek H, Tanyüksel M. Fascioliasis Tanısında Erişkin Antijeni İle Pbs Ve Rpmı 1640'da Elde Edilen Ekskresyon/ Sekresyon Antijenlerinin Elisa Yöntemiyle Karşılaştırılması. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2005; 62(1): 17-26.
2. Chontanarath T, Thanawan Tejangkura NW, Chimburut C. Morphological characteristics and phylogenetic trends of trematode cercariae in freshwater snails from Nakhon Nayok Province, Thailand. The Korean journal of parasitology 2017; 55.1: 47.
3. Aldhoun JA, Podhorský M, Holická M, Horák P. Bird schistosomes in planorbid snails in the Czech Republic. Parasitology international 2012; 61(2): 250-9.
4. Akbulut M, Odabasi DA, Kaya H, Celik ES, Yildirim MZ, Odabasi S, et al. Changing of Mollusca fauna in comparison with water quality: Saricay Creek and Atikhisar Reservoir models (Canakkale-Turkey). Journal of Animal and Veterinary Advances, 2009; 8(12): 2699-707.
5. Poulin R, Tsukushi K, Clément L. "Evolution, phylogenetic distribution and functional ecology of division of labour in trematodes." Parasites & vectors 2019; 12(1): 1-10.
6. Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği, 2007.
7. Kılıçaslan I, Özbek M. Contributions to the knowledge on the distribution of freshwater Mollusca species of Turkey. Review of Hydrobiology 2010; 3.2: 127-44.
8. Dere T, Boztuğ D, Tayhan N, Yıldırım N, Danabaş D, Gülşad U. Uzunçayır Baraj Gölü (Tunceli)'nin Fiziko-Kimyasal Özellikleri ve Su Kalitesinin Değerlendirilmesi. Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 2012; 2.2: 93-106.
9. Schwelm J, Soldánová M, Vyhřídálová T, Sures B, Selbach C. Small but diverse: larval trematode communities in the small freshwater planorbids *Gyraulus albus* and *Segmentina nitida* (Gastropoda: Pulmonata) from the Ruhr River, Germany. Parasitology research 2017; 117.1: 241-55.
10. Choubisa SL, Jaroli VJ, Sheikh Z. First record of a rare transversotrematid cercaria larva (Trematoda: Digenea) from Rajasthan, India: focus on seasonal occurrence and host-specificity of diverse cercariae. Journal of Parasitic Diseases 2017; 41.2: 496-502.
11. Abdulkadir FM, Maikaje DB, Umar YA. Cercarial Diversity in Freshwater Snails from Selected Freshwater Bodies and Its Implication for Veterinary and Public Health in Kaduna State, Nigeria. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Animal and Veterinary Sciences 2018; 12(2): 52-8.

# Encephalitozoonosis in rabbits under different care conditions

## Farklı bakım koşullarındaki tavşanlarda encephalitozoonosis

Hakan TÜFEK<sup>1</sup>, Özcan ÖZKAN<sup>2</sup>

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to investigate the seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits in facilities with different care conditions in three different provinces.

**Methods:** The sera samples of rabbits that have been hosted in open, semi-open and controlled areas which were obtained from three different enterprises with different environmental possibilities, hygienic situations, maintenance and feeding conditions were evaluated by using the ELISA kits.

**Results:** Consequently, the seropositivity of the rabbits in open, semi-open and controlled shelters were found to be 70%, 40% and 80%, respectively. In this study, in the rabbit under the different care conditions, antibodies anti - *E. cuniculi* (63.3% ) were found in all sera samples.

**Conclusion:** In the context of the data obtained, it was seen that the animals taken into the facility may be infected from the beginning and an infected animal in the facility may have been a source of infection for the many others in the facility. It was also concluded that the septic and aseptic rules which are potentially accepted in the facilities are not enough in battling with the agent and that the zoonotic disease can be a risk for animal keepers and researchers.

**Key Words:** Rabbit, *Encephalitozoon cuniculi*, serology, care conditions

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı farklı bakım ve hijyen koşullarına sahip tesislerde yetiştirilen tavşanlarda *Encephalitozoon cuniculi*'nin seroprevalansını araştırmaktır.

**Yöntem:** Farklı çevresel koşullara, hijyenik durumlara, bakım ve beslenme koşullarına sahip; açık, yarı açık ve kontrollü alanlarda barındırma yapılan üç farklı işletmeden alınan tavşanların serum örnekleri ELISA kitleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Sonuç olarak, açık, yarı açık ve kontrollü barınaklardaki tavşanların seropozitifliği sırasıyla %70, %40 ve %80 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, farklı bakım koşullarına sahip üç tesise de serum örneklerinde anti - *E. cuniculi* (%63.3) antikor varlığı tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Elde edilen veriler ışığında, tesise alınan hayvanların orijin olarak enfekte olabileceği, tesiste enfekte bir hayvanın sürü için enfeksiyon kaynağı olabileceği, tesislerde olası yürütülen septic/aseptik kuralların etkenle mücadele için yeterli olmadığı ve zoonoz karakterdeki enfeksiyonun hayvan bakıcısı ve araştırmacılar için de potansiyel risk taşıdığı kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Tavşan, *Encephalitozoon cuniculi*, seroloji, bakım koşulları

<sup>1</sup>Zonguldak Bülent Ecevit University, Çaycuma Vocational High School, Zonguldak

<sup>2</sup>Çankırı Karatekin University, Faculty of Science, Department of Biology, Çankırı



İletişim / Corresponding Author : Hakan TÜFEK

Zonguldak Bülent Ecevit Üni. Çaycuma Gıda ve Tarım MYO 67900 Zonguldak - Türkiye

E-posta / E-mail : hakan.tufek@beun.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 08.06.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 03.08.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.18784

Tüfek H, Özkan Ö. Encephalitozoonosis in rabbits under different care conditions  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 349-354

## INTRODUCTION

*Encephalitozoon cuniculi* is a eukaryotic, unicellular, compulsory intracellular living, sportive, monoxen, zoonotic, microsporidian parasite which can be found on many mammals, including rabbits, rodents, lagomorphs, carnivores, livestock, non-human primates, and humans (1-3).

The occurrence of infection in rabbits depends on the infective dose and the host resistance. Infection in rabbits generally occurs as asymptomatic and chronic. Signs of encephalitozoonosis may develop suddenly in rabbits, and severe cases may result in death. Evidence of vestibular disease, head tilt (bending the head-characteristic) and ataxia encephalitozoonosis are among the early findings (4-9).

The symptomatic or asymptomatic clinical picture is formed in rabbits' mouths (urine scattered in the cage-fecal contaminated food-water), by the inhalation or transplacental transmission of *E. cuniculi* spores which are resistant to environmental conditions and which can survive for 4-6 weeks (10, 11). Personnel who come into contact with animals should take into account the potential zoonotic risk, as infectious spores can be found in various body fluids, even if the animals are clinically healthy. Attention should be given to personal hygiene in order to prevent direct and indirect transmission by the fecal-oral route (12, 13). Therefore, before the rabbits' meat is eaten the laboratory animal or pet animal is taken into shelter and serological screening should be performed in case of disease. For this, animals that are seronegative should be used as a result of serological screening of samples taken every two weeks for two months (12, 14). Otherwise, it may cause loss of time and material resources besides zoonotic risk. Improving the quality of care of the animals in the shelter, following the hygiene rules and carrying out periodic disinfection procedures, may help to keep the disease under control (12-14).

Santaniello et al. (15) emphasized that rabbits are the main reservoir of *E. cuniculi* and this parasite is important for public health. In addition, Shin et al. (16) reported that *E. cuniculi*, which is

important in terms of zoonotic potential and public health, is present in and spreads through by domestic rabbits. In many studies, serological screening for *E. cuniculi* infection was advised, regardless of clinical evaluation in rabbits (16, 17).

In many facilities, which have various hygiene and care conditions in Turkey, encephalitozoonosis in rabbits have been reported histologically, serologically, clinically and molecular in several studies (8, 9, 13, 18-20). In this study, it was aimed to investigate the presence of *E. cuniculi* infection in rabbits in facilities with different care conditions in three different provinces.

## MATERIAL and METHOD

### Animals, Care Condition and Clinical Evaluation

The study was performed during the routine health evaluation which was executed under the responsibility of veterinarians. Blood samples taken from the rabbits in the relevant facilities for routine health screening were used in this study. The animals routine clinical checks such as daily water, feed intake, urine, fecal outputs were monitored and recorded. No experimental procedures have been performed on animals. Consequently, the study did not require an Animal Ethics statement in accordance with the Regulations (Article-2b) due to non-experimental clinical veterinary medicine practices. In the study, the physical properties, environmental conditions and hygiene procedures of the three facilities located in Ankara, Istanbul and Tekirdag provinces were evaluated.

### Serological Analysis

For routine clinical screening, blood samples were taken from the marginally used veins of the rabbits to the biochemistry gel tube. Blood samples were centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes. Serum samples were stored at -20 °C until serological analysis was performed. An ELISA kit (Rabbit Biotech

International-USA) containing positive and negative controls (rabbit serum) was used to determine *E. cuniculi* specific antibody (IgG) responses in rabbits. The analysis was carried out step by step according to the manufacturer's instructions. If the difference between sample optical density (OD) and negative control OD ( $\Delta$ ) was greater than or equal to 0.300, the sample was considered positive.

## RESULTS

The first study area was a shelter, an environment of which is created in an open area by the researcher, was limited by wire mesh and maintained in a wooden structure. There was no hygiene practice here and the animals were kept completely on the ground in groups. The animals were fully open to the environment and were fed with ordinary containers, feed, water and grass - vegetables. Natural lighting was used and there was not any air conditioning. Since this shelter was completely in traditional poultry structure, it (A) was defined as an uncontrolled shelter (n=10).

The other study area was a semi-open shelter with no environmental control system, a shelter where air conditioning and lighting are uncontrolled, and it was a shelter where traditional family breeding was carried out through windows. This shelter (B) was defined as a semi-open shelter (n=10). In this shelter, the animals (n=46) were kept singly or in pairs within the wireframe. Commercial pellet feed water was provided to the animals.

The last workspace had a temperature of 18 to 21°C, 50±5% relative humidity, and a 12:12 light / dark

cycle, with controlled environmental conditions, the working flow in accordance with the septic / aseptic rule, and a licensed shelter. This shelter (C) was defined as a controlled shelter (n=10). The animals were kept in cages in accordance with the European standards, with one rabbit in each cage. Rabbits are fed with a standard commercial pellet feed and water and libitum is provided.

Adult rabbits of 2.0-3.5 kg body weight of the two gender were included in the study, while neurological findings such as torticollis, seizure, paralysis in the posterior and forelegs, fluttering in the eyes, cataract-like formations, strabismus, irregular vertical eye movements and normal clinical findings were observed in the evaluation of water, feed intake, urine, and fecal outputs of the subjects daily in terms of symptoms such as polydipsia, polyuria, and anamnesis.

In the serology analysis, a total of 30 rabbit sera, 10 from each shelter, were used. According to the ELISA results, the seropositivity of the animals in A and B shelters were found to be 70% (7/10), 40% (4/10) and 80% (8/10), respectively (Table 1). The serologic results of the animals that have been bred in traditional pens with no hygiene rules (open system) and the ones that have been found bred in fully controlled systems were close to each other whereas the seropositivity in the semi-open system were lower. When evaluated regardless of shelter and hygiene characteristics, the rate of the disease was found to be 63.3% seropositive in rabbits (Table 1).

**Table 1.** The seropositivity of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits under different care conditions

| SHELTER                         | CARE CONDITIONS |   |           |   |            |   |
|---------------------------------|-----------------|---|-----------|---|------------|---|
|                                 | UNCONTROLLED    |   | SEMI-OPEN |   | CONTROLLED |   |
|                                 | A (n=10)        |   | B (n=10)  |   | C (n=10)   |   |
| <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | +               | - | +         | - | +          | - |
|                                 | 7               | 3 | 4         | 6 | 8          | 2 |
| TOTAL (%)                       | 70              |   | 40        |   | 80         |   |
|                                 | 63.3            |   |           |   |            |   |

## DISCUSSION

Throughout history, animals which were the source of many transmissible diseases had an important role with regards to human health. Therefore, today, zoonoses is seen as a major public health problem, affecting all continents (16, 21, 22). Infections caused by *E. cuniculi* in humans and animals have been reported in many continents of the World such as Asia, Europe, Africa and America (23-26). Consequently, and currently, the attention to *E. cuniculi*, which is important in terms of zoonotic potential and public health is increasing among the fields of veterinary medicine and human medicine.

In Northern Italy, a serological survey study on commercially reared rabbits reported a high prevalence of *E. cuniculi* infection (24). In another study, in 40 commercial rabbit farms, antibodies anti-*Encephalitozoon cuniculi* were found in 505 of 1600 (75.4%) sera samples (15). In the serological study conducted by Lavazza et al. (7), seropositivity was reported in 826 pet rabbits with and without clinical findings (310/516) in 70.6% of sick rabbits and 52.9% of healthy rabbits. Serums collected from rabbits (n:264) produced for meat in shelters with different ventilation systems using different management-nutrition programs in two different cities in Thailand were analyzed by ELISA test. The presence of anti-*E. cuniculi* IgG was 20% in one shelter and 71.9% in the other shelter (26). On the other hand, 300 clinically healthy rabbits and 300 people were investigated for *E. cuniculi* seropositivity in the shelters of different races in three cities with different climatic and environmental conditions in China. As a result of the study, respectively 6, 5, 18 and 9.67% (29/300) people in different shelters in each region were found to be 18.67% (56/300) seropositive in total (22). It has been reported that 63.5% of the serum samples of 337 rabbits with or without clinical findings, which were examined at the facility located in 20 different provinces in Japan, were found positive for anti-*E.*

*cuniculi* IgG (27). In England, Scotland and Wales, serum obtained from 97 rabbits that did not show any clinical symptoms during routine health controls and pre-anesthesia controls which were analyzed by indirect ELISA method; 52 (53.6%) samples were evaluated as *E. cuniculi* seropositive (28). In Brazil, Baldotto et al. (25) found *E. cuniculi* positivity rate as 85.0% (136/160) in asymptomatic animals and 61.5% (16/26) in diseased animals.

In this study, as a result of evaluating the samples taken from rabbits without any clinical symptoms, factors were found in all facilities at different locations and a percentage of 63.3 seropositivity was determined. In our study, seropositivity between 40-80% was found in accordance with the previous studies which were conducted on the basis of provinces. As it is seen in our study and other studies, it was observed that the rate of the factor may change even in different places within the same country according to ecological indicators and cultivation systems. However, in the evaluation of the hygiene and care conditions of the shelters used in this study, the rate of seropositivity in the semi-open shelter system, which has no hygiene rule, was found to be lower compared to other shelters. On the other hand, the serological results of animals raised in unlicensed and controlled shelters with uncontrolled shelter system was found close to each other.

Regardless of the conditions of care, each animal newly taken into the facility should be considered to be infected from the beginning and should be quarantined. Serological screening should be done in this process. The facilities, cages and equipment should be disinfected at regular intervals. *E. cuniculi* spores are environmentally resistant, therefore environmental disinfection is important step for encephalitozoonosis control. There are a number of recommended disinfection protocols. Namely; 70% ethanol, effectively kills the spores with a contact time of 30 seconds. Another protocol is also 0.1% bleach at a contact time of 10 minutes, on the other



side, the different disinfection procedure is sodium hydroxide (1%), formaldehyde (0.3%) and hydrogen peroxide (1%) effectively kill spores with contact time 30 minutes (29).

However, there were potential limitations according to the design of the study. Serological tests were not carried out before the animals were transported to their facility. The samples collected within the scope of clinical applications were collected from facilities that have different hygiene and care conditions and are currently active in their field. Therefore, its relatively common occurrence in the routine controlled facility selected for the study suggests that animals may become infected with *E. cuniculi* before being taken into the facility.

In the light of these results; (a) It should not be ignored that the animal circulation is not high and that even if it is a licensed shelter, the animals may be infected from the beginning when the animal was put to the shelter for the first time. (b) Serological

screening of the animals should be integrated into the herd and the appropriate animals into the shelter at the end of the quarantine period. This is very important for herd health. (c) It should not be ignored that an infected animal in the shelter will be a source of infection for the herd, considering the transmission routes of the agent. (d) In the routine health screenings suggested by Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA), the animals identified as seropositive should be removed from the herd immediately. (d) Due to the high incidence of seropositivity in the shelters where standard protocols are applied, it is seen that septic/ aseptic application carried out in the shelters may not be sufficient to combat the factor due to spor form of the parasite being resistant to many environmental factors. (e) In terms of public health, it should be remembered that this infection of zoonotic character can be found in any shelter and can carry potential risk for animal keepers and researchers.

## TEŞEKKÜR

This study was prepared from the master thesis by Hakan Tüfek in the Department of Biology, Institute of Natural and Applied Science, ÇAKÜ.

## REFERENCES

1. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19(5): 485-92.
2. Otto GM, Franklin CL, Clifford CB. Biology and diseases of rats. In: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT, editors. *American College of Laboratory Animal Medicine, Laboratory Animal Medicine (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2015. pp. 151-207.
3. Rodríguez-Tovar LE, Villarreal-Marroquín A, Nevárez-Garza AM, Castillo-Velázquez U, Rodríguez-Ramírez HG, Navarro-Soto MC et al. Histochemical study of *Encephalitozoon cuniculi* spores in the kidneys of naturally infected New Zealand rabbits. *J Vet Diagn Invest.* 2017; 29 (3): 269-77. doi: org/10.1177/1040638716668559.
4. Jordan CN, Zajac AM, Lindsay DS. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Parasitology Compendium.* 2006; 28 (2): 108-16.
5. Dipineto L, Rinaldi L, Santaniello A, Sensale M, Cuomo A, Calabria M et al.. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses Public Hlth.* 2008; 55 (3): 173-5.
6. Weese JS, Fulford MB. Fungal Disease. In: Weese JS, Fulford MB, editors. *Companion Animal Zoonoses*. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd.; 2011. pp. 275-99.
7. Lavazza A, Chiari M, Nassuato C, Giardiello D, Tittarelli C, Grilli G. Serological investigation on *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in north-central Italy. *J Exot Pet Med.* 2016; 25 (1): 52-9.

8. Özkan Ö, Alçıgır ME. Subacute Stage of Encephalitozoon cuniculi Infection in Eye Lesions of Rabbit in Turkey. Iran. J Parasitol. 2018; 13 (2): 301-9.
9. Ozkan O, Karagoz A, Kocak N. First molecular evidence of ocular transmission of Encephalitozoonosis during the intrauterine period in rabbits. Parasitol Int. 2019; 71: 1-4.
10. Rodríguez-Tovar LE, Nevárez-Garza AM, Trejo-Chávez A, Hernández-Martínez CA, Gustavo Hernández-Vidal G, Zarate-Ramos JJ et al. Encephalitozoon cuniculi: Grading the histological lesions in brain, kidney, and liver during primoinfection outbreak in rabbits. J Pathog. 2016; 1-9. doi.org/10.1155/2016/5768428.
11. Pellett S. Encephalitozoon cuniculi in rabbits: An overview. Companion Animal. 2016; 21 (5): 300-5. doi.org/10.12968/coan.2016.21.5.300.
12. Harcourt-Brown FM. Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. Semin Avian Exot Pet Med. 2004; 13 (2): 86-93.
13. Ozkan O, Ozkan AT, Zafer K. Encephalitozoonosis in New Zealand rabbits and potential transmission risk. Vet Parasitol. 2011; 179 (1-3): 234-7. doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.007.
14. Keeble E. Nervous system and musculoskeletal disorders. In: Meredith A and Lord B, editors. BSAVA Manual of Rabbit Medicine, England: British Small Animal Veterinary Association; 2016. pp: 214-32.
15. Santaniello A, Dipineto L, Rinaldi L, Menna LF, Cringoli G, Fioretti A. Serological survey of Encephalitozoon cuniculi in farm rabbits in Italy. Res Vet Sci. 2009; 87: 67-9.
16. Shin JC, Kim DG, Kim SH, Kim S, Song KH. Seroprevalence of Encephalitozoon cuniculi in pet rabbits in Korea. Korean J Parasitol. 2014;52(3):321-3. doi.org/10.3347/kjp.2014.52.3.321.
17. Künzel F, Fisher PG. Clinical signs, diagnosis, and treatment of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 2018; 21 (1): 69-82. doi:10.1016/j.cvex.2017.08.002. PMID:29146032.
18. Berkin Ş, Kahraman MM. Türkiye’de tavşanlarda Encephalitozoon (Nosema) cuniculi enfeksiyonu. Ankara Univ Vet Fak Derg. 1983; 30 (2): 397-406.
19. Eröksüz H, Eröksüz Y, Metin N, Özer H. Morphologic examinations of cases of naturally acquired encephalitozoonosis in a rabbit colony. Turk J Vet Anim Sci. 1999; 23: 191-5.
20. Eröksüz Y, Eröksüz H, Özer H, Cevik A, Unver O. A survey of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbit colonies in Elazığ, Turkey: Pathomorphologic and serologic (Carbonimmunoassay Test) studies. Isr J Vet Med. 1999a; 54 (3): 73-7.
21. Kruse H, Kirkemo A, Handeland K. Wildlife as source of zoonotic infections. Emerg Infect Dis. 2004; 10 (12): 2067-72. doi:10.3201/eid1012.040707.
22. Pan Y, Wang S, Liu X, Li T, Sun Y, Gadahi JA. Seroprevalence of Encephalitozoon cuniculi in humans and rabbits in China. Iran J Parasitol. 2015; 10 (2): 290-5.
23. Okewole EA. Seroprevalence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in domestic rabbits in Nigeria. Onderstepoort J Vet. 2008; 75 (1): 33-8.
24. Lonardi C, Grilli G, Ferrazzi V, Cin MD, Rigolin D, Piccirillo A. Serological survey of Encephalitozoon cuniculi infection in commercially reared rabbit does in Northern Italy. Res Vet Sci. 2013; 94: 295-8.
25. Baldotto SB, Cray C, Giannico AT, Reifur L, Montiani-Ferreira F. Seroprevalence of Encephalitozoon cuniculi infection in pet rabbits in Brazil. J Exot Pet Med. 2015; 24 (4): 435-40.
26. Intachat C, Jiwaganont P, Wannasilp S, Udompattanakorn O, Kovitvadhi, Jala S et al. Slaughterhouse seroprevalence of Encephalitozoon cuniculi in meat rabbits at central part of Thailand. Thai J Vet Med. 2018; 12 (2): 35-45.
27. Igarashi M, Oohashi E, Dautu G, Ueno A, Kariya T, Koji F. High seroprevalence of Encephalitozoon cuniculi in pet rabbits in Japan. J Vet Med Sci. 2008; 70 (12): 1301-4.
28. Keeble EJ, Shaw DJ. Seroprevalence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in domestic rabbits in the United Kingdom. Vet Rec. 2006; 158 (16): 539-44.
29. Jordan CN, Dicristina JA, Lindsay DS. Activity of bleach, ethanol and two commercial disinfectants against spores of Encephalitozoon cuniculi. Vet Parasitol. 2006; 136 (3-4):343-6.

# Epidemiological and clinical aspects of the COVID-19 pandemic and world common experiences in treatment: Turkey experience

## COVID-19 pandemisinin epidemiyolojik ve klinik yönleri ve tedavide dünyanın ortak deneyimleri: Türkiye deneyimi

Hasan KARAGEÇİLİ<sup>1</sup>, Zuhâl YILDIRIM<sup>2</sup>

### ABSTRACT

The COVID-19 outbreak like SARS and MERS would have been thought to end in China. But it has not been envisaged, spread in Iran then Italy to continental Europe and spread to America in very prevalent and in a very short time. It was thought that looking to China from Turkey was very distant story for us. When it showed that the heavy influence on Italy, gave us the idea to be our next photograph. No matter how slow the World Health Organization behaved, the fact that it declared the disease as a pandemic during this period, increased the seriousness. COVID-19, after confirmation with the PCR test, the detection of spread in the lungs with radiological imaging chest tomography is also done. Commonly presented clinical findings were characterized by fever, cough, headache and muscle weakness. Some person recovered with mild symptoms of this disease contrary to the high level of contagiousness without symptoms of this disease sign both a good and a bad condition. It is very crucial to avoid contact, to protect personal distance, to wear a mask and to pay attention to hand hygiene to prevent disease transmission from human to human. It is important for those with suspected diseases to isolate themselves, to be quarantined and to be kept under the supervision of a doctor. The screening

### ÖZET

COVID-19 salgınının SARS ve MERS gibi Çin'de sona ereceği düşünülüyordu. Ancak öngörülemedi, İran'a, sonra İtalya'dan Avrupa kıtasına yayıldı ve kısa sürede ve yaygın şekilde Amerika'ya yayıldı. Türkiye'den Çin'e bakmanın bizim için çok uzak bir hikaye olduğu düşünülüyordu. İtalya üzerindeki ağır etkisini gösterdiğinde, bir sonraki fotoğrafımız olduğu fikrini verdi. Dünya Sağlık Örgütü ne kadar yavaş davranırsa davranırsın, hastalığı bu dönemde salgın olarak ilan etmesi ciddiyeti arttırdı. COVID-19, PCR testi ile onaylandıktan sonra, radyolojik görüntüleme (göğüs tomografisi) ile akciğerlerdeki yayılma tespit edilmektedir. Genel klinik bulguları ateş, öksürük, baş ağrısı ve kas güçsüzlüğü ile karakterizedir. Bu hastalığı hafif atlatanların olmasının yanında, semptom göstermeden bulaşıcılığının yüksek oranda olması hem iyi hem kötü, ikili bir durum doğurmaktadır. Hastalığın insandan insana bulaşmasını önlemek için temastan kaçınmak, kişisel mesafeyi korumak, maske takmak ve el hijyenine dikkat etmek çok önemlidir. Şüpheli hastalığı olanların kendilerini izole etmeleri, karantinaya alınmaları ve bir doktor gözetiminde tutulmaları önemlidir. Son üç gün aileleri ile temas halinde olan hastaların taranması ve

<sup>1</sup>Siirt University, Faculty of Health Sciences, Siirt

<sup>2</sup>Ankara Health Directorate, Public Health Services Presidency, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Zuhâl YILDIRIM

Rüzgarlı Cad. İbrahim Mütefferika Sok. No: 5 Ulus Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : zyildirim7073@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 14.06.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 23.07.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.95914

Karageçili H, Yıldırım Z. Epidemiological and clinical aspects of the COVID-19 pandemic and world common experiences in treatment: Turkey experience  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 355-366

and observation of patients with whom they have been in contact with their families for the last three days is the best way to break the chain of contamination. Teams established to contact tracing are working hard in our country. The number of patient cases in Turkey as of May 22, 154.500. The number of death was 4.276, with 2.8% ratio. COVID-19 case numbers and mortality rates declined with the curfew of over 65-year old people and younger than 20s. With the drugs that were used in the treatment protocol as hydroxychloroquine, favipiravir and supportive treatments, in Turkey, it is stated that the treatment was good.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, pandemic, contact tracing, epidemiology

gözlemlenmesi, kontaminasyon zincirini kırmanın en iyi yoludur. Ülkemizde filyasyon için kurulan ekipler çok çalışmaktadır. Hasta vaka sayısı Türkiye’de 22 Mayıs itibarıyla 154.500 idi. Ölü sayısı 4276, mortalite oranı ise %2.8 idi. COVID-19 vaka sayıları ve mortalite oranları, 65 yaşın üzerindeki ve 20 yaşından küçüklerin sokağa çıkmalarının kısıtlanması ile azaldı. Tedavi protokolünde kullanılan hidroklorokin, favipiravir ilaçları ve destekleyici tedaviler ile Türkiye’de tedavinin başarılı olduğu belirtilmektedir.

**Key Words:** COVID-19, pandemi, filyasyon, epidemiyoloji

## INTRODUCTION

In late December 2019, a group of patients were accepted to hospitals with a diagnosis of pneumonia of unrecognized etiology. These patients were epidemiologically related to a seafood and livestock wholesale market in Wuhan, the capital city of Hubei Province, China (1). Wuhan city became the center of an unknown pneumonia epidemic in December 2019. On January 7, 2020, Chinese scientists isolated a new coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2; formerly studied 2019-nCoV) from these patients with virus-infected pneumonia (2). By the World Health Organization (WHO) this novel coronavirus-infected pneumonia was called as coronavirus disease 2019 (COVID-19) on the February 11, 2020 (3). Because the first epidemic data enormously conform to exponential progress, in the preliminary work the average approximation of reproduction number (RO) for the 2019-nCoV was found to extent from 2.24 to 3.58, and that is remarkably larger than 1.

These findings indicated the potential of 2019-nCoV to result in epidemics (4). COVID-19 looks extremely infectious. It is primarily classified as a type of RNA virus belonging to the coronavirus family leading to respiratory system disease. One of the predominant marks for COVID-19 is pneumonia (5). When the number of newly confirmed cases in China increased 13 times, WHO decided to characterize COVID-19 as a pandemic on March 11, 2020 and asked member states to expand their emergency response mechanisms (6). COVID-19 is an pandemic with an estimated mortality between 1% and 5%; and an estimated RO of 2.2 to 6.7, according to various sources (7). As of March 28, 2020, there were more than 649.000 confirmed cases and a total of 30.249 deaths worldwide (8). This virus is transmitted from person to person within 2 m of land on the surfaces of the person contaminated with large cough, sneezing or rhinorrhea droplets. The COVID-19 virus can survive for at least 24 hours on hard surfaces and up

to 8 hours on soft surfaces. The virus is transmitted to another person by hand contact on a contaminated surface and then touching the mouth, nose or eyes. Aerosol airborne contaminated particles formed during sneezing or coughing can stay in the air for 3 hours (9). CoVs, the largest well-known RNA viruses, are also divided into four genera: alpha-coronavirus, beta-coronavirus, gamma-coronavirus, and delta-coronavirus (10). Six coronaviruses were formerly noted to bring about disease in humans, SARS-CoV-2 is the seventh member of the coronavirus family that infects human beings after SARS-CoV and MERS-CoV. SARS-CoV-2, such as SARS-CoV and MERS-CoV, belongs to  $\beta$ -coronavirus. The genome sequence homology of SARS-CoV-2 and SARS is about 79%, the 2019-nCoV is closer to the SARS-like bat CoVs (MG772933) than the SARS-CoV (11). Verification of the disease is done using nucleic acid amplification tests (NAAT), such as real-time reverse transcriptase polymerized chain reaction (RT-PCR). Imaging of the lungs on chest computed tomography (CT) is important in the scope and follow-up of COVID-19 pneumonia (12, 13). Parametric research shows that the growth rate of COVID-19 is approximately twice that of SARS and MERS, and that the COVID-19 doubling cycle is between two and three days, which means that the number of COVID-19 patients would double within two to three days without human intervention (14). Results from a meta-analysis of 46.248 infected patients showed

that the most common comorbidity was hypertension ( $17 \pm 7.95\%$  CI 14-22%) and diabetes ( $8 \pm 6.95\%$  CI 6-11%), followed by cardiovascular diseases ( $5 \pm 4.95\%$  CI 4-7%) and respiratory system disease ( $2 \pm 0.95\%$  CI 1-3%) (15). The average time from onset of symptoms to death is 17.8 days (95% reliable interval [CrI] 16.9-19.2) and hospital discharge time is 24.7 days (22.9-28.1). Crude case mortality rate was (adjusted for censorship) 3.67% (95% CrI 3.56-3.80). However, after further adjustments under demography and determination, China achieved the best estimate of 1.38% (1.23-1.53) case death rate (16).

COVID-19 was widely seen in China in December and in February in many countries around the world. The first case was seen in Turkey on March 10. As the number of tests increased every day, the number of positive cases increased. As of May 22, the total number of tests performed was 1.767.495, the number of intensive care patients was 800, the total number of intubated patients was 401, the number of tests performed was 37.507, the number of cases was 952, the number of deaths was 27, the number of recovered patients was 1.121, the total number of cases was 154.500, the total recovered patient number was 116.111, the total number of deaths was 4.276 and the recovered patients rate was 75%, mortality rate was 2.8%, in Turkey. Figure 1 below shows the data of Turkey (17).

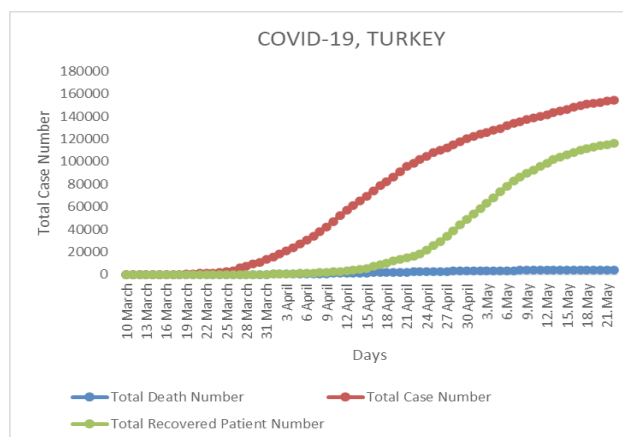


Figure 1. Turkey datas, total case number, total death number, total recovered patients number up to 22 May 2020 (17)

The average total cases were 5.235.452, the total recovered patients were 2.072.768 and total death cases were 338.612, the recovered rate was 39% and the death rate was 6.5% worldwide in May 22. The most important issue that the health minister emphasized was to determine contact tracing.  $R_0$  number was 4.3 in mid-April in Turkey. A sick person infects an average of 4.3 people. As a result of prevention efforts,  $R_0$  number was calculated as 1.56 on May 13 and 0.72 on May 20. Contact tracing may vary depending on the socio-cultural situation of societies. With the 5.300 contact tracing team, each COVID-19 patient who has a positive diagnosis is determined to be in contact with whom up to three days ago. It was emphasized that the effectiveness of family physicians is another important point. They stated that favipiravir, which is one of the drugs in the treatment protocol, is used firstly in patients not need intensive care and that its therapeutic effect was good. In addition, one million boxes of hydroxychloroquine drugs using in treatment are in stocks. This situation leads us to the conclusion that the medications we use in the treatment protocol are effective. These drugs are hydroxychloroquine sulfate, which the Food and Drug Administration (FDA) give permission to be tested, and favipiravir, which we bought from China. It was announced by the health minister that favipiravir drug, which was sent for use in intensive care in almost all provinces, has been used in treatment since April 1. It was stated that it was beneficial in patient recover. And also an antibacterial, macrolid group drug, azithromycin is used against COVID-19.

### Genetics

The genetic sequence of COVID-19 showed more than 80% identity to SARS-CoV and more than 50% to MERS-CoV. Both SARS-CoV and MERS-CoV were caused by bats (1). The virus genome consists of six main open reading frames (ORF) common to coronaviruses and a number of other helper genes. Further analysis shows that some of the 2019-nCoV genes

shared less than 80% nucleotide sequence identity with SARS-CoV. However, the amino acid sequences of the seven conserved replicase domains used for the classification of CoV species in ORF1ab were 94.4% identical between 2019-nCoV and SARS-CoV, indicating that the two viruses belong to the same species, SARSr-CoV (18). While 96.08% similarity was found between COVID-19 and SARS CoV Mpro, 51.61% low similarity was found for COVID-19 and MERS CoV Mpro. The number of COVID-19 amino acid differences for SARS-CoV and MERS-CoV were 12 and 153, respectively (19). Interestingly, for high similarity of receptor-binding domain (RBD) in Spike-protein, various analyses reveal that SARS-CoV-2 uses angiotension-converting enzyme 2 (ACE2) as receptor, just like as SARS-CoV. Coronavirus essentially recognizes the corresponding receptor on the target cell via the S protein on its surface and enters into the cell, then causing the occurrence of infection. A structure model analysis shows that SARS-CoV-2 binds ACE2 with above 10 folds higher interest than SARS-CoV, but higher than the threshold needed for virus infection (11). According to the general acceptance, origin of COVID-19, Figure 2 (20).

### The mechanisms and effects of a well-known virus family on host cell

It has been confirmed that 2019-nCoV uses the same cell entry receptor angiotensin converting enzyme II (ACE2) as SARS-CoV (16). Besides pulmonary tissue, ACE2 is also highly expressed in digestive system, composed of esophagus, stomach, small intestine, duodenum and kidney (21). The mechanisms of infection pathway of COVID-19 virus can be drawn as in below Figure 3 (22).

### Clinical symptoms

The most prevalent indications at the beginning of the infection are fever (82.1%), cough (45.8%), fatigue (26.3%), shortness of breath (6.9%) and headache (6.5%). The median incubation period was 6.7 days, the time between the beginning of the disease and consult a doctor was 4.5 days. In

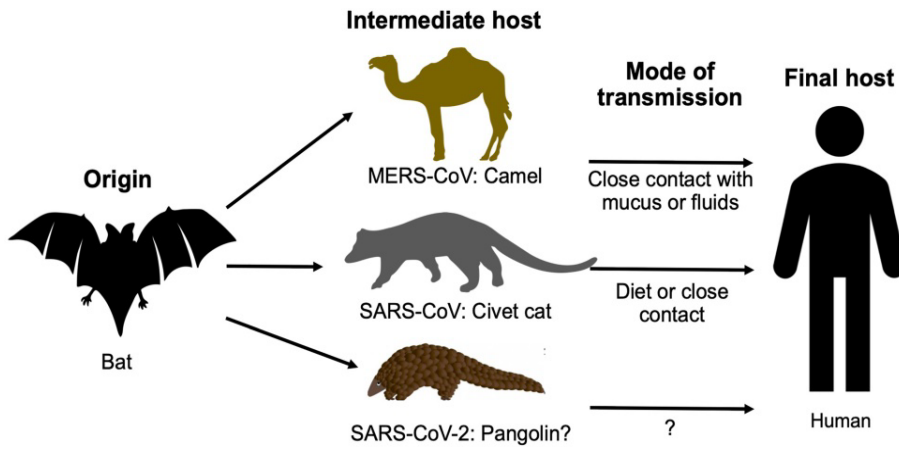


Figure 2. The origin of COVID-19, though still controversial (20).

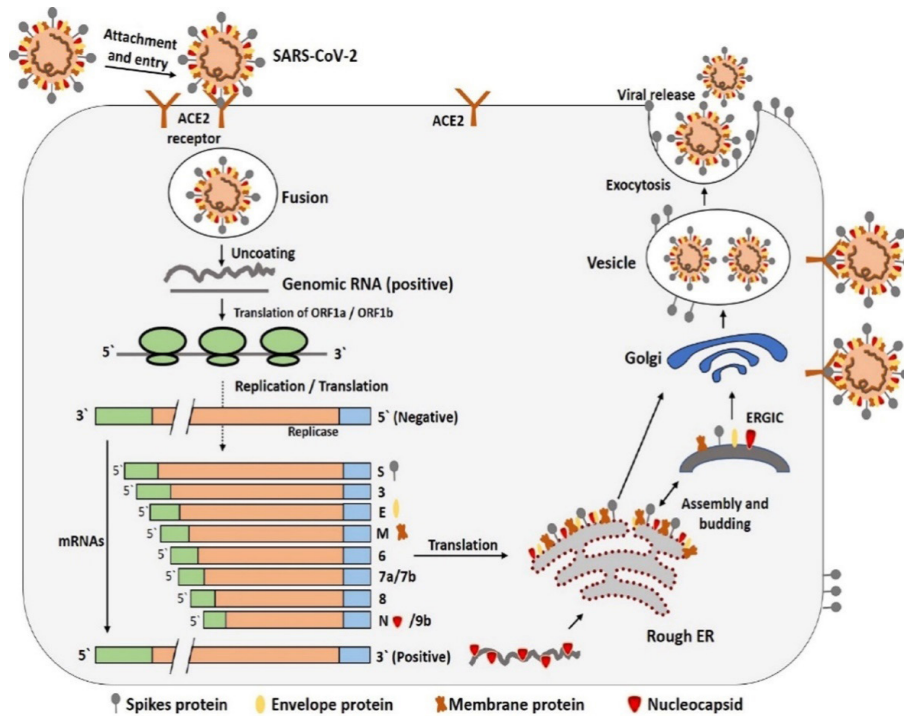


Figure 3. The entering and infection mechanism of COVID-19 to human cell (22).

the study conducted as of February 10, 17.2% of the patients were discharged and 81.7% of them were hospitalized, the mortality rate of COVID-19 infection in Beijing is 0.9% (23). Results from meta-analysis, including 46.248 infected patients, showed that the

most common clinical symptom was fever ( $91 \pm 3.95\%$  CI 86-97%) followed by cough ( $67 \pm 7.95\%$  CI 59-76%), fatigue ( $51 \pm 0.95\%$  CI 34-68%) and dyspnea ( $30 \pm 4.95\%$  CI 21-40%) (14). For 656 patients, fever (88.7%, 95% CI 84.5-92.9%), cough (57.6%, 95% CI 40.8-74.4%)

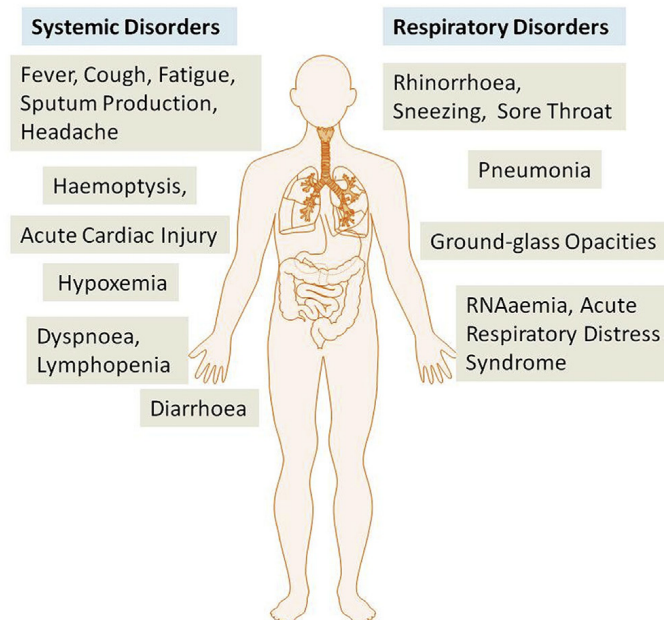
and dyspnea (45.6%, 95% CI 10.9-80.4%) were the most common symptoms. Among the patients, 20.3% (95% CI 10.0-30.6%) needed intensive care unit (ICU), 32.8% posed with acute respiratory distress syndrome (ARDS) (95% CI 13.7-51.8), 6.2% (95% CI 3.1-9.3) with shock. ICU was desired for nearly 20% of polymorbid, COVID-19 infected patients and hospitalization was related with a Case Fatality Rate (CFR) of >13% (24). General clinical symptoms whether they are changed in pandemic period like as below at Figure 4 (25).

According to WHO data, diarrhea, sore throat, headache, difficulty swallowing, joint pain, skin rashes and discoloration of the fingers and toes were also added to existing symptoms of high fever, dry cough, shortness of breath, loss of taste and smell (Figure 4)

#### Laboratory and radiological results

The increasing of neutrophils, Serum amyloid A (SAA), procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), ctTnl, D-dimer lactate dehydrogenase (LDH) and lactate

amount can be used as markers of illness progression, as well as the decrease of lymphocytes counts (26). ICU patients had higher IL2, IL7, IL10, GSCF, IP10, MCP1, MIP1A and TNF- $\alpha$  plasma levels compared to non-ICU patients (27). According to chest X-ray and CT, 74 (75%) patients had bilateral pneumonia, while only 25 (25%) patients had unilateral pneumonia and 14 (14%) patients had multiple mottling and ground glass opacity (28). There was no statistically significant difference in creatinine, aspartate amino transferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), bilirubin, CRP, creatine kinase (CK) and LDH levels between COVID-19 and non-COVID-19 groups (29). The reduction of CD3 +, CD4 + and CD8 + T lymphocyte correlated with the course of patients with COVID-19 pneumonia, especially in severe cases. T lymphocyte level can be used as an indicator of the severity and prognosis of patients with COVID-19 pneumonia (30). Serum cytokine levels of IL-2R, IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  and high LDH levels were notably higher in severe



**Figure 4.** The general and most seen symptoms of COVID-19 (25).



patients than those in non severe patients (31). Troponin levels were importantly increased in the week antecedent the death. 15 (13.4%) patients have introduced marks of pulmonary hypertension (32). The most common laboratory abnormalities were high CRP (68.6% [58.2-78.2]) and decreased lymphocyte count (57.4% [44.8-69.5]) as well as increased LDH (51.6% [31.4-71.6]). The most common chest CT findings were ground glass opacities (80.0% [67.3-90.4]) and bilateral pneumonia (73.2% [63.4-82.1]). ARDS was the most common complication (15.7% [5.0-30.4]) (33). Eosinophil values were little on first hospitalization, later overall became normal before discharge. Rising of eosinophils may be an indicator of COVID-19 recovery (34).

The gold standard in routine microbiological diagnosis for SARS-CoV-2 is to demonstrate the presence of viral RNA in real-time reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in appropriate clinical samples. Although there are tests investigating the presence of antigens in clinical samples, these tests are not recommended for use in clinical diagnosis due to their low sensitivity and specificity. In the light of the available information, the samples that should be taken from the patients for the direct diagnosis of the infection with RT-PCR are respiratory samples (35).

### Medicines used for treatment

Remdesivir and chloroquine have been shown to effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro. Therefore, other nucleoside analogs such as favipiravir, ribavirin and galidesivir are potentially clinically usable against SARS-CoV-2 (3). Arbidol combined with LPV/r can help delay the progression of lung lesions and reduce the likelihood of respiratory and gastrointestinal transmission to reduce the viral load of COVID-19 (36). Clinically controlled studies have proven that chloroquine is effective in the treatment of patients with COVID-19. Remdesivir undergoes numerous clinical trials in several hospitals, and the final effectiveness of the drug is uncertain. Arbidol, a

small indole derivative molecule, has been confirmed to block viral fusion against influenza A and B viruses and hepatitis C viruses and have an antiviral effect on SARS-CoV in the cell assay, so it may be a choice for COVID-19 therapy (37). Currently, there is no vaccine or antiviral therapy for human and animal coronavirus. General strategies include bed rest and antiviral therapy, antibiotic administration, immunomodulatory therapy, organ function support, respiratory support, bronchoalveolar lavage (BAL), blood purification and extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) (10).

Whole patients were cured in isolated condition. 75 (76%) patients had antiviral treatment, including oseltamivir (75 mg every 12 h, orally), ganciclovir (0.25 g every 12 h, intravenously), and lopinavir and ritonavir tablets (500 mg twice daily, orally). The length of antiviral therapy was 3-14 days (median 3 days). When secondary bacterial infection happened, the antibiotics utilized were cephalosporins, quinolones, carbapenems, tigecycline against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, linezolid, and antifungal drugs. The length of antibiotic therapy was 3-17 days (median 5 days). 19 (19%) patients were treated with methylprednisolone sodium succinate, methylprednisolone, and dexamethasone for 3-15 days (median 5) (28). Therapy of hydroxychloroquine is remarkably correlated with reduced or lost viral load in COVID-19 patients, and its impact is enhanced by azithromycin (38). Chloroquine is one of the most greatly used anti-malaria drugs widespread, but has also been examined as a potential broad-spectrum anti-viral drug. Chloroquine also seems to intervene with terminal glycosylation of ACE2 and therefore can eliminate virus-receptor binding and infection (39).

In severe COVID-19, the use of corticosteroids early (immediately after hospitalization or within the first three days after hospitalization) can control disease progression or prevent further deterioration of the disease (40). The data suggest that arbidol monotherapy may be superior to lopinavir/ritonavir

in the treatment of COVID-19 (41). Treatment of cytokine storm has become an important part of saving serious patients. Tocilizumab is an IL-6R blocker that can effectively block the IL-6 signal transduction pathway. Therefore, tocilizumab is likely to be an effective drug for patients with severe COVID-19 (42). Some researchers in Turkey also studied on Dornase alfa which is used to reduce the number of lung infections and to improve lung function in patients with cystic fibrosis, to use against COVID-19. Moreover, the sale of the drug, which is produced by a local pharmaceutical company for use in the treatment of COVID-19, has been granted nowadays. The search for the treatment with existing drugs will continue until the specific drugs are developed against COVID-19.

#### The course of outbreak: now and future

Treatment of cytokine storm has become an important part of saving serious patients. Tocilizumab is an IL-6R blocker that can effectively block the IL-6 signal transduction pathway. Therefore, tocilizumab is likely to be an effective drug for patients with severe COVID-19 (43).

Hydroxychloroquine sulfate and chloroquine phosphate are antimalarial drugs used in malaria treatment. Hydroxychloroquine inhibits Plasmodium malaria cell to not entering human cell and prevent high fever. If the COVID-19 virus is prevented from entering the cell, it can be ensured membrane stability. Certainly, every drug has side effects. With the proposal of Paracelsus, it is the dose that distinguishes the drug from poison. The new coronavirus 2019 of the SARS family is named by the world health organization as COVID-19. Since it is classified in a known virus family, at the beginning, it is normal to try the drugs used for SARS and MERS. Although there is no general belief that they are beneficial and show improvement, it is a fact that a treatment protocol will be established with the drugs available. A medication or a prophylactic vaccine can be developed for the treatment of COVID-19, the

mechanism of action of which is known. It is stated that drug synthesis will take a long time from the chemical synthesis phase, including studies in cell culture and experimental animals. Moreover, even if the phase I, phase II and phase III studies are accelerated in volunteers and patients, it will not be possible in less than 1 year. Although there is no specific drug in the treatment protocol that has undergone sufficient trials and can be used against COVID-19, neither patients nor doctors are waiting. Taking advantage of the similarity of existing drugs, most of the drugs available are used in the treatment of some patients. If these drugs are not used with proper dosage, appropriate duration and suitable patient, it causes a condition that metabolism cannot handle and the patient is lost. It is expected that China will be experienced since the use of drugs within the trial and error first started in China. We expect that trials on drug use and disease treatment will lead to the development and acceleration of evidence-based medicine worldwide. From the scientific committee and the Ministry of Health's statements, doctors are using what drugs and methods of treatment are used based on the evidence. Every day, new studies on transmission routes and new findings about how long the virus remains in sick people are emerging. As stated in the studies, while the virus has been kept alive in the human body for the longest 37 days, in recent studies it is possible to remain alive in the human body for 49 days. It is stated that everyone should wear a mask in public spaces, whether they are sick or not. Everyone can be a potential carrier because of the high transmission of the virus and no symptoms at all.

#### CONCLUSION

As in one study, higher post-oxygen supplement SpO<sub>2</sub> levels were associated with reduced mortality regardless of age and gender (44). A study in the city of Indonesia, Jakarta, found that weather is an important factor in determining the COVID-19

incidence rate. A significant correlation is shown between the temperature averages and COVID-19 pandemic (45). According to empirical outputs, the relationship between temperature and COVID-19 was mostly positive for Hubei, Hunan and Anhui, while was mostly negative for Zhejiang and Shandong provinces (46). Almost every day a new drug, oxygen therapy, prone position, vitamins and similar chemicals were recommended for therapeutic or prophylactic purposes. Strengthening the immune system is important, but the fact that the immune system is strong enough may be a more accurate approach. It is also difficult for the organism to be negatively affected by its own immune system by exposure to cytokine bombardment. Neither a very strong immune system nor a weak, self-protecting immune system is sufficient.

Vitamin D is found in oily fish (eg herring, salmon and sardines), as well as cold liver oil. In addition to vitamin D from foods, it is synthesized in the skin with sunlight. Vitamin D deficiency has been associated with an increased risk of common cancers, autoimmune diseases, hypertension and infection recovery. Vitamin C plays a role in neutralizing the free radicals in the body by working with vitamin E as an antioxidant to wound healing, bone and tooth growth, strengthening blood vessels and walls, and increasing absorption and use of iron (47-50). The reasonable aspect of the doctors' Vit D3 recommendation is that people are not able to consume enough fatty fish and similar products, and because they do not go out, their exposure to the sun

and the ultraviolet rays they receive on the skin are very low. Another recommended vitamin is vitamin C. It is that vitamin C, which is given in abundance intravenously, protects against this disease. Another drug-like substance is the collection of immune plasma from patients who have undergone COVID-19 and who have recovered completely using apheresis technique and used in patients. Intubation devices should be produced, but qualified personnel who will use these machines are also needed. In the world, it is ensured that intensive care units are used effectively due to the fact that patients without respiratory distress do not go to the hospital and stay at home. Initially, this was desirable in Turkey. With the devoted work of healthcare workers and the healthcare system not collapsing, it has caused everyone who had symptoms of this disease called to hospitals for treatment. As a result of the success of the health system in Turkey, the total hospital bed occupancy rate did not exceed 30-32%, the intensive care bed occupancy also did not exceed rates of 60-62%. The drugs used in our country and the drugs that are said to be beneficial are antimalaria medicines known as hydroxychloroquine, favipiravir, which is an antiviral drug, and an antibacterial, azithromycin. It is also used in supportive treatments. Treatment success increases with the use of these drugs within the scope of rational drug use principles, appropriate dose, appropriate patient, appropriate duration and the right way. Furthermore, controlled experiments must be carried out to determine the effects of the drugs used in treatment.

## KAYNAKLAR

1. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun*, 2020; 109: 102433.
2. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020; 395(10229):1054-62.
3. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal*, 2020;10 (2): 102-8.
4. Zhao S, Lin Q, Ran J, Musa SS, Yang G, Wang W, et al. Preliminary estimation of the basic reproduction number of novel coronavirus (2019-nCoV) in China, from 2019 to 2020: a data-driven analysis in the early phase of the outbreak. *Int J Infect Dis*, 2020; 92: 214-7.
5. Yang W, Cao Q, Qin L, Wang X, Cheng Z, Pan A, et al. Clinical characteristics and imaging manifestations of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19): a multi-center study in Wenzhou city, Zhejiang, China. *J Infect*, 2020; 80(4): 388-93.
6. Ho LTF, Chan KKH, Chung VCH, Leung TH. Highlights of traditional Chinese medicine frontline expert advice in the China national guideline for COVID-19. *Eur J Integr Med*, 2020; 36: 101116.
7. Liu Y, Gayle AA, Wilder-Smith A, Rocklöv J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J Travel Med*, 2020; 27(2): taaa021.
8. Desjardins MR, Hohl A, Delmelle EM. Rapid surveillance of COVID-19 in the United States using a prospective space-time scan statistic: detecting and evaluating emerging clusters. *Appl Geogr*, 2020; 118 (102202):1-7.
9. Thomas P, Baldwin C, Bissett B, Boden I, Gosselink R, Granger CL, et al. Physiotherapy management for COVID-19 in the acute hospital setting: clinical practice recommendations. *J Physiother*, 2020, 66 (2): 73-82.
10. Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. *Int J Infect Dis*, 2020; 94: 44-8.
11. Wang L, Wang Y, Ye D, Liu Q. A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence. *Int J Antimicrob Agents*, 2020; 55(6):105948.
12. Fanzca AB, Loh MH, Tan CH, SU LL, Young BE, Lye DC, et al. Care of the pregnant woman with covid-19 in labor and delivery: anesthesia, emergency cesarean delivery, differential diagnosis in the acutely ill parturient, care of the newborn, and protection of the healthcare personnel. *Am J Obstet Gynecol*, 2020; 223 (1): 66-74.
13. Gautret P, Lagier JC, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Sevestre J, et al. Clinical and microbiological effect of a combination of hydroxychloroquine and azithromycin in 80 COVID-19 patients with at least a six-day follow up: A pilot observational study. *Travel Med Infect Di*, 2020; 34: 101663.
14. Liang K. Mathematical model of infection kinetics and its analysis for COVID-19, SARS and MERS. *Infect Genet Evol*, 2020; 82:104306.
15. Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, et al. Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*, 2020. 94: 91-5.
16. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N, et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019 : a model-based analysis. *Lancet Infect Dis*, 2020; 20(6): 669-77.
17. Daily Table of COVID-19 For Turkey. <https://covid19.saglik.gov.tr>. (Accessed Date: May 22, 2020).
18. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020; 579: 270-3.

19. Kandeel M, Al-Nazawi M. Virtual screening and repurposing of FDA approved drugs against COVID-19 main protease. *Life Sci*, 2020; 15:117627.
20. Yi Y, Lagniton PNP, Ye S, Li E, Xu RH. *Int J Biol Sci*, COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. 2020;16(10):1753-66.
21. Zhang H, Kang Z, Gong H, Xu D, Wang J, Li Z, et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCov infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes. *BioRxiv*, 2020; 2020.01.30.927806.
22. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res*, 2020; 24:91-8.
23. Tian S, Hu N, Lou J, Chen K, Kang Z, Ziang Z, et al. Characteristics of COVID-19 infection in Beijing. *J Infect*, 2020; 80(4): 401-6.
24. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*, 2020; 34: 101623.
25. Coronavirus Disease (COVID-19) events as they happen. World Health Organization. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>, (Accessed Date: April 30, 2020).
26. Li X, Wang L, Yan S, Yang F, Xiang L, Zhu J, et al. Clinical characteristics of 25 death cases with COVID-19: a retrospective review of medical records in a single medical center, Wuhan, China. *Int J Infect Dis*, 2020; 94: 128-32.
27. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhaou J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020; 395(10223): 497-506.
28. Chen N, Zhou M, Dong X, Jieming Q, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020; 395(10223):507-13.
29. Hsieh WH, Cheng MY, Ho MW, Chou CH, Lin PC, Chi CY, et al. Featuring COVID-19 cases via screening symptomatic patients with epidemiologic link during flu season in a medical center of central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*, 2020; 53(3): 459-66.
30. He R, Lu Z, Zhang L, Fan T, Xiong R, Shen X, et al. The clinical course and its correlated immune status in COVID-19 pneumonia. *J Clin Virol*, 2020; 127: 104361.
31. Li X, Xu S, Yu M, Wang K, Tao Y, Zhou Y, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol*, 2020 146(1): 110-8.
32. Deng Q, Hu B, Zhang Y, Wang H, Zhou X, Wei Hu, et al. Suspected myocardial injury in patients with COVID-19: evidence from front-line clinical observation in Wuhan, China. *Int J Cardiol*, 2020; 311: 116-21.
33. Fu L, Wang B, Yuan T, Chen X, Ao Y, Fitzpatrick T, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*, 2020; 80(6): 656-65.
34. Liu F, Xu A, Zhang Y, Xuan W, Yan T, Pan K, et al. Patients of COVID-19 may benefit from sustained lopinavir-combined regimen and the increase of eosinophil may predict the outcome of COVID-19 progression. *Int J Infect Dis*, 2020; 95:183-91.
35. Wong JEL, Leo YS, Tan CC. COVID-19 in Singapore-current experience: critical global issues that require attention and action. *JAMA*, 2020; online ahead of print.
36. Deng L, Li C, Zeng Q, Liu X, Li X, Zhang H, et al. Arbidol combined with LPV/r versus LPV/r alone against corona virus disease 2019: a retrospective cohort study. *J Infect*, 2020; 81(1): e1-e5.
37. Wang L-S, Wang Y-R, Ye D-W, Liu Q-Q. A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19) based on current evidence. *Int J Antimicrob Agents*, 2020; 55(6): 105948.
38. Gautret P, Lagier JC, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Mailhe M, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents*, 2020; 20: 105949.

39. Wu C-I, Postema PG, Arbelo E, Behr ER, Bezzina CR, Napolitano C, et al. SARS-CoV-2, COVID-19 and inherited arrhythmia syndromes. *Hear Rhythm*. 2020, 31; S1547-5271(20)30285-X.
40. Zheng C, Wang J, Guo H, Lu Z, Ma Y, Zhu Y, et al. Risk-adapted treatment strategy for COVID-19 patients. *Int J Infect Dis*. 2020, 94:74-77.
41. Zhu Z, Lu Z, Xu T, Chen C, Yang G, Zha T, et al. Arbidol monotherapy is superior to lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. *J Infect*, 2020; 81(1):e21-e23.
42. Zhang C, Wu Z, Li J-W, Zhao H, Wang G-Q. The cytokine release syndrome (CRS) of severe COVID-19 and interleukin-6 receptor (IL-6R) antagonist tocilizumab may be the key to reduce the mortality. *Int J Antimicrob Agents*, 2020; 55(5):105954.
43. Amrane S, Tissot-Dupont H, Doudier B, Eldin C, Hocquart M, Mailhe M, et al. Rapid viral diagnosis and ambulatory management of suspected COVID-19 cases presenting at the infectious diseases referral hospital in Marseille, France, - January 31st to March 1st, 2020: a respiratory virus snapshot. *Travel Med Infect Dis*, 2020; 20:101632.
44. Xie J, Covassin N, Fan Z, Singh P, Gao W, Li G, et al. Association between hypoxemia and mortality in patients with COVID-19. *Mayo Clin Proc*. 2020, 95(6): 1138-47.
45. Tosepu R, Gunawan J, Effendy DS, Ahmad LOAI, Lestari H, Bahar H. et al. Correlation between weather and Covid-19 pandemic in Jakarta, Indonesia. *Sci Total Environ*, 2020; 725: 138436.
46. Shahzad F, Shahzad U, Fareed Z, Iqbal N, Hashmi SH, Ahmad F. Asymmetric nexus between temperature and COVID-19 in the top ten affected provinces of China: a current application of quantile- on-quantile approach. *Sci Total Environ*, 2020; 736:139115.
47. Karageçili H. Vitaminler. In: Paşaoğlu H, ed. *Temel - Klinik Tıbbi Laboratuvar*. 1. Baskı. Ankara. Pelikan Tıp Teknik Yayıncılık - Akademik Kitaplar, 2018: 81-8.
48. Bozalioğlu S, Kılıç N, Yıldırım Z, Baştürk B, Kurukahvecioğlu O. The relationship between HLA-G levels and oxidative stress parameters in patients with breast cancer. *Turk J Med Sci*, 2013; 43(6): 870-7.
49. Yıldırım Z, Uçgun NI, Yıldırım F. The role of oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011; 66(5): 743-6.
50. Uçgun NI, Yıldırım Z, Abbasoğlu ÖE, Özel Ü, Fikret ZC, Bilgihan A, et al. Senil katarakt ilerlemesi ve askorbik asit. *MN Oftalmol*, 2005; 12: 10-2.
51. Biswal M, Rudramurthy SM, Jain N, Shanthan AS, Sharma D, Jain K, et al. Controlling a possible outbreak of *Candida auris* infection: lessons learnt from multiple interventions. *J Hosp Infect*, 2017; 97: 363-70.
52. Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2016; 5: 35.
53. Anonymous. <http://www.promedmail.org/post/20180425.5767936>, (Erişim Tarihi: 15.05.2019).

# Küresel bir tehdit: *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları, antimikrobiyal dirençte güncel durum ve alternatif tedavi yaklaşımları

## A global threat: *Acinetobacter baumannii* infections, current condition in antimicrobial resistance and alternative treatment approaches

Aybala TEMEL<sup>1</sup>, Bayri ERAÇ<sup>2</sup>

### ÖZET

*Acinetobacter baumannii* ventilatör ilişkili pnömoni ve kateter ilişkili bakteriyemi başta olmak üzere, idrar yolu enfeksiyonları, yumuşak doku enfeksiyonları, sepsis ve menenjit gibi ciddi enfeksiyonlara neden olan önemli nozokomial patojenlerden birisidir. Polisakkarit kapsül, fimbria, Lipit A ve lipopolisakkarit yapı gibi çeşitli virülans faktörlerinin yanı sıra siderofor, sekresyon sistemleri, biyofilm oluşturma özelliği ve antibiyotik direnç genleri bakterinin patogeneze katkı sağlamaktadır. Karbapenemler, aminoglikozitler, sulbaktam, kolistin ve tigesiklin ciddi klinik tablolara neden olan *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan antimikrobiyal ajanlardır. Karbapenemlere direnç, genellikle çoklu ilaç direnci (ÇİD) ile birlikte görülmektedir. Dirençli izolatların tedavisinde kullanılan tigesiklin ve kolistine dahi çeşitli merkezlerde artan direnç oranları rapor edilmekte, bu durum *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisini ve eradikasyonunu oldukça zorlaştırmaktadır. *A. baumannii*'de antimikrobiyal direnç durumunun ulaştığı endişe verici boyut, 2018 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan 'yeni antibiyotik keşfi gerektiren dirençli bakteriler' listesinin ilk sırasında bu bakteri türünün yer almasıyla açıkça

### ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* is an important nosocomial pathogens that cause serious infections such as ventilator-associated pneumonia, catheter-related bacteriemia, urinary tract infections, soft tissue infections, septicemia and meningitis. Various virulence factors such as polysaccharide capsule, fimbria, lipid A and lipopolysaccharide structure, siderophore, secretion systems, biofilm formation and antibiotic resistance genes contribute to the pathogenesis of the bacteria. Carbapenems, aminoglycosides, sulbactam, colistin and tigecycline are frequently used antimicrobial agents in *Acinetobacter* infections. Resistance to carbapenems is usually seen as multidrug resistance (MDR). As reported from various centers, the development of resistance to tigecycline and colistin, used in the treatment of MDR isolates, makes treatment of *A. baumannii* infections more difficult. In 2018, the World Health Organization published 'global priority list of antibiotic-resistant bacteria requiring new antibiotic discovery' and *A. baumannii* has been at the top of this list. The alarming dimension of the antimicrobial resistance in *A. baumannii* was clearly

<sup>1</sup>İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir  
<sup>2</sup>Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir



İletişim / Corresponding Author : Bayri ERAÇ

E.Ü. Eczacılık Fak., Farmasötik Mik. A.D., Ankara Cad. No: 172/98 Bornova - İzmir - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 15.03.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 30.07.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.04764

Temel A, Eraç B. Küresel bir tehdit: *Acinetobacter baumannii*, antimikrobiyal dirençte güncel durum ve alternatif tedavi yaklaşımları  
Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 367-378

ortaya konmuştur. Antimikrobiyal dirençle mücadele ve etkin tedavi açısından bakterinin virülans faktörlerinin ve direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılması oldukça önemlidir. Çoklu ilaç dirençli bakterilerle mücadele global bir sağlık problemi haline gelmiş olup *A. baumannii*'nin de içinde bulunduğu bu tür dirençli mikroorganizmalar ile mücadelede enfeksiyon kontrol önlemleri, akılcı antibiyotik kullanımı ve antivirülans stratejilerinin bütüncül bir yaklaşımla bir arada kullanılması gerekmektedir. Bu bağlamda, kombine antibiyotik kullanımı, eflüks pompa inhibitörleri, anti-biyofilm ajanların kullanımı ve faj terapisi gibi alternatif tedavi potansiyeli olduğu düşünülen alanlarda yürütülen araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Bu derlemede; *A. baumannii*'nin patogeneğinde rol oynayan faktörler, epidemiyolojik özellikleri ve antibiyotik direnç mekanizmaları hakkında güncel bilgilere yer verilmiş ve bu patojenle mücadelede öne çıkan alternatif tedavi yaklaşımları incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, antibiyotik direnci, virülans faktörleri

demonstrated by this report. Understanding of the virulence and resistance mechanisms of the bacterium is essential for effective treatment and fighting antibiotic resistance. In combating MDR bacteria that have become a global health problem such as *A. baumannii*, infection control preventions, rational antibiotic use and anti-virulence strategies need to be used in a holistic approach. The studies carried on alternative therapies such as combined antibiotic use, efflux pump inhibitors, anti-biofilm agents and phage therapy are of great importance. In this review; the current knowledge about the factors involved in pathogenesis of *A. baumannii*, its epidemiological characteristics, antibiotic resistance mechanisms and alternative treatment approaches for combating had been evaluated.

**Key Words:** *Acinetobacter baumannii*, antibiotic resistance, virulence factors

## GİRİŞ

*Acinetobacter* türleri, ilk kez 1911 yılında mikrobiyolog Beijerinck tarafından izole edilmiş olup *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilmiştir. 1939 yılında DeBord tarafından üretral örneklerden izole edilmesinin ardından uzun bir süre *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mima polymorpha*, *Morexalla lwoffii* gibi farklı isimlerle anılan bu bakteri türleri günümüzde *Acinetobacter* cins adı ile tanınmaktadır (1). *Moraxellaceae* ailesinin üyelerinden olan *Acinetobacter* türleri; gram negatif kokobasiller olup, hareketsiz, nonfermentatif, zorunlu aerob, oksidaz negatif ve katalaz pozitif mikroorganizmalardır. DNA'larında G+C içeriğinin %39-47 oranında olduğu bilinmektedir (2). Bu bakteri türleri; mikrobiyoloji laboratuvarlarında

rutin olarak kullanılan Eosin Metilen Blue (EMB) agar ve kanlı agar gibi besiyerlerinde 35-37 °C'de rahatlıkla üreyebilmekte ve genellikle düzgün, bazen mukoid formda açık sarı-beyaz renkte koloniler oluşturmaktadır (2,3). Bu mikroorganizmaların çeşitli klinik ve çevresel örneklerden izolasyonunda Leeds *Acinetobacter* Medium, Heralla agar, Holton agar gibi seçici ve ayırt edici nitelikte farklı besiyerleri de kullanılabilir (2). *Acinetobacter* türleri, *Neisseria* ve *Moraxella* gibi diğer nonfermentatif bakterilerden oksidaz negatif olmalarıyla, diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden anaerobik şartlarda üreyememe ve nitratı redükte etmemeleriyle ayrılırlar.



DNA hibridizasyon çalışmaları ve farklı genomik araştırmalar sonucunda *Acinetobacter* genusunda toplam 26 genomik tür tanımlanmıştır. Bu genomik türlerden *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *A. baumannii* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU; fenotipik olarak birbirine oldukça benzeyen, birbirlerinden ayırt edilmesi zor olan türlerdir. Bu nedenle genellikle “*A. baumannii* - *A. calcoaceticus* kompleks” (*A. baumannii* kompleks-ABK) olarak adlandırılmaktadırlar (3). *A. nosocomialis* olarak adlandırılan *Acinetobacter* genomik tür 13TU ve *Acinetobacter* genomik tür 3 (*A. Iwoffii*) hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak karşılaşılabilen türlerken, *A. calcoaceticus* klinik açıdan daha az önem atfedilen çevresel bir patojen olarak değerlendirilmektedir (4). Tıbbi açıdan en önemli tür olan *A. baumannii*, sıklıkla klinik örneklerden izole edilmekte ve ciddi enfeksiyon tablolarına neden olmaktadır (2).

### Virülans Faktörleri ve Patogenez

*Acinetobacter* türleri, genellikle virülansı düşük patojenler olarak değerlendirilseler de çok sayıda virülans faktörüne sahip bakterilerdir. Özellikle altta yatan hastalığı olan ve çeşitli risk faktörlerini taşıyan hastalarda, ağır klinik tablolarla seyredabilen hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı bir patojen olarak karşımıza çıkmaktadır. *Acinetobacter* türleri arasında *A. baumannii* en virulan tür olarak bilinmektedir. Yapılan çok değişkenli analizler, diğer türlerin etken olduğu enfeksiyonlara oranla, *A. baumannii* enfeksiyonlarının mortalitesinin dokuz kat fazla olduğunu ortaya koymuştur (5).

Polisakkarit kapsül, fimbria, Lipit A ve lipopolisakkarit yapının yanı sıra quorum sensing (QS-çoğunluğu algılama sistemleri), biyofilm oluşturma, sitotoksik dış membran proteini (OmpA) ve antibiyotik direnç genleri mikroorganizmanın patogeneze katkı sağlayan önemli virülans faktörleridir.

Polisakkarit kapsül, bakteriyi fagositozdan koruyarak konak immün yanıtından kaçışını kolaylaştırırken, fimbria mikroorganizmanın konak

epitel hücrelerine bağlanmasına aracılık eden, Lipit A ise endotoksik aktivite göstererek bakterinin patogenezinde rol oynayan yapılardır (6).

*A. baumannii* kompleks türlerinde sık rastlanan virülans faktörlerinden bir diğeri sideroforlar olup, bakterinin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için gerekli demir ihtiyacını karşılamayı sağlayan şelat oluşturuşu ajanlardır. Demir, doğal çevrede yaygın olarak bulunan bir kimyasal elementtir ancak Fe<sup>+3</sup> şeklinde sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. Bakteriler, kendi metabolizmaları için gereken demiri sideroforlar aracılığıyla alırlar. Demir yetersizliği durumunda birçok aerobik bakteri tarafından düşük molekül ağırlıklı demir şelatları üretilir. Bu sideroforlar; demir iyonları ile kompleks oluşturduktan sonra bakteri hücresinde bulunan özel reseptörler aracılığıyla tanınır ve hücre içerisine alınır (7,8). Pek çok mikroorganizma tarafından sentezlenen hidroksamat, katekolat gibi farklı kimyasal yapılarda sideroforlar mevcut olup, ABK türlerinde en çok rastlanan siderofor ‘acinetobactin’ adıyla bilinmektedir. Acinetobactin’in mikroorganizmanın konak epitel hücrelerinde hasara yol açarak virülansı arttırdığı çalışmalarda bildirilmiştir (7).

Bakterilerde bulunan porin adı verilen dış membran proteinleri konak epitelyal hücrelerine yapışmayı ve invazyonu sağlar. ABK üyelerinde yaygın olarak bulunan ve sitotoksik bir dış membran proteini olan OmpA’nın, konak epitel hücrelerini çeşitli mekanizmalarla apoptoza sürükleyerek patogeneze katkı sağladığı bilinmektedir (9).

QS sistemi, biyofilm yapısı, beta-laktamaz enzimlerin varlığı ve RND tipi eflüks pompaları *Acinetobacter* türlerinde gerek patojeniteyi arttıran gerekse antimikrobiallere duyarlılığın azalmasına ve direnç sorununa neden olan en önemli virülans mekanizmaları olarak değerlendirilmektedir. Çeşitli sinyal moleküllerinden oluşan çoğunluğu algılama sistemiyle, mikroorganizmalar buldukları ortamda meydana gelen değişimleri (besin ve oksijen miktarında azalma, pH değişimi gibi) ve populasyon

yoğunluğunu algılayabilmekte, ortama adapte olabilmektedir. Sinyal moleküllerinin belirli bir eşik değerin üzerinde üretilmeleri, bakterinin farklı virülans faktörlerinin regülasyonunda otoindükleyici etki sağlayarak patogenezi desteklemektedir. QS sistemini oluşturan N-açilhomoserinlaktan yapısındaki bu sinyal moleküllerinin, bakterilerin belirli odak noktalarda toplanmasını sağlayarak biyofilm yapısının oluşumunda da etkin rol oynadığı bilinmektedir (10).

Biyofilm yapısı; besin yetersizliği, pH değişikliği gibi olumsuz dış ortam koşullarında hayatta kalabilmek üzere mikroorganizmaların kendi ürettikleri organik ekzopolisakarit yapılarla oluşturdukları bir mikro-ekosistem olarak tanımlanabilir. Biyofilm, canlı ve cansız farklı yüzeylerde oluşabilmektedir. Adezyonu kolaylaştıran bu yapı aracılığıyla mikroorganizmalar belirli dokulara veya tıbbi malzemelerin yüzeylerine yerleşerek kolonize olabilmektedir. Bu yapı, bakterinin kolonizasyonunu kolaylaştırarak enfeksiyon riskini arttırmanın yanı sıra antimikrobiallerin etkisini azaltarak hem tedaviyi zorlaştırmakta hem de direnç gelişimine sebep olmaktadır (11). Biyofilm yapısında yer alan mikroorganizmaların, planktonik formlarına kıyasla antibiyotiklere 100 ila 1000 kat, dezenfektanların etkisine ise 10 ila 100 kat daha dirençli olabildikleri bilinmektedir (12).

*Acinetobacter* türlerinde biyofilm yapısı ile ilgili bazı virülans genleri ve proteinleri tanımlanmış durumdadır (3). *Acinetobacter*'lerde varlığı ilk olarak Loehfelm ve arkadaşları tarafından tanımlanan 'Bap' (Biofilm associated protein) proteininin, *A. baumannii* biyofilm yapısının oluşumu ve olgunlaşmasında etkili olduğu gözlenmiştir. Bakterinin tip I sekresyon sistemi aracılığıyla sekrete edilen bir hücre yüzey proteini olan *Bap* varlığında, mikroorganizmanın biyofilm oluşturma kapasitesinin arttığı araştırma sonuçlarıyla ortaya konmuştur (13,14). Çok sayıda farklı araştırma sonucunda, klinik ve çevresel örneklerden izole edilen *A. baumannii* suşlarında biyofilm oluşum kapasitesi ile biyofilm ilişkili genlerin (*abaIR*, *csuA*) varlığı arasında korelasyon olabileceği öne sürülmektedir (13,15).

*Acinetobacter* türlerinde antimikrobiyal direnç sorununa neden olan bir diğer önemli faktör, antibiyotiği inaktive eden bazı enzimlere sahip olmalarıdır. Beta laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısını oluşturan beta laktam halkasındaki amid bağı parçalayarak ilacı etkisiz kılan beta-laktamaz enzimlerine *A. baumannii*'de sıklıkla rastlanabilmektedir. Bu durum mikroorganizmanın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antibiyotik seçeneklerini oldukça kısıtlamaktadır (9,16). Bilinen farklı beta-laktamaz enzim tipleri mevcut olup OXA tipi karbapenemazlar ve AmpC tipi sefalosporinazlar genetik ve moleküler araştırmalarda *A. baumannii* izolatlarında en sık rastlanan beta laktamaz enzimleri olarak dikkat çekmektedir. Bu enzimlerinin varlığının antimikrobiallere direnç sağlamanın yanı sıra mikroorganizmanın farklı virülans faktörlerini de destekleyebildiği düşünülmektedir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) grubu bir beta laktamaz enzimi olan PER-1 enziminin; *A. baumannii*'de hücre adezyonunu etkileyebildiğini, Ambler sınıflandırmasında Grup D içerisinde yer alan OXA karbapenemazların varlığının bakterinin biyofilm oluşum kapasitesi ile ilişkili olabileceğini işaret eden bazı ilginç çalışma sonuçları literatürde yerini almıştır (13).

### Epidemiyoloji ve Enfeksiyonlar

*Acinetobacter*'ler doğada toprakta ve suda yaygın olarak bulunabilen mikroorganizmalar olmakla birlikte kuruluğa dayanıklılık göstermekte, cansız yüzeylerde, farklı ısı ve pH koşullarında uzun süre canlılığını sürdürebilmektedir. Genellikle *A. baumannii* haricindeki türler bazı sağlıklı bireylerde normal mikrobiyota üyesi olarak görülebilmekte, insan vücudunda özellikle deri, koltuk altı ve kasık gibi bölgelerde rastlanabilmektedir (17). Ayrıca, çeşitli et ve süt ürünleriyle sebzeler üzerinden de izole edilmişlerdir (5).

Sağlıklı bireylerde enfeksiyon geliştirme riski düşük kabul edilen *A. baumannii* özellikle hastane

enfeksiyonlarına ve immünsuprese bireylerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olan tehlikeli bir patojen olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda ventilatör ilişkili pnömoni ve kateter ilişkili bakteriyemi başta olmak üzere, idrar yolu enfeksiyonları, yumuşak doku enfeksiyonları, septisemi, menenjit ve biyofilm ilişkili enfeksiyonlar gibi çok sayıda farklı enfeksiyona ve ağır seyreden klinik tablolara neden olabilen bu mikroorganizmalar, enfeksiyonların kontrolünde ve tedavide başarısızlıkların yanı sıra sağlık bakım giderlerinde de ciddi artışa yol açmaktadır (10,18).

Uzun süreli antibiyotik kullanımı, hastanede ve özellikle yoğun bakım ünitesinde yatış süresinin uzaması, katater ve implant benzeri tıbbi araç gereçlerin uzun süre kullanımı, ventilatöre bağlı kalma, kardiyo-pulmoner hastalık, geniş yüzeyle yanıklar, bilinç düzeyinde değişim gösterme ve immün sistem yetersizlikleri gibi faktörler hastane kaynaklı *A. baumannii* enfeksiyonuna zemin hazırlayan önemli risk faktörlerindedir (19). *A. baumannii* hastalara genellikle çevresel yüzeylerden ve sağlık çalışanlarının ellerinden temas yoluyla bulaşabilir. Ancak enfekte ve/veya kolonize hastalardan damlacık (aerosolizasyon) yolu ile bulaş da söz konusudur (5).

#### A. *baumannii* Enfeksiyonlarında Tedavi ve Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

*A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde farklı antibiyotik grupları kullanılabilen ve çoğunlukla geniş spektrumlu antibiyotiklerle enfeksiyonun eradikasyonuna yönelik tedavi stratejileri uygulanmaktadır. Karbapenem grubu antibiyotiklerin tek başlarına veya aminoglikozitlerle kombine halde kullanımları, geniş spektrumlu sefalosporinler ile beta laktamaz inhibitörleri tedavide öne çıkan başlıca antibiyotiklerdir. Ciddi klinik tablolarla seyreden *A. baumannii* enfeksiyonlarında ilk olarak imipenem+amikasin kombinasyonu tercih edilmektedir. Bu bakteri türüne bakterisidal etkili olduğu bilinen sulbaktam ile bir beta laktam antibiyotik kombinasyonu da (örneğin, sulbaktam+sefaperazon)

olumlu sonuç veren iyi bir tedavi seçeneği olarak bildirilmektedir (20).

Klasik tedavilere dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde ise tigesiklin kullanımı tercih edilebilmektedir. Yüksek in vitro etkinliği bilenen polimiksin grubu antibiyotiklerin nefrotoksisite ve nörotoksisite yan etkileri nedeniyle tedavide kullanımları oldukça kısıtlıyken, son yıllarda çoklu ilaç direnci gösteren suşların hızla artması polimiksinlerin klinikte kullanımlarını tekrar gündeme taşımıştır (20).

Pek çok mikroorganizma türünde olduğu gibi *Acinetobacter* türlerinde de tedavide kullanılan antibiyotiklere hızla direnç gelişmekte ve maalesef bu durum tüm dünyada enfeksiyonların kontrolünü zorlaştıran bir sağlık sorunu olarak geçerliliğini korumaktadır. *A. baumannii*'nin farklı antibiyotik gruplarına karşı (beta laktam, florokinolonlar, tetrasiklinler, aminoglikozitler) farklı mekanizmalar aracılığıyla hızla direnç geliştirebildiği gözlenmektedir (21). Tedavide kullanılan en az üç farklı antibiyotik sınıftan birer ilaca direnç görülmesi durumu "Çoklu İlaç Direnci" (ÇİD, multidrug resistance=MDR) olarak tanımlanmaktadır. Bir veya iki ajan dışında tüm antibiyotiklere direnci ifade etmek içinse "Aşırı İlaç Dirençli" (AİD, extremely drug resistant=XDR) terimi kullanılmaktadır (21). Son yıllarda ülkemizde ve tüm dünyada; çoklu ilaç dirençli-ÇİD *A. baumannii* izolatlarının insidansında yaşanan belirgin artış dikkat çekmektedir. Karbapenem dirençli *Acinetobacter*'ler çoğunlukla ÇİD karakterde olmakta, tedavilerinde kolistin veya tigesiklin kullanımı gündeme gelmektedir. Ancak maalesef bu antibiyotiklere dahi dirençli suşlar nadir de olsa rapor edilmeye başlanmıştır (22). İlk tedavi seçeneklerinden birisi olan karbapenemlere karşı *A. baumannii* izolatlarında direncin artışı dünya genelinde farklı merkezlerde yürütülen çok sayıda araştırma sonucuyla da doğrulanmaktadır. 2008-2009 yıllarında bazı Avrupa, Ortadoğu ve Afrika ülkelerini kapsayan COMPACT çalışmasında, ABK izolatlarının %49'u imipenem dirençli bulunmuştur.

Türkiye, Yunanistan, İtalya, İspanya ve İngiltere’de imipenem direnç oranları bu ortalamadan daha yüksekken (%45-85), Fransa, Almanya ve İsveç gibi ülkelerde ise daha düşük (% 4-20) saptanmıştır (22). Kireççi ve arkadaşları; ülkemizde yaptıkları bir araştırma sonucunda 47 ABK izolatının in vitro karbapenem direnç oranlarını imipenem için %80.8, meropenem için %87.3 olarak, Gözütok ve arkadaşları ise *A. baumannii* kökenleri ile yürüttükleri bir başka çalışmada izolatların karbapenem direncini %91 olarak bildirmektedir (19, 23).

Geniş spektrumlu bir antibiyotik olan ve ülkemizde yaklaşık son on yıldır tedavide yer alan tigesikline dirençli *A. baumannii* izolatlarının, düşük oranlarda da olsa (%11-16) varlığı bilinmekte ve bu durum bakterinin direnç geliştirme kabiliyetini bir kez daha gözler önüne sermektedir (23).

Hızla artan direnç oranları tedavide başarı sağlayacak antibiyotik sayısını da hızla azaltırken, kolistin kullanımı günümüzde klinisyenler tarafından tekrar gündeme alınmıştır. Kolistinle, özellikle santral sinir sistemi enfeksiyonları, bakteriyemi, sepsis gibi ağır klinik tablolarda, %57-77 oranında tedavide başarı sağlanabildiği bildirilmektedir (24).

Gerek direnç gelişimin önlenmesi gerekse yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için antibiyotik direnç mekanizmalarının araştırılması ve daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Bilindiği üzere bakterilerdeki antibiyotik direnç mekanizmaları doğal veya kazanılmış nitelikte olabilmektedir. *Acinetobacter* türlerinde rastlanan başlıca direnç mekanizmaları; ilacı inaktive eden enzimlerin üretimi (beta-laktamazlar, aminoglikozit modifiye edici enzimler), antibiyotiğin hedef bölgesinde değişiklik, dış membran proteinlerinde değişim ve dışa atım pompa sistemlerinin aşırı aktivitesi olarak sıralanabilir.

Beta laktam direnci diğer türlere kıyasla *A. baumannii* izolatlarında daha sık görülmektedir (25). Bu bakteri türünde karbapenem direncine genellikle Sınıf D OXA tipi karbapenemazlar aracılık etmekte

olup, Sınıf A ve Sınıf B tipi beta-laktamazlar ile ilişkili bazı genler de (*blaGES-14*, *blaKPC*, *blaIMP*, *blaVIM*, *blaSIM-1*) tanımlanmıştır (26). *A. baumannii* izolatlarında en sık rastlanan sınıf-D oksasilinazlar; OXA-23, OXA-24, OXA-58 ve OXA-143 ilişkili enzimlerdir (22). *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında hızla yayılan OXA tipi olmayan karbapenemazlara, *A. baumannii*’de de sıklıkla rastlanabilmektedir. Karbapenemleri hidrolize etme aktivitesi güçlü metallo-betalaktamazlardan olan VIM-2, ilk olarak 1995’te *P. aeruginosa*’da saptanmasından kısa süre sonra 1998’de VIM-2 ve IMP-1 *Acinetobacter* türlerinde saptanmıştır (27). Son yıllarda adını sıkça duyuran NDM-1 metallo-betalaktamaz taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatları 2011 yılından itibaren rapor edilmeye başlanmıştır (28,29).

*Acinetobacter*’lerde karbapenem direnci genellikle karbapenemaz üretimine bağlı olmakla birlikte, artan eflüks pompa aktivitesi, porin proteinlerinde modifikasyon ve penisilin bağlayan protein (PBP) yapısındaki değişimler gibi diğer faktörlere veya bunların kombinasyonuna bağlı olarak da gelişebilir (22).

Klinikte beta laktam grubu antibiyotiklerle kombine halde sıkça kullanılan ve bir beta laktamaz inhibitörü olan sulbaktamın *A. baumannii* üzerinde etkinliğinin; düşük PBP-2 ekspresyonu ve TEM-1 beta laktamaz varlığında düştüğünü gösteren bazı çalışma sonuçları mevcuttur (30,31). Bakterisidal etkisini Lipit A yapısı üzerinden göstermekte olan kolistin antibiyotiğine karşı direncin ise, Lipit A yapısına fosfoetanolamin ilavesi ve açillenme gibi modifikasyonlarla antibiyotiğin hedef bölgesinde gerçekleşen değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (32,33). Lipit A yapısındaki bu değişimlere daha çok, *pmrAB-2* komponent sistemindeki mutasyonlar neden olmaktadır (34). Bu mutasyonlar kolistin ortamda olmadığında hızla geri dönebilmektedir. Bakterinin protein sentezini inhibe ederek etki gösteren aminoglikozit grubu antibiyotiklere direnç, çoğunlukla asetiltransferazlar,

adenil transferazlar gibi aminoglikozit modifiye edici enzimler aracılığıyla ilacın inaktivasyonu yoluyla sağlanmaktadır. Benzer etki mekanizmasına sahip farklı bir antibiyotik grubu olan tetrasiklinlere direnç gelişiminin ise gram negatif bakterilerde sıklıkla bulunan *tetA*'dan *tetE*'ye kadar tanımlanmış farklı genlerin kodladığı eflüks pompa sistemlerinden kaynaklandığı bilinmektedir. Dirençli *A. baumannii* izolatlarında *tetA* ve *tetB* direnç genlerine sık rastlanmaktadır. Bu direnç genlerinin genellikle eflüks pompası regülasyonunda rol alan *adeB* geniyle bir arada bulunmaları, plazmit veya transpozon ilişkili genler olmaları dikkat çekmektedir (35).

Antibiyotik direncinden sorumlu bir başka mekanizma olan dışa atım pompa (eflüks) sistemleri; gram pozitif ve gram negatif farklı mikroorganizma türlerinde bulunabilen, transport proteinleridir. Antimikrobiyal ajanların etkisini azaltan bu dışa atım sistemleri, tek bir substratı hedefleyebileceği gibi birbirinden farklı maddeleri de substrat olarak kullanabilmektedir. Bu durum mikroorganizmaların antibiyotiklerin yanı sıra dezenfektanlar, boyalar, biyositler, antiseptik ajanlar gibi pek çok farklı kimyasal maddenin etkisinden eflüks pompaları aracılığıyla korunabildiği anlamına gelmektedir (36).

Eflüks pompa sistemlerinin ABC (ATP binding cassette), MFS (Major faciliator), RND (resistance nodulation division) ve SMF (small multidrug resistance) süper ailesi olmak üzere farklı alt tipleri tanımlanmıştır. Gram negatif bakterilerde çoklu ilaç direncinde rol alan dışa atım pompa sistemlerinin genellikle RND süper ailesinden oldukları gözlenmektedir (13,36). ÇİD *A. baumannii* izolatlarında bulunan başlıca eflüks pompaları, RND süper ailesi grubunda yer alan *AdeABC*, *AdeFGH* ve *AdelJK* dışa atım pompa sistemleridir. Bu pompa sistemleri aminoglikozitler, tetrasiklinler, florokinolonlar, beta laktamlar ve eritromisin gibi pek çok farklı gruptan antibiyotiğin dışa atımını sağlayarak antimikrobiyal direnç gelişiminde rol oynamaktadır (37,38). Ayrıca *AdeABC*'nin ekspresyonundaki

artışın, *A. baumannii* kökenlerinde, bakterinin biyofilm oluşturma kapasitesi ve membran bileşimi üzerine etkileri olabileceği düşünülmektedir (13). *AdeFGH* dışa atım pompasının azalmış regülasyonu durumunda *A. baumannii* izolatlarında biyofilm oluşum kapasitesinin azaldığı, bu pompa sistemlerinin bakteride biyofilm oluşumu aşamasında sentezlenen otoindükleyicilerle etkileşim içinde olabileceği öne sürülmektedir (28,39).

### Alternatif Tedavi Yaklaşımları

*A. baumannii* enfeksiyonlarının görülme sıklığının artması, yüksek morbidite ve mortalite oranları, antimikrobiyal direnç profilleri göz önüne alındığında; enfeksiyonların kontrolünde ve tedavisinde kullanılacak antibiyotiğin doğru seçiminin, yeterli doz ve sürede ilaç kullanımının, kültür sonuçları ile antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının ne denli önemli olduğu anlaşılmaktadır. *A. baumannii*'nin direnç kazanma eğiliminin yüksek oluşu ve direncin hızla yayılımına kıyasla yeni antibiyotik keşfinin oldukça sınırlı olması; enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde antibiyotik dışı alternatif yaklaşımlarını daha da değerli kılmaktadır. Direnç sorunu ile mücadele için akılcı antibiyotik kullanım politikalarının yanı sıra kombinasyon terapileri, QS sinyal yolağını bozma, eflüks pompa inhibitörlerinin kullanımı, bakteriyofaj terapisi, doğal kaynaklı antimikrobiyaller, antibiyofilm ajanlar gibi çeşitli alanlarda araştırmalar dünya genelinde artarak sürmektedir.

Retrospektif bazı çalışmalarla çoklu ilaç direnci görülen *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde birden fazla antibiyotik grubuyla yapılan kombine tedavilerin daha başarılı sonuçlar verdiği ve ölüm oranlarında düşüşün sağlanabildiği gözlenmiştir. Ülkemizde yürütülen ve *A. baumannii* enfeksiyonlarında monoterapi sonuçlarının kombinasyon tedavisi ile karşılaştırıldığı bir çalışmada; 36 hastaya kolistin monoterapisi uygulanırken, 214 hastada kolistine ek olarak başka bir antibiyotik ajanla (102 hastada karbapenem, 69 hastada sulbaktam veya ampisilin+sulbaktam

ve 43 hastada diğer antibiyotikler) kombinasyon tedavisi uygulanmıştır. Hasta grupları incelendiğinde, mortalite oranının kombine tedavi alan grupta (%52,3), monoterapi grubuna göre(%72) anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca eradikasyon oranının kombinasyon grubunda (%79) daha yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (40). Kengkl K. ve arkadaşlarının; 2529 hastayı kapsayan toplam 29 makale üzerinden yaptığı meta-analiz çalışmasında, ÇİD ve AİD *A. baumannii* izolatlarına karşı kolistin+sulbaktam kombinasyonunun tedavi açısından, kolistin+tigesiklin ve kolistin monoterapisine göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha üstün olduğu belirtilmiştir (41). Aynı araştırmacılar, tigesiklinin ÇİD ve AİD *A. baumannii* suşlarına bağlı bakteriyemi ile seyreden enfeksiyonlar için uygun olmadığını da rapor etmişlerdir (41).

Proteomik analiz çalışmalarıyla rifampisin dirençli *A. baumannii* kökenlerinde, QS sinyal molekülünün degradasyonunu sağlayan AHL laktonaz varlığında kökenlerin biyofilm oluşumunda azalma olduğu saptanmıştır. Bir başka çalışmada ise QS sistemi üzerinde inhibitör etkili *MomL* enziminin varlığında, *A. baumannii*'nin farklı antibiyotiklere duyarlılık oranlarında artış gözlemlendiği rapor edilmiştir (13, 42).

Bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal kaynaklardan elde edilen doğal ürünlerin mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisi her zaman güncelliğini koruyan araştırma alanlarından. Mikroorganizmaların biyofilm yapısı üzerine bazı bakteriyel sekonder metabolitlerin etkisi araştırılmaktadır (43). İçme suyundan izole edilen bazı bakterilerin ürettiği metabolitlerin, *A. calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia*, *Methylobacterium* sp, *Mycobacterium mucogenicum*, *Sphingomonas capsulata* ve *Staphylococcus* türlerinde biyofilme etkisi incelenmiş ve *A. calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia*, *Methylobacterium* sp, *M. mucogenicum* biyofilmleri üzerine inhibe edici etkileri gözlenmiştir (44). Kateter gibi tıbbi cihazların 'nötral polimerik sülfobetain' veya 'metilselüloz' gibi anti-adezif

materyallerle kaplanmasına, biyofilm oluşumunun ve buna bağlı gelişen enfeksiyonların azaltılmasına, bakteriyel adezyonda kilit rol oynayan fimbriaları hedefleyen molekül tasarımına ilişkin çalışmalar sürdürülmektedir (45).

Günümüzde enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin yetersiz kalışı bakteriyofaj terapisinin kullanımı yeniden gündeme getirmiştir. Bakteriyofajlar kısaca bakteriyi enfekte eden virüsler olarak tanımlanabilir. *A. baumannii* türlerine karşı etkili bazı bakteriyofaj türleri belirlenmiş olup vB<sub>Ab-M-G7</sub> ve Bφ-C62 litik bakteriyofajların, ÇİD *A. baumannii* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (46,47). Bakteriyofaj tarafından kodlanan litik bir enzim olan ve bakteri hücre duvarını parçalayabilen 'Endolysin' enziminin antimikrobiyal ajan olarak potansiyeli olabileceği düşünülmektedir. Bu enzimin gram negatif bakterilerde daha etkili olmasını sağlamak amacıyla, bakterinin dış membranını destabilize eden peptitlerle kombine halde 'Artilyns' adı verilen spesifik yapılar tasarlamak üzere çalışmalar yapılmaktadır. Artilyns yapılarının özellikle ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili bir tedavi seçeneği olabileceği öngörülmektedir (48). Ancak faj terapisinin klinikte yaygın olarak uygulanabilmesi için aydınlatılması gereken farklı sorunlar mevcut olup daha fazla araştırma sonucuna ihtiyaç duyulmaktadır.

Eflüks pompa inhibisyonunun da dirençle mücadelede oldukça etkili bir başka yol olabileceği ve bu sayede mevcut antibiyotiklerden tedavide fayda sağlanmaya devam edilebileceği düşünülmektedir. 1-(1-naftilmetil) piperazin (NMP) ve fenil-arjinin beta-naftilamid (PABN), özellikle gram negatif bakterilerde yaygın olan RND tipi dışa atım pompaları üzerinde inhibitör etkisi gözlenen moleküller olup antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanımlarına ilişkin araştırmalar sürdürülmektedir. Siyanid-3-klorofenilhidrazon (CCCP), kolistin duyarlı ve dirençli suşlarda MİK değerlerinde azalma sağladığı

belirlenmiş olan bir başka eflüks pompa inhibitörüdür (49).

## SONUÇ

Son yıllarda, ESKAPE patojenler (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp.) olarak da anılan ve önemli nozokomiyal patojenler olarak kabul edilen mikroorganizma türlerinin neden olduğu enfeksiyonların görülme sıklığı artarak kalmayıp çoklu antibiyotik direnci nedeniyle bu enfeksiyonlardan korunmada, tedavi ve eradikasyonda ciddi zorluklar yaşanmaktadır (9). 2018 yılında, Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan, artan direnç oranları nedeniyle acilen 'yeni antibiyotik keşfi gerektiren dirençli bakteriler' listesinin ilk sırasında *A. baumannii* yer almaktadır (50). Farklı ülkelerde yürütülen çok sayıda araştırma sonucu; ÇİD *A. baumannii* izolatlarının artışı doğrulamakta ve bu izolatlarda biyofilm üretim kapasitesinin de hızla arttığını gözler önüne sermektedir (13). Bakterinin biyofilm yapısı içerisinde, mikroorganizmaların antibiyotiklere ve dezenfektanlara çok daha dirençli olabildikleri bilinmektedir. Antimikrobiyal direnç; sağlık giderlerinde ciddi artışla birlikte *A. baumannii* enfeksiyonlarına bağlı morbidite ve mortalite oranlarının da hızla yükselmesine neden olan, endişe verici boyutlarda global bir tehdit halini almıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde *Acinetobacter* enfeksiyonlarının yıllık sayısının yaklaşık 45000, Dünya'da ise yaklaşık bir milyon vaka olduğu tahmin edilmektedir. Asya ve bazı Latin Amerika ülkelerinde,

*A. baumannii*, nozokomiyal pnömoni ve bakteriyemiye neden olan ilk üç etkeninden birisidir (5).

*A. baumannii* gibi hastane enfeksiyonu etkenlerinin yayılımını kontrol altına almak için, enfeksiyon kontrol önlemleri ile akılcı antibiyotik kullanım politikaları eş zamanlı uygulanmalıdır. Hastane personelinin, başta hijyenik el yıkama olmak üzere enfeksiyon kontrolü konusunda eğitimi, dezenfektanların rotasyonlu kullanımı, enfekte hastaların mümkün olduğunca izole edilmesi ve gerektiğinde kısa süreli servis kapatma yoluna gidilmesi gibi önlemler kritik önem taşımaktadır. Antibiyotik kullanımında sadece kısıtlamaya gitmekten ibaret olmayan akılcı antibiyotik kullanımında, antibiyogram sonuçlarının doğru yorumlanması, enfeksiyon hastalıkları uzmanı konsültasyonu kuralı, antibiyotiklerin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri gibi daha geniş bir çerçeveden bakılmalıdır. Tüm bu önlemlerin klinik verilere yansımaları için belirli bir süre gerektiği akılda tutularak özenle uygulanmaya devam edilmesi gerekmektedir.

Antimikrobiyal direnç sorunu nedeniyle enfeksiyonlar karşısında çaresiz kalmamak adına *A. baumannii*'nin virülans faktörleri ve antibiyotik direnç mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik çalışmalar hız kesmeden sürdürülmelidir. Moleküler yöntemler başta olmak üzere farklı yöntemlerle virülans faktörlerinin inhibisyonuna yönelik araştırmaların, antibiyotik tedavisine alternatif olabilecek yeni uygulamaların, eflüks pompa inhibitörleri ve antibiyofilm ajanların geliştirilmesi için yapılacak araştırmaların dünya genelinde enfeksiyonların kontrolü ve toplum sağlığı açısından çok değerli olduğu unutulmamalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 2012;3(3):243-50. doi:10.4161/viru.19700.
2. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 2008;21(3):538-82. doi:10.1128/CMR.00058-07.
3. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*, 1991;29(2):277-82. doi:10.1128/jcm.44.3.827-832.2006.
4. Doi Y, Murray GL, Peleg AY, Hospital A. HHS Public Access. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016;36(1):85-98. doi:10.1055/s-0034-1398388.
5. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev*, 2017;30(1):409-47. doi:http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00058-16.
6. Erac B, Yilmaz FF, Hosgor LM, Ozturk I, Aydemir S. Investigation of the virulence factors of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Mikrobiyol Bul*, 2014;48(1):70-8.
7. Erdem B. Mikrobiyal sideroforlar ve biyoteknolojideki uygulama alanları. *Karadeniz Fen Bilim Derg*. 2013;3(8):77-88.
8. Kraemer SM. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci*, 2004;66(1):3-18. doi:10.1007/s00027-003-0690-5.
9. Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017;7(March). doi:10.1007/BF00449040.
10. Asık G. *Acinetobacter baumannii* Virülansının Açıklanmasında Güncel Yaklaşımlar *Acinetobacter baumannii*. *Mikrobiyol Bul*, 2011;45(2):371-80.
11. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms*. 2017;5(2):15. doi:10.3390/microorganisms5020015
12. Temel A, Erac B. Bacterial Biofilms: Detection Methods And Role In Antibiotic Resistance. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2018;48(1):1-13 doi:10.5222/TMCD.2018.001.
13. Eze EC, Chenia HY, Zowalaty ME El. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infect Drug Resist*, 2018;(11):2277-99. doi:10.2147/IDR.S169894.
14. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol*, 2008;190(3):1036-44. doi:10.1128/JB.01416-07.
15. Bardbari AM, Arabestani MR, Karami M, Keramat F, Alikhani MY, Bagheri KP. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. *Microb Pathog*, 2017;108:122-8. doi:10.1016/j.micpath.2017.04.039.
16. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 2010;300(6):371-9. doi:10.1016/j.ijmm.2010.04.005.
17. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol*, 1998;36(7):1938-41.
18. J. Towner K. The Genus *Acinetobacter*. In: *Prokaryotes*. Vol 4. ; 2006:746-58. doi:10.1007/0-387-30746-X\_25.
19. Kireççi E, Kireççi M, Aksu M. Investigation of the Antibiotic Susceptibility of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Clinical Samples. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2014;44(2):65-69. doi:10.5222/TMCD.2014.065.



20. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 2010;35(3):219-26. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.10.024.
21. Ece G, Erac B, Cetin HY, Ece C, Baysak A. antimicrobial susceptibility and clonal relation between *Acinetobacter baumannii* strains at a tertiary care center in Turkey. *Jundishapur J Microbiol*, 2015; 8(2): e15612.
22. Clark NM, Zhanel GG, Lynch JP. Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter* species: A global threat. *Curr Opin Crit Care*, 2016;22(5):491-9. doi:10.1097/MCC.0000000000000337.
23. Gozutok F, Mutlu Sariguzel F, Celik I, Berk E, Aydin B, Guzel D. Investigation of Antimicrobial Resistance Rates of *Acinetobacter baumannii* Strains from Nosocomial Infections. *Ankem Derg*, 2013;27(1):7-12. doi:10.5222/ankem.2013.007.
24. Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol Sci*, 2018;25(3):586-96. doi:10.1016/j.sjbs.2016.02.009.
25. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Int J Antimicrob Agents*, 2008;32(2):106-19. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.02.013.
26. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat*, 2012;15(4):237-47. doi:10.1016/j.drup.2012.06.001.
27. Ocak M, Ozer B, Inci M, Duran N. Antibiotic Resistance and Investigation of IMP-1, IMP-2, VIM-1 and VIM-2 Metallo-β-Lactamases in *Acinetobacter* Strains Isolated From Clinical Samples. *Klimik Dergisi*, 2015;28(1):23-7. doi:10.5152/kd.2015.05.
28. Chen H, Cao J, Zhou C, Liu H, Zhang X, Zhou T. Biofilm Formation Restrained by Subinhibitory Concentrations of Tigecyclin in *Acinetobacter baumannii* Is Associated with Downregulation of Efflux Pumps. *Chemotherapy*, 2017;62(2):128-33. doi:10.1159/000450537.
29. Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, Emirian A, Bonnin RA, Anais L, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull*, 2013;18(31).
30. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 2003;51(3):565-74.
31. Krizova L, Poirel L, Nordmann P, Nemeč A. TEM-1 beta-lactamase as a source of resistance to sulbactam in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 2013;68(12):2786-91. doi:10.1093/jac/dkt275.
32. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011;55(7):3370-9. doi:10.1128/AAC.00079-11.
33. Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins J V, Trent MS, Hancock REW. The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011;55(8):3743-51. doi:10.1128/AAC.00256-11.
34. Geisinger E, Isberg RR. Interplay between antibiotic resistance and virulence during Disease promoted by multidrug-resistant bacteria. *J Infect Dis*, 2017;215(Suppl 1):S9-S17. doi:10.1093/infdis/jiw402.
35. Ciftci IH, Asik G. Antibiotic Resistance Mechanisms of *Acinetobacter baumannii*. *ANKEM Derg*, 2011;25(3):196-207. doi:10.5222/ankem.2011.196.
36. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 2007;59(6):1210-5. doi:10.1093/jac/dkl509.

37. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011;55(3):947-3. doi:10.1128/AAC.01388-10.
38. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* - The role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol*, 2008;46(3):257-7. doi:10.2478/v10042-008-0056-x.
39. He X, Lu F, Yuan F, Jiang D, Zhao P, Zhu J et al. Biofilm formation caused by clinical *Acinetobacter baumannii* isolates is associated with overexpression of the AdeFGH efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015;59(8):4817-25. doi:10.1128/AAC.00877-15.
40. Batirel A, Balkan II, Karabay O, Agalar C, Akalin S, Alici O, et al. Comparison of colistin-carbapenem, colistin-sulbactam, and colistin plus other antibacterial agents for the treatment of extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014;33(8):1311-22. doi:10.1007/s10096-014-2070-6.
41. Kengkla K, Kongpakwattana K, Saokaew S, Apisantharak A, Chaiyakunapruk N. Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* infections: A systematic review and network meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, 2018;73(1):22-32. doi:10.1093/jac/dkx368.
42. Zhang Y, Brackman G, Coenye T. Pitfalls associated with evaluating enzymatic quorum quenching activity: the case of MomL and its effect on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* biofilms. *PeerJ*, 2017;5:e3251. doi:10.7717/peerj.3251.
43. Seo H, Kim J, Jung J, Jin HM, Jeon CO, Park W. Complexity of cell-cell interactions between *Pseudomonas* sp. AS1 and *Acinetobacter oleivorans* DR1: Metabolic commensalism, biofilm formation and quorum quenching. *Res Microbiol*, 2012;163(3):173-81. doi:10.1016/j.resmic.2011.12.003.
44. Bai X, Wu F, Zhou B, Zhi X. Biofilm bacterial communities and abundance in a full-scale drinking water distribution system in Shanghai. *J Water Health*, 2010;8(3):593-600. doi:10.2166/wh.2010.048.
45. Hauser AR, Meccas J, Moir DT. Beyond antibiotics: New therapeutic approaches for bacterial infections. *Clin Infect Dis*, 2016;63(1):89-95. doi:10.1093/cid/ciw200.
46. Kusradze I, Karumidze N, Rigvava S, Dvalidze T, Katsitadze M, Amiranashvili I, et al. Characterization and Testing the Efficiency of *Acinetobacter baumannii* Phage vB-GEC\_AbM-G7 as an Antibacterial Agent. *Front Microbiol*, 2016;7:1590. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01590>.
47. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim MA, Lee CR et al. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *Int J Mol Sci*, 2015;16(5):9654-92. doi:10.3390/ijms16059654.
48. Rodríguez-Rubio L, Chang WL, Gutiérrez D, Lavigne R, Martínez B, Rodríguez A et al. 'Artilylation' of endolysin  $\lambda$ Sa2lys strongly improves its enzymatic and antibacterial activity against streptococci. *Sci Rep*, 2016;6(June):1-11. doi:10.1038/srep35382.
49. Park YK, Ko KS. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistin. *J Microbiol*, 2015;53(1):53-9. doi:10.1007/s12275-015-4498-5.
50. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Available at: [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb\\_ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb_ET_NM_WHO.pdf). Accessed October 10, 2018.

## 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

