



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

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

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

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 81 ■ Sayı/Number 4 ■ Yıl/Year 2024

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü adına

On behalf of General Directorate of Public Health

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

EDİTÖR

EDITOR IN CHIEF

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

EDİTÖR YARDIMCILARI

DEPUTY EDITORS

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

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

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

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

YAYIN KURULU

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

İSTATİSTİK EDİTÖRLERİ

STATISTICAL EDITORS

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

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

İNGİLİZCE DİL EDİTÖRÜ

ENGLISH LANGUAGE EDITOR

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

TEKNİK KURUL

TECHNICAL BOARD

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

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

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

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

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

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

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

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

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

Aralık - 2024 / December - 2024

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç

Anna PAPA, Yunanistan

Aziz SANCAR, ABD

Cristina DOMINGO, Almanya

Daniel MOTLHANKA, Botsvana

Dwight D. BOWMAN, ABD

Isme HUMOLLI, Kosova

Isuf DEDUSHAJ, Kosova

Iva CHRISTOVA, Bulgaristan

Johan LINDH, İsveç

Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail

Manfred WEIDMANN, İngiltere

Paul HEYMAN, Belçika

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba

Sıraç DİLBER, İsveç

Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya

Takashi AKAMATSU, Japonya

Varalakshmi ELANGO, Hindistan

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Alanya

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Ankara

Banu ÇAKIR, Ankara

Banu SANCAK, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Afyonkarahisar

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Can Hüseyin HEKİMOĞLU, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Cemile SÖNMEZ, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Ebubekir CEYLAN, Ankara

Emrah RUH, Kıbrıs

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fehminaz TEMEL, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnaz ÇULHA, Hatay

Gülnur TARHAN, Adıyaman

Hakan ABACIOĞLU, İzmir

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

I) AMAÇ VE KAPSAM

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

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

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

II) YAYIN İLKELERİ

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

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

Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.

III) TELİF VE LİSANS

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

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

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

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

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

IV) AÇIK ERİŞİM POLİTİKASI

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

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

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

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

V) ÜCRET POLİTİKASI

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

VI) ETİK KURALLAR

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

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

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

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

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

VII) YAZI DİLİ

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

VIII) YAZIM KURALLARI

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

Başvurular www.turkhijyen.org adresinden "**Çevrimiçi Makale Gönder, Takip Et, Değerlendir**" programı aracılığıyla on line olarak yapılmaktadır.

Yayımlanmak üzere gönderilecek yazılar;

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

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

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

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

a. Yazının başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.

b. Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.

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

şirkette bir ilişki yoksa, başvuru yazısında belirtilmelidir.

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

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

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

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

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

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

8. Araştırma yazıları;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- **Tez:** Bilhan Ö. Labirent savakların hidrolik karakteristiklerinin deneysel olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005. GenBank/DNA dizi analizi: Gen kalıtım numaraları ve DNA dizileri makale içinde kaynak olarak gösterilmelidir. Konuyla ilgili ayrıntılı bilgi için “National Library of Medicine” adresinde “National Center for Biotechnical Information (NCBI)” bölümüne bakınız.

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

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

10. **Derleme türü yazılarda** tercihen yazar sayısı ikiden fazla olmamalıdır. Yazar(lar) daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olması; bu deneyimlerini derleme yazısında tartışmalı ve kaynak olarak göstermelidir. Derlemelerde Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet (en az 250, en fazla 400 sözcük içermelidir) ve anahtar sözcükler bulunmalıdır. Derleme türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 60 olmalıdır.

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

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

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

14. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

15. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

I) AIM and SCOPE

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

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

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

II) PUBLISHING POLICY

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

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

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

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

III) COPYRIGHT and LICENSING

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

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

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

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

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

IV) OPEN ACCESS POLICY

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

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

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

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

V) PRICE POLICY

Article submission, evaluation and publication are free.

VI) ETHICAL RULES

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

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

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

In case animal studies, approval also is needed; it should be stated clearly that the subjects will be prevented as much as possible from pain, suffering and inconvenience. In animal experiments, the study should be conducted in accordance with the ethical regulations specified in the "Guide to the Care and Use of Laboratory Animals" (www.nap.edu/catalog/5140.html) and the authors should declare that the ethics committee approval was obtained and the date and number of the ethics committee in the "Materials and Methods" section. Experimental and clinical drug studies performed in accordance with the Republic of Turkey Ministry of Health regulations and ethics committee approval must be stated in the article.

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

VII) LANGUAGE of the JOURNAL

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

VIII) WRITING RULES

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

Applications are made online at www.turkhijyen.org via the "Online Manuscript Submit, Track, Evaluate Program".

Articles to be submitted for publication;

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

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

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

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

- a. The title should be short and written in lower case.
- b. The short title should not exceed 40 characters.
- c. The study supported by a fund or scientific organisation must be mentioned in a footnote or in the acknowledgements.

d. The study presented in a conference/symposium must be mentioned with the type of presentation in footnotes or in the acknowledgements.

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

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

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

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

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

8. Research Articles;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ETİK İLKELER VE YAYIN POLİTİKASI

ETİK İLKELER

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

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI POLİTİKASI

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

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

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

YAYIN POLİTİKASI ve HAKEM DEĞERLENDİRME SÜRECİ

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

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

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

ETHICAL PRINCIPLES AND PUBLICATION POLICY

ETHICAL PRINCIPLES

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

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

CONFLICT OF INTEREST POLICY

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

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

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

PUBLICATION POLICY and PEER REVIEW PROCESS

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

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 80

Fax : +90 312 565 55 91

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

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız.

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

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

Furthermore, please check.

- "Ethics Committee Approval" is given.
- Support to a study by a fund or organization is mentioned.
- Congress / Symposium presentations and the type of presentation are stated.
- Acknowledgement is given, if there is.

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

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

INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL

Scopus

ResearchGate

CAS[®]

A division of the American Chemical Society

Google
scholar beta

Academic Journals Database
disseminating
quality controlled scientific knowledge

EBSCO
HOST Electronic
Journals
Service

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

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

TÜRK
HİJYEN
DİZİNİ

TÜRK MEDLINE

TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

GENAMICS[™]
...research from your desktop

medoanet
Mediterranean Open Access Network

Open
J-Gate

İLETİŞİM

CORRESPONDENCE

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

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

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

Tel: 0312 565 55 80

Faks: 0312 565 55 91

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

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

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. COVID-19'un etkilerinin seçilmiş sağlık göstergeleri üzerinden incelenmesi ve ONGBM (1,1) ile gelecek tahmini
Examining the effects of COVID-19 on selected health indicators and future Forecasting with ONGBM (1,1)
Tezcan ŞAHİN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.80000 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 351 - 368


2. İneklerde subklinik mastitisin aerobik bakteriyolojisinin değerlendirilmesi
Evaluation of aerobic bacteriology of subclinical mastitis in cows
Berrak DELİKANLI KIYAK, Elçin GÜNAYDIN, Gülşen GONCAGÜL
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.90094 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 369 - 378


3. Çiftlik hayvanlarından izole edilen *Acinetobacter* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları
Antibiotic susceptibility of *Acinetobacter* spp. isolated from farm animals
Elçin GÜNAYDIN, Gülşen GONCAGÜL, Pınar MURSALOĞLU KAYNAR, Özlem KARDOĞAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.86300 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 379 - 386


4. Investigation of organic acid levels as a prognostic indicator in Covid-19 positive patients
Covid-19 pozitif hastalarda prognostik bir göstergesi olarak organik asit düzeylerinin araştırılması
Ceylan BAL, Ayşe KAYA KALEM, Sevilay SEZER, Bircan KAYAASLAN, Fatma ESER, İmran HASANOĞLU, Adalet AYPAK, Rahmet GÜNER, Özcan EREL, Gülsen YILMAZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.88258 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 387 - 398


5. The role of recombinant basic fibroblast growth factor in de-differentiation of chondrocyte to mesenchymal stem cell-specific immunophenotype
Kondrositlerin mezenkimal kök hücreye spesifik immünofenotipe geri farklılaşmasında rekombinant bazik fibroblast büyüme faktörünün rolü
Hasan SALKIN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.08624 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 399 - 408


6. Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde takip edilen HIV ile enfekte erişkin bireylerde toksoplazma seropozitifliğinin araştırılması, 2024
Investigation of toxoplasma seropositivity in adult individuals infected with HIV followed at Marmara University Pendik Training and Research Hospital, 2024
Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, Uluhan SİLİ, Elif TÜKENMEZ TİGEN, Buket ERTÜRK ŞENGEL, Barış CAN, Tekin TUNÇEL, Fatma Burcu DOĞANÇ, Eda Buse MEŞECİ, Arzu İLKİ, Volkan KORTEN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.40501 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 409 - 418


7. Effect of copper sulphate in rat brain tissue: Kir channels
Sıçan beyin dokusunda bakır sülfat etkisi: Kir kanalları
Selda KAHVECİ, Osman ÖZTÜRK, Sümeyye UÇAR, Aslı OKAN OFLAMAZ, Derya GÖKMEN, Seher YILMAZ, Züleyha DOĞANYİĞİT
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.33678 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 419 - 430


8. Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde takip edilen HIV ile yaşayan erişkin bireylerde sifilis seropozitifliğinin araştırılması, 2024
Investigation of syphilis seropositivity in adult individuals living with HIV followed at Marmara University Pendik Training and Research Hospital, 2024
Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, Uluhan SİLİ, Elif TÜKENMEZ TİGEN, Buket ERTÜRK ŞENGEL, Barış CAN, Tekin TUNÇEL, Fatma Burcu DOĞANÇ, Benan ATAK BOLATASLAN, Eda Buse MEŞECİ, Arzu İLKİ, Volkan KORTEN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.04207 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 431 - 438


9. Should we prefer imipenem relebactam and ceftazidime-avibactam in infections with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*?
Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarında imipenem relebactam ve seftazidime avibactamı tercih edelim mi?
Umut Safiye ŞAY COŞKUN, Yelda DAĞCIOĞLU, Baki TAŞTAN, Ayşenur GÜNEŞ, Büşra BAYAR ÇOŞKUN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.33269 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 439 - 448


10. The effect of medication and lifestyle factors on global burden of disease and mortality in chronic diseases in OECD countries: the case of type 2 diabetes mellitus
OECD ülkelerinde kronik hastalıklarda ilaç kullanımı ve yaşam tarzı faktörlerinin küresel hastalık yüküne ve ölümlere etkisi: tip 2 diyabet örneği
Yasin ARAS
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.59751 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 449 - 462


■ Olgu Sunumu / Case Report

11. Polikistik over sendromlu hastanın diyet tedavisi: Bir olgu sunumu
Diet therapy in a patient with polycystic ovary syndrome: A case report
Seniha ÇUKUROVALI SOYKURT
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.66909 (Dil: "Türkçe" - Language: "Turkish")

463 - 466



■ Derleme / Review

12. Aşının önemi ve aşı tereddütü sorunu
Importance of vaccine and vaccine hesitancy problem
Asuman TEZEL KAHRAMAN, Şeyma Aliye KARA
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.64624 (Dil: "Türkçe" - Language: "Turkish")
13. Gizemli bakteri lejyonella: Büyük silah cephanesine sahip bir ordu mu?
Mysterious bacteria legionella: An army with a big arms armory?
Gönül ASLAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2024.04864 (Dil: "Türkçe" - Language: "Turkish")

467 - 476



477 - 492



COVID-19'un etkilerinin seçilmiş sağlık göstergeleri üzerinden incelenmesi ve ONGBM (1,1) ile gelecek tahmini

Examining the effects of COVID-19 on selected health indicators and future forecasting with ONGBM (1,1)

Tezcan ŞAHİN¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19), eğitimden sağlığa, ulaşımdan ekonomiye birçok alanda olumsuz etkiler yaratan bir salgın ile dünyanın yüzleşmesine neden olmuştur. Dünya genelinde bu süreçte insan sağlığının daha az etkilenmesi ve bu hastalığın sonlandırılabilmesi için çeşitli önlemler alınmaya çalışılmış ve farklı politikalar yürütülmüştür. Bu çalışmanın amacı, Türkiye için seçilmiş sağlık göstergeleri üzerinden COVID-19'un etkilerini değerlendirmek ve farklı senaryolar aracılığı ile gelecek tahminlemesi yapmaktır.

Yöntem: Çalışma kapsamında Türkiye'ye ait kişi başına düşen kamu ve özel sağlık harcamaları, kaba ölüm hızı, kaba doğum hızı ve doğumda beklenen yaşam süreleri değerlendirmeye alınmıştır. Bu göstergeler 2009-2021 yıllarını kapsamaktadır. İki senaryo üretilmiştir. 1. Senaryoda "Pandemi olmasaydı 2030'a kadar seçilmiş sağlık göstergelerinde nasıl bir değişim izlenirdi" sorgulaması yapılmaktadır. Bunun için 2009-2019

ABSTRACT

Objective: The coronavirus disease 2019 (COVID-19) has caused the world to face a pandemic that has negative effects in many areas from education to health, transportation to economy. In this process throughout the world, various measures have been tried to be taken and different policies have been implemented to lessen the impact on human health and to end this disease. The aim of this study is to evaluate the effects of COVID-19 through selected health status indicators for Türkiye and to make future predictions through different scenarios.

Methods: Within the scope of the study, Türkiye's public and private health expenditures per capita, crude death rate, crude birth rate and life expectancy at birth were evaluated. These indicators cover the years 2009-2021. Two scenarios were produced. Scenario 1 poses the question: "What changes would be observed in selected health indicators by 2030 if there were no pandemic?". For this purpose, future

¹Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sağlık Yönetimi Bölümü, Muğla, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Tezcan ŞAHİN

Muğla Sıtkı Koçman Üni., Sağ. Bil. Fakültesi, Sağlık Yön. Bölümü, Menteşe / Muğla - Türkiye

E-posta / E-mail : tezcankasmer@mu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 20.12.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 07.05.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.80000

Şahin T. COVID-19'un etkilerinin seçilmiş sağlık göstergeleri üzerinden incelenmesi ve ONGBM(1,1) ile gelecek tahmini. Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(4): 351 - 368

verileri kullanılarak 2030'a kadar gelecek tahminlemesi yapılmıştır. 2. Senaryoda ise "Pandemi yaşandığı için 2030'a kadar seçilmiş sağlık göstergeleri nasıl bir seyir izleyecektir" değerlendirmesi yapılmaktadır. Bu kapsamda 2009-2021 verileri kullanılarak 2030'a kadar tahminleme yapılmıştır. Araştırmada tahminleme için ONGBM (1,1) modeli kullanılmış ve MAPE (mean absolute percentage error- ortalama mutlak yüzdesel hata) değerlerinin %10'dan küçük olduğu tespit edilmiştir.

Bulgular: Senaryo 2'ye göre 2030'a kadar kamu sağlık harcamalarında Senaryo 1'e göre daha yüksek düzeyde, özel sağlık harcamalarında ise daha düşük düzeyde artış olması beklenmektedir. Senaryo 1'de 2030'a kadar kaba ölüm oranında azalış beklenirken Senaryo 2'de artış yönünde bir beklenti ortaya çıkmıştır. Kaba doğum oranındaki düşüş beklentisi Senaryo 2'de daha fazladır. Doğumda beklenen yaşam süresi açısından Senaryo 1'de artış, Senaryo 2'ye göre ise azalış beklenmektedir. Senaryo 1 ve 2'nin 2022'den 2030'a tahmin sonuçları kıyaslandığında iki senaryo arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla COVID-19'un sağlık göstergeleri üzerinde kısımla etkisi yarattığı sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç: Elde edilen bulgular, karar verici ve yöneticilerin COVID-19'un etkileri nedeni ile geleceğe ilişkin kararları yeniden gözden geçirmeleri ve planlama yaparken farklı senaryolar oluşturarak alternatif çözüm önerileri geliştirmeleri gerektiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, sağlık durumu göstergeleri, tahmin, Türkiye

forecasts were made until 2030 using 2009-2021 data. In the second scenario, an assessment is made: "How will the selected health indicators develop by 2030 after the pandemic has occurred?". In this context, forecasts were made until 2030 using 2009-2021 data. The study used the ONGBM (1,1) model for estimation and found that the MAPE (mean absolute percentage error) values were less than 10%.

Results: According to Scenario 2, it is expected that there will be a higher increase in public health expenditures and a lower increase in private health expenditures until 2030 compared to Scenario 1. While a decrease in the crude death rate was expected until 2030 in Scenario 1, an expectation for an increase in Scenario 2 emerged. The expectation of a decrease in the crude birth rate is greater in Scenario 2. In terms of life expectancy at birth, it is expected to increase in Scenario 1 and decrease according to Scenario 2. When the forecast results of Scenarios 1 and 2 from 2022 to 2030 were compared, it was determined that there were statistically significant differences between the two scenarios. Therefore, it was concluded that COVID-19 had a breaking effect on health indicators.

Conclusion: The findings revealed that decision makers and managers should reconsider future decisions because of COVID-19 and develop alternative solutions by creating different scenarios while planning.

Key Words: COVID-19, health status indicators, forecasting, Türkiye

GİRİŞ

Yeni Coronavirüs türü SARS-CoV-2'nin neden olduğu COVID-19, dünyada bir pandemi yaratmıştır. 30 Ocak 2020'de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), COVID-19 salgınının uluslararası önemi haiz bir halk sağlığı acil durumu olduğunu ilan etmiştir (1).

COVID-19 pandemisinin dünyadaki tüm toplumlar ve ülkelerin sağlık sistemleri üzerinde büyük sonuçları olmuştur. DSÖ tarafından Aralık 2023 tarihinde dünya çapında toplam yaklaşık 7 milyon ölümün nedeninin COVID-19 olduğu ve 12-19 Aralık 2023 aralığında toplam 3.952 yeni vaka olduğu rapor edilmiştir (2). Başka bir değerlendirme, 2021 yılı sonuna kadar

dünya çapında yaklaşık 18 milyon insanın pandemi nedeniyle ölmüş olabileceğini göstermektedir (3). İlk vakanın kaydedilmesinden 19 Aralık 2023'e kadar dünyada toplam vaka sayısı ise 772.838.745 olarak bildirilmiştir (2). Bu hali ile COVID-19 şu anda İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra yüzyılın en ağır zorluklarından ve en büyük trajedilerinden biri olarak kabul edilmektedir (4).

Tüm dünyada milyonları hasta eden COVID-19 salgını, politika yapıcılarını birçok standart politikayı yeniden değerlendirmeye zorlamıştır. COVID-19 pandemisi sağlığın, insan yaşamının merkezinde yer aldığını, her durum ve koşulda bu olgunun önceliğinin olduğunu çarpıcı biçimde hatırlatmıştır. Bu süreçte ülkelerin sağlık sistemlerinin hazırlıksızlığı ve personel yetersizliği ön plana çıkan bir sorun olmakla birlikte yetersiz yatırımla karşı karşıya kalınmıştır. Pandeminin yayılma hızı, ulusal sağlık sistemleri için hazırlık süresinin sınırlı olması ve ulusal sağlık sistemlerindeki normal kapasitenin çok üzerinde olan hastalıkla ilişkili yüksek bakım gerektiren hastaneye yatış ihtiyacı, büyük ve yeni bir sağlık sorununu ortaya çıkarmıştır (5).

Krizlere karşı dayanıklı sağlık sistemleri geliştirebilmek için yaşanan olayların etkilerinin analiz edilmesi ve gelecek planlamalarının bu doğrultuda gerçekleştirilmesi önemlidir. Bir sonraki krizin nasıl bir şekil alacağı bilinmese de veriler, krizle başa çıkmak için hayati önem taşır. Verilerin ve bunları eyleme geçirilebilir bilgilere dönüştürecek araçların daha iyi kullanılması, yeni tehditlerin gözetimi ve daha iyi bir sağlık resminin sağlanması açısından kritik öneme sahiptir (3). Bu nedenlerle çalışmada sağlık hizmetlerinde girdi niteliği taşıyan sağlık harcamaları ile sağlık çıktısı niteliği taşıyan kaba ölüm oranı, kaba doğum oranı ve doğumda beklenen yaşam süresinin COVID-19'dan nasıl etkilendiğini tespit etmek için nicel bir desen geliştirilmiştir.

KAVRAMSAL ÇERÇEVE

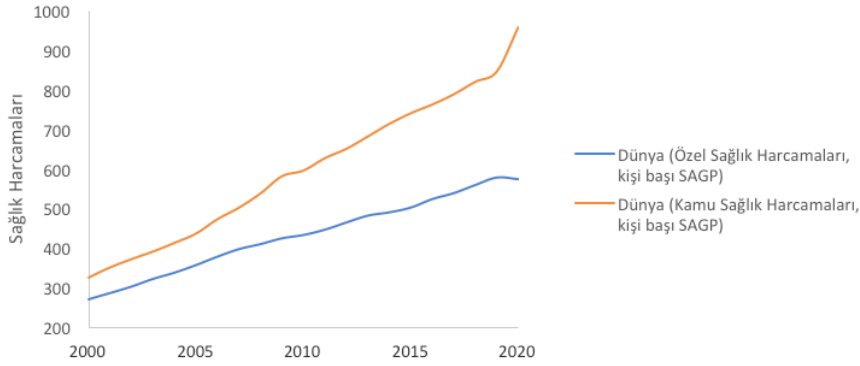
COVID-19 döneminde ülkelerin sağlık harcamalarında yükselişler olmasına rağmen pandemi

sürecinin uzaması ve morbidite ile mortalitenin artması gibi sorunlar sağlık harcamaları üzerine tartışmaların gündeme gelmesine yol açmıştır (6). Sağlık hizmetlerindeki belirsizliğin ve riskin yaygınlığı, sigortanın önemli rolü, bilgi engelleri sorunu, rekabet kısıtlamaları ve hükümet sübvansiyonlarının ve kamu hizmetlerinin rolü gibi özelliklerden dolayı hem özel sektör hem de kamu sektörü bu pazarda önemli roller oynamaktadır. Ancak özellikle hükümetin rolünün tüm dünyadaki sağlık hizmetleri pazarlarındaki payının arttığı gözlemlenmiştir (7). Gelişmiş ülke veya bölgelerdeki uygulamalar, hükümetin sağlık harcamalarının yalnızca vatandaşların sağlık refahından yararlanmasına yardımcı olmakla kalmayıp aynı zamanda onların sağlık harcamalarını azalttığını, fiziksel ve zihinsel sağlıklarını iyileştirdiğini göstermiştir (8). Nitekim Kapitsinis (2020) sağlık yatırımlarının, COVID-19'un ölüm oranını azaltmada hayati bir rol oynadığını belirtmektedir (9). Şekil 1'deki Dünya Bankası istatistikleri incelendiğinde dünyada kişi başına yurt içi genel devlet sağlık harcaması ortalamasının 2015 yılında 738.91\$, 2019'da 844.5\$ (Satin alma gücü paritesi-SAGP) olduğu, COVID-19 etkilerinin yaygın biçimde hissedildiği 2020 yılında ise bir önceki yıla oranla %13'lük ciddi bir artış ile 956.07\$'a ulaştığı görülmektedir (10).

Sağlık harcamaları kapsamında ülkelerin uyguladıkları sağlık sistemlerine bağlı olarak özel sağlık harcamaları da COVID-19 döneminde araştırılan bir konu olmuştur. Çünkü katastrofik sağlık harcamalarının ortaya çıkmasına neden olan özel sağlık harcamalarının, pandemi döneminde değişime uğrama olasılığı yüksektir. Nitekim COVID-19'un ağırlığı cepten harcamalar ile katastrofik harcamaları arttırmıştır (11). Özellikle COVID-19 bakımının sübvansiyon edilmediği ülkelerde, COVID-19 testi ve bakımının maliyetleri önceden var olan cepten harcamalara eklenmiş olabilir. Aynı zamanda hastaların, kamu hastanelerinde COVID-19'a maruz kalmaktan kaçınmak için özel sektörü kullanması, özel sağlık harcamalarının yükünü arttırmıştır (12). Bu değerlendirmelere alternatif olarak ise hastaların,

COVID-19 korkusu veya rutin erişimi engelleyen karantina önlemleri nedeniyle tedaviyi ve prosedürleri ertelemesi, cepten yapılan harcamaların azalmasına neden olmuştur (13). Şekil 1'deki Dünya Bankası istatistikleri incelendiğinde dünyada kişi başına yurt içi özel sağlık harcaması ortalamasının 2015 yılında 500,97 \$, 2019'da 576,76\$ (SAGP) olduğu, COVID-19 etkilerinin yaygın biçimde hissedildiği 2020 yılında ise

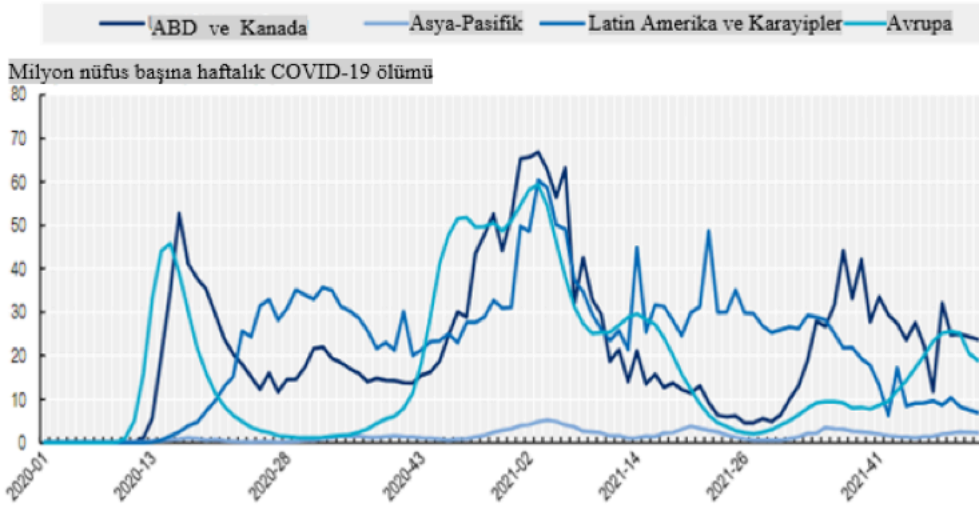
572,69\$'a düştüğü görülmektedir (14). Bu bakımdan pandemi etkisinin incelenmesinde "sağlık ürünleri ile hizmetlerinin belirli bir zaman dilimi içerisindeki nihai tüketiminin nüfusa dayalı biçimde ölçülmesi" (15) şeklinde tanımlanan kişi başına düşen sağlık harcamalarının hem kamu hem de özel harcamalar şeklinde değerlendirmesinin yapılması önem arz etmektedir.



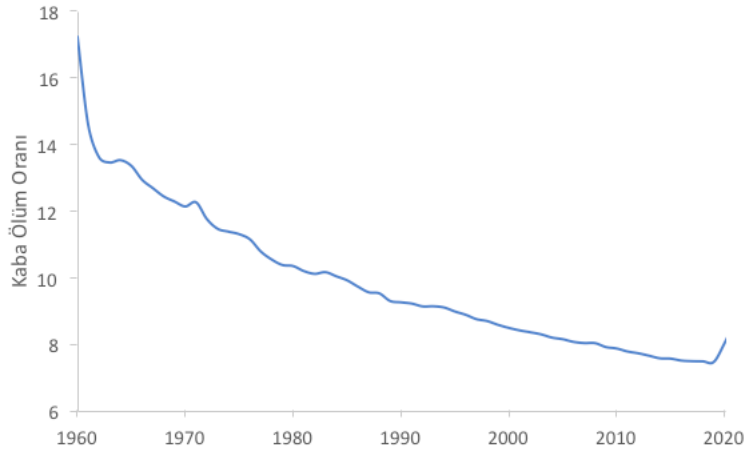
Şekil 1. Kişi Başı Kamu ve Özel Sağlık Harcamaları Dünya Ortalaması (SAGP)

Zamana bağlı olarak COVID-19 eğilimlerinin karşılaştırılması, pandemiyi izlemek ve hastalık yükünü azaltmayı amaçlayan politikaları dolaylı olarak değerlendirmek için esastır (16). Rice ve Cooper (1954) "Hastalıkların kontrolü ve ortadan kaldırılması gibi kamu programları için, [...] insan yaşamının değerlendirilmesinin, elde edilecek faydaların doğru hesaplanması için temel bir gereklilik olduğunu" iddia etmişlerdir (17). Bu bakımdan ölüm eğilimlerinin sağlık göstergesi olarak değerlendirilmesinde, kaba ölüm oranı (KÖO) sıkça kullanılan bir göstergedir (18). KÖO, "bir ülke ya da bölgede belirli bir yıl içindeki toplam ölüm sayısının yıl ortası nüfusa oranlanması ile hesaplanır. Bölge ya da ülkenin kabaca ölüm düzeyi hakkında bilgi verir" (19). COVID-19 sürecinde ülkeler arasında ölümleri saymak için tek tip bir sistem geliştirilmemiştir. İtalya, İspanya, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), İngiltere ve Çin gibi yüksek oranda etkilenen ülkelere gelen veriler, Güney Kore gibi bulaşmayı etkin bir

şekilde kontrol edebilen ülkelerle ilgili verilerden çok farklı rakamlar göstermiştir. Enfeksiyon ölüm oranlarıyla ilgili belirsizlik, esas olarak herhangi bir zamanda COVID-19 enfeksiyonunun gerçek insidansını ve prevalansını tanımlamanın zorluğundan kaynaklanmaktadır (20). Şekil 2'de Ocak 2020-Aralık 2021 için haftalık olarak bildirilen COVID-19 ölümleri, OECD ülkelerinin bölgelere göre gruplandırılmış hali ile sunulmaktadır. Bu şekilde de görüldüğü üzere pandemi etkisi ile gerçekleşen ölümler zaman faktörü içinde değişkenlik göstermiştir (21). Şekil 3 incelendiğinde 2019'da %0.7 olan dünya ortalama KÖO eğiliminin kırıldığı ve 2019'a kadar düşme eğiliminde olan KÖO'nun 2019 sonrasında artışa geçtiği 2020'de %0.8, 2021'de %0,9'a ulaştığı görülmektedir (22). COVID-19 gibi salgınlardan etkisinin toplumdaki toplam ölüm seyrini nasıl etkilediğini izleyebilmek için KÖO bakımından yıllar arası seyir değişikliklerini incelemek ve gelecek projeksiyonları yapmak önemli bir yol gösterici olacaktır.



Şekil 2. Haftalık olarak bildirilen COVID-19 ölümleri, OECD ülkeleri bölgelere göre gruplandırılmış, Ocak 2020 - Aralık 2021



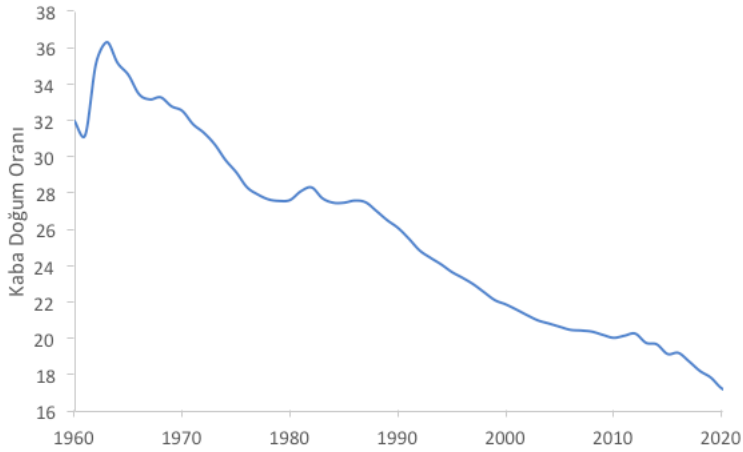
Şekil 3. Kaba Ölüm Oranı - Dünya ortalaması (1.000 kişi başına)

Tarih boyunca pandemiler insan nüfusundaki değişimin temel itici gücü olmuştur. Pandeminin ölüm oranlarına etkisi büyük ilgi görse de ikinci önemli demografik etken olan doğumlar üzerindeki etkilerinin incelenmesi de önem arz etmektedir. Çünkü salgınların hamile kalmayı planlayanlar, hamile kadınlar ve fetal sonuçlar üzerinde derin etkileri olduğu bilinmektedir (23). Örneğin Malthus döneminde tekrarlanan ölüm ve doğurganlık krizlerinin birleşiminde, olumsuz dış şoklar nedeniyle ölüm oranlarının zirve yapması, genellikle 9 ila 12 ay arasında doğumların dip noktasına

gelmesine neden olmuştur (24). Geçen yüzyılın en büyük salgını olan 1918-1919 H1N1 influenza A pandemisi (İspanyol gribi), ABD’de doğum oranlarında 1918’de 1.000 nüfus başına 23’ten 1919’da 1.000’de 20’ye %13’lük bir düşüşe neden olmuştur (23). Cohen (2021) ABD’nin, 2019’a kıyasla 2020 için doğumlarda %3,8’lik bir düşüş yaşadığını, ancak düşüş oranının yıl sonunda çok daha hızlı olduğunu (Aralık ayında %8) ortaya koymuştur (25). Sobotka vd. (2022) doğum dalgalanmalarının daha düşük olduğu 17 ülkede, doğum sayısının bir önceki yılın aynı ayına göre Kasım

2020’de ortalama %5,1, Aralık 2020’de %6,5 ve Ocak 2021’de %8,9 düştüğünü tespit etmişlerdir. İspanya, analiz edilen ülkeler arasında doğum sayısında en keskin düşüşü yaşamış; doğum sayısı Aralık 2020 ve Ocak 2021’de %20 oranında düşmüştür. Artan ölüm oranı ve düşen doğum oranlarının birleşik etkisi, birçok ülkede doğum ve ölüm dengesini bozup doğal nüfus artışını 2020 ve 2021’de rekor düzeyde düşük seviyelere itmiştir (26). Şekil 4’te de kaba doğum

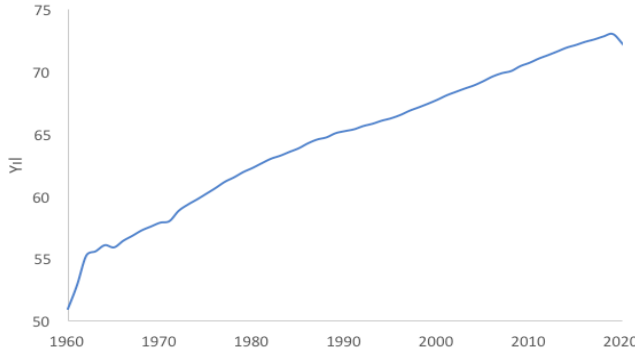
oranı dünya ortalaması yer almakta olup 1963’ten sonra ciddi azalma eğilimi izlenmekte, 2020’ye geldiğinde binde 17,22’ye, 2021’de ise 16,93’e düştüğü görülmektedir. Bu nedenle bu araştırma kapsamında “yıl ortasında tahmin edilen 1.000 nüfus başına yıl boyunca meydana gelen canlı doğum sayısını gösteren” (27) kaba doğum oranı, pandeminin etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan bir kriter olmuştur.



Şekil 4. Kaba Doğum Oranı - Dünya ortalaması (1.000 kişi başına)

Doğumda yaşam beklentisi, nüfus sağlığı ve uzun ömürlülüğün en yaygın kullanılan ölçütüdür. COVID-19’dan kaynaklanan ölüm oranının artmaya devam etmesi, doğumda beklenen yaşam süresi üzerinde olumsuz bir etki yaratabilir. Örneğin 1918 grip pandemisi ve 2014 Ebola virüsü salgını gibi önceki salgınlar, ABD ve Liberya’da sırasıyla 11,8 yıl ve 1,6-5,6 yıl gibi bir sürelik doğumda yaşam beklentisinde düşüşe neden olmuştur. Liberya’da Ebola virüsü ölümlerinden kaynaklanan yaşam beklentisindeki olası düşüşler 1,63 yıl ile 5,56 yıl arasında değişirken, Sierra Leone’de olası yaşam beklentisi düşüşleri 1,38 ila 5,10 yıl arasında değişmiştir (20;28). COVID-19 salgını, nüfus sağlığı üzerinde ek zorluklar ortaya çıkaran küresel bir ölüm krizini tetiklemiştir. Pandemi, diğer ölüm nedenlerinden kaynaklanan ölümleri de dolaylı olarak etkilemiştir. Ortaya çıkan kanıtlar, gecikmiş tedavilerin veya kanserler

ve kardiyovasküler hastalıklar için tedavi almayı ertelemenin olumsuz etkilerini vurgulamaktadır. Bu koşullardan kaynaklanan ölüm oranları artarken, karantina uygulaması sebebiyle kazalar gibi nedenlerden kaynaklı ölüm sayısı ise azalmış olabilir (4). ABD yaşam beklentisinin 2021 yılında bir yıldan fazla (-1,26 yıl), HIV salgınının en kötü yılından veya opioid krizinin en kötü 3 yılından çok daha fazla düştüğü ve 2008’den bu yana en düşük seviyesine ulaştığı tahmin edilmektedir. Panama, Peru ve İtalya, İspanya, ABD ve özellikle Meksika’nın bazı bölgeleri için 2 yılı aşan önemli ölçüde daha büyük düşüşler olduğu tahmin edilmektedir (29). Şekil 5’te doğumda beklenen yaşam süresi dünya ortalamasına ilişkin seyir görülmekte olup 1960’lardan 2019’a kadar neredeyse sürekli artan eğilim izlenmektedir. Ancak 2019’da ortalama beklenen süre 73 yıl iken 2020’de 72’ye, 2021’de ise 71’e düşmüştür (30).



Şekil 5. Dünya için doğumda beklenen yaşam süresi, toplam (yıl)

Türkiye, sağlık hizmeti ve finansmanı konusunda karma sistemi uygulamaktadır ve kamu, sağlık hizmeti sunumunda en büyük aktördür (31). COVID-19 döneminde de Sağlık Bakanlığı koordinatörlüğünde yürütülen süreçte pandemi hastaneleri tespit edilmiş, bu hastanelerin bulunmadığı durumda, ikinci basamak erişkin yoğun bakım ünitesi bulunan hastaneler pandemi hastanesi olarak ilan edilmiş ve yeni acil durum hastaneleri açılmıştır. COVID-19 tedbirleri kapsamında 3 bin 144'ü erişkin, 125'i çocuk ve 158'i yenidoğan olmak üzere yoğun bakım yatağı sayısında toplam 3 bin 427 artış sağlanmıştır (32; 33; 34). Sağlık Bakanlığı tarafından temin edilen COVID-19 aşıları, tüm vatandaşlara ücretsiz olarak uygulanmıştır (35). COVID-19 tedavisi gören hastaların test sonuçlarına bakılmaksızın Sağlık Uygulama Tebliği (SUT) kapsamındaki sağlık giderleri Sosyal Güvenlik Kurumu (SGK) tarafından karşılanmıştır (36). COVID-19 uygulamaları değerlendirildiğinde hem cari sağlık hem de yatırım harcamalarının büyük bir çoğunluğunun kamu tarafından finanse edildiği görülmektedir. Bununla birlikte pandemi süresince hastalıktan korunmak için bireysel önlemler alınması gerektiği belirtilmiş ve maske kullanımı zorunlu hale getirilmiştir (34). Maske kullanma zorunluluğu vatandaşlar için cepten ödemeler aracılığı ile karşılanan bir gider kalemi olmuştur. Aynı zamanda Demir ve arkadaşlarının (2021) araştırmalarında tespit ettiği gibi pandemi sürecinde yetişkinlerin besin destekleri kullanımı artmıştır ve bu da hane halkı gelirlerini azaltan bir

etki yaratmıştır (37). Alınan kararlar ve gerçekleşen uygulamalar içerik olarak değerlendirildiğinde bu süreçte hem kamu düzeyinde çeşitli girişimlerin olduğu ve dolayısıyla kamu harcamalarının arttığı (38), hem de bireysel düzeyde zorunluluklara uymak ve kendini koruma çabası içerisinde bireysel harcamaların arttığı görülmektedir (39).

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'deki seçilmiş sağlık göstergeleri üzerinden COVID-19'un etkilerini değerlendirmek ve farklı senaryolar aracılığı ile gelecek tahminlemesi yapmaktır. Bu kapsamda araştırmanın temel göstergeleri ve ilgili verilere nereden ulaşıldığı aşağıda belirtilmektedir. Sağlık göstergelerinin 2009-2021 yılları arasındaki verileri Tablo 1'de sunulmaktadır.

Göstergeler 2009-2021 yıllarını kapsamaktadır. İki senaryo üretilerek COVID-19 etkisi ve gelecek tahminlemesi yapılmıştır. Bu senaryolar aşağıdaki gibidir:

1. Senaryo: Türkiye'de pandemi yaşanmadı varsayılır. 2009-2019 verileri değerlendirmeye alınır. "2030'a kadar ilgili göstergeler bağlamında nasıl bir değişiklik izlenir?" sorusuna yanıt aranır.

2. Senaryo: Türkiye'de pandeminin yaşandığı kabul edilir. 2009-2021 verileri değerlendirmeye alınır. "2030'a kadar ilgili göstergeler bağlamında nasıl bir değişiklik izlenir?" sorusuna yanıt aranır.

Temel Göstergeler	Veri Kaynağı
Kişi başına düşen kamu sağlık harcaması (KKSH) (\$, Satın alma gücü paritesi SAGP)	Sağlık İstatistikleri Yıllıkları
Kişi başına düşen özel sağlık harcaması (KÖSH) (\$, SAGP)	Sağlık İstatistikleri Yıllıkları
Kaba ölüm oranı (KÖO) (1.000 kişide)	Dünya Bankası (DB)
Kaba doğum oranı (KDO) (1.000 kişide)	DB
Doğumda beklenen yaşam süresi (DBYS) (yıl)	DB

Tablo 1. 2000-2021 Yılları Arası Seçilmiş Sağlık Göstergelerine İlişkin Veriler

Yıllar	KKSH	KÖSH	KÖO	KDO	DBYS
2009	691	162	5,269	18,06	74,765
2010	698	190	5,251	17,746	75,069
2011	742	191	5,44	17,638	74,941
2012	748	196	5,205	17,664	75,678
2013	788	216	5,04	17,737	76,297
2014	831	242	5,046	17,972	76,565
2015	883	241	5,125	17,939	76,646
2016	943	258	5,234	17,739	76,66
2017	985	277	5,129	17,368	77,141
2018	996	289	5,065	16,481	77,563
2019	1026	289	5,084	15,594	77,832
2020	1109	289	6,378	15,033	75,85
2021	1321	347	6,398	14,678	76,032

ONGBM(1,1) Modeli

Bu çalışmada tahminleme yapmak için Optimize Edilmiş Doğrusal Olmayan Gri Bernoulli Modeli (ONGBM(1,1))'nden yararlanılmıştır. İlk kez Chen (2008) tarafından ortaya konulan Doğrusal olmayan gri Bernoulli modelinde (NGBM(1,1)), ilk aşamada n adet negatif değer almayan ham veri seti $X^{(0)}$ oluşturulur (40).

$$X^{(0)} = \{x^{(0)}(1), x^{(0)}(2), x^{(0)}(3), \dots, x^{(0)}(n), n \geq 4\} \quad (1)$$

İkinci aşamada, birinci dereceden birikim operatörü $X^{(1)}$ oluşturulur.

$$X^{(1)} = \{x^{(1)}(1), x^{(1)}(2), x^{(1)}(3), \dots, x^{(1)}(n)\} \quad (2)$$

Burada,

$$X^{(1)}(k) = \sum_{i=1}^k x^{(0)}(i) \quad k = 1, 2, \dots, n \quad (3)$$

Üçüncü aşamada, sırasıyla beyazlatma ve fark denklemleri oluşturulur.

$$\frac{dx^{(1)}(k)}{dt} + ax^{(1)}(k) = b \left(x^{(1)}(k)\right)^{\gamma} \quad (4)$$

$$x^{(0)}(k) + az^{(1)}(k) = b \left(z^{(1)}(k)\right)^{\gamma} \quad (5)$$

Burada a geliştirme katsayısını, b ilerletme katsayısını ve γ ise kuvvet katsayısını ifade etmektedir. Birinci dereceden ortalama operatör adı verilen $z^{(1)}(k)$ aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır.

$$z^{(1)}(k) = \lambda * x^{(1)}(k) + (1 - \lambda) * x^{(1)}(k - 1), \quad k = 2, 3, 4, \dots, n \quad (6)$$

Burada, λ katsayısı 0-1 aralığında değişmekle birlikte geleneksel gri tahmin modelinde bu katsayı 0,5 olarak kabul edilir (41).

Dördüncü aşamada, Denklem 5'teki a ve b katsayıları en küçük kareler metodu ile aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$\begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix} = [B^T B]^{-1} B^T Y \quad (7)$$

Burada B ve Y matrisleri sırasıyla aşağıda belirtilmektedir.

$$B = \begin{bmatrix} -z^{(1)}(2) & (z^{(1)}(2))^Y \\ -z^{(1)}(3) & (z^{(1)}(3))^Y \\ -z^{(1)}(4) & (z^{(1)}(4))^Y \\ \vdots & \vdots \\ -z^{(1)}(n) & (z^{(1)}(n))^Y \end{bmatrix}, \quad Y = \begin{bmatrix} x^{(0)}(2) \\ x^{(0)}(3) \\ x^{(0)}(4) \\ \vdots \\ x^{(0)}(n) \end{bmatrix} \quad (8)$$

Son aşamada, tahmin veri seti oluşturulur.

$$\hat{x}^{(1)}(k) = \left[\left((x^{(0)}(1))^{1-\gamma} - \frac{b}{a} \right) e^{-a \cdot (1-\gamma)(k-1)} + \frac{b}{a} \right]^{\frac{1}{1-\gamma}}, \quad k = 2, 3, \dots, m \quad (9)$$

Burada,

$x^{(1)}(1) = x^{(0)}(1)$ formülüyle üretilen ilk tahmin verisinin ham veri setindeki ilk değere eşit olduğu kabul edilir.

NGBM(1,1)'de denklem 6'daki 0,5 olarak kabul edilen λ katsayısı eğer 0-1 arasında optimize edilirse ONGBM(1,1) olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte, denklem 5'teki γ katsayısı 0 olursa NGBM(1,1) modeli GM(1,1) modeline, ONGBM(1,1) modeli ise OGM(1,1) modeline indirgenmiş olur.

ONGBM(1,1) modelindeki λ ve γ katsayılarının optimizasyonunda Genetik Algoritma metodundan yararlanılmıştır. Gri tahmin metodu excelde formüle edilmiş ve Evolver paket programıyla Genetik Algoritma metodu kullanılarak tahmin modelindeki λ ve γ katsayıları optimize edilmiştir. Bu çalışmada,

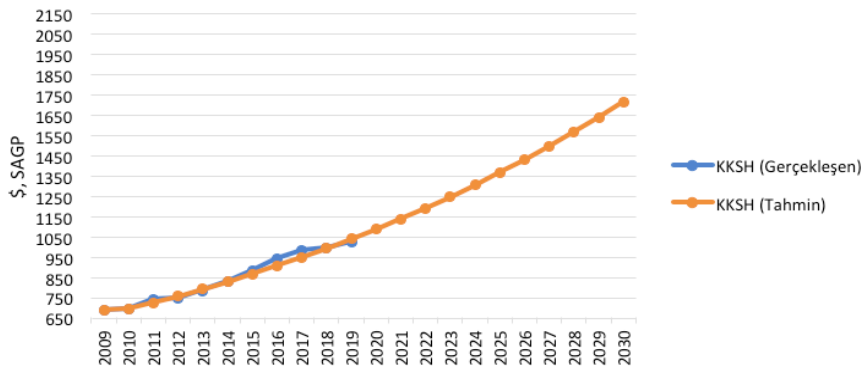
ONGBM(1,1) modelinin tahmindeki başarısı Denklem 10'da belirtilen Ortalama Mutlak Yüzdese Hata (MAPE) değeri ile ölçülmektedir (42).

$$MAPE (\%) = \sum_{i=1}^n \left| \frac{x^{(i)} - \hat{x}^{(i)}}{x^{(i)}} \right| x \frac{100}{n} \quad (10)$$

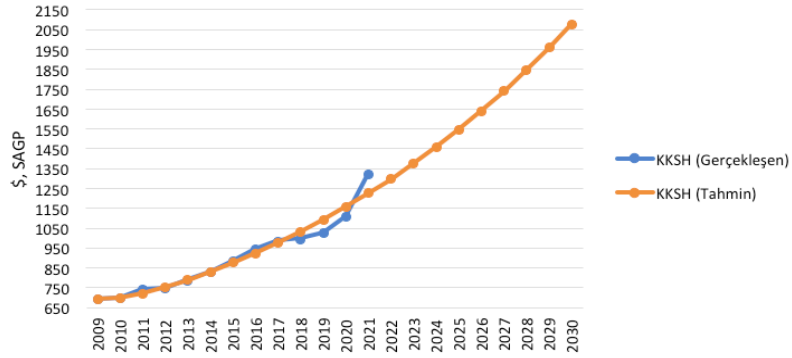
ONGBM(1,1) modelindeki λ ve γ katsayılarının değeri tahmin modelindeki MAPE değerinin en küçük olması koşuluna bağlıdır. Bununla birlikte, tahmin modelinin başarısı en düşük MAPE değerine sahip olmasına bağlıdır. Ayrıca, MAPE değerinin %10'dan küçük olması tahmin modelinin başarısının yüksek olduğunu göstermektedir (43).

BULGULAR

Üretilen her iki senaryo beş temel gösterge bağlamında karşılaştırılmıştır. İlk olarak ekonomik göstergeler bakımından incelendiğinde KKSH için Senaryo 1 ve 2'ye göre yapılan tahminler sırasıyla Şekil 6 ve 7'de gösterilmektedir. Veriler incelendiğinde her iki durumda da artan bir seyir izlenmektedir. Veriler kıyaslandığında KKSH için Senaryo 1'e göre 2020 yılında beklenen 1091\$ iken gerçekleşen 1158\$, 2021 için beklenen 1141\$ iken gerçekleşen 1321\$ olmuştur. 2030'da Senaryo 1'e göre tahmini 1720\$ olması beklenen KKSH'nın Senaryo 2'ye göre 2079\$'a ulaşması beklenmektedir. COVID-19'un KKSH'nı arttırıcı bir etki yarattığı görülmekte ve bunun gelecekte de devam etmesi beklenmektedir.



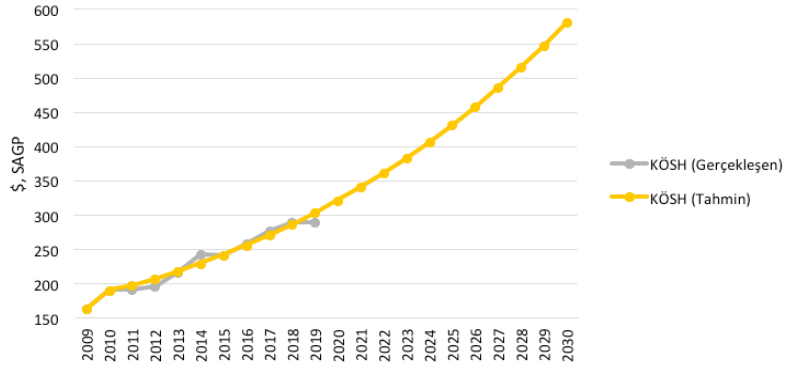
Şekil 6. Senaryo 1'e göre KKSH - Gerçekleşen ve Tahmin Edilen



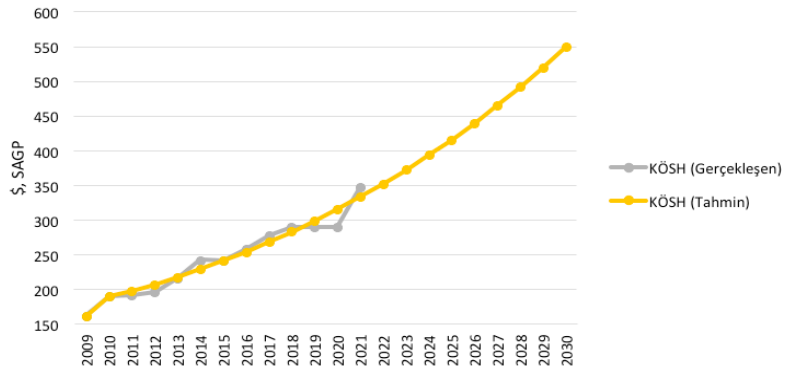
Şekil 7. Senaryo 2'ye göre KOSH - Gerçekleşen ve Tahmin Edilen

KÖSH bakımından Senaryo 1 ve 2'ye göre yapılan tahminler sırasıyla Şekil 8 ve 9'da gösterilmekte olup her iki senaryo için de artan bir eğilim söz konusudur. Senaryo 2 incelendiğinde 2020 yılında beklenenin altında, 2021 yılında ise beklenen üzerinde bir

harcama olması çarpıcı bir etkidir. 2030 yılı için kıyaslama yapıldığında KÖSH'nin Senaryo 1'e göre 580\$, Senaryo 2'ye göre 550\$ olacağı öngörülmektedir. Bu bilgi dahilinde COVID-19'un KÖSH üzerinde azaltıcı etki oluşturması beklenmektedir.



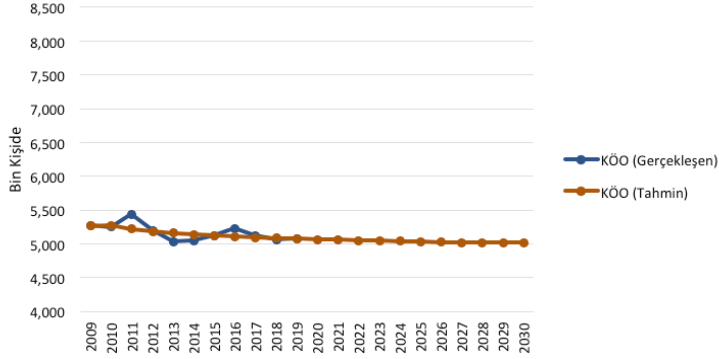
Şekil 8. Senaryo 1'e göre KÖSH - Gerçekleşen ve Tahmin Edilen



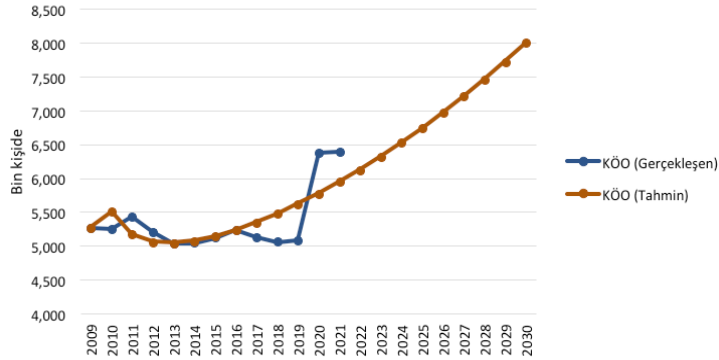
Şekil 9. Senaryo 2'ye göre KÖSH - Gerçekleşen ve Tahmin Edilen

KÖO bakımından Senaryo 1 ve 2'ye göre yapılan tahminler sırasıyla Şekil 10 ve 11'de gösterilmektedir. Senaryo 1'e göre azalan bir seyir beklentisi ile birlikte KÖO'nun 2030'da yaklaşık %5'e düşmesi beklenirken Senaryo 2'ye göre artan bir seyir ile 2030'da %8'e çıkması beklenmektedir. Dolayısıyla COVID-19'un

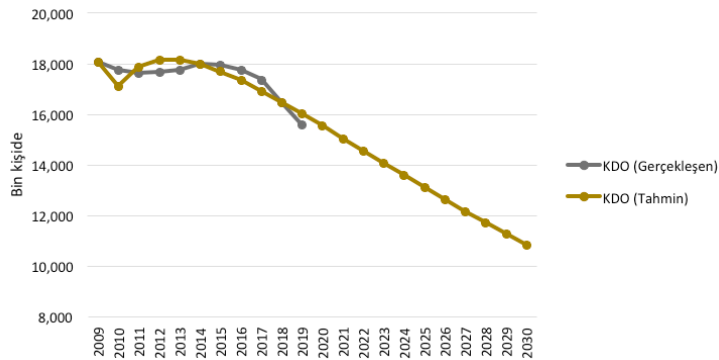
KÖO üzerinde arttırıcı bir etki yarattığı söylenebilir. KDO bakımından Senaryo 1'e ait Şekil 12 incelendiğinde azalan seyir izlenmekte olup 2030'da bu değerın %10,85 olacağı tahmin edilmiştir. Şekil 13, Senaryo 2'ye göre de azalma beklentisi olmakla birlikte 2030'da %9,56'ya düşeceği öngörülmektedir.



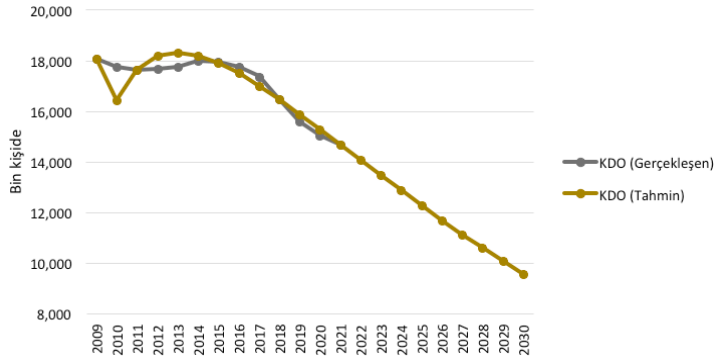
Şekil 10. Senaryo 1'e göre KÖO - Gerçekleşen ve Tahmin Edilen



Şekil 11. Senaryo 1'e göre KÖO - Gerçekleşen ve Tahmin Edilen



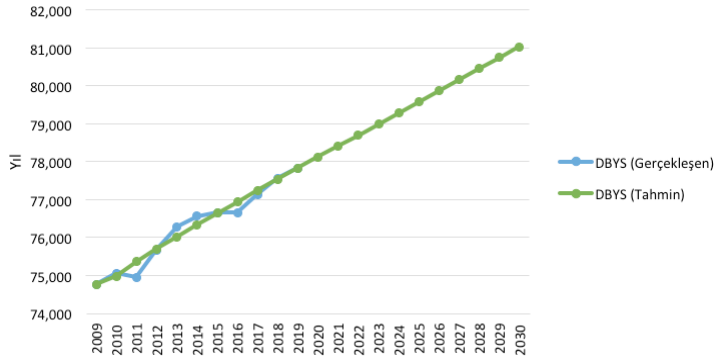
Şekil 12. Senaryo 1'e göre KDO - Gerçekleşen ve Tahmin Edilen



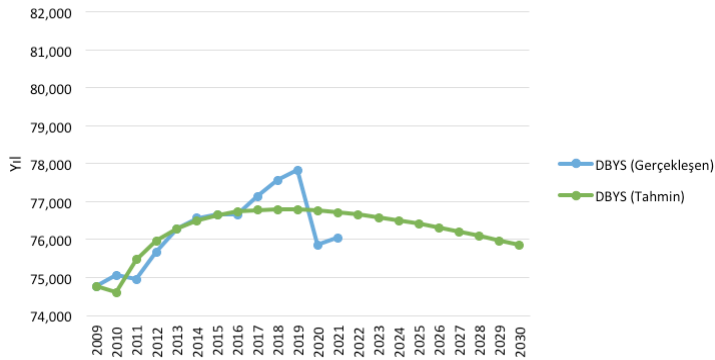
Şekil 13. Senaryo 2'ye göre KDO - Gerçekleşen ve Tahmin Edilen

DBYS bakımından Senaryo 1 ve 2'ye göre yapılan tahminler sırasıyla Şekil 14 ve 15'te gösterilmektedir. Senaryo 1'e göre DBYS, her yıl artmaya devam edecek ve 2030 yılında 81,04'e ulaşacaktır. Fakat

senaryo 2 incelendiğinde farklı olarak 2020 yılındaki kırılmanın DBYS seyrini azalma yönünde değiştirdiği ve 2030 için beklenen sürenin 75,85 yıl olduğu görülmektedir.



Şekil 14. Senaryo 1'e göre DBYS - Gerçekleşen ve Tahmin Edilen



Şekil 15. Senaryo 2'ye göre DBYS - Gerçekleşen ve Tahmin Edilen

Tablo 2’de tüm sağlık göstergelerine ait Senaryo 1 ve 2 kapsamında elde edilen veriler arasında istatistiksel bakımdan anlamlı farklılıklar bulunma durumuna ilişkin analiz sonuçları yer almaktadır. Bu kapsamda Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi yapılmış olup beş gösterge bakımından da istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunduğu

tespit edilmiştir. Bu sonuç itibarıyla COVID-19’un sağlık göstergeleri üzerinde anlamlı farklılık yarattığı sonucuna ulaşılmaktadır. Bununla birlikte her iki senaryo bakımından sağlık göstergelerine ait MAPE değerlerinin %10’dan küçük olması tahmin modelinin başarısının yüksek olduğunu göstermektedir (43).

Tablo 2. 2022-2030 Yılları Senaryo 1 ve Senaryo 2 İle Tahmin Edilen Sağlık Göstergeleri Verilerinin Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi ve MAPE Değerleri

Yıllar	S1 KKSH	S2 KKSH	S1 KÖŞH	S2 KÖŞH	S1 KÖO	S2 KÖO	S1 KDO	S2 KDO	S1 DBYS	S2 DBYS
2022	1194	1299	361	352	5,054	6,126	14,558	14,065	78,710	76,652
2023	1250	1377	383	372	5,047	6,320	14,068	13,455	79,001	76,580
2024	1308	1460	406	393	5,041	6,524	13,583	12,854	79,292	76,498
2025	1369	1548	431	416	5,035	6,741	13,104	12,264	79,584	76,407
2026	1433	1641	457	440	5,030	6,969	12,633	11,689	79,875	76,309
2027	1500	1741	485	465	5,025	7,209	12,171	11,129	80,167	76,203
2028	1570	1847	515	492	5,020	7,460	11,719	10,588	80,459	76,091
2029	1643	1959	547	520	5,015	7,724	11,279	10,065	80,751	75,973
2030	1720	2079	580	550	5,011	8,001	10,851	9,562	81,044	75,850
Sig.	0,008*		0,008*		0,008*		0,008*		0,008*	
MAPE %	1,4513	2,4255	2,3935	3,2082	1,2665	4,4128	1,8988	1,8363	0,1902	0,5669

S1: Senaryo 1, S2: Senaryo 2, *p<0,05

TARTIŞMA

Bu çalışmada Türkiye için sağlık harcamaları (kamu ve özel- kişi başına düşen), kaba ölüm ve doğum oranları (bin kişide) ve doğumda beklenen yaşam süresi (yıl) göstergelerinin COVID-19 olmasaydı ve COVID-19 yaşandı senaryoları dahilinde gelecek tahminleri yapılmıştır. Her iki senaryo bağlamında kıyaslamalar yapıldığında COVID-19’un göstergeler üzerinde anlamlı farklılaştırıcı etkileri olduğu tespit edilmiş, bunlara ilişkin açıklamalar aşağıda tartışılmıştır.

Kamu sağlık sistemi ve politikasının geliştirilmesi için kamu sağlık harcamalarının incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Cutler ve Miller (2006) kamu sağlık

harcamalarının hükümetin kamu sağlık politikasını yansıttığına ve ulusal sağlığın korunmasına katkıda bulunan bir faktör olduğuna işaret etmektedirler (44). Vysochyna ve Jakubowska (2022), Estonya’nın COVID-19’a karşı en dirençli sağlık sistemine sahip olduğunu ve mevcut sağlık harcamalarının yapısında %25’inin özel, %75’inin devlet harcaması olup dış finansmanın yok denecek kadar az olduğunu tespit etmişlerdir. Panel regresyon modellemesi kullanılarak yaptıkları daha derinlemesine analizde kamu, özel ve dış sağlık harcamalarının ölüm oranlarını azaltmadaki olumlu etkisinin yanı sıra mevcut sağlık harcamalarını artırmanın yaşam beklentisi üzerindeki olumlu etkisini ortaya çıkarmıştır (45). Coccia (2021) istatistiksel kanıtların genel olarak, ortalama COVID-19 ölüm

oranının düşük olduğu ülkelerin kişi başına yüksek sağlık harcamaları (>2.300 ABD doları) yaptığı tezini desteklediğini savunmuştur (46). Barrera Algarin ve ark. (2020), Avrupa'da kişi başına düşen kamu sağlığı yatırımlarının daha düşük düzeyde olmasının, milyon kişi başına düşen yüksek sayıda COVID-19 ölümüyle ilişkili olduğunu göstermektedir; genel olarak, COVID-19'un yüksek ölüm oranı, yüksek gelir eşitsizliğiyle bağlantılı düşük sağlık harcamalarından kaynaklanmaktadır (47). Bu çalışma da Türkiye'de kamu sağlık harcamalarının COVID-19 sürecinden etkilendiğini ve aynı zamanda gelecek tahminlerinde pandemi nedeni artış yönünde bir farklılık oluştuğunu göstermektedir.

Sağlık harcaması konusunda dikkate alınması gereken bir diğer harcama, zaman zaman hane halklarının finansal sorunlar yaşamasına sebep olabilen özel sağlık harcamalarıdır. Bu çalışmada KÖSH'nin COVID-19 yaşanmasaydı 2020 yılında 321\$, 2021 yılında ise 340\$ olması beklenirken gerçekte 2020'de 289\$, 2021'de ise 347\$ olduğu tespit edilmiştir. 2020 yılındaki düşüş eğiliminde kapanma, sağlık hizmetlerine sınırlı erişim gibi nedenlerin etkili olabileceği düşünülmektedir. 2021 yılındaki artış ise kapanmanın sona ermesi, insanların salgın hastalıklardan korunmak için daha fazla çaba sarf etmesi gibi sebeplerden kaynaklanmış olabilir. Benzer biçimde Sukmanee vd. (2023) Tayland'da gerçekleştirdikleri çalışmada pandemi sırasında, tıbbi ekipman için toplam hane halkı cepten harcamasının 2019'da 643 milyon Tayland Bahtından 2020'de 9,4 milyar Tayland Bahtına hızla yükselmiş olduğunu bulmuşlardır (48). Jaafar vd. (2021) Malezya'da gerçekleştirdikleri çalışmalarında pandemi döneminde önleyici tedbirlerle ilgili ortalama kümülatif aylık cepten harcamaların hane halkı gelirinin %4,3'ünü oluşturduğu; en yüksek harcamaların geleneksel ve tamamlayıcı tıp için yapıldığını tespit etmişlerdir (49). Rajalakshmi vd. (2023) çalışmalarında, hanelerin yarısından fazlasının cepten harcama ile karşı karşıya olduğunu, toplam hanelerin dörtte birinin katastrofik sağlık harcaması

yaşadığını ve hanelerin yarısının COVID-19 nedeniyle finansman konusunda sıkıntı yaşadığını ortaya koymuşlardır (11). Bu çalışmada da nihai olarak COVID-19 öncesine kıyasla daha düşük düzeyde kalmasına rağmen Türkiye'de KÖSH'nin COVID-19 etkisinde de artacağı tespit edilmiştir.

Kaba ölüm oranları bakımından değerlendirildiğinde; Türkiye'de 2020'de beklenen %5,069, 2021'de %5,061 iken gerçekleşen 2020'de %6,378, 2021'de ise %6,398 olmuştur. Gelecek tahmini konusunda COVID-19 etkisinin kabul edildiği durumda bu oranın artması ve 2030 yılında %8,001'e ulaşması beklenmektedir. Yapılan bir çalışmada COVID-19 etkisi nedeni ile Panama, Peru, İtalya, İspanya, ABD ve özellikle Meksika'nın bazı bölgeleri için KÖO'da 2 yılı aşan çok daha büyük artışlar olacağı tahmin edilmektedir (29). 30 Ağustos 2020 itibarıyla, COVID-19'a ilişkin KÖO, AB ülkeleri arasında büyük farklılıklar göstermiştir; Belçika en yüksek değeri rapor ederken (86,3/100.000), onu Birleşik Krallık (68,5/100.000) ve İspanya (62,1/100.000) takip etmiş, Slovakya ise en düşük değeri (0,6/100.000) bildirmiştir (50).

Türkiye'de kaba doğum oranları bakımından 2020'de beklenen %15,536, 2021'de %15,048 iken gerçekleşenin 2020'de %15,083, 2021'de ise %14,678 olduğu tespit edilmiştir. Kearney ve Levine (2023) ABD pandemisinin başlangıçta Ağustos 2020'den Şubat 2021'e kadar olan bir "bebek çöküşü" döneminde, öncekinden yaklaşık 100.000 daha az doğum gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır. Bu eksik doğumların çoğu, pandemi koşullarına karşı davranışsal doğurganlık tepkisi ile tutarlı olarak, 2020 yılının Mart ayında pandemi başladıktan sonra meydana gelmiş olabileceği varsayılmıştır (51). Pandemi döneminde kaba doğum oranlarında, dikkate alınan 22 ülkeden 7'sinde geçmiş eğilimlerle tahmin edilenin ötesinde önemli bir düşüş eşlik etmiş ve özellikle güney Avrupa'da güçlü düşüşler yaşanmıştır: İtalya (%-9,1), İspanya (%-8,4), ve Portekiz (%-6,6) (24). Bu çalışma kapsamında Türkiye'de KDO'nun 2030'da %9,56'ya düşmesi beklenmektedir.

Araştırma kapsamında Türkiye için doğumda beklenen yaşam süresi 2020 yılı için 78,12 ve 2021 için 78,41 yıl olarak tespit edilmiş ancak gerçekleşen sırasıyla 75,85 ve 76,03 olmuştur. 2020 yılında DBYS, bir önceki yıla göre 1,98 yıl düşmüştür. Trias-Llimós ve Bilal'in (2020) Madrid'de COVID-19 krizinin potansiyel yıllık yaşam beklentisi düzeyleri üzerindeki rolünü inceledikleri araştırma sonuçları, DBYS'nin erkeklerde 1,9 yıl, kadınlarda ise 1,6 yıl azaldığını göstermektedir (52). Marois vd. (2020)'nin yaptığı araştırmaya göre %10'luk COVID-19 yaygınlık oranında, doğumda beklenen yaşam beklentisindeki kayıp, Kuzey Amerika ve Avrupa ile Latin Amerika ve Karayipler'de muhtemelen 1 yılın üzerindedir. %95 tahmin aralıklarının altında COVID-19 enfeksiyonlarının %50 prevalansı ile ölüm oranlarındaki belirsizlik göz önüne alındığında, yaşam beklentisi Kuzey Amerika ve Avrupa'da 3 ile 9 yıl, Latin Amerika ve Karayipler'de 3 ile 8 yıl, Güneydoğu Asya'da 2 ile 7 yıl ve Sahra altı Afrika'da 1 ile 4 yıl arasında düşecektir. Ancak tüm yaygınlık senaryolarında, COVID-19 enfeksiyon yaygınlık oranı %1 veya %2'nin altında kaldığı sürece, COVID-19 yaşam beklentisini önemli ölçüde etkilemeyecektir (20). Aburto vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada 29 ülkeden 27'sinde DBYS'nin 2019'a kıyasla 2020'de düştüğü tespit edilmiştir. ABD ve Litvanya'daki erkekler, 2020 boyunca doğumda yaşam beklentisinde en büyük kayıpları yaşamıştır (sırasıyla 2,2 ve 1,7 yıl), ancak erkekler için 11 ülkede ve kadınlarda 8 ülkede bir yıldan fazla azalmalar belgelenmiştir (4). Vasishtha vd. (2021) Hindistan'da COVID-19'a atfedilebilir ölümlerin yaşam beklentisini 0,8 yıl, COVID-19 öncesi dönemde 73,2 yıldan 2020'nin sonuna kadar 72,4 yıla düşürdüğünü tespit etmişlerdir. COVID-19'a atfedilebilir ölümler toplam ölümlerin %10'una yükselirse, doğumdaki yaşam beklentisi muhtemelen 1,4 yıl azalacaktır (53). Castro vd. (2021) Brezilya'da 2014'ten beri görülmeyen bir ölüm seviyesi olan 1,3 yıllık bir düşüş olduğunu tahmin etmişlerdir. 2020'de 65 yaştaki yaşam beklentisindeki azalma ise 0,9 yıl olmuş ve Brezilya'yı 2012 seviyelerine geri döndürmüştür (54). Türkiye

için COVID-19 etkisi kapsamında 2030'da DBYS'nin 75,85 yıl olması beklenmektedir.

Seçilmiş sağlık göstergelerinin sonuçları, yalnızca hastalığın yayılmasını yansıtmamaktadır. COVID-19 sürecindeki kaba ölüm hızı, kaba doğum hızı ve doğumda beklenen yaşam süresi, hastalığın görülme sıklığı ve ciddiyeti ve hasta insanlarla başa çıkmak için kullanılan stratejiler, sağlık sistemlerinin kalitesinin bir fonksiyonudur. Bu nedenle yaşanan olaylardan öğrenmek, çok kıymetli bir bilgi kaynağıdır. Nitekim COVID-19'un son salgın olmayacağı göz önüne alınarak politika yapıcıların ve karar vericilerin, yaşanan olayların mevcut durumu nasıl değiştirdiğini anlamaya, geleceği nasıl etkileyebileceğini öngörmeye ve acil durum hazırlıkları gibi kararlarını bu bilimsel dayanaklar aracılığı ile geliştirmelerine ihtiyaç vardır.

Makro düzeydeki politika ve eylemlerden sorumlu uluslararası aktörlerin ve hükümetlerin ve mikro düzeye doğru diğer çeşitli düzeylerdeki karar vericilerin çeşitli senaryolar aracılığı ile farklı olağanüstü durumlara hazırlıklı olmaları gerektiği COVID-19 pandemisi ile yeniden hatırlanmıştır. Günümüzün çok değişkenli küresel alanı içerisinde yöneticilerin, salt sezgisel yaklaşımlar ya da salt sayısal veriler aracılığı ile karar vermeleri mümkün değildir. Özellikle sağlık hizmetlerinin kendine has özelliklerinin ve bağlamsal farklılıkların göz önünde bulundurulması, karar verme ve uygulamaların başarılı olmasında etkili olacaktır. Bu nedenle yöneticilerin deneyim, tecrübe ve öngörülerini ile modern karar verme tekniklerini kullanarak bilimsel bilgiye dayalı karar vermeleri zorunluluk haline gelmiştir. Bu kapsamda eylem hazırlıkları sürecinde kantitatif verilerin ve kırılma noktalarının tespiti ve gelecek projeksiyonlarının bunlara göre oluşturularak farklı yaklaşımların etki olasılıklarının belirlenmesi kritik önem arz etmektedir.

Bu çalışma, karar vericilerin senaryolar aracılığı ile sonuç kıyaslaması yaparak pandemi etkilerini değerlendirebilmelerine olanak sağlamaktadır. Ayrıca literatür incelendiğinde ilgili konuda seçilen

göstergeler üzerinden ve senaryo aracılığı ile yapılmış bir çalışma olmaması, bu boşluğun doldurulması adına katkı sağlayacaktır. Çalışmanın temel sınırlılıkları ise sadece belirli bir yöntem aracılığı ile tahminleme

yapılması ve beş göstergenin seçilmiş olmasıdır. Gelecek çalışmalarda farklı yöntemler kullanılarak ve farklı göstergeler eklenerek yeni çalışmalar yapılabilir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Talevi D, Socci V, Carai M, Carnaghi G, Faleri S, Trebbi E, di Bernardo A, Capelli F, Pacitti F. Mental health outcomes of the CoViD-19 pandemic. Riv Psichiatr, 2020; 55 (3): 137-44.
2. WHO (2023) WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, <https://covid19.who.int/> (Accessed: Dec 2023).
3. OECD. Ready for the next crisis? Investing in health system resilience. OECD Health Policy Studies, Paris: OECD Publishing, 2023.
4. Aburto JM, Schöley J, Kashnitsky I, Zhang L, Rahal C, Missov TI, Mills MC, Dowd JB, Kashyap R. Quantifying impacts of the COVID-19 pandemic through life-expectancy losses: a population-level study of 29 countries. International Journal of Epidemiology, 2022; 51 (1): 63-74.
5. Khan JR, Awan N, Islam MM, Muurlink O. Healthcare capacity, health expenditure, and civil society as predictors of COVID-19 case fatalities: A global analysis. Front. Public Health, 2020;8:347.
6. Alkaya A, Gülbahar HO. Sağlık harcamaları üzerinde sağlık harcamaları belirleyicileri etkisi: OECD ülkeleri panel regresyon analizi. Third Sector Social Economic Review, 2022; 57 (1): 47-67.
7. Self S, Grabowski R. How effective is public health expenditure in improving overall health? A cross-country analysis. Applied Economics, 2003; 35 (7): 835-45.
8. Shi Y, Xie Y, Chen H, Zou W. Spatial and temporal differences in the health expenditure efficiency of China: Reflections based on the background of the COVID-19 pandemic. Front. Public Health, 2022;10:879698.
9. Kapitsinis N. The underlying factors of the COVID-19 spatially uneven spread, Initial evidence from regions in nine EU countries. Regional Science Policy and Practice, 2020; 12 (6): 1027-45.
10. Dünya Bankası. 2023a. Domestic general government health expenditure per capita, PPP (current international \$). <https://data.worldbank.org/indicator/SH.XPD.GHED.PP.CD?end=2021&start=2000&view=chart> (21.11.2023)
11. Rajalakshmi E, Sasidharan A, Bagepally BS, et al. Household catastrophic health expenditure for COVID-19 during March-August 2021, in South India: a cross-sectional study. BMC Public Health, 2023; 23: 47.

12. Haakenstad A, Bintz C, Knight M, Bienhoff K, Chacon-Torrico H, Curioso PWH, et al. Catastrophic health expenditure during the COVID-19 pandemic in five countries: a time-series analysis. *Lancet Glob Health*, 2023;11:e1629-39.
13. Williams OD. COVID-19 and private health: market and governance failure. *Development (Rome)*. 2020; 63 (2-4): 181-90.
14. Dünya Bankası. 2023b. Domestic private health expenditure per capita, PPP (current international \$). <https://data.worldbank.org/indicator/SH.XPD.PVTD.PP.CD> (Accessed: Dec 2023).
15. Aydın JC, Akyürek ÇE. Sağlık harcamaları. In: Aslan H, Çetin Aslan E. ve Top M. eds. *Sağlık Ekonomisi*, Ankara: Siyasal Kitabevi, 2021:285-310.
16. Gallo V, Chiodini P, Bruzzese D, Kondilis E, Howdon D, Mearu J, et al. Comparing the COVID-19 pandemic in space and over time in Europe, using numbers of deaths, crude rates and adjusted mortality trend ratios. *Sci Rep*, 2021; 11: 16443.
17. Rice DP, Cooper BS. The economic value of human life. *Am J Pub H Nati* 1967 Nov;57(11):1954-66.
18. Korkmaz D, Binokay H, Alparslan ZN. Standartlaştırılmış hızlarla COVID-19 ölümleri. *Van Tıp Dergisi*, 2020 ;27 (3): 292-6.
19. Anadolu Üniversitesi. Kaba ölüm hızı. <https://anabilgi.anadolu.edu.tr/?contentId=196370> (Accessed: Nov 2023).
20. Marois G, Muttarak R, Scherbov S. Assessing the potential impact of COVID-19 on life expectancy. *PLoS ONE*, 2020;15(9):e0238678.
21. James C, Mueller M, Hashiguchi TCO, Haywood P. COVID-19 outcomes across OECD countries. In OECD, eds., *Ready for the Next Crisis? Investing in Health System Resilience*, OECD Health Policy Studies, Paris: OECD Publishing, 2023:91-114.
22. Dünya Bankası. Death rate, crude (per 1,000 people). <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.CDRT.IN> (Accessed: Nov 2023)
23. Chandra S, Christensen J, Mamelund SE, Paneth N. Short-term birth sequelae of the 1918-1920 influenza pandemic in the United States: State-level analysis. *Am J Epidemiol*, 2018;187(12):2585-95.
24. Aassve A, Cavalli N, Mencarinia L, Placha S, Sanders S. Early assessment of the relationship between the COVID-19 pandemic and births in high-income countries. *PNAS*, 2021; 118 (36): e2105709118.
25. Cohen PN. Baby bust: Falling fertility in US counties is associated with COVID-19 prevalence and mobility reductions. *SocArXiv [Preprint]*, 2021. <https://osf.io/preprints/socarxiv/qwxz3/> (Accessed: Nov 2023).
26. Sobotka T, Jasilioniene A, Galarza AA, Zeman K, Nemeth L, Jdanov D. Baby bust in the wake of the COVID-19 pandemic? First results from the new STFF data series. (2021, March 24).
27. Dünya Bankası. 2023d. Birth rate, crude (per 1,000 people). <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.CBRT.IN> (Accessed: Nov 2023)
28. Helleringer S, Noymer A. Assessing the direct effects of the ebola outbreak on life expectancy in Liberia, Sierra Leone and Guinea. *PLoS Curr.*, 2015Feb19;7:eurrents.outbreaks.01a99f8342b42a58d806d7d1749574ea.
29. Heuveline P, Tzen M. Beyond deaths per capita: comparative COVID-19 mortality indicators *BMJ Open*, 2021; 11: e042934.
30. Dünya Bankası. 2023e. Life expectancy at birth, total (years). <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.LE00.IN> (Accessed: Dec 2023).
31. Ağır H, Tıraş HH. Türkiye’de sağlık harcamaları türlerinin değerlendirilmesi. *KSÜSBD*, 2018; 15 (2): 643-70.
32. Budak F, Korkmaz Ş. COVID-19 pandemi sürecine yönelik genel bir değerlendirme: Türkiye örneği. *Sosyal Araştırmalar ve Yönetim Dergisi*, 2020; 1: 62- 79.
33. AA. Türkiye’nin Kovid-19’la mücadelesine 2020’de açılan 17 dev hastane büyük katkı sağladı. <https://www.aa.com.tr/tr/koronavirus/turkiyenin-kovid-19la-mucadelesine-2020de-acilan-17-dev-hastane-buyuk-katki-sagladi/2096775#> (Accessed: Nov 2023)
34. Cansever İH. Covid-19 sürecinde Türkiye’de sağlık politikaları. *Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 2021 ; 6: 86-104.

35. Sağlık Bakanlığı. 2023. COVID-19 aşıları nerede uygulanıyor, ücretli mi? <https://covid19asi.saglik.gov.tr/TR-85104/4-covid-19-asilari-nerede-uygulaniyor-ucretli-mi.html#:~:text=Evde%20sağlık%20hizmeti%20sistemine%20kayıtlı,sağlık%20kuruluşlarında%20ücretsiz%20olarak%20uygulanmaktadır.> (14.11.2023)
36. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı, 2020. Bakan Selçuk: "PCR Test Sonucuna Bakılmaksızın, COVID-19 Tedavisi Gören Hastalarımızın SUT Kapsamındaki Sağlık Giderlerini Karşılıyor, Pandemi Bakım Ücreti Ödülüyoruz". <https://www.csgb.gov.tr/haberler/bakan-selcuk-pcr-test-sonucuna-bakilmaksizin-covid-19-tedavisi-goren-hastalarimizin-sut-kapsamindaki-saglik-giderlerini-karsiliyor-pandemi-bakim-ucreti-oduyoruz/> (14.11.2023)
37. Demir G, Kılıçkalkan B, Takak MK. COVID-19 pandemisi sürecinde yetişkinlerin besin destekleri kullanımlarının incelenmesi. Genel Tıp Derg, 2021; 31 (4): 430-9.
38. Çağdaş Y. Koronavirüs (Covid-19) salgınının ekonomi ve kamu maliyesine etkilerinin kümeleme analizi ile incelenmesi. Ekonomi Politika ve Finans Araştırmaları Dergisi, 2020; 5 (Özel Sayı): 137-63.
39. Erişen MA, Yılmaz FÖ. COVID-19 pandemisi döneminde bireylerin harcamalarının incelenmesi. Gaziantep University Journal of Social Sciences, 2020; Special Issue: 340-53.
40. Chen C. Application of the novel nonlinear grey Bernoulli model for forecasting unemployment rate. Chaos Solitons Fractals, 2008; 37 (1): 278-87.
41. Ma W, Zhu X, Wang M, Forecasting iron ore import and consumption of China using grey model optimized by particle swarm optimization algorithm. Resour. Policy, 2013; 38: 613-20.
42. Xu N, Ding S, Gong Y, Bai J, Forecasting Chinese greenhouse gas emissions from energy consumption using a novel grey rolling model. Energy, 2019; 175: 218-27.
43. Wang Z.-X, Li Q. Modelling the nonlinear relationship between CO2 emissions and economic growth using a PSO algorithm-based grey Verhulst model. Journal of Cleaner Production, 2019;207:214-24.
44. Cutler DM, Rosen AB, Vijan S. The value of medical spending in the United States. N. Engl. J. Med. 2006;355: 920-7.
45. Vysochyna A, Jakubowska A. Influence of health expenditure on COVID-19 contraction: theoretical and empirical analysis. Health Economics and Management Review, 2022;3(1):51-61.
46. Coccia M. High health expenditures and low exposure of population to air pollution as critical factors that can reduce fatality rate in COVID-19 pandemic crisis: a global analysis. Environ Res. 2021 Aug;199:111339.
47. Barrera-Algarín E, Estepa-Maestre F, Sarasola-Sánchez-Serrano JL, Vallejo-Andrada A. COVID-19, neoliberalismo y sistemas sanitarios en 30 países de Europa: repercusiones en el número de fallecidos [COVID-19, neoliberalism and health systems in 30 european countries: relationship to deceases.]. Rev Esp Salud Publica. 2020 Oct28;94:e202010140. Spanish. PMID: 33111713.
48. Sukmanee J, Butchon R, Karunayawong P, Dabak SV, Isaranuwatthai W, Teerawattananon Y. (2023) The impact of universal health coverage and COVID-19 pandemic on out-of-pocket expenses in Thailand: an analysis of household survey from 1994 to 2021. Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research, 2023;23(7):823-30.
49. Jaafar H, Abd Laziz NA, Ithnin M, Azzeri A. Assessing the impact of out-of-pocket expenditures for prevention of COVID-19 infection on households: Evidence from Malaysia. INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing, 2021; 58.
50. Villani L, McKee M, Cascini F, Ricciardi W, Boccia S. Comparison of deaths rates for COVID-19 across Europe during the first wave of the COVID-19 pandemic. Front. Public Health, Sec. Infectious Diseases - Surveillance, Prevention and Treatment, 2020;8:620416.
51. Kearney MS, Levine PB. The US COVID-19 baby bust and rebound. J Popul Econ, 2023; 36: 2145-68.
52. Trias-Llimós S, Bilal U. Impact of the COVID-19 pandemic on life expectancy in Madrid (Spain). Journal of Public Health, 2020; 42 (3): 635-6.
53. Vasishtha G, Mohanty SK, Mishra US, Dubey M, Sahoo U. Impact of COVID-19 infection on life expectancy, premature mortality, and DALY in Maharashtra, India. BMC Infect Dis, 2021; 21 (343): 1-11.
54. Castro MC, Gurzenda S, Turra CM, Kim S, Andrasfay T, Goldman N. Reduction in life expectancy in Brazil after COVID-19. Nat Med, 2021; 27: 1629-35.

İneklerde subklinik mastitisin aerobik bakteriyolojisinin değerlendirilmesi

Evaluation of aerobic bacteriology of subclinical mastitis in cows

Berrak DELİKANLI KIYAK¹ (ID), Elçin GÜNAYDIN² (ID), Gülşen GONCAGÜL³ (ID)

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada subklinik mastitisli süt sığırlarının bakteriyolojik muayenesi ile kalite göstergesi olarak kullanılan somatik hücre sayısı değişiminin karşılaştırılması sonucu elde edilen verilerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu amaçla klinik olarak mastitis belirtisi göstermeyen rastgele seçilen toplam 280 Holsteyn ırkı süt sığır ve bunlara ait 1120 meme lobundan süt örnekleri alınmıştır. Süt örneklerinin California mastitis test (CMT) ve somatik hücre sayısı (SHS) ile genel mikrobiyal durumu ve identifikasyon analizi ile de bakteri türleri tanımlanmıştır.

Bulgular: CMT sonucuna göre, süt sığırının 58'i (%20,7) subklinik mastitis yönlü pozitif bulunmuştur. Araştırmaya dahil edilen 232 meme lobundan 82'si (%35,3) CMT (-), 47'si (%20,3) CMT (+), 78'i (%33,6) CMT (++) ve 25'i (%10,8) ise CMT (+++) olarak skorlanmıştır. CMT pozitif meme loblarında bakteri üreme oranı %64,66 olarak tespit edilmiş ve örneklerden sırasıyla *E. coli* (%26,10), *S. aureus* (%21,29) ve *S. agalactiae* (%20,08) izole edilmiştir. Örneklerdeki SHS değerleri

ABSTRACT

Objective: The study aimed to evaluate the data obtained by comparing the bacteriological examination of dairy cattle with subclinical mastitis and the change in somatic cell count, which is used as a quality indicator.

Methods: For this purpose, milk samples were taken from a total of 280 randomly selected Holstein breed dairy cattle and from 1120 mammary lobes, which did not show clinical signs of mastitis. The general microbial status of the milk samples was assessed using the California Mastitis Test (CMT) and somatic cell count (SCC), and bacterial species were identified through identification analysis.

Results: According to the CMT results, 58 (20.7%) of the dairy cattle were found positive for subclinical mastitis. Of the 232 breast lobes included in the study, they were scored as 82 of them (35,3%) CMT (-), 47 of them (20,3%) CMT (+), 78 of them (33,6%) CMT (++) and 25 of them (10,8%) CMT (+++). The bacterial growth rate in CMT-positive mammary lobes was determined to be 64,66%, and *E. coli* (26,10%), *S. aureus* (21,29%), and *S. agalactiae* (20,08%) were isolated from samples,

¹Bursa Uludağ Üniversitesi İznik Meslek Yüksekokulu, Bursa, Türkiye

²Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD., Kastamonu, Türkiye

³Bursa Uludağ Üniversitesi Mennan Pasınlı Atçılık Meslek Yüksekokulu, Bursa, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Berrak DELİKANLI KIYAK

Selçuk Mahallesi Üyüvek Mevkii Hastane Caddesi, 06101, İznik-Bursa - Türkiye

E-posta / E-mail : bdelikanli@uludag.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 24.06.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 24.07.2024

incelendiğinde değerlerin 50.000 ile 960.000 hücre/mL arasında değişkenlik gösterdiği ve ortalama değerinin ise 333.862 hücre/mL düzeyinde olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Sonuçlar, subklinik mastitisin süt işletmelerinde yaygın olduğunu ve bu hayvanlardan elde edilen sütlerden daha çok *Staphylococcus* spp. ile *E. coli*'nin izole edildiğini göstermektedir. Gıda güvenliği kapsamında süt tedarik zincirinde meme sağlığı ve sağım hijyenine yönelik tedbirlerin eksiksiz uygulanmasının kaliteli süt ve süt ürünleri üretimine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bakteri, somatik hücre sayısı, subklinik mastitis

respectively. When the SHS values in the samples were examined, it was determined that the values varied between 50,000 and 960,000 cells/mL and the average value was 333,862 cells/mL.

Conclusion: The results indicate that subclinical mastitis is prevalent in dairy farms, and that *Staphylococcus* spp. and *E. coli* are more frequently isolated from the milk obtained from these animals. In the context of food safety, it is considered that the implementation of measures related to udder health and milking hygiene in the milk supply chain will contribute to the production of high-quality milk and dairy products.

Key Words: Bacteria, somatic cell count, subclinical mastitis

GİRİŞ

Mastitis, süt ineklerinin meme dokularında gözlenen ve enfeksiyona sebebiyet verebilen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyona bağlı olarak süt veriminin azalması, süt kalitesinin düşmesi, tedavi ve ekstra işçilik masraflarının artması gibi olumsuz durumların ortaya çıkması söz konusu olabilmektedir. Ayrıca hastalık etmeninin patojen kaynaklı olmasının halk sağlığını direkt etkileyebileceği düşüncesi nedeniyle de süt hayvancılığı için önemli bir enfeksiyon hastalığı olarak değerlendirilmektedir (1-3).

Mastitis oluşumu, patojenik mikroorganizmaların meme dokularını istila ederek toksin üretmeleri sonucu dokuda oluşan tahribata bağlı süt üreten hücrelerin yıkımının gözlenmesi şeklinde seyretmektedir. Ayrıca meme bezinin yangılanması ile süt bileşiminde, laktöz seviyesinin azalması, iyon konsantrasyonunun artması, pıhtılaşma özelliklerinin bozulması ve karşılaştırmalı olarak somatik hücre sayısının (SHS) artması ve hücre tipi dağılımının değişmesi gibi olumsuz değişikliklere ve özellikle

meme bezi fonksiyonunda homeostazisinde bozukluğa neden olarak süt kalitesini olumsuz etkilemektedir (4, 5).

Süt ürünü imalatı gerçekleştiren işletmelerde, üretilen sütlerin Ulusal Süt Kalite Standardına uygun olması istenmektedir (6). Bu standartları karşılamayan çiğ süt, süt işleme endüstrisi tarafından kabul görmemektedir. Mastitisli sütte bakteri sayısının optimum sınırın üzerinde olması, bileşimdeki yağ ve katı madde oranlarının düşük olması, düşük süt kalitesi ve süt veriminin düşüklüğü, süt endüstrisi için büyük mali kayıplar oluşturmaktadır (7). Hindistan, Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere ve dünya genelindeki yıllık ekonomik kayıpların sırasıyla 1,1 milyar dolar (8), 2 milyar dolar (9), 371 milyon dolar (10) ve 35 milyar dolar (11) olduğu tahmin edilmektedir. Mastitisin, hala dünya çapında sütçü sürülerde yaygın görülen, süt kalitesini etkileyen ciddi ekonomik kayıplara neden olan ve insan sağlığını da etkileyebilen önemli bir enfeksiyon olduğu belirtilmektedir (12).

Çeşitli patojenik mikroorganizmaların süt bezlerine nüfuz ederek memede çoğalması ile oluşan ve inflamatuvar bir hastalık olarak değerlendirilen

mastitis, (13) invazyon, enfeksiyon (kolonizasyon) ve inflamasyon olmak üzere 3 evre şeklinde gelişebilmektedir (14). Ayrıca mastitis, klinik belirtilerin mevcut olup olmama durumuna göre de subklinik (gizli) veya klinik tip olarak kategorize edilmektedir (15). Subklinik mastitis, sütte patojenik mikroorganizmaların ve genellikle yüksek sayıda somatik hücrenin varlığı ile memede gözle görülür büyük bir lezyon veya salgısının olmaması, meme bezinin iltihaplanması, süt üretiminin azalması, salgıda bakteri bulunması, kompozisyon değiştirmesi ve > 500.000/mL beyaz kan hücresi sayısı dahil olmak üzere sütte bazı değişikliklere neden olmaktadır (16). Meme bezlerinin subklinik enfeksiyon durumunu değerlendirmek için altın standart, ardışık üç numuneden en az ikisinde aynı bakteriyel patojenin izolasyonu ve tanımlanmasıdır (17). Klinik mastitiste ise esas olarak sütte pıhtı gibi değişikliklerin ortaya çıkması ve meme bezlerinde şişlik, ısı, ağrı ve ödem gibi değişen derecelerde sistemik semptomlar görülebilmektedir (16). Klinik mastitis, üretici tarafından kolayca tespit edilebilmektedir; ancak subklinik mastitisin, gözle görülür herhangi bir belirti oluşturmaması nedeniyle sadece sütteki enflamatuvar bileşenlerin ve patojenlerin ölçülmesiyle saptanabilmektedir (18). Genel anlamda mastitis oluşumundan sorumlu mikroorganizmaların çoğunun bakteriyel kökenli olduğu ve baskın ve patojenik olarak *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*), *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Streptococcus uberis*'i (*S. uberis*) içerdiği belirtilmektedir (19). Özellikle streptokoklar, inek sağlığı, süt kalitesi ve üretkenliği üzerinde önemli bir etkiye sahip olan başlıca mastitis patojenleri olarak görülmektedir (20). *S. aureus*, *S. agalactiae* ve *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) dahil enfeksiyöz patojenlerin neden olduğu mastitisin bulaşıcı olduğu da ifade edilmektedir (21). *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ve koagülaz negatif stafilokoklar gibi çevresel patojenlerin neden olduğu meme enfeksiyonları ise çevresel mastitis

olarak tanımlanmaktadır (22). Mastitis çok faktörlü etiyojolojiye sahip karmaşık bir hastalık olması nedeniyle ortaya çıkmasında birçok risk faktörü etkili olabilmektedir (23, 24).

Mastitise bağlı meme bezinin enfeksiyonunu takiben süt bileşiminde meydana gelen değişimlere ek olarak SHS de artış meydana gelmektedir. Genel anlamda somatik hücreler sütün normal bileşenleridir; ancak yüksek düzeyde SHS sütün kalitesini, miktarını ve fiyatını etkilemektedir (25). Bu nedenle meme sağlığının takibinde ve çiğ sütün mikrobiyal kalitesinin belirlenmesinde SHS kritik bir öneme sahip bulunmaktadır (26, 27).

Bu araştırmanın amacı, süt sığırlarında subklinik mastitis tanısı konulmuş meme loblarından alınan süt örneklerinde bakterilerin belirlenmesi ile kalite göstergesi olarak kullanılan SHS değerlerinin karşılaştırılmasının sağlanmasıdır. Ayrıca elde edilen bulgular doğrultusunda sütlerin gıda güvenliği kapsamında kullanılabilirliği de değerlendirilme altına alınmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada 2-3 laktasyon döneminde olan Bursa ili çevresinde bulunan, benzer hijyenik tedbirlerin uygulandığı, 4 farklı işletmeden klinik olarak mastitis belirtisi göstermeyen rastgele seçilen toplam 280 Holstayn ırkı süt sığır ve bunlara ait 1120 meme lobundan örnek alınmıştır. 15.02.2014 Tarih ve 28914 Sayılı Resmî Gazete'de yayınlanan "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" 'in 8. maddesinin k fıkrası gereği; süt sağma, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (HAYDEK) iznine tabi olmaması nedeniyle çalışmanın yürütülmesi amacıyla etik kurula bir başvuru yapılmamıştır.

Süt örneklerinde CMT ve SHS

Çalışmada yer alan süt sığırlarında subklinik mastitis, CMT uygulanmasında CMT solüsyonu süt içeriğinde bulunan lökositlerle reaksiyona girmesi

sonucu, karışımın pıhtılaşma ve viskozitesine göre, oluşan reaksiyon negatif, +, ++ ve +++ olarak okunarak (28) yüzde oran şeklinde değerlendirilmeye tabi tutulmuştur.

CMT testi sonrasında pozitif bulunan süt sığırlarının meme dokusu temizlendikten sonra, %70 alkole batırılmış gazlı bez ile silinmiştir. Pozitif bulunan meme loblarından aseptik koşullarda iki steril tüpe biri SHS'da diğeri ise bakteriyolojik muayenede kullanılmak üzere toplam 20 ml süt numunesi alınmıştır.

SHS, Somacount 150 (Bentley Instruments, Chaska, MN, ABD) ile belirlenmiştir. Süt örneklerinde saptanan SHS değeri ise dağılımlarına göre kategorik sınıflandırılmıştır. Bu amaçla; SHS değeri düşük (<100.000 hücre/mL), orta (100.000-400.000 hücre/mL) ve yüksek (\geq 400.000 hücre/mL) olmak üzere üç farklı derecede değerlendirilmiştir.

Her bir meme lobuna uygulanan CMT ile pozitif bulunan süt örnekleri soğuk zincirde bakteriyoloji laboratuvarına nakledilmiş ve ardından derhal konvansiyonel kültürel yöntem ile incelemeye alınmış ve/veya standart bakteriyolojik besi yerinde izole edilerek maksimum 24 saat boyunca +4°C'de muhafaza edilmiştir. Bu tarama testi standart prosedür uygulanarak yürütülmüştür (29).

Bakteri kültürü ve identifikasyon

Alınan süt numunelerinin her biri ilk olarak sıvı Tiyoglikolat besi yerine (BBL, 221196) inoküle

edilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, bir öze dolusu alınarak Kanlı agar (BBL, 297876) ve EMB agar (BBL, 221355) besiyerlerine ekimler yapılmış ve 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Üreyen koloniler morfolojisi ve gram boyama özelliklerine göre değerlendirilmiş ve saf kültürleri hazırlanmıştır. İzolatların identifikasyonu BBL Crystal (BectonDickinson, Sparks, ABD) Gram pozitif ve Gram negatif ID sistem kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

CMT ile taranan, 4 farklı sürüden rastgele seçilen toplam 280 süt sığırının 58'i (%20,7) subklinik mastitis yönlü pozitif bulunmuştur. Bu süt sığırlarından alınan örneklerin CMT skorları, tek ve miks enfeksiyonlu örneklerden izole edilen bakterilerin dağılımı Tablo 1'de verilmiştir. İncelenen 58 süt sığırına ait CMT değerleri incelendiğinde 232 meme lobunun 82'i (%35,3) negatif (N), 47'si (%20,3) +, 78'i (%33,6) ++ ve 25'i (%10,8) ise +++ şeklinde reaksiyon skorlanmıştır. Süt örneklerinde enfeksiyona yol açan mikroorganizmalar arasında *E. coli*, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *S. agalactiae*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *S. uberis* ve *Staphylococcus chromogenes* (*S. chromogenes*) yer almaktadır. İzole edilen bakterilere ait yüzde/izolasyon oranı değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Süt örneklerinden izole edilen bakteriler ve izolasyon oranları

Bakteri	İzolat sayısı (n) ve Oranı (%)
<i>E. coli</i>	65 (26,10)
<i>Staphylococcus aureus</i>	53 (21,29)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	50 (20,08)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	30 (12,05)
<i>Enterococcus faecalis</i>	21 (8,43)
<i>Streptococcus uberis</i>	19 (7,63)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	11 (4,42)
TOPLAM	249 (100)

Ayrıca süt örneklerindeki SHS değerleri incelendiğinde değerlerin 50.000 ile 960.000 hücre/mL arasında değişkenlik gösterdiği ve ortalama değerlerin ise 333.862 hücre/mL düzeyinde olduğu

tespit edilmiştir. Analiz edilen örneklerin 21 (%36,2)'inde SHS değerinin kategorik olarak yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Süt örneklerinin somatik hücre sayılarının kategorik değerlendirilmesi

Parametre	Örnek sayısı	Düşük (%) [*]	Orta (%) [†]	Yüksek (%) [‡]
Somatik hücre sayısı (hücre/mL)	58	8 (13.8)	29 (50)	21 (36.2)

Somatik hücre sayısı: * <math> < 100 \times 10^3 </math>, † $100-400 \times 10^3$ hücre/mL, ‡ $> 400 \times 10^3$ hücre/mL

TARTIŞMA

Mastitisin hayvan sağlığını, süt kalitesini ve süt üretim ekonomisini olumsuz yönde etkilemesi ve büyük mali kayıplara neden olması nedeniyle mastitis, gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere her ülkeyi etkileyen küresel bir sorun olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle hastalığın tespiti büyük bir önem arz etmektedir. Bu kapsamda meme sağlığının takibinde ve çiğ sütün mikrobiyal kalitesinin belirlenmesinde SHS değerinin bilinmesi oldukça önem teşkil etmektedir. CMT, sütteki SHS tahmin etmek için kullanılan pratik ve ucuz bir test olmasının yanı sıra elde edilen yüksek değerler, artan mastitis olasılığı ve şiddeti ile doğru orantılı olarak ilişkilendirilmektedir (30-32). Ayrıca yürütülen çalışmalarda CMT değerlerinde bazı farklılıkların oluşabileceği de görülmektedir (33-37). Bu kapsamda çalışmamızdaki CMT değerleri incelendiğinde toplam %13,4 oranında pozitif reaksiyon olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde mastitisin süt sığırlarındaki rastlanma durumu ile ilgili önemli çalışmalar yürütülmüştür. Siyah-Alaca (33 baş) ve Esmer ırk (50 baş) ineklerden oluşan işletme sürüsünü içeren bir çalışmada CMT değerleri incelendiğinde ineklerin herhangi bir meme lobundan bu değer pozitif reaksiyon verme oranının %39,76 olduğu saptanmıştır (33). Diğer bir çalışmada ise Diyarbakır'da subklinik mastitis kapsamında 300 inek ve 1200 meme lobu araştırma altına alınmış ve CMT değerinin ineklerin

%89,18'inde ve sütlerin ise %66'sında pozitif sonuç verdiği ortaya konulmuştur (34). Yine benzer bir çalışmada süt sığırlarının %51,77'sinin, meme loplularının ise %28.04'ünün CMT pozitif sonuç verdiği saptanmıştır (35). Çetin ve ark. (36) tarafından yürütülen diğer çalışmada ise ortalama CMT pozitiflik oranı %26 olarak tespit edilmiştir. Gülcü ve Ertaş (37) ise Elâzığ yöresinde, 1950 hayvanı araştırma altına alarak yürüttükleri çalışmalarında ineklerin CMT pozitiflik oranının %8,2 olduğunu bulmuşlardır. Çalışmalar arasında farklı sonuçların ortaya çıkması, mastitisin çok faktörlü etiyojolojiye sahip karmaşık bir hastalık olmasının yanı sıra temin edilen süt örneklerinin farklı yıllara, dönemlere ve lokalizasyona ait olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Birçok ülkede mastitis oluşumu ve neden olan patojenin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yürütülmüş ve elde edilen veriler doğrultusunda *E. coli*, *S. aureus* ve *S. agalactia*'nın mastitis sütünde majör etken olarak aktif rol aldığı tespit edilmiştir (38-42). Bu kapsamda yürütülen araştırmalar incelendiğinde mastitis vakalarında özellikle bakteriyel patojenlerin rolünün araştırıldığı ve elde edilen verilerin ise birbirinden oldukça farklı olduğu görülmektedir. Abebe ve ark. (43) tarafından yürütülen bir çalışmada test edilen mastitis pozitif örneklerden izole edilen patojen bakterilerin %28,1'ini *Staphylococcus aureus*, %21,1'ini *E. coli*, %14'ünü *Bacillus spp.*, %14'ünü *Streptococcus spp.*, %12,3'ünü koagülaz negatif stafilkoklar, %5,3'ünü

aureus dışı stafilocoklar, %3,5'ünü *Enterobacter* spp., %1,8'ünü *Klebsiella* spp., %1,8'ünü *Corynebacterium* spp. ve %1,8'ünü *Proteus* spp. (%1,8)'in oluşturduğu rapor edilmiştir. Manasa ve ark. (44) ise yürüttükleri çalışmalarında çeşitli yarı organize özel çiftliklerden elde ettikleri 78 klinik mastitisli süt örneğinden, *E. coli*'nin neden olduğu sığır klinik mastitisinin %41 gibi yüksek bir insidans oranına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer başka bir çalışmada ise inceleme altına alınan örneklerin %41'inde *S. aureus*, %17'sinde koagulaz negatif stafilocok (KNS), %12'sinde *Enterobacter aerogenes*, %9,4'ünde *E. coli*, %8,5'inde *Streptococcus* spp., %6,8'inde *Klebsiella pneumoniae*, %5,1'in *Citrobacter* spp. ve %2,6'sinde ise *Bacillus* spp.'in izole edildiği ifade edilmiştir (45). Abera ve ark. (46) Etiyopya'da mastitisli inek sütlerinin %64,3'ünden, Persson ve ark. (47) İsveç'te %58'inden, Türütöğlü ve ark. (48) Türkiye'de %64,76'sından *Staphylococcus* spp.'in sorumlu olduğunu saptamışlardır. Tel ve ark. (49) ise Şanlıurfa'da yürüttükleri çalışmalarında CMT pozitif 181 (%72,4) inekten aldıkları 332 (%33,2) adet süt örneğinin mikrobiyolojik incelemesinde, örneklerin 84'ünden (%32,5) *S. aureus*, 71'inden (%27,5) KNS, 23'ünden (%8,9) *Streptococcus* spp., 16'sından (%6,2) *E. coli*, 15'inden (%5,8) *Arcanobacterium pyogenes*, 9'undan (%3,4) *Bacillus* spp., 8'inden (%3,1) *Corynebacterium bovis*, 7'sinden (%2,7) *Micrococcus* spp., 5'inden (%1,9) *Enterobacter aerogenes*, 5'inden (%1,9) *Candida* spp., 4'ünden (%1,5) *Pasteurella multocida*, 4'ünden (%1,5) *Klebsiella pneumoniae*, 4'ünden (%1,5) *Citrobacter diversus* ve 3'ünden (%1,1) ise *Pseudomonas auriginosa* olmak üzere toplam 258 aerobik bakterinin tespit edildiğini belirtmişlerdir. Elde edilen bu bulgular mastitis üzerine farklı cins ve türden birçok bakterinin sorumlu olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda ise mastitisli süt örneklerinin %37,76'sında *Staphylococcus* spp. ve %26,10' da ise *E. coli*'nin hakim olduğu tespit edilmiştir. Bahsi geçen bakterilerin izolasyon oranlarının yüksekliği ise, sığır mastitislerinde önemli etkenler arasında

yer aldığını göstermektedir. Çalışma sonuçları söz konusu benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında tespit edilen patojen mikroorganizma çeşitlerinde ve izolasyon oranlarında bazı farklılıkların olduğu da görülmektedir. Bu farklılıkların mastitise neden olan faktörlerin çeşitliliğine lokalizasyon ve çiftlik biyogüvenlik tedbirlerinin uygulanışına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir.

SHS değerinin tespiti ise meme sağlığı ve süt kalitesinin göstergesi olması nedeniyle özellikle gıda sektöründe üretim ve proses aşamalarında ürün kalitesinin artırması açısından oldukça önemli bir kriter olarak değerlendirilmektedir. Her ülkede SHS için yasal limit düzeyleri farklılık gösterse de Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği kapsamında Ülkemizde, SHS değerinin ayda en az 1 numune ile 3 aylık bir periyodun yuvarlanmış geometrik ortalamasının ≤ 400.000 hücre/ml olması gerektiği vurgulanmaktadır (6). Çalışmamızda elde edilen bulgular incelendiğinde ortalama değer (333,862 hücre/mL) ve örneklerin %63,8'inin belirtilen bu limitin değerinin altında olduğu görülmektedir. Ayrıca çalışmamız süt içeriğindeki SHS'nin belirlenmesini konu alan benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında SHS ortalama değer Çoban ve ark. (50), Kaygısız ve Karnak (51), Patır ve ark. (52) tarafından yürütülmüş olan çalışmalardaki değerlere kıyasla daha düşük; Hagnestam-Nielsen ve ark. (53), Olde-Riekerink ve ark. (54), Temelli ve Şerbetçioğlu (55) tarafından yürütülmüş olan çalışmalardaki değerlere kıyasla ise daha yüksek değere sahip olduğu saptanmıştır.

Mastitisin süt verimini büyük ölçüde etkileyerek verim kaybına ya da azalmasına neden olmasının yanı sıra süt kalitesini ve miktarını etkilediği ve hayvanların kabul edilemez bir yaşta itlaf edilmesine, sürü içerisinde kontaminasyon riski oluşturmasına neden olduğu bilinmektedir. Süt sığırlarında mastitisin görülmesi, gıda güvenliğine direkt olarak etki etmesi ile halk sağlığı üzerinde önemli bir role sahip bulunmaktadır. Ayrıca tüm bu faktörler dikkate alındığında ekonomik anlamda büyük bir kayba yol

açabileceği de görülmektedir. Bu bağlamda hastalığın önlenmesi hakkında bilgi sağlamak ve ekonomik açıdan önemli olan bu hastalık için uygun hastalık kontrol stratejileri ortaya koymak gerekmektedir. Bu nedenle mastitis risklerinin azaltılabilmesi amacıyla süt kontaminasyonunun azaltılmasına ve patojen mikroorganizmaların inaktif hale getirilmesine olanak sağlayan iyi süt işleme uygulamalarının devreye alınması gerekmektedir. Kaliteli çiğ süt üretimi, toplam kaliteye etki göstermesinin yanında, sütün besleyici özelliklerinin korunması ile halk sağlığı açısından olumlu etki sağlaması süt desteklemelerinden bakteriyolojik yük azalmasıyla üreticinin desteklemelerden daha fazla pay almasına neden olacaktır.

Çiğ sütte kalite parametrelerinden biri olan SHS subklinik mastitisin tespitinde CMT ile beraber kullanılan bir yöntemdir (56). Yapılan bazı araştırmalarda subklinik mastitis belirlenen sütteki yüksek SHS değerinin özellikle sütün fiziko-kimyasal

parametrelerinde bazı değişikliklere neden olduğu belirtilmektedir. Bunun temelinde ise bileşiminde bulunan yağ, laktoz ve kazein oranındaki azalmanın olduğu ifade edilmektedir. Bu azalmalara bağlı olarak ise süttten peynir üretim sürecindeki pıhtı oluşum süresinin uzaması, düşük pıhtı sertliği, randıman düşüklüğü ortaya çıkmaktadır. Bu durumda özellikle ürün kalitesi olumsuz olarak etkilenmektedir (57, 58) Ayrıca sütte SHS artışının süt içerisinde proteinazlarla ilişkili olarak protein dağılımını etkilediği ve yüksek SHS değerinin sütlere polimorfonükleer lökosit (PMN Lökosit) kaynaklı yüksek lipoliz ile sütün yağ bileşimini olumsuz etkileyerek birçok süt ürününün kalitesinde istenmeyen durumlara neden olabileceği de bilinmektedir (59, 60). Bu nedenle çiftlikten sofraya gıda güvenliği sloganı ile sığır sütü üretiminde tüm proses aşamalarının takip edilerek izlenebilirliğinin sağlanmasının mikrobiyal kontaminasyonların azaltılmasında önemli etkiler yaratacağı düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed South Ethiopia. *BMC Vet Res*, 2016; 12(1): 1-11.
2. Mushtaq S, Shah AM, Shah A, Lone SA, Hussain A, Hassan QP, et al. Bovine mastitis: an appraisal of its alternative herbal cure. *Microb Pathog*, 2017; 114: 357-61.
3. Awandkar SP, Kulkarni MB, Agnihotri AA, Chavan VG, Chincholkar VV. Novel fluconazole-resistant zoonotic yeast isolated from mastitis. *Anim Biotech*, 2021; 34(3): 746-55.
4. Rovai M, Rusek N, Caja G, Saldo J, Leitner G. Effect of subclinical intramammary infection on milk quality in dairy sheep: I. Fresh-soft cheese produced from milk of uninfected and infected glands and from their blends. *Small Rumin Res*, 2015a; 125: 127-36.
5. Rovai M, Caja G, Quevedo JM, Manuelian CL, Saldo J, Salama AA, et al. Effect of subclinical intramammary infection on milk quality in dairy sheep: II. Matured-pressed cheese (Manchego) produced from milk of uninfected and infected glands and from their blends. *Small Rumin Res*, 2015b; 126: 59-67.
6. Anonim. 2011: T.C. Cumhurbaşkanlığı mevzuat bilgi sistemi hayvansal gıdalar için özel hijyen kuralları yönetmeliği. <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=15664&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5>.
7. Abera A. Prevalence and associated risk factors of bovine mastitis in lactating cows of small holder dairy farms in Ethiopia. *J Vet Med Surg*, 2020: 4.
8. Mir AQ, Bansal BK, Gupta DK. Subclinical mastitis in machine milked dairy farms in Punjab: prevalence, distribution of bacteria and current antibiogram. *Vet World*, 2014; 7(5): 291-4.
9. Raszek MM, Guan LL, Plastow GS. Use of genomic tools to improve cattle health in the context of infectious diseases. *Front Genet*, 2016; 7(7): 30.
10. Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O'Kennedy R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotech*, 2009; 27(8): 486-93.
11. Huang JM, Wang XG, Jiang Q, Sun Y, Yang CH, Ju ZH, et al. Identification of CD14 transcript in blood polymorphonuclear neutrophil leukocytes and functional variation in Holsteins. *Genet Mol Res*, 2015; 15(2): 1-10.
12. Huilca-Ibarra MP, Vasco-Julio D, Ledesma Y, Guerrero-Freire S, Zurita J, Castillejo P, et al. High prevalence of *Prototheca bovis* infection in dairy cattle with chronic mastitis in Ecuador. *Vet Sci*, 2022; 9(12): 659.
13. Usman T, Yu Y, Zhai L, Liu C, Wang X, Wang Y. Association of CD4 SNPs with fat percentage of Holstein cattle. *Gen Mol Res*, 2016; 15(3): 15038697.
14. Ruegg PL. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci*, 2017; 100(12): 10381-97.
15. Tezera M, Ali EA. Prevalence and associated risk factors of bovine mastitis in dairy cows in and around Assosa town, Benishangul-Gumuz Regional State, Western Ethiopia. *Vet Med Sci*, 2021; 7(4): 1-7.
16. Lidet GM, Benti D, Feyissa B, Abebe M. Study on prevalence of bovine mastitis in lactating cows and associated risk factors in and around Areka town, southern of Ethiopia. *Afr J Microbiol Res*, 2013; 7: 5051-6.
17. Andersen S, Dohoo IR, Olde-Riekerink R, Stryhn H. Diagnosing intramammary infections: Evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. *J Dairy Sci*, 2010; 93(7): 2966-75.
18. Almag G, Melaku A. Prevalence of bovine subclinical mastitis in Gondar town and surrounding areas, Ethiopia. 2020.
19. Carrillo-Casas EM, Miranda-Morales RE. Bovine mastitis pathogens: prevalence and effects on Somatic Cell Count. Paris, France. Intech Open. 2012.
20. Kabelitz T, Aubry E, van Vorst K, Amon T, Fulde M. The role of *Streptococcus* spp. in bovine mastitis. *Microorganisms*, 2021; 9(7): 1497.

21. Ashraf A, Imran M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Anim Health Res*, 2020; 21(1): 36-49.
22. De Visscher A, Supré K, Haesebrouck F, Zadoks RN, Piessens V, Van-Coillie E, et al. Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. *Vet Microbiol*, 2014; 172(3-4): 466-74.
23. Erskine RJ. Mastitis in Cattle. *MSD Veterinary Manual*. 2020.
24. Kebede N, Tilahun A. Review on dairy cow mastitis and its economic impact. *Int J Adv Res*, 2023; 10(2): 109-25.
25. Usman T, Wang Y, Liu C, Wang X, Zhang Y, Yu Y. Association study of single nucleotide polymorphisms in JAK2 and STAT5B genes and their differential mRNA expression with mastitis susceptibility in Chinese Holstein cattle. *Anim Gen*, 2015; 46(4): 371-80.
26. Costa A, Neglia G, Campanile G, De Marchi M. Milk somatic cell count and its relationship with milk yield and quality traits in Italian water buffaloes. *J Dairy Sci*, 2020; 103: 5485-94.
27. Gürlü Z, Karadaş E, Kozan E, Çelik HA, Birdane FM, Kara R, et al. Investigation of effect of somatic cell count and seasons on buffalo milk quality. *Kocatepe Vet J*, 2021; 14(2): 268-73.
28. Indian Council Of Agricultural Research (ICAR). *Handbook of animal husbandry*. 3rd edition. New Delhi. 2011; 520-2.
29. Quinn PJ, Carter M, Markey BK, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*. Harcourt. Virginia. 2011; 331-44.
30. Deb R, Kumar A, Chakraborty S, Verma AK, Tiwari R, Dhama K, et al. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis. *Pakistan J Biolog Sci*, 2013; 16(23): 1653-61.
31. Tekkal H. Sığırlarda mastitisin teşhisinde mikrobiyolojik kültür ve çiftlikkültür yöntemlerinin karşılaştırılması. *Doktora Tezi*, Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2022.
32. Anonim. Somatik hücre sayısı ve kaliforniya mastitis test. *Hayvancılık projesi. Bilgi Kaynağı*: 18.
33. Sabuncuoğlu N, Çolak A, Akbulut Ö, Tüzemen N, Bayram B. Siyah-alaca ve esmer ineklerde CMT skoru ile bazı süt verim özellikleri arasındaki ilişkiler. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg*, 2003; 34: 139-43.
34. Yeşilmen S, Özyurtlu N, Bademkiran S. Diyarbakır yöresinde subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 2012; 1(4):24-2.
35. Saydan M, Kalkan C. Malatya arguvan yöresinde süt ineklerinde subklinik mastitis prevalansı. *Fırat Üniv Sağ Bil Vet Derg*, 2017; 31: 193-200.
36. Çetin M, Alan M. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi doğum ve jinekoloji kliniğinde karşılaşılan meme sorunları. *YYU Vet Fak Derg*, 2008; 2: 1-6.
37. Gülcü HB, Ertaş HB. Elazığ yöresinde mezbahada kesilen ineklerde mastitisli meme loblarının bakteriyolojik incelenmesi. *Turk J Vet Anim Sci*. 2004; 28: 91-4.
38. Awandkar SP, Khode NV, Sardar VM, Mendhe MS. Prevalence and current antibiogram trend of mastitic agents in udgir and its vicinity. Maharashtra State, India. *Int J Dairy Sci*, 2009; 4: 117-22.
39. Hussain A, Shakoore A, Akbar-Shahid M, Numan M, Gulraiz F. Clinical and subclinical staphylococcus aureus mastitis in dairy buffaloes: disease characteristics and antibiotic susceptibility profiles of isolates. *Int J Agric Res*, 2007; 2(9): 804-11.
40. Junaidu AU, Salihu M, Tambuwala FM, Magaji AA, Jaafaru S. Prevalence of mastitis in lactating cows in some selected commercial dairy farms in sokoto metropolis. *Adv Appl Sci Res*, 2011; 2(2): 290-4.
41. Nüesch-Inderbinnen M, Käppeli N, Morach M, Eicher C, Corti S, Stephan R. Molecular types, virulence profiles and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* causing bovine mastitis. *Vet Rec Open*, 2019; 6(1): 000369.

42. Unakal CG, Kaliwal BB. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Vet World*, 2010; 3(2), 65-7.
43. Abebe R, Markos A, Abera M, Mekbib B. Incidence rate, risk factors, and bacterial causes of clinical mastitis on dairy farms in Hawassa City. Southern Ethiopia. *Sci Rep*, 2023; 13: 10945.
44. Manasa V, Sai-Kumar T, Prasada-Rao T, Kamisetty AK. Incidence of bovine clinical mastitis caused by *Escherichia coli*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 2019; 8(5): 1249-56.
45. Çokal Y, Konuş R. Subklinik mastitisli ineklerin sütlerinden bakterilerin izolasyonu. *BAUN Sağ Bil Derg*, 2012; 1: 65-9.
46. Abera M, Habte T, Aragaw K, Asmare K, Sheferaw D. Major causes of mastitis and associated risk factors in smallholder dairy farms in and around Hawassa, Southern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*, 2012; 44: 1175-9.
47. Persson Y, Nyman AKJ, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand*, 2011; 53, 36.
48. Türütoğlu H, Mudut S, Pehlivanoğlu F. Antibiotic susceptibility and β -lactamase prevalence for *Staphylococci* isolated from bovine mastitic milk samples. *Acta Vet (Beograd)*, 2002; 52: 337-44.
49. Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Kaya NBA. Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı, aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Fırat Üniv Sağ Bil Vet Derg*, 2009; 23: 101-6.
50. Çoban O, Sabuncuoğlu N, Tüzemen N. Siyah alaca ve esmer ineklerde somatik hücre sayısına çeşitli faktörlerin etkisi. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 2007; 47(1): 15-20.
51. Kaygısız A, Karnak İ. Kahramanmaraş ili süt sığırı işletmelerinden toplanan çiğ süt örneklerinde somatik hücre sayısının AB normları ve subklinik mastitis bakımından değerlendirilmesi. *KSÜ Tar Doğa Der*, 2012; 15(3): 3-19.
52. Patır B, Can OP, Gürses M. Farklı illerden toplanan çiğ inek sütlerinde somatik hücre sayıları. *Fırat Üniv Sağ Bil Derg*, 2010; 24(2): 87-91.
53. Hagnestam-Nielsen C, Emanuelson U, Berglund B, Strandberg E. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *J Dairy Sci*, 2009; 92(7): 3124-33.
54. Olde-Riekerink RGM, Barkema HW, Stryhn H. The Effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *J Dairy Sci*, 2007; 90(4): 1704-15.
55. Temelli S, Şerbetcioğlu T. Bir süt işletmesinde işlenen inek sütlerinde somatik hücre sayısının dört yıllık periyottaki değişiminin incelenmesi. *Bursa Uludag Üniv Sağ Bil Vet Fak Derg*, 2011; 30(1): 1-7.
56. Düz M, Doğan YN, Doğan İ. Inek sütlerinde somatik hücre sayısı ile süt amiloid a, elektriksel iletkenlik ve pH arasındaki ilişkiler. *KASÜ Tar Doğa Derg*, 2021; 24(2): 457-63.
57. Kelly AL, Tiernan D, O'sullivan C, Joyce P. Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. *J Dairy Sci*, 2000; 83(2): 300-4.
58. Olechnowicz J, Jaśkowski JM. Somatic cells count in cow's bulk tank milk. *J Vet Med Sci*, 2012; 74(6): 681-686.
59. Gargouri A, Hamed H, El-Feki A. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with lipolysis. *Livest Sci*, 2008; 113(2-3): 274-9.
60. Velthuis AGJ, Van-Asseldonk MAPM. Process audits versus product quality monitoring of bulk milk. *J Dairy Sci*, 2011; 94(7): 235-49.

Çiftlik hayvanlarından izole edilen *Acinetobacter* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları

Antibiotic susceptibility of *Acinetobacter* spp. isolated from farm animals

Elçin GÜNAYDIN¹ (ID), Gülşen GONCAGÜL² (ID), Pınar MURSALOĞLU KAYNAR³ (ID),
Özlem KARDOĞAN⁴ (ID)

ÖZET

Amaç: *Acinetobacter* cinsi Gram-negatif kokobasil grubuna ait doğada yaygın olarak bulunan, heterojen bir organizma grubudur. Bu bakteriler insan ve hayvan kaynaklı olarak izole edilmektedir. Antimikrobiyal ajanlar hem insanlarda hem de hayvanlarda bulaşıcı hastalıkların tedavisinde hayati bir rol oynamaktadır. *Acinetobacter* cinsi antibiyotik dirençli bakteriler olarak insan ve hayvan sağlığı için giderek artan bir endişe kaynağıdır. Bu çalışmanın amacı, farklı hayvanların reproduktif organlardan *Acinetobacter* cinsine ait bakterilerin ve bu bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanmasıdır.

Yöntem: Çalışmamızda, Bursa ilinde bulunan atlardan (kısarak) 247 uterus swabı, Nevşehir ile Bursa illerindeki 56 dive (sığır) ve 32 inekten vajinal swab örneği alınmıştır. Bakteriolojik inceleme için Fluid Thioglycollate Medium (BBL; 221196) içerisine alınan örnekler, 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminden sonra EMB agar (Eosin Methylen-Blue Laktöz-Sakaroz, BBL; 221355) ve Kanlı Agar (BBL; 297876) besiyerinde izolasyon çalışması

ABSTRACT

Objective: The genus *Acinetobacter* is a heterogeneous group of organisms belonging to the Gram-negative coccobacillus group, widely found in nature. These bacteria are isolated from human and animal sources. Antimicrobial agents play a vital role in the treatment of infectious diseases in both humans and animals. *Acinetobacter* genus antibiotic resistant bacteria are of increasing concern for human and animal health. The aim of this study was to identify bacteria belonging to the genus *Acinetobacter* from reproductive organs of different animals and their antimicrobial susceptibility.

Methods: Our study material consisted of 247 uterine swabs from horses (mare), 56 heifers (cattle), and 32 vaginal swabs from cows in different regions. In bacteriological examination, the samples were incubated in Fluid Thioglycollate Medium (BBL; 221196) at 37 °C for 24 hours. After incubation, isolation studies were carried out on EMB agar (Eosin Methylen-Blue Lactose-Saccharose, BBL; 221355) and Blood Agar (BBL;

¹Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD., Kastamonu, Türkiye

²Bursa Uludağ Üniversitesi, Mennan Pasınlı Atçılık Meslek Yüksekokulu, Bursa, Türkiye

³Ankara Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD., Ankara, Türkiye

⁴Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Kanatlı Hayvan Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Elçin GÜNAYDIN

Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD., Kastamonu - Türkiye

E-posta / E-mail : elcingunaydin@kastamonu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 26.08.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 05.09.2024

gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen saf kültürlerin tanımlanması, BBL kristal (Becton-Dickinson, Sparks, USA) Gram pozitif ve Gram negatif ID sistem kitleri ile bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tanımlanan *Acinetobacter* spp. izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile farklı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları incelenmiştir.

Bulgular: Atlardan alınan 247 uterus swapından ve 56 düve vajinal swapından en fazla izole edilen *Acinetobacter lwoffii* (sırasıyla, n = 4 ve n=3), 32 inekten alınan vajinal swap örneğinden ise en fazla *Acinetobacter johnsonii* (n=3) elde edilmiştir. Tüm örneklerden *Acinetobacter lwoffii* izole edilmiştir. Atlardan izole edilen *Acinetobacter lwoffii*'ye karşı disk difüzyon yöntemi ile test edilen antibiyotiklerden amikasin, doksisisiklinin ve ampisilin/sulbaktama %100 etkili olduğu bulunmuştur. Aynı etkenin izole edildiği düvelerde ise bu antimikrobiyal ajanlara ilave olarak netilmisin ve gentamisine karşı %100 duyarlılık tespit edilmiştir. İneklerden izole edilen *Acinetobacter lwoffii*'ye uygulanan antimikrobiyal duyarlılık testinde ise düvelerde %100 duyarlılık gösteren antimikrobiyallerden başka ofloksasine de %100 duyarlılık saptanmıştır.

Sonuç: *Acinetobacter* spp., insan ile hayvanlar arasındaki bulaşmanın yakın zamanda kanıtlanması nedeniyle ciddi bir halk sağlığı sorununu temsil edebilir. Bu nedenle hayvancılık ortamındaki antibiyotik duyarlı *Acinetobacter* cinsi bakteriler hakkındaki bilgileri genişletilmesi daha sonra yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter*, inek, at, düve, antibiyotik duyarlılığı

297876). Identification of pure cultures obtained as a result of bacterial isolation studies was performed using BBL crystal (Becton-Dickinson, Sparks, USA) Gram positive and Gram negative ID system kits and computer program. The susceptibility of the identified *Acinetobacter* spp. isolates to different antibiotics was investigated by disc diffusion method.

Results: *Acinetobacter lwoffii* was isolated from 247 uterine swabs from horses and 56 vaginal swabs from heifers (respectively, n = 4 and n=3), while *Acinetobacter johnsonii* was determined from 32 vaginal swabs from cows (n = 3). *Acinetobacter lwoffii* was isolated from all samples. *Acinetobacter lwoffii* which was isolated most frequently in horses. Among the antibiotics tested by disc diffusion method, amikacin, doxycycline and ampisilin/sulbaktama were found to be 100% effective against. In addition to these two antimicrobial agents, 100% susceptibility was detected against netilmicin and gentamicin in heifers where the same agent was isolated. In the antimicrobial susceptibility test applied to *Acinetobacter lwoffii* isolated in cows, 100% susceptibility was found to ofloxacin in addition to the antimicrobials showing 100% susceptibility in heifers.

Conclusion: *Acinetobacter* spp. may also represent a serious public health problem due to recent evidence of transmission between human and animal. Therefore, we believe that expanding the knowledge about antibiotic-resistant *Acinetobacter* in the livestock environment will be a resource for future studies.

Key Words: *Acinetobacter*, cow, horse, heifer, antibiotic susceptibility

GİRİŞ

Acinetobacter spp. toprakta, tatlı su, okyanus ve kontamine alanlar gibi çok farklı ortamlarda bulunması nedeniyle oldukça yaygındır (1). Doğal yaşam alanlarında yaygınlığı nedeniyle gıda ve su

kirliliği ile insan ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu bakterilerin hemen hemen her yüzeye kolonize olabilmeleri ve farklı antibiyotiklere direnç kazanabilmeleri, onları diğer bulaşıcı bakterilerden ayırmaktadır. *Acinetobacter* spp. farklı hayvanlardan izole edilen, bazen de

ölümcül enfeksiyonlara neden olmasıyla hayvan yetiştiriciliği açısından da önemlidir (2). Dünya genelinde *Acinetobacter*'inde içinde yer aldığı çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların artması ile tedavi zorlukları ortaya çıkmaktadır (3). Hayvancılık ortamları, MDR gelişimi, iletimi ve yaygınlığı için önemli noktalar. MDR ve antibiyotik direnç genleri hayvan atıklarında, atık yönetim sistemlerinde ve çiftlikle ilişkili ortamlarda, tarımsal alanlarda, atmosferde ve gıda zincirinde yaygın olarak tespit edilmektedir (4, 5). Bu durum "Tek Sağlık" kavramı altında, halk sağlığı için öngörülemez riskler oluşturmaktadır. Halk sağlığı tehditlerini en aza indirmek için önemli bir bakteri olan *Acinetobacter*'in rutin olarak tespit edilmesini önermektedir (6). Hayvan bağırsakları, antibiyotik dirençli *Acinetobacter*'in yaşam alanları ve çevresel kaynaklarıdır (7). Çiftlik hayvanlarında reproduktif organlardaki konformasyon bozuklukları özellikle bağırsaklarda yaşayan mikroorganizmaların üreme kanalı içerisine girişine olanak sağladığı bildirilmekte ve özellikle çiftlik hayvanlarında üreme sisteminin enfeksiyonlarının doğru tedavi edilmediğinde infertiliteye yol açabilmekte, böylece yetiştiricilik açısından hala önemli bir ekonomik sorun yaratmaktadır (8-10). İnsanlarda infertilite vakalarında endometriyumundan izole edilmiş etkenler arasında *Acinetobacter* spp. varlığı bildirilmiştir (11). Özellikle çiftlik hayvanlarının yaşam alanları ve çevresel kaynaklı *Acinetobacter* spp. varlığının üreme kanalı içerisinde diğer bakterilerle birlikte bulunması ve doğal savunma mekanizmalarının olumsuz etkilenmesi ile bakteriler enfeksiyon riskini arttırdığı bildirilmektedir (12). Attili ve ark. (13), farklı hayvan türlerinde yaptığı çalışmada, atlarda *Acinetobacter* spp.'nin en fazla izolasyonunun genital ve üriner sistemden (%48) yapıldığını bildirmişlerdir. Çek Cumhuriyeti'nde evcil hayvanlarda *Acinetobacter* türlerin araştırılması üzerine yapılan çalışmada, ürogenital sistemden *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*'in %0,29, *A. pittii*'nin %0,87 oranında izole edildiği vurgulanmıştır (14). Nemeç ve ark. (15)

ilk olarak *A. pseudolwoffii* suşlarının izolasyonunu ruminantlarda, atlarda, kobaylarda, insanlarda ve rektal sürüntülerde ve çevresel örneklerde gerçekleştirmişlerdir. Diğer yapılan çalışmalarda; *A. lwoffii* olarak tanımlanan organizmaların insan, hayvan veya çevre örneklerinden yaygın olarak bulunduğu rapor edilmiş ve insanlarda fırsatçı enfeksiyonlarla da ilişkilendirilmiştir (16). Bu nedenle dünyada halk sağlığı açısından hayvanlarla ayrılmaz bir yaşamı olması nedeniyle önemli bir bakteri olarak tanımlanan *Acinetobacter* spp.'lerin saptanması ve etkili tedavinin gerçekleştirilmesi önerilmektedir (6). Bununla birlikte *Acinetobacter* spp.'lerin antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi de önemlidir. Dünyada birçok ülkede sağlıklı kısıraklardan izole edilen *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. gibi bakteriler antimikrobiyal direnç veya çoklu ilaç direnci göstermektedir (17). Özellikle *Acinetobacter* türlerindeki direnç artışı ve insan hekimliğinde de çoklu ilaca dirençli suşların ortaya çıkmasıyla endişe verici bir hal aldığı bildirilmektedir (18). Çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter* izolatlarının insan ve çeşitli hayvan türlerinde farklı sistemler üzerinde enfeksiyonları rapor edilmektedir. İnsan ve hayvanlarda yol açacağı enfeksiyonların tedavi süreçlerini olumsuz etkilemesi nedeniyle antimikrobiyal dirençliliği tehdit olarak görülmektedir. Özellikle yayılma olasılıkları, tedavi seçeneklerinin sınırlı olması nedeniyle endişe yaratmaktadır (19).

Bu çalışmada, farklı hayvanların reproduktif organlarından *Acinetobacter* cinsine ait bakteri türlerinin belirlenmesi ve elde edilen izolatların antimikrobiyal ajanlara duyarlılığının tanımlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney hayvanları kullanımının etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinleri, 15.02.2014 Tarih ve 28914 Sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına

Dair Yönetmelik'in 8. maddesinin k) fıkrası gereği; dışkı veya altlık toplama örneği, sürüntü ile örnek alma, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (HAYDEK) iznine tabi değildir. Bu çalışma, 2022-2023 yılları arasında Bursa ilinde bulunan atlardan (kısarak) 247 uterus swapı, Nevşehir ile Bursa illerindeki 56 düve (sığır) ve 32 inekten vajinal swap olmak üzere toplam 335 numune alınarak çalışılmıştır. Alınan sürüntü örnekleri, Fluid Thioglycollate Medium (BBL; 221196) içerisinde ve soğuk zincir şartları altında laboratuvara ulaştırılmıştır. Bakteriyolojik incelemede, Fluid Thioglycollate Medium (BBL; 221196) içerisinde bulunan örnekler, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminden sonra EMB agar (Eosin Methylen-Blue Laktoz-Sakaroz, BBL; 221355) ve Kanlı Agar (BBL; 297876) besiyerlerinde izolasyonu yapılmıştır. Genel bakteriyolojik incelemeler için besiyerleri aerobik koşullarda, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminden sonra gelişen kolonileri, koloni morfolojisi ve Gram boyama özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Bakteriyel izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen saf kültürlerin tanımlanması, BBL Kristal (Becton-Dickinson, Sparks, USA) Gram pozitif ve Gram negatif ID sistem kitleri ile bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının saptanması

Saf kültürlerin antimikrobiyal duyarlılıkları, Mueller Hinton Agar besiyeri kullanılarak, Kirby Bauer Disk Difüzyon yöntemiyle test edilmiştir (20). Antibiyogramda imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), tobramisin (10 µg), netilmisin (30 µg), ofloksasin (5 µg), amikasin (30 µg), doksisisiklin (30 µg), ampisilin/sulbaktam (20 µg), gentamisin (10 µg), seftazidim

(30 µg), ko-trimoksazol (25 µg) ve piperasilin (100 µg) antibiyotik diskleri kullanılarak duyarlılıkları test edilmiştir. İzolatlardan steril %9'luk fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde 0,5 McFarland standardında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Steril pamuklu eküvyon çubuğu, bu solüsyon içerisine daldırılarak Müller-Hinton Agar besiyeri üzerine ekimi yapılmıştır. Antibiyotik diskleri agar yüzeyine yerleştirilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra zon çapları CLSI rehberine göre değerlendirilmiştir (21). Netilmisin ve ofloksasin duyarlılığını değerlendirmek için *P. aeruginosa*'ya ilişkin referans değerleri kullanılmıştır. Ortamın ve disklerin kalitesi, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) referans suşları ile doğrulanmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde, örneklerden izole edilen *Acinetobacter* bakteri tür sayıları (n) ve bu bakterilerin antibiyotik duyarlılık oranlarını yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda, herhangi bir tedavi sürecinde olmayan atlardan alınan 247 uterus swap örneğinin dördünde *A. lwoffii* (%1,62), üçünde *A. johnsonii* (%1,21), birer adet de *A. calcoaceticus* (%0,4), *A. pittii* (%0,4); 56 düveden alınan vajinal swap örneğinin üçünde *A. lwoffii* (%5,36), ikisinde *A. calcoaceticus* (%3,57) ve 32 inekten alınan vajinal swap örneğinde ise ikisinde *A. lwoffii* (%6,25), üçünde *A. johnsonii* (%9,38) izole edilmiştir. Çiftlik hayvan örneklerinden izole edilen *Acinetobacter* bakteri türlerinin sayısı (n) ile % oran değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çiftlik hayvanlarından izole edilen *Acinetobacter* bakteri türlerinin sayısı ve % oran değerleri

<i>Acinetobacter</i> Bakteri Türünün Adı	At (Kısarak) (n=247)		Sığır (Düve) (n=56)		İnek (n=32)	
	n	%	n	%	n	%
<i>A. lwoffii</i>	4	1,62	3	5,36	2	6,25
<i>A. johnsonii</i>	3	1,21	-	-	3	9,38
<i>A. calcoaceticus</i>	1	0,4	2	3,57	-	-
<i>A. pittii</i>	1	0,4	-	-	-	-

n: sayı, -: izole edilmedi

Acinetobacter spp.'lerin test edilen imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), tobramisin (10 µg), netilmisin (30 µg), ofloksasin (5 µg), amikasin (30 µg), doksisisiklin (30 µg), ampisilin/sulbaktam (20 µg), gentamisin (10 µg), seftazidim (30 µg), ko-trimoksazol (25 µg) ve piperasilin (100 µg) antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarının disk difüzyon yöntemi ile belirlen zon çaplarının (mm) CLSI (21) rehberinin duyarlı (S) ve dirençli (R) sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir. Çiftlik hayvanlarından elde edilen *Acinetobacter* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının yüzde (%) dağılımları da Tablo 2'de sunulmuştur.

Çalışmamızda, at örneklerinde en fazla izole edilen *A. lwoffii*'ye karşı antibiyotiklerden amikasin, doksisisiklin ve ampisilin/sulbaktama karşı %100 duyarlılık bulunmuştur. Düve örneklerinden izole edilen aynı etkenin ise bu antimikrobiyal ajanlara ilave olarak netilmisin ve gentamisine karşı %100 duyarlılıkları tespit edilmiştir. İneklerden alınan örneklerden izole edilen *A. lwoffii*'de

ise düve örneklerinde %100 duyarlılık gösteren antimikrobiyallerden başka ofloksasine karşı %100 duyarlılık saptanmıştır. At ve düve örneklerindeki *A. johnsonii* bakterinin ise imipenem, meropenem, tobramisin, ofloksasin, amikasin, doksisisiklin, ampisilin/sulbaktam, gentamisin ve ko-trimoksazole karşı %100 duyarlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca düve örneklerinden izole edilen *A. johnsonii* bakterisinin netilmisin ve piperasiline karşı %100 duyarlılığı görülmüştür (Tablo 2). At ve düve örneklerinden izole edilen *A. calcoaceticus* bakterisinin sadece seftazidime karşı duyarlılığı tespit edilmezken diğer antibiyotiklere karşı duyarlılıkları görülmüştür. At örneklerinden izole edilen *A. pittii*'nin imipenem, meropenem, tobramisin, netilmisin, ofloksasin, amikasin, doksisisiklin, ampisilin/sulbaktam ve gentamisin antibiyotiklerine karşı duyarlılığının (%100) olduğu görülürken seftazidim, ko-trimoksazol ve piperasiline karşı duyarlılığının bulunmadığı (%0) saptanmıştır.

Tablo 2. Çiftlik hayvanlarından elde edilen *Acinetobacter* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları (%)

Antibiyotik	<i>A. lwoffii</i>			<i>A. johnsonii</i>		<i>A. calcoaceticus</i>		<i>A. pittii</i>
	At (Kısrak)	Düve (Sığır)	İnek	At (Kısrak)	İnek	At (Kısrak)	Düve (Sığır)	At (Kısrak)
İmipenem	75	66,7	50	100	100	100	100	100
Meropenem	75	66,7	50	100	100	100	100	100
Tobramisin	75	66,7	50	100	100	100	50	100
Netilmisin	75	100	100	100	66,7	100	100	100
Ofloksasin	50	66,7	100	66,7	66,7	100	100	100
Amikasin	100	100	100	100	100	100	50	100
Doksisisiklin	100	100	100	100	100	100	100	100
Ampisilin/sulbaktam	100	100	100	100	100	100	100	100
Gentamisin	75	100	100	100	100	100	100	100
Seftazidim	75	66,7	50	66,7	66,7	0	0	0
Ko-trimoksazol	75	66,7	50	66,7	66,7	100	100	0
Piperasilin	75	66,7	50	100	100	100	100	0

TARTIŞMA

Günümüzde hayvanların üreme ortamlarının, doğrudan ve dolaylı temas yoluyla diğer hayvanlara ve insanlara yayılabilen farklı mikroorganizmaların kaynağı olduğu kabul edilmektedir (19). Enfeksiyon ajanlarının insanlardan hayvanlara veya hayvanlardan insanlara yayılma olasılığının engellenmesi için hızlı ve doğru bir şekilde suşların tanımlanması ile etkili bir tedavinin gerçekleşmesi gerektirmektedir (22). Yapılan farklı çalışmalarda; endişe verici düzeyde, çoklu ilaç dirençliliği oranına sahip *Acinetobacter* spp.'lerin insan dışında hayvanlar arasında da yaygın bir patojen olduğunu göstermektedir (22, 23). Çalışmamızda, farklı hayvan türlerinin ürogenital sisteminden izole edilen *Acinetobacter* spp.'lerde çoklu ilaç direnci gözlenmemiştir. Son yıllarda hayvanlarda yapılan çalışmalar; hastanelerde veya klinik ortamlardan edinilen *A. baumannii*'nin köpeklerde, kedilerde, atlarda ve diğer hayvanlarda enfeksiyonlara neden olduğunu göstermiştir (24-28). Çalışmamızda, *A. baumannii* izole edilememiştir. Yapılan çalışmalarda *A. baumannii*'nin yanı sıra *A. radyoeresistens*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. ursingii*, *A. guillouiae*, *A. beijerinckii*, *A. townneri* ve *A. gandensis* dahil olmak üzere diğer türler hayvanlardan izole edilmiştir (25-27). Çalışmamızda; *A. johnsonii* ve *A. lwoffii* en fazla izole edilen ajanlar olmuştur. Ayrıca yapılan bu çalışmalardan farklı olarak *A. calcoaceticus* ve *A. pittii* izolasyonu gerçekleşmiştir. Çalışmamızda izole edilen *A. calcoaceticus* ile ilgili olarak özellikle yapılan farklı çalışmalarda hastanede yatan refakatçi hayvanlarda ve atlarda çoklu ilaca dirençli *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB) kompleks suşlarının veteriner ve halk sağlığı için bir tehdit olarak ortaya çıkabileceğine dair endişelerin artmakta olduğu vurgulanmıştır (22, 28, 29). Singh ve ark. (30) yaptıkları çalışmada da beş vakadan izole edilen *A. calcoaceticus*-*baumannii* kompleks suşlarının iki vakada tek bir bakteri olarak izole edildiği ve özellikle insanlarda hastane enfeksiyonlarının bir nedeni olarak kabul edilen bu bakterinin hayvanlarda ölüm veya septisemi nedeni olarak nadiren rapor edilmesi ve veteriner hekimlik alanında ihmal edilen patojenlerden biri olarak kabul edilmesi nedeniyle endişe verici olduğunu

bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da at ve düve örneklerinde sırasıyla *A. calcoaceticus* etkenini %0,40 ve %3,57 oranında ürogenital sistemde izole edilmiştir. *Acinetobacter* izolatlarının %88,89'unda MDR ve %33,33'ünde karbapenem dirençli (KR) bulunduğu bildirilmiş ve çalışmanın yapıldığı bölgede su kütlelerinde bulunan *Acinetobacter* izolatlarında bildirilen MDR ve KR oluşumunun oldukça yüksek olduğunun vurgulanması bulaş kaynağını göstermiştir (7). Bizim çalışmamız gibi bölgesel *Acinetobacter* spp. yüksek ilaç direnci seviyeleri, bölgedeki hayvan sağlığının tedavi süreci ile korunması için kaynak teşkil edeceği öngörülmektedir. Ayrıca Al Atrouni ve ark. (7), none-ACB komplekse ait izolatlar arasında, *A. lwoffii* (%18,75), *A. johnsonii* (%12,25), *A. courvalinii* (%12,25), *A. bereziniae* (%6,25)'yi ortam, hayvan, insan ve gıda dahil olmak üzere farklı ekosistemlerde izole ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da dominant izolat olarak benzer etkenlerin izole edildiği görülmüştür. Crippen ve ark. (31) farklı yetiştirme ortamlarındaki ineklerden yaptıkları çalışmada, *Acinetobacter* spp.'nin en baskın bakterisi (%16,42) olduğunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca *A. lwoffii* üçüncü (%2,86) ve *A. pseudolwoffii* beşinci sırada en sıklıkla (%2,79) izole edildiği de rapor edilmiştir. İneklerde yapılan diğer bir çalışmada da özellikle *Acinetobacter* spp.'nin doğada ve vajinal mukozada yoğun bulunduğu; bunun yanında antibiyotik dirençli *A. calcoaceticus* suşlarının kontamine boğa sperması ile *in vitro* fertilizasyon sistemine dahil olduğu da bilinmektedir (32, 33). Bizim çalışmamızda da yer alan hayvan gruplarından en fazla izole edilen *A. lwoffii* etkeninin ineklerde abortusa da neden olduğu ve fertilizasyon açısından değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda *in vitro* fertilizasyon uygulamalarında biyogüvenliğin önemini de ortaya koymaktadır. Çin'de, subklinik mastitisli sığır sütünden izole edilen *A. lwoffii* suşlarına antimikrobiyal duyarlılık ve direnç profilini tanımlamak üzere yapılan çalışmada; spesifik olarak 23 antibiyotik arasında suşların doksisisiklin, eritromisin polimiksin, klindamisin, imipenem ve meropenem dahil olmak üzere altı antibiyotiğe tamamen duyarlı bulunurken (34); çalışmamızda da doksisisiline karşı tam duyarlılık belirlenmiş; imipenem ve meropenem'e karşı daha

düşük duyarlılık tespit edilmiştir. *A. lwoffii* için ilaç direnci paternindeki farklılık ise farklı bölgelerde farklı ilaçların kullanılmasından kaynaklanmıştır. Bu durum da takip çalışmalarının önemini ortaya koymaktadır. Çiftlik ortamında *Acinetobacter* spp. yaygınlığı “Tek Sağlık” yönüyle değerlendirildiğinde de *Acinetobacter* izolatlarının süt için antibiyotik dirençliliğinin sürmesinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışma çiftlik hayvanlarında *Acinetobacter* spp.’lerin ürogenital sistem

içerisinde yaygınlığı ve antibiyotik duyarlılığına sahip *Acinetobacter*’lerin kayda değer yaygınlığı rapor edilmiştir. Antibiyotik direnç gen transferinin araştırılması ve mevcut antibiyotik direnç kriziyle mücadele etmek için özellikle çiftlik hayvanlarında *Acinetobacter* spp.’ler üzerine yenilikçi çözümler geliştirmek amacıyla yeni araştırmaların yapılmasının “Tek Sağlık” kavramı ve halk sağlığı risklerinin değerlendirilmesi açısından önemli olacağı görülmüştür.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Mahjoubi M, Jaouani A, Guesmi A, Amor SB, Jouini A, Cherif H, et al. Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential, *New Biotechnology*, 2013; 30(6): 723-33.
2. Francey T, Gaschen F, Nicolet J, Burnens AP. The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. *J Vet Res*, 2000; 14(2): 177-83.
3. Gajdác M, Albericio F. Antibiotic resistance: from the bench to patients. *Antibiotics*, 2019; 8(3): 129.
4. Gao FZ, Zou HY, Wu DL, Chen S, He LY, Zhang M, et al. Swine farming elevated the proliferation of *Acinetobacter* with the prevalence of antibiotic resistance genes in the groundwater. *Environ Int*, 2020; 136: 105484.
5. Bai H, He LY, Wu DL, Gao FZ, Zhang M, Zou HY, et al. Spread of airborne antibiotic resistance from animal farms to the environment: dispersal pattern and exposure risk. *Environ Int*, 2022; 158: 106927.
6. Guidelines for Drinking-Water Quality. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 2011.
7. Al Atrouni A, Joly-Guillou ML, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of Non-baumannii *Acinetobacter* Species. *Front Microbiol*, 2016; 7: 49.
8. Günaydın E, Goncagül G, Özdemir Salcı ES. Evaluation of cultivable aerobic vaginal microbiota of repeat breeder and healthy pregnant dairy cows. *Turk Bull Hyg Exp Bio* 2024; 81(3): 331-40.
9. Gilbert RO. Management of reproductive disease in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2016; 32: 387-410.
10. Neubrand L, Wagener K, Drillich M. Bovine uterine diseases: aspects of microbiology, molecular biology, and immunology. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere*, 2020; 48:253-61.
11. Devi CA, Ranjani A, Dhanasekaran D, Thajuddin N, Ramanidevi T. Surveillance of multidrug resistant bacteria pathogens from female infertility cases. *African J Biotech*, 2013; 12(26): 4129-34.

12. Günaydın E, Goncagül G, Mursaloğlu Kaynar P. Repeat breeder ineklerde genital kanal bakteriyolojisi ve antibiyotik direnç profilleri. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2023; 80(4): 513-22.
13. Attili AR, Nocera FP, Sisto M, Linardi M, Gigli F, Ngwa VN, et al. Evidence and antibiotic resistance profiles of clinical *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (ACB) and non-ACB complex members in companion animals: A 2020-2022 retrospective study. *Comparative Immunology, Microbiol Infect Dis*, 2024; 109: 102185.
14. Bzdil J, Holy O, Toporcak J. Gram-negative aerobic and microaerophilic microorganisms isolated from pathological processes and lesions of horses. *Veterinární Medicína*, 2018; 63(2): 55-62.
15. Nemeč A, Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, Nemeč M, Clermont D, Bzdil J, et al. Revising the taxonomy of the *Acinetobacter lwoffii* group: the description of *Acinetobacter pseudolwoffii* sp. nov. and emended description of *Acinetobacter lwoffii*. *Syst Appl Microbiol*, 2019; 42(2): 159-67.
16. Turton JF, Shah J, Ozongwu C, Pike R. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J Clin Microbiol*, 2010; 48: 1445-9.
17. Weese JS. Infection control in veterinary practice; the time is now. *J Small Anim Pract*, 2011; 52: 507-8.
18. Kurcik-Trajkovska B. *Acinetobacter* spp. - A serious enemy threatening hospitals worldwide. *Macedon J Med Sci*, 2009; 2(2): 157-62.
19. Anyanwu MU, Jaja IF, Nwobi OC, Mgbearhuruie AC, Ikpendu CN, Okafor NA, et al. Epidemiology and traits of mobile colistin resistance (mcr) gene-bearing organisms from horses. *Microorganisms*, 2022; 10: 1499.
20. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol 1. Washington. DC: Am Soc Microbiol, 2016.
21. CLSI M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing- Supplement M100. Philadelphia: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2023.
22. Nocera FP, Addante L, Capozzi L, Bianco A, Fiorito F, De Martino L, et al. Detection of a novel clone of *Acinetobacter baumannii* isolated from a dog with otitis externa. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2020; 70: 101471.
23. Maboni G, Seguel M, Lorton A, Sanchez S. Antimicrobial resistance patterns of *Acinetobacter* spp. of animal origin reveal high rate of multidrug resistance. *Vet Microbiol*, 2020; 245: 108702.
24. Wareth G, Neubauer H, Sprague LD. *Acinetobacter baumannii* - a neglected pathogen in veterinary and environmental health in Germany. *Veterinary Research Communications*, 2019; 43(1):1-6.
25. Kimura Y, Harada K, Shimizu T, Sato T, Kajino A, Usui M, et al. Species distribution, virulence factors and antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. isolates from dogs and cats: A preliminary study. *Microbiol Immun*, 2018; 62(7): 462-6.
26. Kozińska A, Paździor E, Pękala A, Niemczuk W. *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii*-the emerging fish pathogens. *J Vet Res*, 2014; 58(2): 193-9.
27. Püntener-Simmen S, Zurfluh K, Schmitt S, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M. Phenotypic and genotypic characterization of clinical isolates belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (ACB) complex isolated from animals treated at a veterinary hospital in Switzerland. *Front Vet Sci*, 2019; 6: 17.
28. Hérivaux A, Pailhoriès H, Quinqueneau C, Lemarié C, Joly-Guillou ML, Ruvoen N, et al. First report of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* carriage in pets from the community in France. *Int Soc Chemoth*, 2016; 48(2): 220-1.
29. Ewers C, Klotz P, Leidner U, Stamm I, Prenger-Berninghoff E, Göttig S, et al. OXA-23 and ISAbA1-OXA-66 class D B-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. *Int J Antimicrob Agents*, 2017; 49(1): 37-44.
30. Singh BR, Karthikeyan R, Sinha DK, Vinodhkumar OR, Jaykumar V, Yadav A, et al. Potentially pathogenic bacteria in water bodies and drinking water supplies in and around Bareilly, India. *Acta Sci Microbiol*, 2022; 5(9): 113-26.
31. Crippen TL, Kim D, Poole TL, Swiger SL, Anderson RC. The bacterial and archaeal communities of flies, manure, lagoons, and troughs at a working dairy. *Front Microbiol*, 2024; 14: 1327841.
32. Husted JR. Bacterial and fungal organisms in the vagina of normal cows and cows with vaginitis. Doctoral Dissertation, Texas A&M University, 2005.
33. Bielanski A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*, 2007; 68(1): 1-22.
34. Chen Q, Zhou W, Cheng Y, Wang G, San Z, Guo L, et al. Four novel *Acinetobacter lwoffii* strains isolated from the milk of cows in China with subclinical mastitis. *BMC Vet Res*, 2024; 20(1): 274.

Investigation of organic acid levels as a prognostic indicator in Covid-19 positive patients

Covid-19 pozitif hastalarda prognostik bir göstergesi olarak organik asit düzeylerinin araştırılması

Ceylan BAL¹ (ID), Ayşe KAYA KALEM³ (ID), Sevilay SEZER² (ID), Bircan KAYAASLAN³ (ID), Fatma ESER³ (ID), İmran HASANOĞLU³ (ID), Adalet AYPAK³ (ID), Rahmet GÜNER³ (ID), Özcan EREL¹ (ID), Gülsen YILMAZ¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Ever since Covid-19 outbreak in Wuhan, China, medical scientists actively strive to contribute in the diagnosis and management of the disease. For this purpose, many markers have been studied so far for the follow-up and prognosis of the disease, apart from these routine tests, the number of targeted and untargeted metabolomic studies have been growing gradually. Organic acids are the intermediate products in various metabolic pathways. Abnormal urinary organic acids can be present in amino acid and carbohydrate metabolism disorders, mitochondrial fatty acid beta oxidation disorders, and some mitochondrial oxidative phosphorylation defects. The aim of this study is to evaluate the organic acids detected in the urine due to the metabolic processes that may be affected by hypoxia in Covid-19 patients who develop clinically mild, moderate and severe pneumonia, to determine their relationship with the disease severity and to compare the results with the control group.

Methods: A total of 120 patients with the clinical spectrum of SARS-CoV-2 infection as mild, moderate and

ÖZET

Amaç: Covid-19 salgınından bu yana, tıp bilim adamları aktif olarak hastalığın teşhisine ve tedavisine katkıda bulunmaya çalışmaktadırlar. Bu amaçla bugüne kadar hastalığın takibi ve prognozu için birçok belirteç çalışılmıştır. Rutin testlerin dışında hedefli ve hedefsiz metabolomik çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Organik asitler, çeşitli metabolik yollardaki ara ürünlerdir. Anormal üriner organik asit düzeylerine, amino asit ve karbonhidrat metabolizması bozukluklarında, mitokondriyal yağ asidi beta oksidasyon bozukluklarında ve bazı mitokondriyal oksidatif fosforilasyon kusurlarında rastlanabilir. Bu çalışmanın amacı, klinik olarak hafif, orta ve şiddetli pnömöni gelişen Covid-19 hastalarında hipoksiden etkilenebilecek metabolik süreçler nedeniyle idrarda saptanan organik asit düzeylerini değerlendirmek, hastalık şiddeti ile ilişkisini belirlemek ve sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırmaktır.

Yöntem: Bu çalışmaya SARS-CoV-2 enfeksiyonunun klinik spektrumu Dünya Sağlık Örgütü Covid-19 hastalık

¹Ankara Yıldırım Beyazıt University, Department of Biochemistry, Ankara, Türkiye

²Ankara City Hospital, Department of Biochemistry, Türkiye

³Ankara City Hospital, Department of Infectious Disease and Clinical Microbiology, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Ceylan BAL

Ankara Şehir Hastanesi, Bilkent, Çankaya, Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 23.03.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 27.12.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.88528

Bal C, Kaya Kalem A, Sezer S, Kayaaslan B, Eser F, Hasanoğlu İ, Aypak A, Güner R, Erel Ö, Yılmaz G. Investigation of organic acid levels as a prognostic indicator in Covid-19 positive patients. Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(4): 387 - 398

severe according to the WHO Covid-19 disease severity classification were included in the present study. First morning urine samples taken inpatient setting were aliquoted and frozen immediately until the analysis day. Urine organic acid levels were measured using Gas chromatography-mass spectrometry.

Results: Among 104 organic acids, pyruvic acid, lactic acid, 2-hydroxybutyric acid levels were significantly higher in the severe disease group ($p=0.006$, $p<0.001$, $p<0.001$, respectively), citric acid and homovanilic acid (HVA) levels were significantly lower in all disease groups ($p<0.001$), α -ketoglutaric acid, vanillylmandelic acid and succinic acid levels were significantly lower in the severe and moderate disease group ($p<0.001$), β -hydroxybutyric acid was significantly higher in the severe and moderate disease group ($p<0.001$), oxalic acid was significantly higher in the moderate disease group compared to the control group ($p=0.041$). The binary logistic regression model included, α -ketoglutaric acid, succinic acid, and HVA. It was statistically significant with $\chi^2 = 98.680$; $p < 0.001$.

Conclusion: α -ketoglutaric acid, succinic acid and HVA were independent predictors of the disease severity, measurement of these specific metabolites might facilitate the developments of novel therapies and may improve responses to currently available therapies with the ease of prognosis prediction of Covid-19.

Key Words: Covid-19, severity, organic acids, urine, GC-MS

şiddeti sınıflandırmasına göre hafif, orta ve şiddetli olarak kabul edilen toplam 120 hasta dahil edildi. Yatan hastalardan alınan sabah ilk idrar örnekleri alikotlara ayrıldı ve analiz gününe kadar donduruldu. İdrar organik asit seviyeleri, Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: 104 organik asit arasında piruvik asit, laktik asit, 2-hidroksibütirik asit düzeyleri ağır hastalık grubunda anlamlı olarak yüksekti, (sırasıyla $p=0,006$, $p<0,001$, $p<0,001$), sitrik asit ve homovanilik asit (HVA) düzeyleri ise tüm hastalık gruplarında anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0.001$), α -ketoglutarik asit, vanililmandelik asit ve süksinik asit seviyeleri, şiddetli ve orta hastalık grubunda anlamlı olarak düşüktü ($p<0.001$), β -hidroksibütirik asit, şiddetli ve orta hastalık grubunda anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$), oksalik asit orta hastalık grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p=0,041$). İkili lojistik regresyon modeli, α -ketoglutarik asit, süksinik asit ve HVA'yı içeriyordu. $\chi^2 = 98.680$ ile istatistiksel olarak anlamlıydı; $p < 0.001$.

Sonuç: α -ketoglutarik asit, süksinik asit ve HVA, hastalık şiddetinin bağımsız belirteçleri olarak bulundu. Bu spesifik metabolitlerin ölçümü, yeni tedavilerin geliştirilmesini kolaylaştırabilir ve Covid-19'un prognoz tahminini kolaylaştırarak mevcut tedavilere verilen yanıtları iyileştirebilir.

Anahtar Kelimeler: Covid-19, şiddet, organik asitler, idrar, GC-MS

INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (Covid-19) is an ongoing worldwide pandemic, affecting 767 million people and causing death of more than 6.9 million people to date (1). The major clinical signs are fever, cough and fatigue, and also lymphopenia, pneumonia, multi-organ failure and death can be seen in severe and uncontrolled cases. Although most of the cases are

mild, hypoxia plays an important role in the formation of undesirable clinical results particularly in severe cases. During hypoxia, along with the physiological changes for returning oxygen level to normal, there are also changes at the molecular level such as the induction of Hypoxia-inducible factor 1- α (HIF 1- α). HIF 1- α is the main regulatory molecule of oxygen homeostasis in mammals and has crucial roles on metabolism during hypoxic conditions. HIF 1- α acts as

a factor to increase the transcription and translation of most glycolytic enzymes and Glucose transporter 1 (GLUT1) and Glucose transporter 3 (GLUT3) to overcome the energy shortage due to disruption of the oxidative phosphorylation as the main source of ATP production. Anaerobic glycolysis increases, pyruvate is converted to lactate in order to maintain NAD⁺/NADH equilibrium. Other α -keto-acid oxidases, such as malate dehydrogenase, also help to replace the cytosolic NAD⁺ pool in a hypoxic environment. HIF 1- α also affects metabolic processes such as fatty acid synthesis, sterol synthesis, triglyceride synthesis and β -oxidation of fatty acids in lipid metabolism (2, 3)

Organic acids are water-soluble compounds that do not contain amino groups and contain one or more carboxyl groups as well as functional groups. In our body, they appear as intermediate products in various metabolic pathways. More than 500 organic acids have been identified in the urine, and although these can be seen in the urine of clinically normal individuals; a single organic acid or combinations of organic acids might increase when several metabolic pathways are blocked. Abnormal urinary organic acids can be present in amino acid and carbohydrate metabolism disorders, mitochondrial fatty acid β oxidation disorders, and some mitochondrial oxidative phosphorylation defects. Besides, urinary organic acid levels may increase in sterol, neurotransmitter, vitamin, purine and pyrimidine metabolism disorders (4). Along with genetic and metabolic diseases, it has been reported that organic acid levels in the urine are increased in certain pathological conditions such as ketosis associated with renal dysfunction types (5).

Ever since Covid-19 outbreak in Wuhan, China, medical scientists actively strive to contribute in the diagnosis and management of the disease. For this purpose, many markers have been studied so far for the follow-up and prognosis of the disease, including coagulation factors, hematological markers, inflammation markers, cardiac markers, hepatic markers, muscle markers, renal markers and electrolytes. Among these markers, white blood cell,

neutrophil, lymphocyte, platelet count, C-reactive protein (CRP), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), D-dimer, fibrinogen and procalcitonin levels have been associated with the prognosis of the disease (6, 7). Apart from these routine tests, the number of targeted and untargeted metabolomic studies have been growing gradually. Amino acid metabolism, tricarboxylic acid cycle (TCA) and energy metabolism, NAD⁺ metabolism, primary bile acids, purine and pyrimidine metabolism were evaluated and different metabolites were found to be associated with the severity of the disease. Among these studies, kynurenine pathway metabolites were the most studied (8). The aim of this study is to evaluate the organic acids detected in the urine due to the metabolic processes that may be affected by hypoxia in Covid-19 patients who develop clinically mild, moderate and severe pneumonia, to determine their relationship with the disease severity and to compare the results with the control group.

MATERIAL and METHOD

Patient selection

Adult patients admitted to the hospital with clinical signs and symptoms associated with Covid-19 and hospitalized at Infectious Diseases Clinic with confirmed diagnosis by detecting SARS-CoV-2 RNA in oro-nasopharyngeal swab samples were participated in the present study. A total of 120 patients with the clinical spectrum of SARS-CoV-2 infection as mild, moderate and severe according to the WHO Covid-19 disease severity classification were included in the present study. Based on this classification, mild patient group was composed of patients without evidence of pneumonia or hypoxia (n=40) whereas moderate patient group was composed of patients with signs and symptoms of pneumonia without signs of severe pneumonia (n=40). The patients with pneumonia and any of the following; > 30 breaths/min; severe respiratory distress; or SpO₂ < 90% at room air were classified in severe patient group (n=40). Additionally,

the control group consisted of volunteers without any clinical signs and symptoms associated with Covid-19 (n=30) were included in the study. In the patient group, 15 patients had hypertension, 10 patients had diabetes mellitus (DM), 4 patients had coronary artery disease, 2 patients had lung disease, 2 patients had hypertension and chronic kidney disease, 1 patient had lung and kidney disease, 7 patients had hypertension and DM, 1 patient had hypertension and DM. This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of the Hospital and written informed consent was obtained from the patients.

Sample Collection and Analyses

First morning urine samples taken inpatient setting were aliquoted and frozen immediately until the analysis day. All samples were thawed and vortexed before analysis. All analyses were performed in Medical Biochemistry Laboratory. The determination of creatinine content of the urine sample was performed in Atellica autoanalyser (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) according to manufacturer's instructions using original kits based on Jaffe method. The analysis of organic acids (OA) by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) after ethyl acetate extraction/oxime-trimethylsilyl derivatization was carried out for profiling urinary organic acids as described in the literature (9). The derivatized extract was injected in the GCMS-QP2010 SE (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) for analysis. Electron impact mass spectrometry was performed in the scan mode with a mass range between m/z 40 and 600. The individual peaks of the organic acids were compared with the library for peak identification and the amount was obtained by ratio to the 4-phenylbutyric acid which was used as pure standard. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Samples were introduced into the column via a splitless injector at 280°C. The initial oven

temperature was kept at 100°C for 4 minutes and then programmed to rise 4°C/min to a final temperature of 320°C. This temperature was maintained for 10 minutes. The column was TRB 5MS 30m x 0.25mm x 1µl with a constant flow of helium at 1ml/minute. It was inserted directly into the ion source with an interface temperature of 280°C. The mass spectra of all GC peaks were generated by a mass spectrometer operated in the electron impact (EI) mode.

The level of 104 organic acids, whose total ion chromatogram is shown in figure 1, was measured. These organic acids were lactic acid, 2-hydroxyisobutyric acid, glycolic acid, oxalic acid, 2-hydroxybutyric acid, 3-hydroxypropionic acid, levulinic acid, pyruvic acid, 3-hydroxybutyric acid, 3-hydroxyisobutyric acid, 2-hydroxyisovaleric acid, 2-methyl-3-hydroxybutyric acid, malonic acid, 3-hydroxyisovaleric acid, 2-keto-isovaleric acid, methylmalonic acid, 4-hydroxybutyric acid, 2-hydroxyisocaproic acid, 3-hydroxyvaleric acid, acetoacetic acid, 2-hydroxy-3-methylvaleric acid, benzoic acid, acetoacetate, 2-keto-3 methyl valerik asit, octanoic acid, 2-methyl-3-hydroxyvaleric acid, glycerol, acetylglycine, ethylmalonic acid, 2-ketoisocaproic acid, phenylacetic acid, succinic acid, erythro 4,5 dihydroxy hexanoate lactone, methylsuccinic acid, glyceric acid, fumaric acid, uracil, 4,5-dihydroxyhexanoic acid lactone, 2-hydroxy glutarat lakton, propionylglycine mevalonic lactone isobutyrylglycine glutaric acid, thymine, 3-methylglutaconic acid, glutaconic acid, succinylacetone-oxime, isovalerylglycine, malic acid, adipic acid, phenyllactic acid, 5-oxoproline, 3-methyladipic acid, tiglylglycine, 3-methylcrotonoylglycine, 2-hydroxyphenylacetic acid, 2-hydroxyglutaric acid, 3-hydroxy glutaric acid, 3-phenyllactic acid, 3-hydroxy-3-methylglutaric acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, 2-keto glutaric acid, hexanoylglycine, 4-hydroxy phenyl acetic acid, phenylpyruvic acid, n-acetylaspartic acid, suberic acid, aconitic acid, orotic acid, homovanillic acid (HVA), citric acid, 3,4-dihydroxy phenylacetic

acid, hippuric acid, homogentisic acid, methylcitric acid, vanillylmandelic acid (VMA), sebacic acid, 4-hydroxyphenyllactic acid, 3-indol asetik asit, 4-hydroxy-fenil purivik acid, phenylpropionylglycine, palmitic acid, 3-hydroxysebacic acid, n-acetyltyrosine, 3-hydroxy-hüppirik asit, 5-hydroxy indolasetik asit, stearic acid, suberylglycine,

3-hydroxy dodecanedioic acid, 7-hydroxy octanoic acid, succinic semialdehyde, 2-methylbutrylglycine, 2-ethyl-3-hydroxy propionic acid, octenedioic acid, azelaic acid, pyrrole-2-carboxyl-glycine, mevalonic acid, 4-hydroxy cyclohexylacetate, dihydrouracil, allo-isoleucine, n-acetyl-ileucine, n-acetylglutamic acid, 3-hydroxyphenylhydracrylic acid.

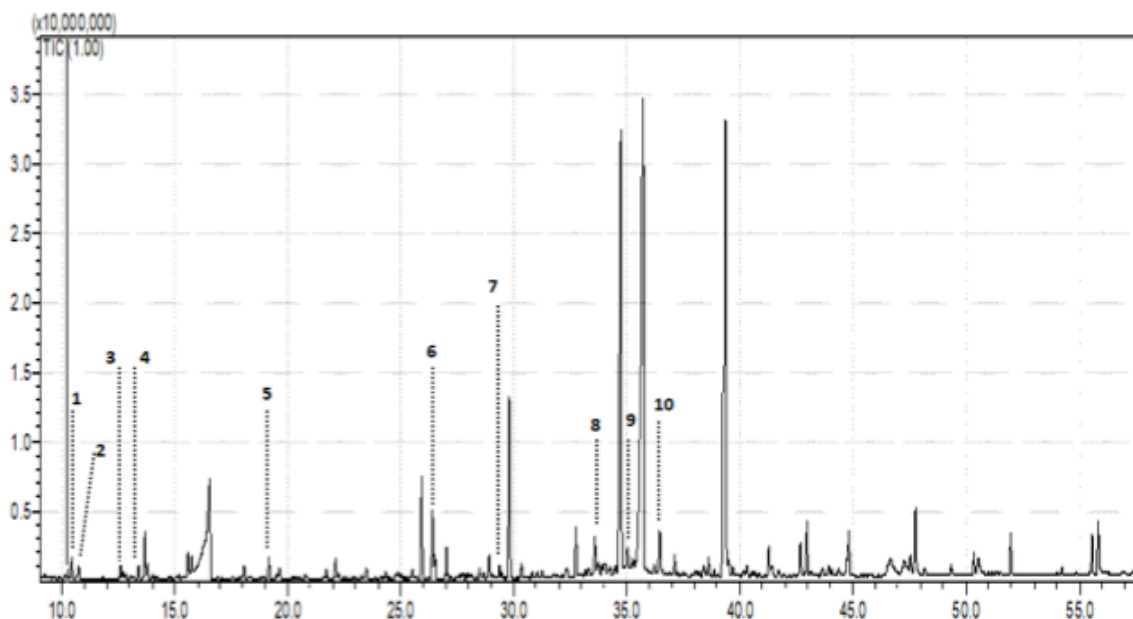


Figure 1. Typical total ion chromatogram of organic acids extracted from human urine. Numbers indicate the following metabolites.

1:Lactic acid; 2:Oxalic acid; 3:2-hydroxybutyric acid; 4: Pyruvic acid; 5:Succinic acid; 6:IS; 7: α -ketoglutaric acid; 8: HVA; 9: Citric acid; 10: VMA

Statistics

The Kolmogorov-Smirnov test was performed to check the normality of the variables. Descriptive analysis was presented using mean \pm SD for normally distributed variables and median (minimum-maximum value) for non-normally distributed variables. Pairwise comparisons of groups with regard to the severity of Covid-19 using the independent samples Kruskal-Wallis test was carried out. Moreover, a binary logistic regression analysis was performed to define independent predictors of disease severity. To eliminate the effects of potential confounders,

namely age, gender, and chronic disease parameters included in the model, we used the enter method, and parameters with p values greater than 0.200 were excluded for the final model with the Forward LR test. The odds ratio was calculated for significantly associated variables. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. All statistical calculations were made using the SPSS for Windows version 26 software program (SPSS Inc., IBM Corporation, Chicago, IL).

The study was approved by the Ankara City Hospital Clinic Researches Ethics Committee (Date: 03.11.2021 and Number: E1-21-2110).

RESULTS

In our study, we evaluated 104 urine organic acids levels in severe, moderate and mild Covid-19 disease groups and compared them with the results of the control group (Table 1). We did not present unexcreted and statistically non-significant organic acid results among 104 parameters. Mean \pm SD or median (min-max) age values of severe disease, moderate disease, mild disease and control groups were 58.8 \pm 13.5, 47.5(22-71), 32(18-71) and 40.9 \pm 20.7, respectively. Severe and moderate disease groups are different from mild disease and control groups ($p < 0.001$). To eliminate the effects of age gap along with the other potential confounders, namely gender, and chronic disease parameters were included in the model to define independent predictors of disease severity.

Of the patients included in the study, 69 were male and 51 were female. There were 17 males and 13 females in the control group. There

was no significant difference between the patient groups in terms of gender between the patient groups and the control group ($p > 0.096$).

In our study, pyruvic acid and 2-hydroxybutyric acid levels were significantly higher in the severe disease group than in all other groups ($p = 0.006$ and $p = 0.001$, respectively). Lactic acid levels were significantly higher in the severe disease group compared to the mild disease group and the control group ($p < 0.001$). Citric acid and homovanillic acid levels were significantly lower in all disease groups compared to the control group ($p < 0.001$). α -ketoglutaric acid levels were significantly lower in the severe and moderate disease group compared to the control group, in the severe disease group compared to the mild disease group ($p < 0.001$). Vanillylmandelic acid was significantly lower in the severe and moderate disease group compared to the control group ($p < 0.001$). Succinic acid was significantly lower in the severe and moderate disease group compared to the control group, in the moderate disease group

Table 1. Comparison of organic acids between groups

Parameters (mmol/molcrea)	Severe Patient Group	Moderate Patient Group	Mild Patient Group	Control Group	P
Pyruvic Acid	4.16 (0.32-40)	2.86(0.60-34.4)	2.0(0.31-19.3)	1.99(0-9.94)	0.006 ^a
Lactic acid	6.95(1.14-183)	6.10(1.17-88.0)	3.70(1.04-39.5)	4.28(1.0-56.3)	<0.001 ^{a,e}
Citric acid	1.0(0-29.8)	4.59(0-76.2)	6.60(0-84.6)	13.4(0-46.4)	<0.001 ^{a,b,c}
α -ketoglutaric acid	3.72(0-49.2)	5.13(1.17-62.6)	8.77(0-65.0)	18.7(1.85-42.0)	<0.001 ^{a,b,e}
Succinic Acid	2.75 (0.63-26.8)	2.65(0.70-15.7)	5.32(0.54-62.3)	8.27(0.64-59.9)	<0.001 ^{a,b,f}
2-hydroxybutyric acid	0 (0-1096)	0(0-2243)	0(0-104)	0(0-0)	<0.001 ^{a,b,f}
Oxalic acid	1.30 (0-15.7)	1.47(0.14-9.55)	1.40(0-37.0)	1.0(0-25)	0.041 ^b
Homovanillic acid	2.51 (0.03-7.65)	1.74(0.96-3.89)	2.34(0.20-12.8)	7.2(0.55-19.8)	<0.001 ^{a,b,c}
Vanillylmandelic acid	2.87 (0-9.16)	2.02(0-10.2)	2.76(0.94-16.9)	5.20(0-16.9)	<0.001 ^{a,b}
2-hydroxybutyric acid	0 (0-99)	0(0-23)	0(0-19.8)	0(0-0)	0.001 ^a

a=significant difference between severe disease control group,
 b= significant difference between moderate disease control group,
 c= significant difference between mild disease control group
 d= significant difference between severe and moderate disease group
 e= significant difference between severe and mild disease group
 f= significant difference between moderate and mild disease group

compared to the mild disease group ($p < 0.001$). The level of β -hydroxybutyric acid was significantly higher in the severe and moderate disease group compared to the control group, in the moderate disease group compared to the mild disease group ($p < 0.001$). Oxalic acid was significantly higher in the moderate disease group compared to the control group ($p = 0.041$).

The binary logistic regression model included, α -ketoglutaric acid, succinic acid, and HVA. It

was statistically significant with $\chi^2 = 98.680$; $p < 0.001$. The model correctly classified 90.5% of the cases. After elimination of the effects of potential confounders namely age, gender, and chronic disease parameters included in the model, increasing α -ketoglutaric acid, succinic acid and HVA were independent predictors of the disease severity with the likelihood ratios shown in Table 2.

Table 2. Odds ratios and coefficients of binary logistic regression analysis of factors associated with disease severity

Parameters	B	p	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
-ketoglutaric Acid	0.098	0.009	1.103	1.025	1.186
Succinic Acid	0.129	0.002	1.138	1.049	1.234
Homovanillic Acid	0.323	0.045	1.382	1.008	1.894

DISCUSSION

Due to the nature of the Covid-19 disease, a wide spectrum and different severity of symptoms may present in patients. Currently, co-morbidities such as age, obesity, lung disease, diabetes, and cancer are accepted as risk factors for the severity of the disease. However, unexpected results can be encountered and some of the patients eventually develop progressive disease (10). The mechanisms which cases have complications remain unclear. Identification of specific metabolites with altered concentration might facilitate the developments of novel therapies and may improve responses to currently available therapies.

In this study, we measured 104 urine organic acid levels by using GC/MS to evaluate carbohydrate metabolism, lipid metabolism, amino acid metabolism and neurotransmitter metabolism in mild, moderate and severe Covid-19 patients. To our knowledge, the first study in which organic acids to include HVA and VMA were measured in Covid-19 patients. We identified that pyruvic and lactic acid concretions were increased whereas TCA

cycle intermediates were decreased. Also keton bodies concentrations were high. We evaluated the results according to the severity of the disease and compared them with the control group. The elevation in 2-hydroxybutyric acid may be valuable in demonstrating which patient is at risk of DM.

During glycolysis, 2 molecules of glucose are converted to pyruvate. Pyruvate has several distinct consequences, depending on the microcellular environment, i.e. oxygen availability and energy demand. In the presence of mitochondria and oxygen, pyruvate enters the citric acid cycle and undergoes oxidative phosphorylation. In the absence of mitochondria or oxygen, pyruvate remains in the cytoplasm and is converted to lactate by anaerobic glycolysis by the enzyme LDH. This reaction allows for the regeneration of NAD^+ , which is necessary for the continuation of glycolysis. 2 ATPs are produced in anaerobic glycolysis, compared to 30 or 32 ATPs produced in oxidative phosphorylation based on the substrate shuttle. Increased blood lactate levels in cases of sepsis are considered as poor prognosis and are associated with increased mortality (11).

For this reason, blood lactate levels were studied in Covid-19 cases with the thought that it would be associated with the disease prognosis, but blood lactate levels were found to be borderline high or normal in some studies. The most important reason for this situation is the deterioration of mitochondrial functions independent of hypoxia in sepsis patients, but the preservation of mitochondrial functions in patients who develop covid pneumonia (12-14). In our study, we found higher pyruvic acid levels in the severe patient group than in the other disease groups and control group. We found higher lactic acid levels in the severe disease group compared to the mild disease group and control group (Figure 2). In addition, we found citric acid, one of the citric acid cycle metabolites, to be significantly lower than the control group in all disease groups, the lowest in the severe disease group. On the other hand, α -ketoglutaric acid was lower in all disease groups compared to the control group, succinic acid levels were lower in the severe and moderate patient group compared to the control group (Figure 3). There was no significant difference in the levels of fumaric acid, malic acid and which are other TCA metabolites.

At the same time, Shi et al. found the blood citric acid level to be low in Covid-19 patients, while they found the succinic acid level to be high (15). L Bowen et al. found TCA enzymes lower in the patient group than in the control group by using LC-MS/MS (16). The shift of glucose oxidation to anaerobic glycolysis during hypoxia may be the main cause of the change in TCA metabolites. In addition, TCA cycle intermediate metabolites play a key role in viral replication and virus-induced inflammation (17).

Ketone bodies (β -hydroxybutyrate, acetoacetate and acetone) are synthesized from fatty acids in the liver and may increase in the blood following a prolonged fasting or ketogenic diet. Ketosis is an important complication of type 1 diabetes pathologically. Therefore, it is important to determine whether it is a physiological adaptation mechanism or whether it develops due to a pathological condition. High blood ketone bodies can also be observed in hospitalized patients, and it is important especially in intensive care patients because it causes acidosis, which is undesirable and needs to be corrected urgently (18). Acidosis is a marker associated with in Covid-19 mortality (19).

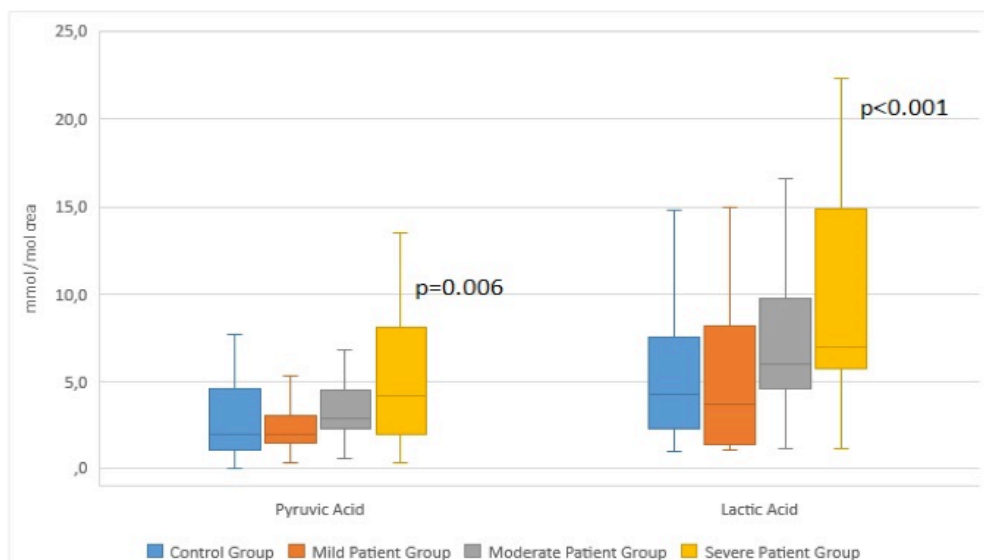


Figure 2. Median Values of Pyruvic Acid and Lactic Acid Median Values in Patient Groups and Control Group

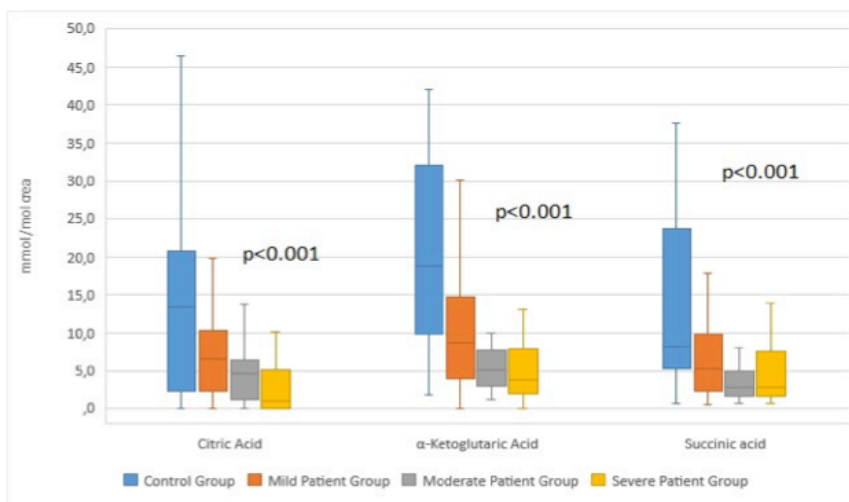


Figure 3. Median Values of Citric Acid, α -Ketoglutaric Acid and Succinic Acid Levels in Patient Groups and Control Group

In our study, we found the level of β -hydroxybutyric acid to be significantly higher in severe and moderate disease groups compared to the control group. While 46 of 120 covid positive patients had β -hydroxybutyric excretion in their urine, 28 of these patients did not have a diagnosed diabetes mellitus, Juyi et al found ketone positivity in the blood or urine of 42 patients, 27 of whom did not have diabetes (18).

Oxalic acid is formed mainly due to a diet of plant origin, it can also be formed as a result of metabolism of ascorbic acid, isocitrate and oxaloacetic acid. It is not well metabolized in the human body, most of it is excreted in the urine and increases the risk of kidney stones. It is known that Covid-19 patients spontaneously start using vitamins after diagnosis. Besides, it is stated that IV vitamin C infusion in hospitalized patients reduces mortality and decreases the production of proinflammatory markers, and vitamin C is used as a part of treatment (20, 21). In addition to viral infection, excessive vitamin C intake is also blamed in acute kidney injury that occurs after acute respiratory distress syndrome (ARDS) in Covid 19 positive patients (20). In our study, we found higher oxalic acid levels in all three disease groups compared to the control group. However, there was no relationship between oxalic acid elevation and

disease severity. Therefore, we think that higher oxalic acid level may be associated with higher vitamin C intake compared to the control group.

The adrenal glands can be infected by bacteria, viruses, fungi and parasites. Infections caused by these pathogens can cause tissue damage and endocrine dysfunction. In autopsy samples, SARS-CoV-2 has been shown to cause degeneration and necrosis in the adrenal glands. In addition, due to the molecular similarity of autoantibodies formed against some amino acids synthesized by SARS-CoV-2, they can attack the host's own molecules, which may cause endocrine dysfunction such as inadequate corticosteroid response (22, 23). In addition, it is claimed that the endocrine response itself may be related to disease severity. It has been shown that viral infections are milder in diseases and occupations with more epinephrine fluctuation. More fluctuation of epinephrine is shown as a reason for having a milder Covid-19 disease in children (24). In our study, we found that adrenaline and noradrenaline metabolites VMA and HVA were lower in the patient group compared to the control group (Figure 4). These low values were associated with disease severity. We could not find a study in the literature that measured urinary VMA and HVA levels in Covid-19 patients.

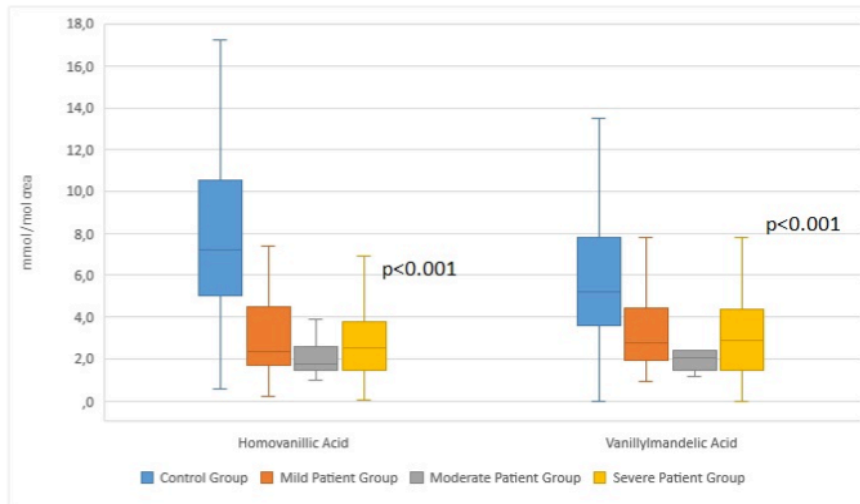


Figure 4. Median Values of Homovanillic Acid and Vanilmandelic Acid in Patient Groups and Control Group

2-Hydroxybutyric Acid or α -hydroxybutyrate is an organic acid originating from α -ketobutyrate, which is metabolized into propionyl-CoA and carbon dioxide formed during the catabolism of sulfur-containing amino acids or glutathione anabolism. 2-Hydroxybutyric Acid is also formed during the synthesis of cysteine from cystathionine. In the case of increased oxidative stress, cystathionine, which is formed as a result of the combination of homocysteine with serine, is hydrolyzed to cysteine, and eventually cysteine is converted to glutathione. For this reason, it is claimed that 2-Hydroxybutyric Acid increases in oxidative stress (25). In addition, it has been argued that the NADH/NAD⁺ ratio increases as a result of lipid oxidation and is associated with insulin resistance and glucose intolerance in the non-diabetic population (25, 26). Multiple lung disease caused by Sars-COV 2 causes hypoxia to increase reactive oxygen species and oxidative stress. There are many studies in the literature showing that oxidative stress increases in Covid-19 patients (27). In addition, it is stated that Covid-19 damages insulin-secreting beta cells with a direct cytotoxic effect. Studies have shown that there may be moderate pancreatic damage after

Covid-19 and that the virus may trigger new onset diabetes (28-31). In our study, we found the level of 2-Hydroxybutyric acid to be higher in the severe disease group compared to the control group. We think that this elevation may be due to increased oxidative stress. However, we do not know whether this elevation increases secondary to the damage to the pancreas. Therefore, we think that these data should be confirmed by experimental studies.

The empirical results reported herein should be considered in the light of some limitations. We used spot urine samples by proportioning organic acid results to creatinine. Despite this, 24h urine collection may be more accurate in VMA and HVA tests in order to eliminate diurnal variation. In the present study, although we tried to ensure that there was no difference between the ages of the groups, there were more elderly individuals in the severe and moderate disease groups due to Covid-19 disease nature. To minimise this age gap along with the other potential confounders, namely gender, and chronic disease parameters were included in the model to define independent predictors of disease severity.

Overall, it may be said organic acid measurement can be considered in Covid-19 patients especially for follow-up and management of the disease. Due to α -ketoglutaric acid, succinic acid and HVA were independent predictors of the disease severity,

measurement of these specific metabolites might facilitate the developments of novel therapies and may improve responses to currently available therapies with the ease of prognosis prediction in Covid-19 patients.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Ankara City Hospital Clinic Researches Ethics Committee (Date: 03.11.2021 and Number: E1-21-2110).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Organization WHO. COVID-19 weekly epidemiological update, edition 150, (Accessed: Jul 2023).
2. Wheaton WW, Chandel NS. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 2011; 300 (3): 385-93.
3. Li Z, Liu G, Wang L, Liang Y, Zhou Q, Wu F, et al. From the insight of glucose metabolism disorder: oxygen therapy and blood glucose monitoring are crucial for quarantined COVID-19 patients. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2020; 197: 110614.
4. Phipps WS, Jones PM, Patel K. Amino and organic acid analysis: Essential tools in the diagnosis of inborn errors of metabolism. *Advance Clin Chem*, 2019; 92: 59-103.
5. Tsoukalas D, Alegakis A, Fragkiadaki P, Papakonstantinou E, Nikitovic D, Karataraki A, et al. Application of metabolomics: Focus on the quantification of organic acids in healthy adults. *Int J Mol Med*, 2017; 40 (1): 112-20.
6. Samprathi M, Jayashree M. Biomarkers in COVID-19: An Up-To-Date Review. *Front Pediatr*, 2020; 8: 607647.
7. Tjendra Y, Al Mana AF, Espejo AP, Akgun Y, Millan NC, Gomez-Fernandez C, et al. Predicting disease severity and outcome in COVID-19 patients: a review of multiple biomarkers. *Arch Pathol Lab Med*, 2020; 144 (12): 1465-74.
8. Hasan MR, Suleiman M, Pérez-López A. Metabolomics in the Diagnosis and Prognosis of COVID-19. *Front Gen*, 2021: 1358.
9. Tanaka K, Hine DG, West-Dull A, Lynn TB. Gas-chromatographic method of analysis for urinary organic acids. I. Retention indices of 155 metabolically important compounds. *Clin Chem*, 1980; 26 (13): 1839-46.
10. Alberca RW, Oliveira LdM, Branco ACCC, Pereira NZ, Sato MN. Obesity as a risk factor for COVID-19: an overview. *Critic Rev Food Sci Nutr*, 2021; 61 (13): 2262-76.

11. Mikkelsen ME, Miltiades AN, Gaieski DF, Goyal M, Fuchs BD, Shah CV, et al. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Critic Care Med*, 2009; 37 (5): 1670-7.
12. Iepsen UW, Plovsing RR, Tjelle K, Foss NB, Meyhoff CS, Ryrso CK, et al. The role of lactate in sepsis and COVID-19: Perspective from contracting skeletal muscle metabolism. *Exp Physiol*, 2021.
13. Vassiliou AG, Tsiplis S, Keskinidou C, Vrettou CS, Jahaj E, Gallos P, et al. Lactate and Lactate-to-Pyruvate Ratio in Critically Ill COVID-19 Patients: A Pilot Study. *J Personal Med*, 2022; 12 (2): 171.
14. Santos AF, Póvoa P, Paixão P, Mendonça A, Taborda-Barata L. Changes in glycolytic pathway in SARS-COV 2 infection and their importance in understanding the severity of COVID-19. *Front Chem*, 2021; 9.
15. Shi D, Yan R, Lv L, Jiang H, Lu Y, Sheng J, et al. The serum metabolome of COVID-19 patients is distinctive and predictive. *Metabolism*, 2021; 118: 154739.
16. Bo-Wen L, Xing F, Wen-Jing C, He T, Si-Yu W, Ji-Yuan Z, et al. Systematic Discovery and Pathway Analyses of Metabolic Disturbance in COVID-19. *Infect Dis Immun*, 2021; 1 (02): 74-85.
17. Sánchez-García FJ, Pérez-Hernández CA, Rodríguez-Murillo M, Moreno-Altamirano MMB. The Role of Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites in Viral Infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021: 830.
18. Li J, Wang X, Chen J, Zuo X, Zhang H, Deng A. COVID-19 infection may cause ketosis and ketoacidosis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2020; 22 (10): 1935-41.
19. Stubbs BJ, Koutnik AP, Goldberg EL, Upadhyay V, Turnbaugh PJ, Verdin E, et al. Investigating ketone bodies as immunometabolic countermeasures against respiratory viral infections. *Med*, 2020; 1 (1): 43-65.
20. Fontana F, Cazzato S, Giovanella S, Ballestri M, Leonelli M, Mori G, et al. Oxalate nephropathy caused by excessive vitamin C administration in 2 patients with COVID-19. *Kidney international reports*, 2020; 5 (10): 1815-22.
21. Massey LK, Liebman M, Kynast-Gales SA. Ascorbate increases human oxaluria and kidney stone risk. *J Nutr*, 2005; 135 (7): 1673-7.
22. Hashim M, Athar S, Gaba WH. New onset adrenal insufficiency in a patient with COVID-19. *BMJ Case Reports CP*, 2021; 14 (1): e237690.
23. Vakhshoori M, Heidarpour M, Bondariyan N, Sadeghpour N, Mousavi Z. Adrenal Insufficiency in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-Infected Patients without Preexisting Adrenal Diseases: A Systematic Literature Review. *Int J Endocrin*, 2021; 2021.
24. Derakhshan M, Ansarian HR, Ghomshei M. Possible effect of epinephrine in minimizing COVID-19 severity: a review. *J Int Med Res*, 2020; 48 (9): 0300060520958594.
25. Gall WE, Beebe K, Lawton KA, Adam K-P, Mitchell MW, Nakhle PJ, et al. α -Hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS One*, 2010; 5 (5): e10883.
26. Shantavasinkul PC, Muehlbauer MJ, Bain JR, Ilkayeva OR, Craig DM, Newgard CB, et al. Improvement in insulin resistance after gastric bypass surgery is correlated with a decline in plasma 2-hydroxybutyric acid. *Surg Obesity Relate Dis*, 2018; 14 (8): 1126-32.
27. Muhammad Y, Kani YA, Iliya S, Muhammad JB, Binji A, El-Fulaty Ahmad A, et al. Deficiency of antioxidants and increased oxidative stress in COVID-19 patients: A cross-sectional comparative study in Jigawa, Northwestern Nigeria. *SAGE Med*, 2021; 9: 2050312121991246.
28. Bornstein SR, Rubino F, Khunti K, Mingrone G, Hopkins D, Birkenfeld AL, et al. Practical recommendations for the management of diabetes in patients with COVID-19. *The lancet*, 2020; 8 (6): 546-50.
29. Wang F, Wang H, Fan J, Zhang Y, Wang H, Zhao Q. Pancreatic injury patterns in patients with coronavirus disease 19 pneumonia. *Gastroenterology*, 2020; 159 (1): 367-70.
30. Yang J-K, Lin S-S, Ji X-J, Guo L-M. Binding of SARS coronavirus to its receptor damages islets and causes acute diabetes. *Acta diabetologica*, 2010; 47 (3): 193-9.
31. Abramczyk U, Nowaczynski M, Słomczynski A, Wojnicz P, Zatyka P, Kuzan A. Consequences of COVID-19 for the Pancreas. *Int J Mol Sci*, 2022; 23 (2): 864.

The role of recombinant basic fibroblast growth factor in de-differentiation of chondrocyte to mesenchymal stem cell-specific immunophenotype

Kondrositlerin mezenkimal kök hücreye spesifik immünofenotipe geri farklılaşmasında rekombinant bazik fibroblast büyüme faktörünün rolü

Hasan SALKIN¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Some changes in genes, protein, and function in chondrocytes can cause them to develop into a fibroblastic morphology. Our study aims to transform chondrocytes in monolayer cultures into a mesenchymal stem cell-like immunophenotype by inducing chondrocyte de-differentiation with recombinant basic-fibroblast growth factor (FGF-b) supplementation.

Methods: In our study, chondrocytes were obtained from Erciyes University Genome and Stem Cell Center as ready-made cell lines. Chondrocytes grown on a standard medium were used as the control group. An experimental group was formed by adding recombinant basic FGF at a concentration of 5 ng/ml to the normal growth medium. MSC-specific surface markers expressions such as CD271, CD166, CD29, CD44, CD73, CD90, and CD105 were compared between groups by flow cytometry. "Muse Annexin-V assay kit" and "Muse Count and viability kit" were used according to the production procedure to compare apoptosis and viability data between groups. Colony-forming potentials in chondrocytes were determined by Colony-forming units-fibroblast assay. Statistical analyzes were performed using the statistics software GraphPad Prism (version

ÖZET

Amaç: Kondrositlerdeki gen, protein ve fonksiyondaki bazı değişiklikler, bunların fibroblastik bir morfolojiye dönüşmesine neden olabilir. Çalışmamız, rekombinant bazik fibroblast büyüme faktörü (FGF-b) takviyesi ile kondrosit de-diferansiyasyonunu indükleyerek tek tabakalı kültürlerdeki kondrositleri mezenkimal kök hücre benzeri bir immünofenotipe dönüştürmeyi amaçlamaktadır.

Yöntem: Çalışmamızda kondrositler Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nden hazır hücre hattı olarak temin edildi. Kontrol grubu olarak standart bir besiyerinde büyütülen kondrositler kullanıldı. Standart büyüme ortamına 5 ng/ml konsantrasyonda rekombinant bazik FGF ilave edilerek deney grubu oluşturuldu. CD271, CD166, CD29, CD44, CD73, CD90 ve CD105 gibi MKH'ye özgü yüzey belirteç ifadeleri, akış sitometrisi ile gruplar arasında karşılaştırıldı. Gruplar arasında apoptoz ve canlılık verilerinin karşılaştırılması için üretim prosedürüne göre "Muse Annexin-V assay kit" ve "Muse Count and viability kit" kullanıldı. Kondrositlerdeki koloni oluşturma potansiyelleri, Koloni oluşturan birimler-fibroblast tahlili ile belirlendi. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism (sürüm 8.02)

¹Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Istanbul Beykent University, Istanbul, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Hasan SALKIN

İstanbul Beykent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., İstanbul - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 08.03.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 29.12.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.08624

Salkın H. The role of recombinant basic fibroblast growth factor in de-differentiation of chondrocyte to mesenchymal stem cell-specific immunophenotype. Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(4): 399 - 408

8.02). Data with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results: The addition of recombinant basic-FGF to chondrocyte cultures reduced the percentage of total apoptosis in chondrocytes and increased viability. Our flow cytometry findings showed a significant increase in the expression of MSC-specific surface markers CD105, CD90, CD166, and CD271 in recombinant basic-FGF-treated chondrocytes. On the other hand, a decrease was observed in CD29 and CD73 expressions. There was no statistically significant difference among the groups in terms of CD44 expression.

Conclusion: In conclusion, the addition of recombinant basic-FGF to chondrocyte cultures decreased the percentage of total apoptosis in chondrocytes and increased viability. Our flow cytometry findings showed a significant increase in the expression of MSC-specific surface markers CD105, CD90, CD166, and CD271 in recombinant basic-FGF-treated chondrocytes. The increase in these MSC key markers suggests that recombinant basic FGF may induce chondrocyte differentiation at the level of MSC phenotype. In this study, we hypothesized that recombinant basic FGF might be an effective growth factor in the differentiation of chondrocytes into MSC immunophenotype. De-differentiation of chondrocytes to the MSC immunophenotype by recombinant basic-FGF may render these cells more effective and potential for chondrocyte implantation for regenerative medicine in cartilage damage such as osteoarthritis (OA) or other joint disorders.

Key Words: Chondrocyte, de-differentiation, fibroblast growth factor, apoptosis, mesenchymal stem cells

istatistik yazılımı kullanılarak yapıldı. $P < 0.05$ olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Kondrosit kültürlerine rekombinant bazik FGF ilavesi, kondrositlerdeki toplam apoptoz yüzdesini azalttı ve canlılığı arttırdı. Akış sitometri bulgularımız, rekombinant bazik FGF ile muamele edilmiş kondrositlerde MKH'ye özgü yüzey belirteçlerinden CD105, CD90, CD166 ve CD271'in ifadesinde önemli bir artış olduğunu gösterdi. Buna karşın CD29 ve CD73 ifadelerinde ise düşüş gözlemlendi. CD44 ifadesi bakımından gruplara arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Sonuç: Sonuç olarak, kondrosit kültürlerine rekombinant bazik FGF ilavesi, kondrositlerdeki toplam apoptoz yüzdesini azaltmış ve canlılığı arttırmıştır. Akış sitometri bulgularımız, rekombinant bazik-FGF ile işlenmiş kondrositlerde MKH'ye özgü yüzey belirteçlerinden CD105, CD90, CD166 ve CD271'in ifadesinde önemli bir artış olduğunu gösterdi. Bu MKH temel belirteçleri üzerindeki artış, rekombinant bazik-FGF'nin MKH fenotipi seviyesinde kondrosit farklılaşmasını indükleyebileceğini düşündürür. Bu çalışmada, rekombinant bazik FGF'nin kondrositlerin MKH immünofenotipine farklılaşmasında etkili bir büyüme faktörü olabileceğini hipotez ettik. Kondrositlerin rekombinant bazik FGF tarafından MKH immünofenotipine geri farklılaşması, bu hücreleri osteoartrit (OA) veya diğer eklem bozuklukları gibi kırıkta hasarında rejeneratif tıp amacıyla kondrosit implantasyonu için daha etkili ve potansiyel hale getirebilir.

Anahtar Kelimeler: Kondrosit, de-diferansiyasyon, fibroblast büyüme faktörü, apoptoz, mezenkimal kök hücreler

INTRODUCTION

Light microscopy observations of chondrocytes in monolayer culture in the sixties described serious

morphological changes to us. Investigations revealed that chondrocytes shifted towards a fibroblast-like morphology in monolayer culture. This phenomenon brought a new perspective to chondrocyte biology,

and this phenomenon is now called de-differentiation (1). De-differentiation is the process by which a cell in a differentiated state is transformed into a less differentiated phenotype in terms of gene, protein, function, and morphology. It has been reported that de-differentiated chondrocytes acquire multipotent character just like mesenchymal stem cells (MSCs), and specific surface markers exhibit similar expressions. Adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation abilities, a characteristic unique to MSCs, were observed in de-differentiated chondrocytes similarly to MSCs (1-3). Researchers examined the changes in stem cell-specific surface marker expression in de-differentiated chondrocytes by RT-PCR and flow cytometry. They observed an increase in the expression of MSC-specific markers such as CD105, CD166, and CD90 in chondrocytes remaining in monolayer culture for two weeks. They found a remarkable increase in CD105 gene and protein expression, especially in late-passage chondrocytes (4-6). Microarray analyses performed to date have identified different growth factors released during de-differentiation. In vitro, sub-cultures showed that insulin growth factor1 (IGF-1), IGF-1R, bone morphogenic protein2 (BMP-2), fibroblast growth factor receptor3 (FGFR-3), transforming growth factor beta2 (TGFB2) and TGFB3 expressions were decreased in chondrocytes. On the contrary, it was revealed that there was an increase in the expression of FGF-18, BMP-5, and 8 (7-11). The FGF family contains at least 23 molecules that regulate the differentiation and proliferation of chondrocytes. Among those identified so far, FGF 1, 2, and 18 have been found to play important roles in cartilage regeneration and chondrocyte differentiation (12). Studies show that FGF-2 (basic) stimulates pro-chondrogenesis in chondrocytes and MSCs via SOX9 (13-15). The addition of FGF-18 to articular chondrocytes in culture showed that these chondrocytes increased matrix production and proliferation (16, 17). Given these considerations, it is highly likely that the FGF family may be involved in de-differentiation from the chondrocyte phenotype

to the MSC-specific immunophenotype.

Therefore, in this study, we hypothesized that recombinant basic FGF might be effective in de-differentiation from chondrocytes to MSC-specific immunophenotype and increase MSC-specific surface marker expressions. FGF-basic is one of 23 known members of the FGF family. Proteins of this family play a central role during prenatal development, postnatal growth, and regeneration of a variety of tissues, by promoting cellular proliferation and differentiation. Recombinant Human FGF-basic is a 17.2 kDa protein consisting of 154 amino acid residues (13, 14). The aim of our study is to convert by recombinant basic FGF supplementation to chondrocytes in monolayer cultures into an MSC-like immunophenotype by inducing chondrocyte de-differentiation. Thus, it is aimed to produce de-differentiated chondrocytes, which can be applied in degenerative joint disorders such as osteoarthritis and whose in vitro regeneration potential is further increased.

MATERIAL and METHOD

Culture of human chondrocytes

Chondrocytes were obtained from Erciyes University Genome and Stem Cell Center (GENKOK) as a ready-made cell line. The human chondrocyte cell line used was purchased from Merck Millipore (Germany) with catalog number SCC042. Since in vitro experiments were performed on ready-made cell lines, no ethics committee document was needed. The supplied cells were thawed in a water bath at 37°C and taken into the culture medium. Cells were cultured at 37°C in DMEM High Glucose (Biological Industries, Israel) containing 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Biological Industries, Israel), 1% penicillin-streptomycin (Lonza, USA) and 1% L-glutamine (Gibco, USA). Chondrocytes were seeded at 8000 cells/cm² and cultured in a humid atmosphere in a 5% CO₂ incubator. Chondrocytes were amplified by passage by trypsinization until they reached the required number for the experimental sets.

Application of recombinant basic FGF to chondrocyte cultures

When the cells reached the required numbers, three repetitive sets of experiments were created for flow cytometry, Colony-forming Units-Fibroblast assay, apoptosis, and viability analyses. In the experimental sets, a standard growth medium was used for the control group. As the experimental group, recombinant basic FGF (ThermoFisher, USA, # 13256-029) was added to the growth medium at a final volume of 5 ng/ml. Thus, the control group chondrocytes were cultured with a growth medium and the experimental group chondrocytes were cultured with FGF supplemented growth medium.

Flow Cytometry

Chondrocytes in the third passage were collected and suspended in their culture medium at a density of 1×10^6 cells/ml. Then, chondrocytes were stained with positive MSC markers such as CD90-FITC, CD44-PE, CD105 PerCP5.5, CD73-APC, CD271-PE, CD166-PerCP5.5 and CD29-APC mouse-anti-human fluorescent antibodies (BD Bioscience, Heidelberg, Germany). After the cells were centrifuged and reconstituted with a washing solution, they were analyzed using a Navios (Beckman Coulter, USA) flow cytometer device. Data were analyzed with KALUZA (Beckman Coulter, USA) software.

Colony Forming Units-Fibroblast (CFU-F) Assay

CFU-F assay was performed to evaluate the clonogenic potential and colony formation potential in culture in the control group and FGF-treated chondrocytes. For this, cells were inoculated into 6 well plates at 100 cells/cm² in control and experimental groups. Thus, the cells were allowed to fall into the culture dishes one by one and away from each other. The cells were cultured in their culture medium (growth medium and growth medium + FGF) for two weeks. Colonies formed at the end of the second week were stained with crystal violet (Sigma, USA). Colored colonies were counted and compared between groups.

Annexin-V Assay

Early, late, and total apoptosis percentages in the control group and experimental group chondrocytes were measured at 24, 72, and 120 hours using the Muse Cell Analyzer (Millipore, Germany) device and Annexin V and Dead cell kit (Muse, Millipore, Germany) according to the production procedure. Experiments were run in three repetitions. The percentages of early, late, and total apoptosis were compared between groups.

Viability Assay

Viability percentages and cell numbers of cells in chondrocytes in the control and experimental groups were measured at 24, 72, and 120 hours using the Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, Germany) device and cell counting and viability kit (Muse Count and Viability-Merk Millipore, Germany) according to the production procedure. Experiments were run in three repetitions. Viability percentages were compared between groups.

Statistical Analysis

Viability, apoptosis, CFU-F, and flow cytometry findings were presented as mean \pm standard deviation in the groups. For comparison of viability and apoptosis parameters, distribution and homogeneity of data between groups were determined by two-way ANOVA. All experiments were performed in triplicate and multiple comparisons between groups were analyzed by Sidak's test. Flow cytometry and CFU-F findings were compared between groups by unpaired t-test. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism (version 8.02) statistical software. Data with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Immunophenotypic Analysis

Recombinant basic FGF administration to chondrocyte cultures increased the expression of MSC-specific positive markers such as CD271,

CD166, CD90, and CD105 ($P < 0.001$). There was no statistically significant difference between the groups regarding CD44 expression. CD29 and CD73 expression decreased in chondrocytes with

recombinant basic FGF administration (Figure 1). The findings obtained between the groups are presented in Table 1 as mean \pm SD, and data with a p-value less than 0.05 were considered statistically significant.

Table 1. Mean \pm SD and p values of immunophenotypic markers whose expressions were compared between groups

Antibodies	Groups	Mean	Std. Deviation	P-value
CD29	Growth medium	99.0	0.3	<0.001
	Growth medium + FGF	92.1	1.0	
CD166	Growth medium	88.2	0.2	<0.001
	Growth medium + FGF	99.0	0.2	
CD271	Growth medium	97.0	0.4	=0.001
	Growth medium + FGF	99.2	0.3	
CD90	Growth medium	88.8	0.5	=0.02
	Growth medium + FGF	90.9	0.9	
CD44	Growth medium	94.5	0.5	=0.55
	Growth medium + FGF	94.9	0.9	
CD105	Growth medium	58.0	1.0	<0.001
	Growth medium + FGF	99.2	0.5	
CD73	Growth medium	98.1	0.3	=0.003
	Growth medium + FGF	94.9	0.8	

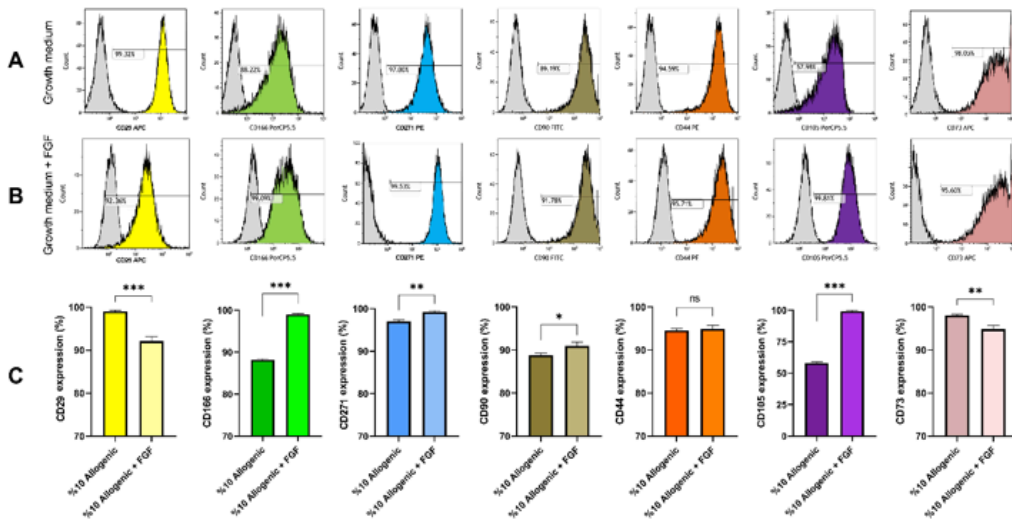


Figure 1. Flow cytometric analyses of CD29, CD166, CD271, CD90, CD44, CD105, and CD73 surface marker expressions between groups (A-B) after FGF administration in chondrocyte cultures in the 3rd passage. Statistical comparison of surface marker expressions between groups after repeated experiments (C). It was determined that FGF administration induced chondrocyte-MSC immunophenotypic de-differentiation. Histograms in gray represent negative control isotypes

Colony Forming Units-Fibroblast (CFU-F) Assay

Colony formation potential in FGF-treated chondrocyte cultures was significantly reduced compared to the control group (Figure 2). FGF-treated chondrocytes were found to display a more monolayer

appearance in culture, while a clustered morphology was observed in control cells. While the number of colonies formed in the control group was 29 ± 2 , the number of colonies formed by chondrocytes treated with FGF was determined as 21.7 ± 4.04 ($P=0.05$).

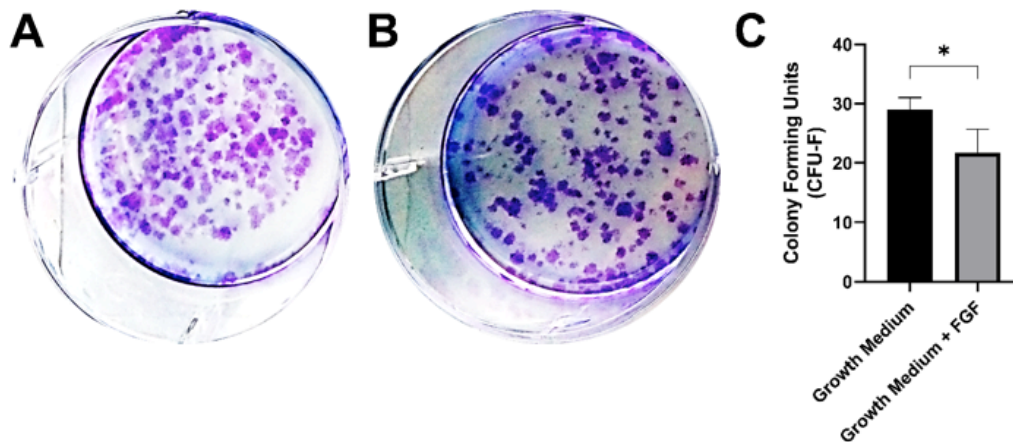


Figure 2. Crystal violet-stained chondrocyte colonies in the control group (A) and FGF-treated chondrocytes (B). Statistical comparison of the numbers of properly morphed and purified colonies between groups obtained as a result of repeated experiments (C).

Annexin-V Apoptosis Assay

Although early apoptosis was found to be significantly increased ($P=0.03$) in FGF-treated chondrocytes at 24 hours compared to the control group, late apoptosis was found to be significantly reduced ($P<0.001$) (Figure 3 A and B). Therefore, there was no statistically significant difference between the groups regarding total apoptosis percentages at 24 hours (Figure 3 C). There was no significant difference between the groups regarding early, late and total apoptosis at 72 hours (Figure 3A-C). Remarkable results in terms of apoptosis were seen at the 120th hour. At 120 hours, total apoptosis was found to be dramatically decreased in FGF-treated chondrocytes

compared to the control group ($P<0.001$). These findings showed us that FGF administration has a suppressive effect on apoptosis, especially in long-term chondrocyte cultures (Figure 3 C).

Viability Analysis

The percentage of cellular viability in FGF-treated chondrocytes compared to the control group was statistically significantly increased at 24 and 120 hours, respectively ($P=0.003$ and $P<0.001$). Especially at the points where apoptosis decreased in chondrocytes with FGF application, it was determined that cellular viability increased significantly ($P<0.001$). Our viability findings supported our apoptosis findings. Viability increased where apoptosis decreased (Figure 3D).

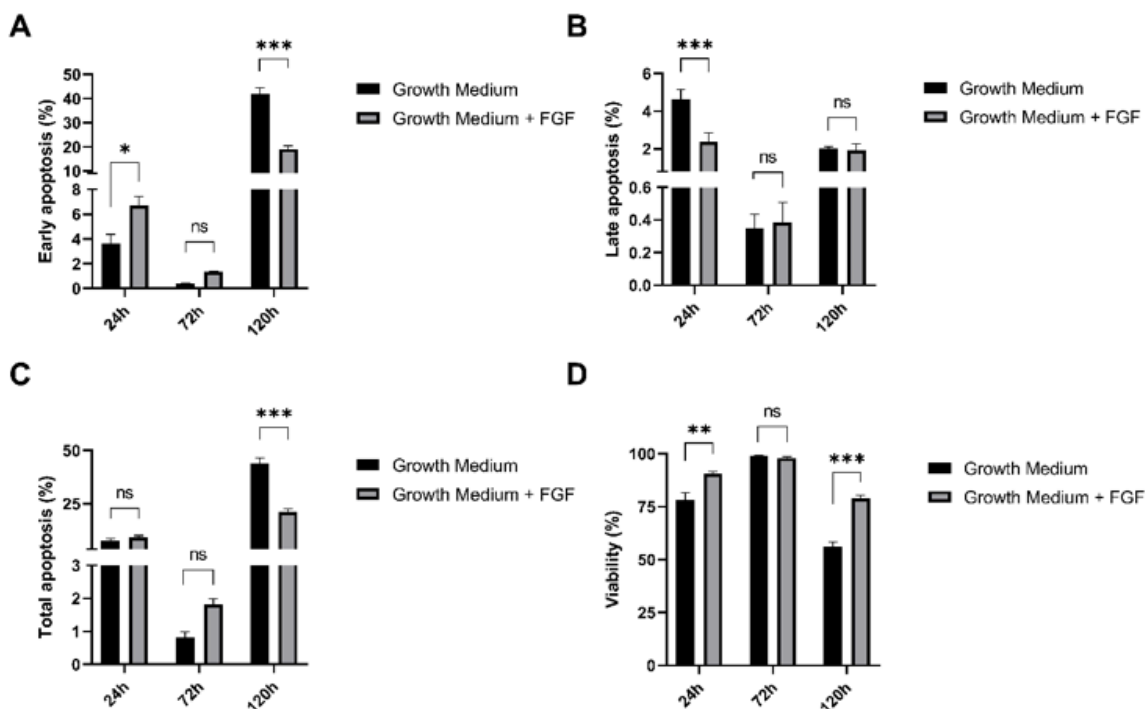


Figure 3. Statistical comparison of the percentages of early apoptosis, late apoptosis, total apoptosis, and viability in the control group and FGF-treated chondrocytes. While FGF administration increased early apoptosis in chondrocytes at 24 hours, it decreased early apoptosis at 120 hours (A). The percentage of late apoptosis was decreased in FGF-treated chondrocytes compared to the control group (B). Total apoptosis in FGF-treated chondrocytes appears to be markedly reduced at the 120th hour (C). Cell viability increases significantly at points where apoptosis is reduced by FGF administration (D).

DISCUSSION

Although studies over the last two decades have evaluated the changes in gene expression patterns on differentiated chondrocytes and de-differentiated chondrocytes in chondrocytes de-differentiation and preservation of chondrocyte properties, the exact mechanism of chondrocyte de-differentiation has still not been elucidated to date (7, 10, 18-19).

The role of growth factors in stimulating chondrocyte proliferation in culture is well known. From the past to the present, many studies have reported that the addition of factors such as transforming growth factor beta1 (TGF-B1), FGF, and insulin-like growth factor1 (IGF-1) to the culture medium increases the proliferation, differentiation,

and extracellular matrix formation of chondrocytes (20-24). In our study, unlike the information reported so far, the role of recombinant basic FGF in inducing de-differentiation to MSC-specific immunophenotype surface markers in cultured chondrocytes was investigated. Yamaoka et al. (2010) emphasized the importance of FGF-18 in the de-differentiation of human chondrocytes in culture and reported that FGF-18 is highly expressed in undifferentiated chondrocytes and that FGF-18 up-regulation may be a marker of differentiation. It has also been reported that it may be an important marker in the preservation of chondrocyte properties. Members of the FGF family, FGF-1,5,10,13 and 18, were found to be expressed higher in the later passages compared to the early passages of chondrocyte cultures (25). In our study,

it was determined that chondrocytes treated with recombinant basic FGF induced chondrocyte-*MSC* immunophenotypic de-differentiation. In addition, our findings show that recombinant basic FGF plays an important role in increasing chondrocyte viability and reducing apoptosis in long-term culture. Cucchiarini et al. (2009) reported that overexpression of FGF-2 in chondrocyte spheroids increased viability and cell division. While the viability of control spheres was 35%, the viability of chondrocyte spheres induced by FGF-2 overexpression viral vectors increased to 92% (26). Results supporting this were also observed in chondrocytes after recombinant basic FGF administration in our study. While the viability was 56% in the control group chondrocytes of our study at the 120th hour, the viability was 80% in the chondrocytes treated with recombinant basic FGF. The increase in viability at the 120th hour in recombinant basic FGF-applied chondrocytes significantly suppressed total apoptosis in the same time period. Our findings show that recombinant basic FGF administration increases viability and reduces apoptosis in chondrocytes.

Many studies have shown that chondrocytes adopt an immunophenotype similar to *MSC* during de-differentiation. It has been reported that de-differentiated chondrocytes increase the expression of *MSC*-specific surface markers CD105, CD10, CD166, and CD90 in monolayer culture. Studies show that CD105 expression is more expressed in later passages compared to early passages, especially in chondrocytes (4-6). In addition, Arufe et al. (2009) showed that CD105+ *MSC* subsets have the potential for chondrogenic differentiation (27). In our study, we found that CD105 expression increased drastically from 58% to 99.2% with FGF application to chondrocytes. Considering that CD105 expression is highly expressed in de-differentiated chondrocytes according to our current literature knowledge, this study shows that recombinant basic FGF application may be very important in chondrocyte-*MSC* immunophenotypic de-differentiation. Our flow cytometry findings showed a significant increase in

the expression of *MSC*-specific surface markers CD105, CD90, CD166, and CD271 in recombinant basic-FGF-treated chondrocytes. On the other hand, a decrease was observed in CD29 and CD73 expressions. There was no statistically significant difference between the groups in terms of CD44 expression. In a previous study, we showed that TGF- β 1 increases CD44 expression in fibroblasts (28). This situation may be one of the possible reasons why CD44 expression did not change in chondrocytes with recombinant basic FGF administration (29). Tanaka et al. (2007) have reported that integrin α 5 β 1 induces hypertrophic differentiation in chondrocytes. Integrin α 5 β 1 is composed of α 5 (ITGA5/CD49e) and β 1 (ITGB1/CD29) subunits (29). This actually explains why CD29 expression was decreased in recombinant FGF-treated chondrocytes in our study. In our study, we aimed to de-differentiate chondrocytes and convert them to an *MSC*-like immunophenotypic profile. Hypertrophy may negatively affect de-differentiation, and therefore, the decrease in CD29 expression with recombinant basic FGF seems to support our hypothesis in our study. Another study reported that CD73 expression was down-regulated, inversely to CD90 expression, in adipose-derived stem cell spheroids induced for chondrocyte differentiation (30). Considering the importance of de-differentiation for a stable cartilage tissue without hypertrophy, the fact that CD73 expression was downregulated by recombinant basic FGF in our study and that it did this in an opposite way to CD90 expression supports the literature. Accordingly, the increased expression of not only CD105 but also *MSC*-specific surface markers such as CD166, CD271, and CD90 in chondrocytes with recombinant basic FGF application revealed that recombinant basic FGF plays a very active and key factor in chondrocyte de-differentiation. Recombinant basic FGF-treated chondrocytes were found to display a more monolayer appearance in culture, while a clustered morphology was observed in control cells. This suggests that recombinant basic FGF can induce chondrocyte

de-differentiation at the level of MSC phenotype.

In conclusion; in this study, we hypothesized that recombinant basic FGF might be an effective growth factor in the de-differentiation of chondrocytes to the MSC immunophenotype. Our findings supported this hypothesis. De-differentiation of chondrocytes to the MSC immunophenotype by recombinant basic FGF

may render these cells more effective and potential for chondrocyte implantation for regenerative medicine in cartilage damage such as osteoarthritis (OA) or other joint disorders. Therefore, there is a need for new studies to be performed in vivo to support these in vitro results. Our results may lead to in vivo studies modeling cartilage damage such as OA.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

REFERENCES

1. Cai S, Fu X, Sheng Z. Dedifferentiation: a new approach in stem cell research. *Bioscience*, 2007; 57: 655-62.
2. Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2003; 48 (5): 1315-25.
3. Charlier E, Deroyer C, Ciregia F, Malaise O, Neuville S, Plener Z, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). *Biochem Pharmacol*, 2019; 165: 49-65.
4. Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, Nescic D, Trub T, Mainil-Varlet P. Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol*, 2005; 202 (3): 731-42.
5. Jones E, Schäfer R. Biological differences between native and cultured mesenchymal stem cells: implications for therapies. *Methods Mol Biol*, 2015; 1235: 105-20.
6. Finson KW, Parker WL, Chi Y, Hoemann CD, Goldring MB, Antoniou J, et al. Endoglin differentially regulates TGF- β -induced Smad2/3 and Smad1/5 signalling and its expression correlates with extracellular matrix production and cellular differentiation state in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010; 18 (11): 1518-27.
7. Lin Z, Fitzgerald JB, Xu J, Willers C, Wood D, Grodzinsky AJ, et al. Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *J Orthop Res*, 2008; 26 (9): 1230-7.
8. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Sadick H, Verse T, Baisch A, et al. In vitro analysis of matrix proteins and growth factors in dedifferentiating human chondrocytes for tissue-engineered cartilage. *Acta Otolaryngol*, 2005; 125 (6): 647-53.
9. Ma B, Leijten JC, Wu L, Kip M, van Blitterswijk CA, Post JN, et al. Gene expression profiling of dedifferentiated human articular chondrocytes in monolayer culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013; 21 (4): 599-603.

10. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, et al. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002; 10 (1): 62-70.
11. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Sadick H, Baisch A, Hormann K, et al. In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors in cultured human chondrocytes. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006; 134 (3): 510-5.
12. Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005; 16 (2): 205-13.
13. Lee J, Lee JY, Chae BC, Jang J, Lee E, Son Y. Fully Dedifferentiated Chondrocytes Expanded in Specific Mesenchymal Stem Cell Growth Medium with FGF2 Obtains Mesenchymal Stem Cell Phenotype In Vitro but Retains Chondrocyte Phenotype In Vivo. *Cell Transplant*, 2017; 26 (10): 1673-87.
14. Handorf AM, Li WJ. Fibroblast growth factor-2 primes human mesenchymal stem cells for enhanced chondrogenesis. *PLoS One*, 2011; 6 (7): e22887.
15. Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005; 16 (2): 233-47.
16. Davidson D, Blanc A, Filion D, Wang H, Plut P, Pfeffer G, et al. Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *J Biol Chem*, 2005; 280 (21): 20509-15.
17. Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, Imanishi M, Fujimori T, Itoh N, et al. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev*, 2002; 16 (7): 870-9.
18. Stokes DG, Liu G, Dharmavaram R, Hawkins D, Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J*, 2001; 360(Pt 2): 461-70.
19. Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res*, 2005; 23: 425-32.
20. Somoza RA, Welter JF, Correa D, Caplan AI. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014; 20 (6): 596-08.
21. Hu X, Zhang W, Li X. Strategies to Modulate the Redifferentiation of Chondrocytes. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021; 9: 764193.
22. Nasrabadi D, Rezaeiani S, Eslaminejad MB, Shabani A. Improved Protocol for Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells -Effect of PTHrP and FGF-2 on TGFβ1/BMP2-Induced Chondrocytes Hypertrophy. *Stem Cell Rev Rep*, 2018; 14 (5): 755-66.
23. Huang L, Yi L, Zhang C. Synergistic Effects of FGF-18 and TGF-β3 on the Chondrogenesis of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Pellet Culture. *Stem Cells Int*, 2018; 2018: 7139485.
24. Jakob M, Démarteau O, Schäfer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, et al. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem*, 2001; 81 (2): 368-77.
25. Yamaoka H, Nishizawa S, Asawa Y, Fujihara Y, Ogasawara T, Yamaoka K, et al. Involvement of fibroblast growth factor 18 in dedifferentiation of cultured human chondrocytes. *Cell Prolif*, 2010; 43 (1): 67-76.
26. Cucchiari M, Terwilliger EF, Kohn D, Madry H. Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J Cell Mol Med*, 2009; 13 (8B): 2476-88.
27. Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes-Boquete I, De Toro FJ, Blanco FJ. Differentiation of synovial CD-105(+) human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *J Cell Biochem*, 2009; 108 (1): 145-55.
28. Salkin H, Acar MB, Gonen ZB, Basaran KE, Ozcan S. Comparative proteomics analysis of transforming growth factor-beta1-overexpressed human dental pulp stem cell-derived secretome on CD44-mediated fibroblast activation via canonical smad signal pathway. *Connect Tissue Res*, 2023; 64 (2): 205-18.
29. Tanaka K, Yokosaki Y, Higashikawa F, Saito Y, Eboshida A, Ochi M. The integrin alpha5beta1 regulates chondrocyte hypertrophic differentiation induced by GTP-bound transglutaminase 2. *Matrix Biol*, 2007; 26 (6): 409-18.
30. Côrtes I, Matsui RAM, Azevedo MS. A Scaffold- and Serum-Free Method to Mimic Human Stable Cartilage Validated by Secretome. *Tissue Eng Part A*, 2021; 27 (5-6): 311-27.

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde takip edilen HIV ile enfekte erişkin bireylerde toksoplazma seropozitifliğinin araştırılması, 2024

Investigation of toxoplasma seropositivity in adult individuals infected with HIV followed at Marmara University Pendik Training and Research Hospital, 2024

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK¹ (ID), Uluhan SİLİ¹ (ID), Elif TÜKENMEZ TİGEN¹ (ID), Buket ERTÜRK ŞENGEL¹ (ID), Barış CAN² (ID), Tekin TUNÇEL¹ (ID), Fatma Burcu DOĞANÇ³ (ID), Eda Buse MEŞECİ¹ (ID), Arzu İLKİ² (ID), Volkan KORTEN¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Ülkemizde HIV/AIDS tanılı hasta sayısının giderek artış göstermesine rağmen literatürde bu hasta grubunda sadece bir merkezden yapılmış iki Toksoplazma seroprevelans çalışması olduğu dikkatimizi çekmiş olup, merkezimizdeki seropozitiflik yüzdesini ortaya koymayı ve elde edilen veriler ile kontrol önlemlerine katkı sağlamayı amaçladık.

Yöntem: Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji HIV polikliniğinde 1985 yılından günümüze kadar HIV enfeksiyonu tanısı almış ve 1995 yılından 2024 yılına (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üniversite Hastanesi döneminden itibaren) kadar takip edilmiş Anti-Toksoplazma IgG test sonucuna ulaşılabilen tüm hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastaların yaş, cinsiyet, cinsel yönelim, CD4 T lenfosit sayıları, Anti-Toksoplazma IgG sonuçları kaydedildi. Serebral toksoplazmozis tanısı alan hastalar çıkarıldı.

Bulgular: Araştırmaya Anti Toksoplazma-IgG test sonucu bulunan toplam 916 HIV/AIDS tanılı hasta

ABSTRACT

Objective: In Turkey HIV/AIDS diagnosed patients' number is gradually increasing currently and there are only two Toxoplasma seroprevalence studies published from one center in the literature. The aim of this study was to reveal the seropositivity rate in our center and to contribute to control measures with the data obtained.

Methods: All patients, who were diagnosed with HIV infection from 1985 to today and followed from 1995 to 2024 at the Marmara University Pendik Training and Research Hospital, Infectious Diseases and Clinical Microbiology HIV outpatient clinics and (starting from the Marmara University Faculty of Medicine University Hospital period) whose Anti-Toxoplasma IgG test results could be obtained, were included in the study. The patients' age, gender, sexual orientation, CD4 T lymphocyte counts, and Anti-Toxoplasma IgG results were recorded. Cerebral toxoplasmosis diagnosed patients were found from records.

Results: A total of 916 HIV/AIDS diagnosed patients with Anti-Toxoplasma IgG test results were included in

¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD., İstanbul, Türkiye

²Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., İstanbul, Türkiye

³Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD., İstanbul, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK

Fevzi Çakmak Mah. Muhsin Yazıcıoğlu Cad. No: 10 Üst Kaynarca / Pendik / İstanbul - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 02.10.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 24.10.2024

DOI ID : 10.55051/TurkHijyen.2024.40501

Yağcı Çağlayık D, Silı U, Tükenmez Tıgen E, Ertürk Şengel B, Can B, Tunçel T, Doğanç FB, Meşeci EB, İlki A, Korten V. Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde takip edilen HIV ile enfekte erişkin bireylerde toksoplazma seropozitifliğinin araştırılması, 2024. Turk Hij Den Biol Derg, 2024; 81(4): 409 - 418

dahil edildi. Hastaların %88,1'i (n=807) erkekti. Tüm hastaların yaş ortalaması 36,9 yıl idi ($\pm 11,4$ yıl; min-maks: 18-81 yıl). CD4 T lenfosit sayısı ortancası 369,0, ortalaması 408,9, ($\pm 275,34$; min-maks: 0,0-1659,0) idi. Tüm hastaların %41,3'ü (n=378) erkeklerle seks yapan erkeklerdi (MSM). Yaş ortalaması MSM grupta 32,5 yıl idi ($\pm 9,9$ yıl; min-maks: 18-81 yıl). Tüm hastaların %9,4'ü (n=86) ve kadınların %78,9'u (n=86) doğurganlık çağındaki (18-49 yaş) kadınlardan oluşmakta idi. *Toxoplasma gondii* için seropozitiflik yüzdesi %36,5 olarak saptandı. Seropozitiflik yüzdesinde, kadınlar arasında %46, MSM grupta %28 olmak üzere istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi.

Sonuç: Bu çalışma ile merkezimizde HIV ile enfekte hastalarda, genel populasyona ait dünya ortalamasına (%30) yakın bir sonuç olan %36,5 seropozitiflik düzeyi tespit edilmiş ve son 20 yıl içinde bu yüzdede azalma sağlandığı görülmüştür. Yaş ortalaması daha düşük olan MSM grupta seropozitiflik anlamlı oranda daha düşüktür. HIV/AIDS tanılı ve Anti-Toksoplazma IgG negatif bireylerin takibinde ilk tanı anında ve her ziyarette *Toxoplasma gondii* geçiş yolları, risk faktörleri ve alınacak önlemlerin hatırlatılıp bilgi düzeyinin artırılması ülkemizdeki Toksoplazma yükünün azaltılmasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: HIV, *Toxoplasma gondii*, seroprevalans, Türkiye

the study. 88.1% of the patients (n=807) were male. The average age of all patients was 36.9 years (± 11.4 years; min-max: 18-81 years). The median CD4 T lymphocyte count was 369.0, and the mean was 408.9 (± 275.34 ; min-max: 0.0-1659.0). 41.3% of all patients (n=378) were men who have sex with men (MSM). The mean age in the MSM group was 32.5 years (± 9.9 years; min-max: 18-81 years). 9.4% of all patients (n=86) and 78.9% of women (n=86) were in childbearing age (18-49 years). The seropositivity rate for *Toxoplasma gondii* was found to be 36.5%. A statistically significant difference was detected in the seropositivity rates, with 46% among women and 28% in the MSM group.

Conclusion: In this study, a seropositivity rate of 36.5% was found in HIV-infected patients at our center, which is close to seroprevalance rate in general population (30%) and it has been observed that there has been a decrease in this rate over the last 20 years. The seropositivity is significantly lower in the MSM group, which has a lower mean age. In the follow-up of HIV/AIDS diagnosed and anti-*Toxoplasma* IgG negative individuals, reminding transmission ways, risk factors, and preventive measures at the time of initial diagnosis and during each visit will contribute to reducing the *Toxoplasma* burden in our country.

Key Words: HIV, *Toxoplasma gondii*, seroprevalance, Türkiye

GİRİŞ

Toxoplasma gondii, sıcak kanlı hayvanları enfekte edebilen zorunlu hücre içi parazittir. Parazitin ookistleri kedi dışkısı yoluyla toprağa ve suya yayılır. Duvar yapısının tirozinden zengin proteinler içermesi nedeniyle ookistler ultraviyoleye dayanıklı olup nemli toprakta 18 aya kadar yaşayabilir (1). İnsanların enfekte olmasında ookist ile kontamine sebzeilerin yenmesi bir yoldur. Ookisti ağız yoluyla alan

hayvanların kas dokularında oluşan doku kistlerinin (bradizoit) insanlarca yutulması enfeksiyona sebep olan diğer bir yoldur (1). Ülkeler arası hatta ülke içinde bölgeler arasında farklılık göstermekle birlikte tüm dünyada prevelans ortalama %30'dur. Seropozitifliği etkileyen faktörler arasında `; ülkenin düşük, orta ya da yüksek gelir grubuna girmesi, çiğ veya az pişmiş et, yıkanmamış çiğ sebze veya meyve tüketimi, kedi teması, kırsal alanda yaşama, yaş ve eğitim düzeyi gösterilmiştir (1,2).

Ülkemizde genel populasyonda yapılmış çok sayıda çalışmada geniş aralıkta seroprevelans sonuçları ortaya çıkmıştır. Van ilindeki hemodiyaliz hastalarında %59,3 (3), Ankara ilindeki kan bağışçılarında %42,5 (4), İstanbul, Bursa, Adana, Kayseri, Kocaeli illerinde çocuk doğurma yaşındaki 17751 kadında %24,61 (5), Kilis'te çocuk doğurma yaşındaki kadınlarda %63,4 (6) olmak üzere farklı gruplarda farklı seropozitiflik yüzdeleri mevcuttur. Marmara bölgesinden yapılan çalışmalarda seropozitiflik yüzdelere bakıldığında Bursa'da hastane başvurusu olan hastalarda 2002-2008 arasında %28,8, İstanbul'da 2003-2005 yıllarında trafik kazası yaşayan şoförlerde %53,5, İstanbul'da 2004-2010 arasında çocuk doğurma yaşındaki kadınlarda %24,6, İstanbul Anadolu yakasında 2013-2015 yıllarında obstetri kliniğine başvuranlarda %31 sıklık saptanmıştır (7,8).

İmmün sistemin baskılandığı durumlardan biri olan HIV enfeksiyonunda latent enfeksiyonun reaktivasyonu sözkonusu olup özellikle CD4 T lenfosit hücre sayısı < 50/µL olduğunda sıklıkla ensefalit (serebral toksoplazmozis) tablosu görülmektedir. Bu klinik tabloda bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans (MR) ile korteks gri cevherde ve bazal gangliyonda tek ya da çok sayıda kontrast tutan lezyon ve eşlik eden ödem ya da diffüz ensefalit görüntülenebilmektedir (2, 9).

Ülkemizde İstanbul ili Avrupa yakasında HIV/AIDS tanılı 164 hastada 2006-2010 yılları arasını kapsayan dönemde, Anti-Toksoplazma IgG pozitiflik sıklığı %52 olarak saptanmıştır (10). CD4 T lenfosit hücre sayısı < 100/µL olan hastalarda bu düzey %64 bulunmuştur. Aynı hastanede 2006-2017 yılları arasında 614 hastada sıklık % 43,5 olarak saptanmıştır. CD4 T lenfosit hücre sayısı < 100/µL olan hastalarda bu düzey % 53,5 bulunmuştur. HIV tanısı olan erkeklerle seks yapan erkeklerde (MSM) seropozitiflik %37,6 olarak daha düşük kaydedilmiştir (11).

Resmi verilere göre ülkemizde 1985- Kasım 2023 arasında HIV enfeksiyonu tanısı almış kişi sayısı 39.437 olup 2.295'i AIDS vakasıdır (12). Avrupa ve Amerika HIV tedavi ve izlem rehberlerine göre HIV tanısı alan

tüm hastalarda latent enfeksiyonun saptanması için Anti-Toksoplazma IgG varlığı ilk vizitte araştırılmalıdır (9, 13). Seronegatif kişilerin takibinde çiğ veya az pişmiş et, midye, istiridye gibi çiğ kabuklu deniz ürünlerinden kaçınılması (14), etin 165- 170°F (74-77°C) iç sıcaklığa ulaşmasının sağlanması, çiğ et ve toprak temasından sonra ellerin yıkanması, meyve ve sebzenin yıkanması, kedi kumu değiştirirken eldiven giyilmesi ve sonrasında ellerin yıkanması, kedilerin evde bakılması, sokak kedilerine dokunulmaması ya da eve alınmaması rehberlerce önerilmektedir (9). Kedileri çiğ ya da pişmemiş etle beslememek, pişmiş sofraya yemeği ya da kurutulmuş ticari yiyeceklerle beslemek de önerilmektedir.

Ülkemizde HIV/AIDS tanılı hasta sayısı giderek artış göstermesine rağmen literatürde sadece bir merkezden yapılmış iki Toksoplazma seroprevelans çalışması olduğu dikkatimizi çekmiş olup, merkezimizdeki seropozitiflik yüzdesini ortaya koymayı ve elde edilen veriler ile kontrol önlemlerine katkı sağlamayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji HIV polikliniğinde 1985 yılından günümüze kadar HIV enfeksiyonu tanısı almış ve 1995 yılından (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üniversite Hastanesi döneminden itibaren) 2024 yılına kadar takip edilmiş Anti-Toksoplazma IgG test sonucuna ulaşılabilen tüm hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastaların ilk vizitinde istenilen Anti Toksoplazma-IgG test sonuçları kaydedildi.

Anti-HIV testleri, 1985-2021 yılları arasında mikropartikül enzim immünoassay yöntemi ile Axsym (Abbott, ABD) cihazı ve kemilüminesans mikropartikül immunoassay (CMIA) yöntemi ile Architect (Abbott, ABD) cihazında gerçekleştirilmiş olup 2021- 2024 yılları arasında ise Elecsys® HIV Duo (Roche, Almanya) kiti kullanılarak HIV 1 p24 antijeni ile birlikte HIV 1 ve HIV 2'ye karşı antikorların kalitatif tayini yapılmıştır.

Reaktif bulunan örnekler doğrulama amacıyla Ulusal AIDS Doğrulama Merkezi'ne gönderilmiştir. Burada, bir başka 4. kuşak ELISA testi olan VIDAS HIV Duo Ultra (bioMérieux, Fransa) ile tekrar test edilmiştir. Reaktif örnekler, Geenius HIV1/2 Supplemental Assay (Bio-Rad, Fransa) gibi hızlı HIV doğrulama testleri ile de doğrulanmıştır. Doğrulama testleri pozitif olan örnekler HIV enfeksiyonu olarak kabul edilmiştir.

Anti-Toksoplazma IgG testi, 1985-2010 yılları arasında mikropartikül enzim immünoassay yöntemiyle Axsym (Abbott, ABD) cihazında, 2010-2021 yılları arasında ise VIDAS (bioMérieux, Fransa) cihazı ile yapılmıştır. Bu cihaz, enzim bağlı floresan antikör (ELFA) yöntemiyle *Toxoplasma gondii*'ye karşı oluşan IgG antikörlerini tespit etmektedir. Testler 2021- 2024 yıllarında Roche Cobas e-801 (Roche Diagnostics, İsviçre) otoanalizöründe kemilüminesans yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Tüm testler, üretici firmaların talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar laboratuvarın kalite kontrol süreçlerine göre değerlendirilmiştir.

İstatistiksel değerlendirme için Jamovi programı kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin değerlendirilmesi için Ki-kare testi uygulanmıştır. Sürekli değişkenler için ise ortalama ölçütleri (ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer) hesaplanmış ve normalite testleri (Kolmogorov-Smirnov) uygulanmıştır. İki grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında, normal dağılım gösterenler Student's t testi, normal olmayan dağılımlar ise Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $<0,05$ kabul edilmiştir.

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:03.11.2023, Karar no: 09.2023.1389).

BULGULAR

Araştırmaya Anti Toksoplazma-IgG test sonucu bulunan toplam 916 HIV/AIDS tanılı hasta dahil

edildi. Hastaların %88,1'i (n=807) erkekti. Tüm hastaların yaş ortalaması 36,9 yıl idi ($\pm 11,4$ yıl; min-maks:18-81 yıl). CD4 T lenfosit sayısı ortancası 369,0, ortalaması 408,9, ($\pm 275,34$; min-maks:0,0-1659,0) idi. Tüm hastaların %41,3'ü (n=378) erkeklerle seks yapan erkeklerdi (MSM). Yaş ortalaması MSM grupta 32,5 yıl idi ($\pm 9,9$ yıl; min-maks:18-81 yıl). Tüm hastaların %9,4'ü (n=86) ve kadınların %78,9'u (n=86) doğurganlık çağındaki (18-49 yaş) kadınlardan oluşmakta idi.

Tüm hastaların %36,5'inde (n=334) Anti Toksoplazma-IgG testi pozitif saptandı. Kadın hastalarda seropozitiflik yüzdesi %46, MSM grupta %28 olarak tespit edildi. Seropozitiflik yüzdesinin yaş ile arttığı ve 48 yaş üzerinde %63,7'ye ulaştığı saptandı. (Tablo 1).

Tüm seropozitif hastalar arasında serebral toksoplazmozisli hasta sayısı 9, düzey % 2,7 bulundu. Serebral toksoplazmozis tanılı hastaların CD4 T lenfosit hücre sayısı ortancası 96, ortalaması 218,4 ($\pm 268,3$, min-maks:9-693,0) idi. Yıllara göre serebral toksoplazmozis tanılı hastaların CD4 sayılarında bir korelasyon saptanmadı ($p=0,966$).

Hastaların diğer demografik verileri Tablo 1'de verilmiştir.

HIV ile enfekte hastaların Anti Toksoplazma-IgG test pozitifliğinin cinsiyet, yaş, uyruk ve HIV tanı yılına göre ilişkisi Tablo 2'de verilmiştir. Heteroseksüellere göre MSM grupta Anti Toksoplazma-IgG test negatifliği yüzdesi anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ($p<0,001$) (Tablo 2).

Çocuk doğurma çağındaki (18-49) kadınların %39,5'inde (n=34) Anti Toksoplazma-IgG pozitifliği mevcuttu. Doğurganlık çağındaki kadınlara göre diğer yaş grubundaki kadınlarda Anti Toksoplazma-IgG pozitifliği yüzdesi anlamlı şekilde daha yüksek saptandı ($p<0,001$) (Tablo 2).

Toplam 10 gebe hastanın 3'ünde (%30) Anti Toksoplazma-IgG pozitifliği saptandı. Gebe olan kadınlarla olmayanlar arasında seropozitiflik yüzdesi açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,669$).

Tablo 1. Hastaların tanımlayıcı özelliklerine göre *T. gondii* sıklığı

	T. gondii Ig G (+) (n/%)	T. gondii Ig G (-) (n/%)	Toplam (n/%)
Cinsiyet			
Erkek	283/35,1	524/64,9	807/100,0
Kadın	51/46,8	58/53,2	109/100,0
Cinsel yönelim			
Heteroseksüel	169/41,1	242/58,9	411/100,0
Homoseksüel/biseksüel	106/28,0	272/72,0	378/100,0
Bilinmiyor/belirtilmemiş	59/46,5	68/53,5	127/100,0
CD4 T lenfosit hücre sayısı (n=887)			
50 ve altı	23/34,8	43/65,2	66/100,0
51-100	24/45,3	29/54,7	53/100,0
101-200	35/36,1	62/63,9	97/100,0
201-350	72/36,5	124/63,3	196/100,0
351-500	69/38,1	112/61,9	181/100,0
501 ve üzeri	102/34,7	192/65,3	294/100,0
Yaş			
18-27	38/17,8	175/82,2	213/100,0
28-37	97/30,5	221/69,5	318/100,0
38-47	90/42,1	124/57,9	214/100,0
48 ve üzeri	109/63,7	62/36,3	171/100,0
Uyruk			
Türkiye	323/36,3	566/63,7	889/100,0
Türkiye dışı*	11/40,7	16/59,3	27/100,0
HIV tanı yılı (n=892)			
2024-2015	214/33,8	420/66,2	634/100,0
2014-2005	106/43,8	136/56,2	242/100,0
2004-1995	6/37,5	10/32,5	16/100,0
Toplam	334/100,0	582/100,0	

*Hastaların 3'ü Avrupa, 7'si Afrika, 13'ü Asya, 4'ü Amerika kıtası kökenlidir.

Tablo 2. HIV'li hastalardaki *T. gondii* seropozitifliğinin istatistik değerlendirmesi

	T. gondii Ig G (+) (n/%)	T. gondii Ig G (-) (n/%)	p değeri
Cinsiyet			
Erkek	283/35,1	524/64,9	0,017
Kadın	51/46,8	58/53,2	
Cinsel yönelim			
Heteroseksüel	169/41,1	242/58,9	<0,001*
Homoseksüel/biseksüel	106/28,0	272/72,0	
CD4 T lenfosit hücre sayısı (n=887)			
199 ve altı	82/38,3	132/61,7	0,559
200 ve üzeri	243/36,1	430/63,9	
Yaş			
18-27	38/17,8	175/82,2	<0,001
28-37	97/30,5	221/69,5	
38-47	90/42,1	124/57,9	
48 ve üzeri	109/63,7	62/36,3	
Uyruk			
TC olan	324/36,4	567/63,6	0,482
TC olmayan	12/42,9	16/57,1	
Tanı yılı (n=892)			
2024-2015	214/33,8	420/66,2	0,022
2014-2005	106/43,8	136/56,2	
2004-1995	6/37,5	10/32,5	
Kadınlar (n=109)			
18-49 yaş	34/39,5	52/60,5	<0,001
50-81 yaş	17/73,9	6/26,1	

*Bilinmiyor/belirtmek istemiyor kategorisi çıkarılarak analiz gerçekleştirilmiştir.

TARTIŞMA

Merkezimizde takip edilen HIV ile enfekte hastalarda *Toxoplasma gondii* için seropozitiflik yüzdesi %36,5 bulunmuştur.

HIV enfeksiyonu tanımlı hastalarda sıklık ülkelerine göre belirgin farklılık göstermekte olup Yunanistan'da %31, İspanya'da %38, Hindistan'da yeni tanı almış HIV enfekte hastalarda %73 bulunmuştur (15,16,17). Çin'de ise aynı hasta grubunda %9,08 ile Amerika Birleşik Devletleri'ndekine (ABD) benzer bir yüzde saptanmıştır (18)

Toplam 37 ülkeyi içine alan bir metaanaliz çalışmasında HIV ile enfekte bireylerde *Toxoplasma gondii* seroprevalansı ortalama %44,22 saptanmış olup, en düşük yüzde Hollanda'da %3,7 olarak bulunmuş olup, Kanada ve ABD'de %10, Brezilya'da %23, Almanya'da %35, Fransa'da %23, İtalya'da %36, Libya'da %88, Fas'ta %62, İran'da %40 ve en yüksek düzey Etiyopya'da olmak üzere %92 olarak kaydedilmiştir (19). Merkezimiz verileri %36,5 ile HIV ile yaşayan bireyler için dünya ortalamasının altında, Avrupa ülkelerine yakın bir oranı göstermektedir.

Merkezimizde kadınlarda %46, MSM grupta %28 olarak bulunan seropozitiflik yüzde farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İstanbul Avrupa yakasından yapılan çalışmaya benzer olarak MSM grupta seropozitifliğin düşük bulunması bu gruptaki yaş ortalamasının 32,5 olmak üzere daha düşük olmasına bağlanabilir (11). Literatürdekine benzer şekilde seropozitiflik yüzdesinin yaş ile arttığı ve 48 yaş üzerinde %63,7'ye ulaştığı saptandı (11).

Yunanistandan HIV enfeksiyonu tanısını yeni almış 155 hastada yapılan bir çalışmada *T. gondii* için seropozitiflik %31,61 bulunmuş olup, hastaların %27'sini oluşturan kadınlardaki sıklığın %50 olduğu ve çalışmamızdakine benzer şekilde erkeklerden daha yüksek sıklığa sahip oldukları gösterilmiştir (15). Bu durum, çalışmada kadınların hormonlarının farklı olmasına bağlanmıştır fakat bu farklılığın esas sebebi merkezimizde izlenen kadın hasta sayısının anlamlı oranda daha az olması ve hastaların yarıya yakınının

(%41,3'ünün) MSM olması olarak değerlendirilebilir. Yunanistan'da yapılan çalışmada göçmenlerin seropozitifliği arttırdığı üzerinde durulmuş olup merkezimizde uyruğu farklı kişilerde oranın %40,7 olduğu ve genel ortalamayı anlamlı şekilde etkilemediği izlenmiştir.

Merkezimizde çocuk doğurma yaşındaki (18-49) kadınların %39,5'inde (n=34) Anti Toksoplazma-IgG pozitifliği mevcut olup merkezimizin de bulunduğu İstanbul Anadolu yakasında genel popülasyonda kaydedilmiş çocuk doğurma yaşındaki kadınlardaki %31'lik seropozitiflik yüzdesine benzer olduğu görülmüştür (8). HIV tanısı aldığı anda gebe olan 10 hastanın 3'ünde (%30) Anti Toksoplazma-IgG pozitifliği saptandı ve seropozitiflik yüzdesi açısından anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,669). Bu da çalışmamızda ortaya çıkan doğurganlık yaşındaki kadınlardaki %39,5'lük sonuç ile uyumludur.

Elli yaşının üzerindeki kadınlarda Anti Toksoplazma-IgG pozitifliği oranının (%73,9) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olmasının sebebi, artan yaşla beraber kadınlarda çiğ yeşillik yıkama, hazırlama ve yemenin veya sokak kedisi besleme alışkanlıklarının daha fazla olması şeklinde yorumlanabilir.

HIV ile enfekte bireylerde serebral toksoplazmozis insidansı; HIV ile enfekte popülasyondaki Toksoplazma prevelansı, CD4 T lenfosit hücre sayısı, profilaksi verilip verilmediği ve Antiretroviral tedaviye yanıtın olup olmadığıyla direkt ilişkilidir (1). Profilaksi ve antiretroviral tedavi almayan AIDS hastalarında bu oranın %20-47 olduğu tahmin edilmektedir (1). Güncel olarak Kamerun'un en büyük şehri olan Douala'da yapılan çalışmada, ortanca CD4 değeri 68 olan HIV ile enfekte hastalarda serebral toksoplazmozis oranı %14 olarak bulunmuştur (20). Güney Kore, Avustralya, Tayland, Hindistan, Kamboçya, Endonezya, Vietnam, Filipinler, Singapur, Malezya, Tayvan, Çin ve Japonya'da 1997-2020 yıllarında HIV enfeksiyonu tanısı alan 9576 hastayı içine alan çalışmada, ortanca CD4 T lenfosit sayısı 40 olan serebral toksoplazmozis olgularının oranı %2,8 bulunmuş olup merkezimizde

takip edilen ve ortanca CD4 T lenfosit sayısı 96 olan serebral toksoplazmozis olgularının oranı olan %2,7 ile benzerdir (21). Ülkemizde sağlık hizmetine kolay erişimin, Asya Pasifik ülkelerine benzer şekilde fakat Afrika'ya göre daha erken dönemde HIV enfeksiyonu tanısı konulmasını sağladığı düşünülebilir.

Türkiye'de kedilerde *Toxoplasma gondii* seroprevalansı ortalama %41,5 olarak bulunmuştur (22). Bölgelere göre değişmekle birlikte ülkemizde koyun ve keçilerde %38 (23), sığırlarda %85'e varan sıklık bildirilmekle beraber kasaplardan toplanan sığır etlerinde yapılan ulusal ve uluslararası bazı çalışmalarda parazitin izole edilememesi veya moleküler olarak pozitifliğe rastlanmamış olması ve donmuş ette bradizoitlerin parçalanması Toksoplazma parazitinin geçişinde et tüketiminden ziyade kedi temasını ve iyi yıkanmamış yeşilliklerden geçişi akla getirebilmektedir (1,24,25).

Avrupa ve Amerika HIV izlem rehberlerine uygun olarak HIV enfeksiyonu tanısı alan her hastada serolojik tarama yapılması gereklidir. Seropozitif kişiler arasında CD4 T lenfosit hücre sayısı < 200/ μ L olanlara, toksoplazma'nın beyin tutulumunu önlemek için trimetoprim-sulfometaksazol profilaksisi verilmelidir (2, 9, 13).

Bu çalışma ile merkezimizde HIV ile enfekte hastalarda, genel popülasyona ait dünya ortalamasına (%30) yakın bir sonuç olan %36,5 seropozitiflik yüzdesi tespit edilmiş ve son 20 yıl içinde bu oranda azalma sağlandığı görülmüş olsa da, HIV/AIDS tanılı ve Anti-Toksoplazma IgG negatif bireylerin takibinde ilk tanısında ve her vizitte *Toxoplasma gondii* geçiş yolları, risk faktörleri ve alınacak önlemlerin hatırlatılıp bilgi düzeyinin artırılması ülkemizdeki Toksoplazma yükünün azaltılmasına katkı sağlayacaktır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:03.11.2023, Karar no: 09.2023.1389).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Montoya JG, Boothroyd JC, Kovacs JA. *Toxoplasma gondii*: General Principles Mandell, Douglas, And Bennett's Principles And Practice of Infectious Diseases, Ninth Edition Elsevier, Inc. 2020 ;3355-87.
2. Wang ZD, Wang SC, Liu HH, Ma HY, Li ZY, Wei F, et al. Prevalence and burden of *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected people: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet HIV*, 2017; 4(4): e177-e188.
3. Yürektürk Ş, Yılmaz H, Cengiz ZT. Investigation of Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in the Hemodialysis Patients with ELISA Method. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2023; 47(1): 16-21.
4. Yılmaz GR, Babür C, Kiliç S, Beyaz E, Karakoç AE. Short communication: investigation of *Toxoplasma gondii* antibodies in blood donors by Sabin-Feldman Dye Test. *Mikrobiyol Bul*, 2006; 40(4): 375-81.
5. Akyar I. Seroprevalence and coinfections of *Toxoplasma gondii* in childbearing age women in Turkey. *Iran J Pub Health*, 2011; 40(1), 63.
6. Demiroğlu T, Polat ZA, Çelik C. Kilis Devlet Hastanesi Kadın Doğum Polikliniğine Başvuran Doğurgan Çağdaki Kadınlarda *Toxoplasma gondii* Seropozitifliğine Etki Eden Risk Faktörlerinin Araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2015; 39: 299-304.
7. Kolören Z, Dubey JP. A review of toxoplasmosis in humans and animals in Turkey. *Parasitology*, 2020; 147(1): 12-28.
8. Numan O, Vural F, Aka N, Alpay M, Coskun ADE. TORCH seroprevalence among patients attending obstetric Care Clinic of Haydarpasa Training and Research Hospital affiliated to association of Istanbul northern Anatolia public hospitals. *Northern clinics of Istanbul*, 2015; 2(3): 203.
9. Panel on Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents With HIV. Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents With HIV. National Institutes of Health, Centers for Disease Control and Prevention, HIV Medicine Association, and Infectious Diseases Society of America. <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-opportunistic-infection>. (Accessed: Aug 2024) [CC1].
10. Aydın ÖA, Karaosmanoğlu HK, Korkusuz R, Nazlıcan Ö. HIV/AIDS Hastalarında *Toxoplasma gondii* IgG Seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2011; 35: 65-7.
11. Şenoğlu S, Yeşilbağ Z, Aydın ÖA, Kumbasar H, Karaosmanoğlu KKY. HIV/AIDS hastalarında *Toxoplasma gondii* IgG seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2018; 42(3): 175-9.
12. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/hastaliklar/hiv-aids.html> (Accessed: Aug 2024)
13. <https://www.eacsociety.org/media/guidelines-12.0.pdf> (Accessed: Aug 2024)
14. Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clinic Infect Dis*, 2009; 49(6): 878-84.
15. Voyiatzaki C, Zare Chormizi AD, Tsoumani ME, Efstathiou A, Konstantinidis K, Chaniotis D, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among HIV Positive Patients under Surveillance in Greek Infectious Disease Units: A Screening Study with Comparative Evaluation of Serological Methods. *Pathogens*, 2024; 13(5): 375.
16. Miguel Vicedo M, Cabello P, Ortega Navas MC, González Barrio D, Fuentes I. Prevalence of Human Toxoplasmosis in Spain Throughout the Three Last Decades (1993-2023): A Systematic Review and Meta analysis, *J Epidemiol Glob Health*, 2024; 1-17.

17. Dutta A, Mehta PR, Nayana I. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in newly diagnosed HIV seropositive patient. *Indian J Med Res*; 2020; 152, November, 515-8.
18. Mao F, Yang Y, Chen Y, Zhang Q, Ding X, Ni B, et al. Seroprevalence and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* Infection Among High-Risk Populations in Jiangsu Province, Eastern China. 2021; *Front Cell Infect Microbiol*, 11: 783654.
19. Safarpour H, Cevik M, Zarean M, Barac A, Hatam-Nahavandi K, Rahimi M et al. Global status of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors in people living with HIV. *AIDS*, 2020; 34(3): 469-74.
20. Luma HN, Tchaleu BCN, Mapoure YN, Temfack E, Doualla MS, Halle MP, et al. Toksooplazma encephalitis in HIV/AIDS patients admitted to the Douala general hospital between 2004 and 2009: a cross sectional study. *BMC Research notes*, 2013; 6: 1-5.
21. Lee KH, Jiamsakul A, Kiertiburanakul S, Borse R, Khol V, Yuniastuti E, et al. Risk factors for toxoplasmosis in people living with HIV in the Asia-Pacific region. *PLoS ONE*, 2024, 19(7): e0306245
22. Yücesan B. Türkiye’de kedilerdeki *Toxoplasma gondii* araştırmaları. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2023, 80:2.
23. Bozukluhan K, Gökçe G, Uzlu E, Mor N, Erkılıç EE, Kızıltepe Ş. Kars Yöresindeki Koyun ve Keçilerde *Toxoplasma gondii* Seroprevalansının Araştırılması. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 2018; 32(3): 169-72.
24. Kennerman E, Kaya G, Gazyağcı S, Babur C, Kılıç S. (2006). Bursa Bölgesi’ndeki Sığırlarda Toksoplazmosisin Serolojik Tanısı ve Anti-*Toxoplasma gondii* Antikor Seroprevalansının Belirlenmesi. *Vet. Bil. Derg.*, 2006; 22(1-2): 45-9.
25. Muz MN. Kırmızı Et ve Ürünlerinde *Toxoplasma gondii*’nin Nested PCR metodu ile tespit edilmesi ve Genotiplendirilmesi Projesi. NKUBAP.10. AY.16.059 Nolu proje, Namık Kemal Üniversitesi, 2016.

Effect of copper sulphate in rat brain tissue: Kir channels

Sıçan beyin dokusunda bakır sülfat etkisi: Kir kanalları

Selda KAHVECİ¹ (ID), Osman ÖZTÜRK² (ID), Sümeyye UÇAR³ (ID), Aslı OKAN OFLAMAZ¹ (ID),
Derya GÖKMEN⁴ (ID), Seher YILMAZ⁵ (ID), Züleyha DOĞANYİĞİT¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Copper plays an important role in the catalyzing of enzymes involved in the function of many enzymes in the cell, especially in mitochondria, where energy is produced in the cell, and is involved in mechanisms such as iron homeostasis, scavenging of free radicals, collagen, and elastin bond formation. The expression of internal potassium channels (Kir) is known in various tissues, especially in brain tissue. In this context, the aim of this study was to evaluate the morphological effect of Copper Sulphate (CuSO₄) in male and female rat brain tissue and the expression of Kir2.1 and Kir4.1 in the prefrontal cortex and hippocampus regions of the brain.

Methods: In this study, female and male Sprague dawley rats were divided into control group (n=10) and CuSO₄ group (n=10) and administered saline to the control group and CuSO₄ (100 mg/kg) to the CuSO₄ group by oral gavage daily for 14 days. The animals were then euthanised and the brain tissues were examined histologically for morphological and tissue integrity and the expression of Kir channel proteins Kir2.1 and Kir4.1 was evaluated by immunohistochemical method.

ÖZET

Amaç: Bakır, hücredeki birçok enzimin işlevinde rol oynayan ve özellikle hücrede enerjinin üretildiği mitokondride etkili olup demir homeostazı, serbest radikallerin temizlenmesi, kolajen ve elastinin bağ oluşumu gibi mekanizmalarda yer alan enzimlerin katalizlenmesinde önemli bir rol oynar. İnternal potasyum kanallarının (Kir) ise çeşitli dokularda özellikle beyin dokusundaki ekspresyonu bilinmektedir. Bu bağlamda bu çalışmada, dişi ve erkek sıçan beyin dokusunda Bakır Sülfatın (CuSO₄) morfolojik etkisi, beyin prefrontal korteks ve hipokampus bölgelerindeki Kir2.1 ve Kir4.1'in ekspresyonunu değerlendirmek amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada dişi ve erkek Sprague dawley ırkı sıçanlar, kontrol grubu (n=10) ve CuSO₄ grubu (n=10) olarak ayrıldı ve 14 gün boyunca günlük olarak ağızdan gavaj yoluyla kontrol grubuna serum fizyolojik, CuSO₄ grubuna ise CuSO₄ (100 mg/kg) uygulandı. Daha sonra hayvanlara ötenazi uygulandı ve ardından beyin dokuları morfolojik ve doku bütünlüğü açısından histolojik olarak incelenerek Kir kanalı proteinleri olan Kir2.1 ve Kir4.1'in ekspresyonu ise immünohistokimyal yöntem ile değerlendirildi.

¹Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Yozgat, Türkiye

²Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Child Health and Diseases, Yozgat, Türkiye

³Erciyes University, Faculty of Medicine, Department of Anatomy, Kayseri, Türkiye

⁴Ankara University, Faculty of Medicine, Department of Biostatistics, Ankara, Türkiye

⁵Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Anatomy, Yozgat, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Selda KAHVECİ

Yozgat Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Histoloji-Embriyoloji AD., Yozgat - Türkiye

E-posta / E-mail : selda.kahveci@yobu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 21.02.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 18.05.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.33678

Kahveci S, Öztürk O, Uçar S, Okan Oflamaz A, Gökmen D, Yılmaz S, Doğanıyigit Z. Effect of copper sulphate in rat brain tissue: Kir channels. Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(4): 419 - 430

Results: Histomorphological characteristics of CuSO₄ group brain tissues were observed to change and tissue integrity was disrupted. In both the control group and CuSO₄ group, Kir2.1 expression in the prefrontal cortex region was more intense than in the hippocampus region in both sexes. Especially in female rats, intense Kir2.1 expression was observed in neurons in the prefrontal cortex region (p=0.001). In CuSO₄ group, the main effect of region was found to be significant for Kir2.1 expression (p=0.014). Kir4.1 expression was observed to be intense in the hippocampus region of the control group, while there was a statistically significant difference between the regions in the control group (p<0.001).

Conclusion: We found that brain tissue exposed to excessive CuSO₄ could not fully preserve its morphology. In addition, we determined that Kir2.1 was intensely expressed especially in the prefrontal cortex region of the brain, but the expression of Kir4.1 was decreased in both prefrontal cortex and hippocampus regions of male rat brain tissues by CuSO₄ treatment. The relationship between the damage caused by intensive CuSO₄ application in brain tissue and the activation/inhibition of Kir channels needs to be investigated in more detail.

Key Words: Copper sulphate, Brain, Kir2.1, Kir4.1

Bulgular: CuSO₄ grubu beyin dokularının histomorfolojik özelliklerinin değiştiği ve doku bütünlüğünün bozulduğu gözlemlendi. Hem kontrol grubunda hem de CuSO₄ grubunda, prefrontal korteks bölgesindeki Kir2.1 ekspresyonu her iki cinsiyette de hipokampus bölgesine göre daha yoğun olduğu izlendi. Özellikle dişi sıçanlarda prefrontal korteks bölgesindeki nöronlarda yoğun Kir2.1 ekspresyonu gözlenmiştir (p=0,001). Kir2.1 ekspresyonu için CuSO₄ grubunda bölgenin ana etkisi anlamlı bulunmuştur (p=0,014). Kir4.1 ekspresyonunun kontrol grubu hipokampus bölgesinde yoğun olduğu izlenirken, aynı şekilde kontrol grubunda bölgeler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu belirlenmiştir (p<0,001).

Sonuç: Aşırı CuSO₄'e maruz kalan beyin dokusunun morfolojisini tam olarak koruyamadığını tespit ettik. Ayrıca bulgularda Kir2.1'in özellikle beyin prefrontal korteks bölgesinde yoğun eksprese olduğu ama CuSO₄ uygulamasıyla özellikle erkek sıçan beyin dokularında gerek prefrontal korteks gerekse hipokampus bölgesinde Kir4.1 ekspresyonunun azaldığını belirledik. Yoğun CuSO₄ uygulamasının beyin dokusunda yol açtığı hasar ile Kir kanallarının aktivasyon/inhibisyon arasındaki ilişkisinin daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bakır Sülfat, Beyin, Kir2.1, Kir4.1

INTRODUCTION

Copper (Cu) is an important trace element that plays a role in the function of many enzymes in the cell (1). It is especially effective in mitochondria, where energy is produced in the cell, and plays a role in catalyzing enzymes involved in mechanisms such as iron homeostasis, clearance of free radicals, and bond formation of collagen and elastin (2). Copper has many functions; it is one of the metals involved in biological processes such as cell proliferation,

cellular oxidation and reduction events, angiogenesis, cell migration, and signal transduction (3). The copper required for the body has been suggested to be between 0.6 and 1.6 mg of copper per day in humans (4). Excess Cu in the body can come from food, drinking water and other environmental source (5). High intake of copper into the organism leads to serious poisoning and is reported to cause serious toxicity. Cu toxicity has been reported to induce oxidative stress and tissue damage as a result of Fenton reaction (6). Also, in the brains of Parkinson's

and Alzheimer's patients, copper levels decreased in brain regions such as substantia nigra, whereas copper accumulation occurred in Lewis bodies or senile plaques (7, 8). In another study, it was reported that chronic copper toxicity caused differential copper accumulation associated with cognitive dysfunction in the cerebral cortex, striatum and cerebellum of male Wistar rats (9). Furthermore, excess copper intake by oral administration has been shown to increase the amount of non-ceruloplasmin-bound copper in plasma, cortex, and hippocampus, which may cause oxidative damage through overproduction of Reactive Oxygen Species (ROS) (10).

The most important physiological feature of ion channels is electrical signals and they provide membrane potential formation in cells such as nerve and muscle where electrical stimulation is high (11). Internal potassium channels (Kir), which are ion channels that play an active role in excitable cells such as neurons and cardiomyocytes, actively conduct K⁺ ions into the cell toward the end of the action potential (12). Important functions of Kir channels; control cell proliferation, regulate hormone secretion in the central nerve system, modulate neurotransmitter release, and can act as hypoxia sensors (13). Studies to date have identified seven structurally distinct subfamilies of the Kir family, ranging from Kir1 to Kir7 (14). Kir2.1 channels are known to be highly expressed in the brain (15), and may regulate the excitability of granular cells in the hippocampus during development (16). Kir4.1 channels are reported to be centrally located in oligodendrocytes, where the myelin sheath is produced, and in astrocytes surrounding neurons, but also in the cortex, thalamus, hippocampus, and brain stem (17). Immunohistochemical evidence exists that oligodendrocytes express Kir4.1 (17) and a study on global Kir4.1 knock-out mice indicated that it is required for oligodendrocyte development and myelination (13, 18).

Therefore, in this study, we aimed to investigate the immunoreactivity changes of Kir channels; Kir2.1 and Kir4.1 with copper sulphate (CuSO₄) in the

prefrontalcortex and hippocampus regions of male and female rat brain tissue. We think that the findings obtained in this study may be effective in changing the activity of Kir channels in brain tissue, especially with CuSO₄, and may help to elucidate the changes in the activity of Kir2.1 and Kir4.1 in both prefrontal cortex and hippocampus regions.

MATERIAL and METHOD

Animals

In all experimental procedures, 30-40 days old male and female Sprague dawley rats with body weights ranging from 50 to 70 g were used and all experimental animals were obtained from Erciyes University DEKAM. Rats were housed in cages at 24 °C ± 2 °C, 12 h light/dark cycles, with food and water in the cages. At the end of the experimental procedure, rats were sacrificed under ketamine-xylazine induced anaesthesia. Every effort and care was carefully taken to minimise animal suffering.

Experimental model induced by copper sulphate (CuSO₄)

In the study, male (n = 10) and female (n = 10) rats were randomly divided into 2 groups:

- i) Control groups receiving saline by oral gavage (n = 10; 5 male- 5 female),
- ii) CuSO₄ groups receiving CuSO₄ dissolved in saline at a dose of 100 mg/kg/day by oral gavage (n = 10; 5 male- 5 female).

The required dosage of CuSO₄ was 100 mg/kg for 14 days following the standard protocol of Liu et al. (19). The rats were then sacrificed and brain tissues were removed for histological and immunohistochemical examinations.

Histological analysis

The brain tissue was first preserved in 10% formaldehyde, and after that, it was flicked and cleaned with running water for an entire night. Tissues were immersed in a succession of progressively stronger alcohol solutions to extract water from

them (20). The tissues were dewatered, rinsed with xylol (amounting to the size of the tissue), and then embedded in paraffin blocks at the proper depth. From the paraffin-embedded blocks, sections with a thickness of 5 μm were cut using a microtome instrument. The tissue sections were then put on poly-L-lysine-coated slides for immunohistochemical analysis and on regular slides for hematoxylin and eosin staining. Following all staining procedures, an Olympus BX53 light microscope was used to assess tissue integrity, oedema and histological changes in the morphology of the prefrontal cortex and hippocampus regions.

Immunohistochemical analysis

The variations in Kir2.1 and Kir4.1 expressions in brain tissues were identified by labeling using immunohistochemical techniques using the avidin-biotin-peroxidase method (21) The 5 μm thick sections from the paraffin tissue blocks were stored at 60 °C for an entire night. They were then rehydrated using xylene and a series of graduated alcohols. After five minutes of distilled water washing, they were boiled in citrate buffer (pH 6.0; Thermo Fischer Scientific, UK, AP-9003-500) for five minutes in the microwave at 600 W, and they were allowed to cool for about fifteen minutes at room temperature. Tissue sections were kept in 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 minutes to prevent endogenous peroxidase. Tissue sections were then treated with Ultra V Block solution (Thermo Fischer Scientific, UK, TA-125-UB) to prevent non-specific staining. Sections were then incubated with Kir2.1 (1:200 dilution ratio; Alomone Labs, APC-026) and Kir4.1 (1:200 dilution ratio; Alomone Labs, APC-035) overnight at 4 °C. After rinsing with PBS 3 times for 5 min each, biotinylated goat anti-polyvalent secondary antibody (Thermo Fischer Scientific, UK, TP-125-BN) was incubated in an oven at 37° C for 40 min. After rinsing in PBS 3 times for 5 min each, the sections were incubated with streptavidin peroxidase (Thermo Fischer Scientific, UK, TS-125-HR) at 37° C

for 30 min in an oven. A solution of diaminobenzidine (DAB) chromogen (Thermo Fischer Scientific, UK, TA-125-HD) was applied to the sections in order to visualize the combined effect of the antibodies. The slides were counterstained using a Hematoxylin solution that was adjusted in accordance with Gill III (Merck, Germany, 1.05174.1000). After exposing each portion to progressively higher alcohol concentrations for ten minutes at a time, entellan was used to completely dehydrate it. With an Olympus BX53 light microscope, the sections were inspected. With Image J Version 1.46 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland), immunoreactivity levels in the hippocampal and prefrontal cortex of the brain were assessed. In each of the three experimental groups, a minimum of ten distinct locations were assessed and visualized for every rat.

Statistical analysis

Experimental data were analysed in SPSS 11.5 and presented as mean \pm SD. Normality was tested using Shapiro-Wilks test and homogeneity of variances were tested using Levene test. Two-way analysis of variance was used to examine the effect of group, gender and region factor on Kir2.1, Kir 4.1 variables $p < 0.05$ was considered statistically significant.

The study was approved by the Animal Ethics Committee of the Erciyes University (Date: 08.02.2024 and Number: 24/021).

RESULTS

Histological analysis

As shown in Figure 1, the tissue integrity was better preserved in the control group compared to the CuSO_4 group. In the experimental group, it was observed that the neuron body structure in the hippocampus region was not completely preserved. (Figure 1). Especially in the CuSO_4 group, we observed that vascular regions were opened in the prefrontal cortex region and also in the hippocampus region (Figure 1).

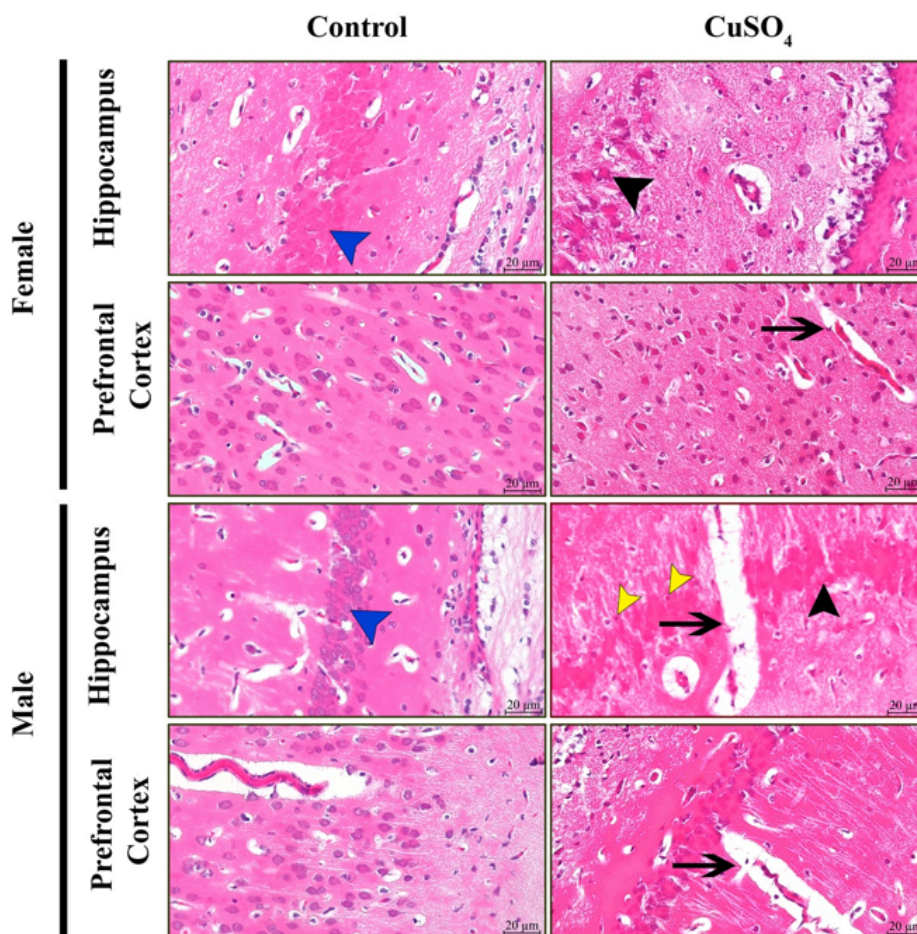


Figure 1. Hematoxylin and Eosin staining images of brain tissues including hippocampus and prefrontal cortex regions of control and CuSO₄ groups. Arrow: Vascular dilatation. Black Arrowhead: Structurally disrupted neuron body. Blue arrowhead: Normal neuron body. Yellow arrowhead: Neuron degeneration. 20 µm: Measuring bar

Immunohistochemical analysis

Kir2.1 expression

Kir2.1 expression in the prefrontal cortex region was more intense than in the hippocampus region in both sexes, but statistically significant difference was observed only in female mice ($p=0.001$) (Figure 2 and Figure 4). However, in the male prefrontal cortex region of the experimental group, Kir2.1 immunopositivity was observed intensely in both cellular and intercellular areas (Figure 2). Moreover, Kir2.1 expression was also observed in neurons in the prefrontal cortex region of control and experimental

group females (Figure 2). In the CuSO₄ group, Kir2.1 expression was more intense in the prefrontal cortex region than in the hippocampus region and the main effect of region ($p=0.014$) was significant (Figure 2 and Figure 4). As a result of the analysis; Region main effect ($p<0.001$), Group*Gender interaction ($p=0.001$), Group*Gender*Region interaction ($p=0.001$) were found significant. As a result, analyses were performed separately for each group. For Control group, Region main effect ($p<0.001$), Gender main effect ($p=0.003$), Region*Gender interaction ($p<0.001$) were found statistically significant.

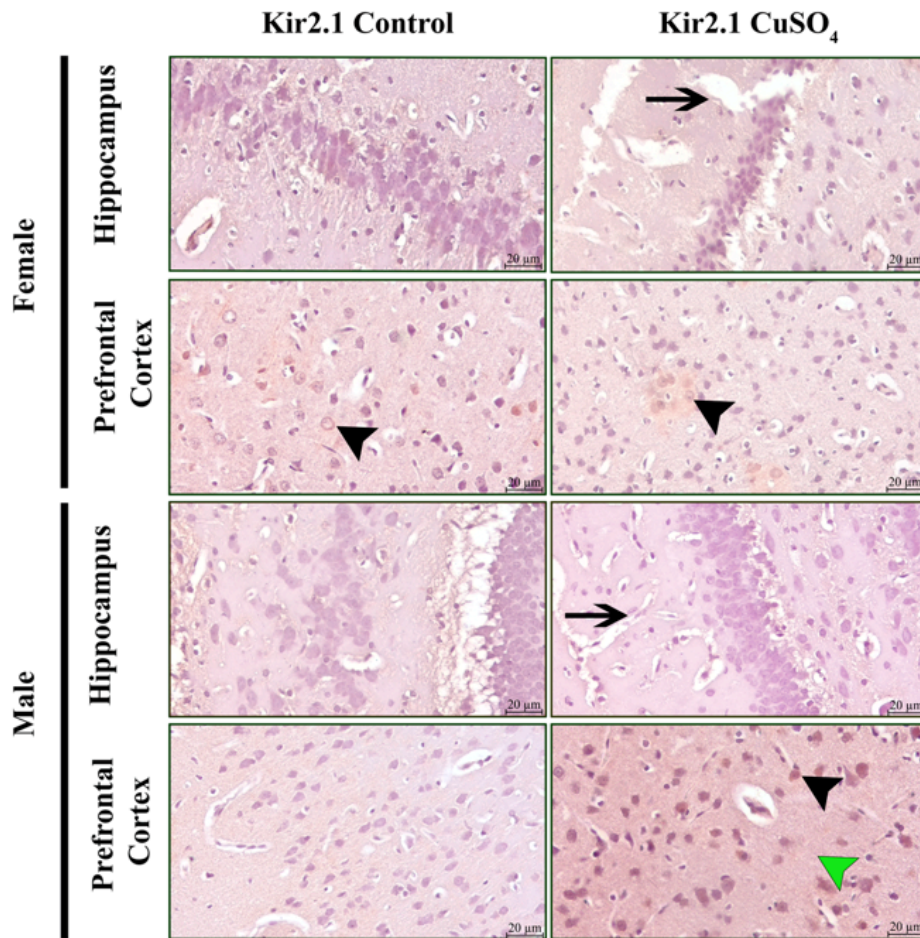


Figure 2. Immunohistochemical staining images showing Kir2.1 in the rat brain tissue. Arrow: Vascular dilatation. Black Arrowhead: Intense Kir2.1 expression in the prefrontal cortex and neuronal cell body. Green arrowhead: Intercellular region. 20 µm: Measuring bar.

Kir4.1 expression

In general, Kir4.1 expression in the intercellular region of the hippocampus was higher in male and female control group brains (Figure 3). In the experimental group, Kir4.1 expression was observed in the neuron body located in the female prefrontal cortex region (Figure 3). In the experimental group, the intensity of Kir4.1 expression was reduced in both cellular and intercellular regions of brain tissue in both hippocampus and prefrontal

cortex regions in both males and females (Figure 3). As a result of the analysis; Region main effect ($p < 0.001$) and Region*Group interaction ($p < 0.001$) were found significant. As a result, analyses were performed separately for each group. While there were statistically significant difference between regions in control group ($p < 0.001$), this difference could not be found statistically significant in the CuSO_4 group ($p = 0.232$) (Figure 4).

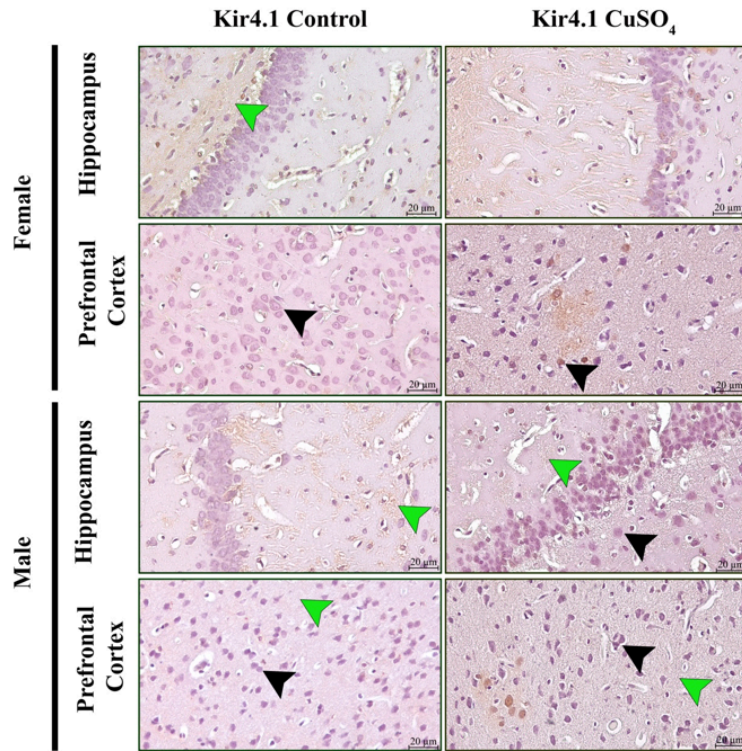


Figure 3. Immunohistochemical staining images showing Kir4.1 in the rat brain tissue. Black Arrowhead: Neuron cell body. Green arrowhead: Intercellular region. 20 μm : Measuring bars.

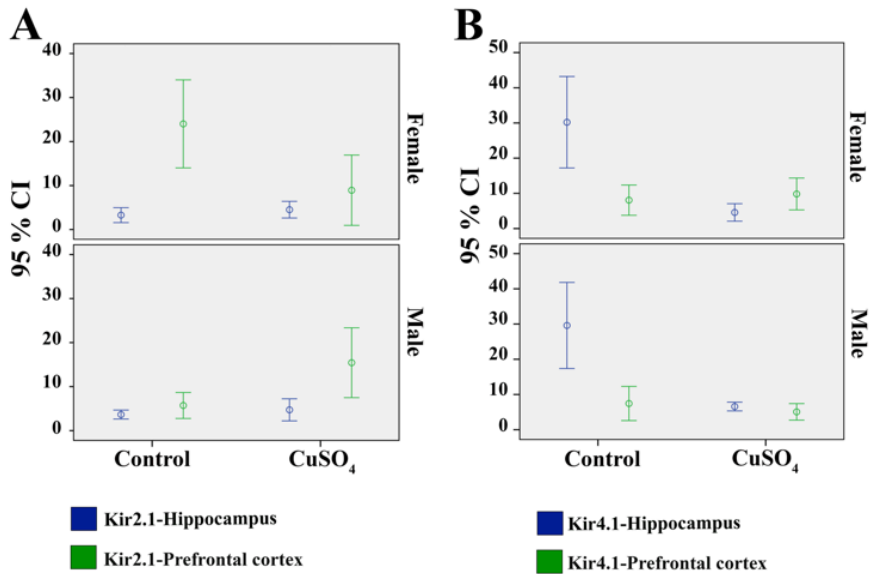


Figure 4. Statistical evaluation of CuSO_4 on Kir2.1 and Kir4.1 in rat brain tissue. CI: Confidence Interval. A: Confidence interval plot for Kir2.1. B: Confidence interval plot for Kir4.1

DISCUSSION

Enzymes related in the control of numerous physiological processes and biochemical activities have been reported to require copper as a cofactor (22). Cu is also crucial for the manufacture of hormones and for the growth and activity of the central nervous system (23). However, Cu excess has been linked to neuronal cell damage and the development of neuropsychiatric disorders. High Cu concentrations have also been reported in patients with Alzheimer's, Parkinson's and Wilson's diseases (24, 25). Additionally, a number of investigations have demonstrated that an excess of copper in Wilson's illness results in structural alterations in the thalamus, cerebral cortex, cerebellum, and caudate nucleus, among other brain regions (26, 27). A copper overdose combined with ethanol consumption has been linked to neuron death in the rat brain's lower regions of the hippocampus (28). Moreover, it has been documented that Cu toxicity can impair memory and learning by directly triggering apoptosis and astrocytosis in brain areas involving the frontal cortex and hippocampus, or indirectly through the glutamate and oxidative stress pathways (29).

According to research, Cu has been reported to cause hepatotoxicity such as oxidative stress, ER stress and apoptosis (30). CuSO₄ application may also be effective in reproductive organs and may increase autophagy level in testis and spermatogonia cell line (31). A study looking at the effect of CuSO₄ in rat brain tissues, brain histology showed degenerated neurons and damage to the cerebral cortex in rats treated with Cu alone (32). In a different study, the total volume of cerebellar structures in rats treated with CuSO₄ (1 and 8 mM) decreased significantly, and the total number of cells in the cerebellum cortex decreased in a dose-dependent manner (33). Based on this study, CuSO₄ dose of 100 mg/kg was administered to rats for 14 days in our study. In order to make the morphological evaluation of CuSO₄ in brain tissue, we performed histological evaluation

with haematoxylin-eosin staining. According to the results we obtained, we observed that the tissue integrity of the brain tissues of the CuSO₄-treated group could not be fully preserved. We also observed that there were areas of blood supply in the brain tissues treated with CuSO₄. Especially in the CuSO₄ group, we determined that vascular regions were opened in the prefrontal cortex region.

A vital element for cellular physiology, copper plays numerous important functions in respiration, activity of antioxidants, tissue honesty, and synapse activity (22). With the growing awareness that copper is an essential signalling modulator, its role in intracellular trafficking is a major topic of research. However, there are still many areas to be explored as to how copper exerts such a diverse and widespread control over cell signaling. Thus, understanding the effect of excessive copper intake on Kir channels in brain tissue will be important. Composed of seven different subunits from Kir1 to Kir7 (12) and control cell proliferation, regulate hormone secretion in the central nervous system (CNS), modulate neurotransmitter release and can act as hypoxia sensors (12, 34). Kir channels are tetramers of four subunits and K⁺ ions cross the cell membrane by travelling across their electrochemical gradient downward (35). Kir channels are localised in specific regions of a cell, such as apical or basolateral membranes in epithelial cells and pre or postsynaptic regions in neurons; and consist of a structural form such as ion flow and channel pore opening kinetics (12). Kir2.x channels have been reported to be predominantly expressed in neurons (36). It has been documented that during hippocampal development, Kir2.1 channels influence the activity of granular cells (16). The Kir4.1 channel subunit is being distributed in glial cells of the CNS (37) and Kir4.1 plays an essential role in preserving K⁺ stability for proper neuronal function (38). In our study, we investigated the effect of CuSO₄ on Kir2.1 and Kir4.1 from Kir channels in rat brain tissues. Immunohistochemical analysis revealed that Kir2.1 expression in the

prefrontal cortex region was more intense than in the hippocampus region in both sexes in both the control and CuSO_4 groups. Regarding sex differences, we observed intense Kir2.1 expression in neurons in the prefrontal cortex region, especially in female rats.

In our study, Kir4.1 immunohistochemical analyses revealed that Kir4.1 expression in the area of hippocampus was higher in male and female control group brains. We also observed Kir4.1 expression in the vascular endothelium in the hippocampus region of control group males. When we looked at the CuSO_4 group, we found that the intensity of Kir4.1 expression was decreased in both hippocampus and prefrontal cortex regions in male and female brain tissue. Participation of Cu in the redox cycle and reactive oxygen species (ROS) production have been associated with macromolecular damage and altered sulfhydryl homeostasis (39). Damage caused by intense CuSO_4 intake may have activated especially Kir2.1 channels

in neurons located in both hippocampus and prefrontal cortex in brain tissue. In addition, we suggest that the morphological structure of brain tissues exposed to intense CuSO_4 was not preserved and therefore Kir2.1 and Kir4.1 expression may have varied in different regions of the brain according to sex difference.

In conclusion; this study shows that intensive CuSO_4 treatment in rats causes a decrease in Kir4.1 channel protein expression and morphological damage in the brain. In addition, the importance of sex difference, which is one of the parameters examined in our study, is important here. We think that the relationship between the damage caused by intensive CuSO_4 application in brain tissue and the activation of Kir channels should be investigated in more detail. In addition, pathways affecting dirt channels, effects such as apoptosis or autophagy will need to be examined in future studies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

In order to recognise the participation of the authors, we highlight each individual contribution: O.Ö; Z.D, S.Y; Conceptualisation, Methodology, Writing - Review and Editing and designed the study, S.K; S.U; A.O.O: Conducted and supervised the experiments, S.K; (corresponding author); S.U; Z.D: Conceptualisation, Methodology, S.K; Z.D.: Contributed to formal analysis, experimentation, filtering and follow-up of histopathological evaluations. D.G; Performed statistical analyses. S.K; O.Ö; S.U; A.O.O; D.G; S.Y; Z.D: Writing - Original Draft, commented on figures, visualised and revised the manuscript. All these authors made significant contributions to the final manuscript and have approved this submission.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Animal Ethics Committee of the Erciyes University (Date: 08.02.2024 and Number: 24/021).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Shanbhag VC, Gudekar N, Jasmer K, Papageorgiou C, Singh K, Petris MJ. Copper metabolism as a unique vulnerability in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021; 1868 (2): 118893.
2. Sharp PA. Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *Int J Biochem & Cell Bio*, 2002; 35 (2003) : 288-91.
3. Maghool F, Emami MH, Alipour R, Mohammadzadeh S, Sereshki N, Dehkordi SAE, et al. Rescue effect of curcumin against copper toxicity. *J Trace Elem Med Biol*, 2023; 78 (2023): 127153.
4. Tapiero H, Townsend, DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. *Copper*. *Biomed Pharmacother*, 2003; 57 (9): 386-98.
5. Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol*, 2016; 35: 107-15.
6. Raschke S, Ebert F, Kipp AP, Kopp JF, Schwerdtle T. Selenium homeostasis in human brain cells: Effects of copper (II) and Se species. *J Trace Elem Med Biol*, 2023; 78: 127149.
7. Genoud S, Roberts BR, Gunn AP, Halliday GM, Lewis SJG, Ball HJ, et al. Subcellular compartmentalisation of copper, iron, manganese, and zinc in the Parkinson's disease brain. *Metallomics*, 2017; 9 (10): 1447-55.
8. Schrag M, Mueller C, Oyoyo U, Smith MA, Kirsch WM. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog Neurobiol*, 2011; 94 (3): 296-306.
9. Pal A, Prasad R. Regional Distribution of Copper, Zinc and Iron in Brain of Wistar Rat Model for Non-Wilsonian Brain Copper Toxicosis. *Indian J Clin Biochem*, 2016; 31 (1): 93-8.
10. Arnal N, Castillo O, de Alaniz MJ, Marra CA. Effects of copper and/or cholesterol overload on mitochondrial function in a rat model of incipient neurodegeneration. *Int J Alzheimer's Dis*, 2013; 1-14.
11. Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*, 2005; 57: 387-95.

12. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 2010; 90: 291-366.
13. Neusch C, Weishaupt JH, Bahr M. Kir channels in the CNS: emerging new roles and implications for neurological diseases. *Cell Tissue Res*, 2003; 311: 131-8.
14. Gonzalez C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzun I, Rojas P, Naranjo D, et al. K(+) channels: functional-structural overview. *Compr Physiol*, 2012; 2: 2087-149.
15. Kang SJ, Cho SH, Park K, Yi J, Yoo SJ, Shin KS. Expression of Kir2.1 channels in astrocytes under pathophysiological conditions. *Mol Cell*, 2008; 25 (1): 124-30.
16. Mongiat LA, Esposito MS, Lombardi G, Schinder AF. Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One*, 2009; 4 (4): e5320.
17. Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P. Kir4.1 Potassium Channel Subunit Is Crucial for Oligodendrocyte Development and In Vivo Myelination. *J Neurosci*, 2001; 21 (15): 5429-38.
18. Brasko C, Hawkins V, De La Rocha IC, Butt AM. Expression of Kir4.1 and Kir5.1 inwardly rectifying potassium channels in oligodendrocytes, the myelinating cells of the CNS. *Brain Struct Funct*, 2016; 2017 (222): 41-59.
19. Liu JY, Yang X, Sun XD, Zhuang CC, Xu FB, Li YF. Suppressive Effects of Copper Sulfate Accumulation on the Spermatogenesis of Rats. *Biol Trace Elem Res*, 2016; 174: 356-61.
20. Akyuz E, Doganyigit Z, Okan A, Yilmaz S, Ucar S, Akin AT. Immunoreactivity of Kir3.1, muscarinic receptors 2 and 3 on the brainstem, vagus nerve and heart tissue under experimental demyelination. *Brain Res Bull*, 2023; 197 (2023): 13-30.
21. Doganyigit Z, Okan A, Kaymak E, Pandir D, Silici S. Investigation of protective effects of apilarnil against lipopolysaccharide induced liver injury in rats via TLR 4/ HMGB-1/ NF-kappaB pathway. *Biomed Pharmacother*, 2020; 125 (2020): 109967.
22. Grubman A, White AR. Copper as a key regulator of cell signalling pathways. *Expert Rev Mol Med*, 2014; 16: e11.
23. Scheiber IF, Mercer JF, Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain. *Prog Neurobiol*, 2014; 116 (2014): 33-57.
24. Mlyniec K, Davies CL, de Agüero Sanchez IG, Pytka K, Budziszewska B, Nowak G. Essential elements in depression and anxiety. Part I. *Pharmacol Rep*, 2014; 66 (2014): 534-44.
25. Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG. Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol*, 2015; 14 (1): 103-13.
26. Stezin A, George L, Jhunjhunwala K, Lenka A, Saini J, Netravathi M, et al. Exploring cortical atrophy and its clinical and biochemical correlates in Wilson's disease using voxel based morphometry. *Parkinsonism Relat Disord*, 2016; 30: 52-7.
27. Smolinski L, Litwin T, Redzia-Ogrodnik B, Dziezyc K, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowska A. Brain volume is related to neurological impairment and to copper overload in Wilson's disease. *Neurol Sci*, 2019; 40: 2089-95.
28. Turgut G, Akdogan I, Adigüzel E, Genç O. Effect of copper overload together with ethanol uptake on hippocampal neurons. *Tohoku J Exp Med*, 2003; 199 (4): 239-45.
29. Kalita J, Kumar V, Misra UK, Bora HK. Memory and Learning Dysfunction Following Copper Toxicity: Biochemical and Immunohistochemical Basis. *Mol Neurobiol*, 2018; 55: 3800-11.
30. Wu H, Guo H, Liu H, Cui H, Fang J, Zuo Z, et al. Copper sulfate-induced endoplasmic reticulum stress promotes hepatic apoptosis by activating CHOP, JNK and caspase-12 signaling pathways. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020; 191 (2020): 110236.
31. Guo H, Ouyang Y, Yin H, Cui H, Deng H, Liu H, et al. Induction of autophagy via the ROS-dependent AMPK-mTOR pathway protects copper-induced spermatogenesis disorder. *Redox Biol*, 2021; 49 (2022): 102227.

32. Arowoogun J, Akanni OO, Adefisan AO, Owumi SE, Tijani AS, Adaramoye OA. Rutin ameliorates copper sulfate-induced brain damage via antioxidative and anti-inflammatory activities in rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020; 35: e22623.
33. Erfanizadeh M, Noorafshan A, Naseh M, Karbalay-Doust S. The effects of copper sulfate on the structure and function of the rat cerebellum: A stereological and behavioral study. *IBRO Neurosci Rep*, 2021; 11: 119-27.
34. Barres BA, Chun LL, Corey DP. Ion channels in vertebrate glia. *Annu Rev Neurosci*, 1990; 13: 441-74.
35. Glowatzki E, Fakler G, Brandle U, Rexhausen U, Zenner HP, Ruppersberg JP, et al. Subunit-Dependent Assembly of inward-Rectifier K⁺ Channels. *Proceedings of the royal society B*, 1995; 261: 251-61.
36. Shen W, Tian X, Day M, Ulrich S, Tkatch T, Nathanson NM, et al. Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci*, 2007; 10 (11): 1458-66.
37. Newman E. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci*, 1993; 13 (8): 3333-45.
38. Sibille J, Dao Duc K, Holcman D, Rouach N. The neuroglial potassium cycle during neurotransmission: role of Kir4.1 channels. *PLoS Comput Biol*, 2015; 11 (3): e1004137.
39. Stosh SJ, Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 1995; 18 (2): 321-36.

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde takip edilen HIV ile yaşayan erişkin bireylerde sifiliz seropozitifliğinin araştırılması, 2024

Investigation of syphilis seropositivity in adult individuals living with HIV followed at Marmara University Pendik Training and Research Hospital, 2024

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK¹ (ID), Uluhan SİLİ¹ (ID), Elif TÜKENMEZ TİGEN¹ (ID), Buket ERTÜRK ŞENGEL¹ (ID), Barış CAN² (ID), Tekin TUNÇEL¹ (ID), Fatma Burcu DOĞANÇ³ (ID), Benan ATAK BOLATASLAN¹ (ID), Eda Buse MEŞECİ¹ (ID), Arzu İLKİ² (ID), Volkan KORTEN¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Ülkemizde HIV ile yaşayan birey sayısı giderek artış göstermektedir. Amacımız merkezimizde takip edilen HIV ile yaşayan bireylerde Sifiliz seropozitifliği yüzdesini, ülkemizde ve dünyada yapılmış diğer çalışmalarla karşılaştırarak ortaya koymaktır. Bu iki hastalığın yayılmasının önüne geçebilmek için oluşturulacak kontrol önlemlerine ortaya çıkan veriler ile katkı oluşturmak amaçlanmıştır.

Yöntem: Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji HIV polikliniğinde 1985 yılından günümüze kadar HIV enfeksiyonu tanısı almış ve 1995 yılından 2024 yılına (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üniversite Hastanesi döneminden itibaren) kadar takip edilmiş *Treponema pallidum* Hemaglutinasyon (TPHA) test sonucuna ulaşılabilen tüm bireyler çalışmaya dahil edildi. Hastaların yaş, cinsiyet, cinsel yönelim, CD4 T lenfosit sayıları ile TPHA sonuçları kaydedildi.

Bulgular: Araştırmaya TPHA test sonucu bulunan toplam 1042 HIV ile yaşayan birey dahil edildi. Bu

ABSTRACT

Objective: The number of individuals living with HIV increases in Turkey. Aim of this study is to reveal and compare the percentage of Syphilis seropositivity in our centre with other studies done in Turkey and all over the world. It is aimed to give contribution to the control measures to prevent the transmission of these two diseases with the data obtained.

Methods: Individuals diagnosed with HIV infection at the Marmara University Pendik Training and Research Hospital, Infectious Diseases and Clinical Microbiology since 1985 and followed up from 1995 to 2024 (starting from the Marmara University Faculty of Medicine University Hospital period) and whom *Treponema pallidum* Hemagglutination (TPHA) test results were available were included. The patients' age, gender, sexual orientation, CD4 T lymphocyte counts and TPHA results were recorded.

Results: A total of 1042 individuals living with HIV with TPHA test results were included in the study. 87.9% (n=916) were male, the median age was 35.0

¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD., İstanbul, Türkiye

²Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., İstanbul, Türkiye

³Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD., İstanbul, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK

Fevzi Çakmak Mah. Muhsin Yazıcıoğlu Cad. No: 10 Üst Kaynarca / Pendik / İstanbul - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 02.10.2024

Kabul Tarihi / Accepted : 24.10.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.04207

Yağcı Çağlayık D, Sili U, Tükenmez Tigen E, Ertürk Şengel B, Can B, Tunçel T, Doğanç FB, Atak Bolataslan B, Meşeci EB, İlki A, Korten V. Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde takip edilen HIV ile yaşayan erişkin bireylerde sifiliz seropozitifliğinin araştırılması, 2024. Türk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(4): 431 - 438

kişilerin %87,9'u (n=916) erkekti, yaş medyanı 35,0 yıl (ort: 37,0±11,7 yıl; min-maks: 18-81) idi. Cinsel yönelimlerine göre %35,7'si (n=372) homoseksüel/biseksüel, %37,8'i (n=389) heteroseksüel ve %27,0'i (n=281) bilinmiyordu. 1042 HYB'in %24,9'unda (n=259) TPHA pozitif olarak sonuçlandı. TPHA pozitif saptanan HYB'lerin %95,0'ı erkek (n=246), %5,0'ı kadın (n=13) idi. TPHA pozitif olan erkeklerin %45,5'inin (n=112) cinsel yönelimi homoseksüel/biseksüel iken %29,7'sinin cinsel yönelimi (n=73) heteroseksüel, %24,8'inin da cinsel yönelimi (n=61) bilinmemekte olarak kaydedildi. Erkeklerle seks yapan erkeklerde (MSM) seropozitiflik %30,1 olarak daha yüksek izlendi. HIV ile yaşayan MSM bireylerde yaş gruplarına göre TPHA pozitifliği açısından bir fark saptanmadı (p=0,329). Hepatit B virus enfeksiyonu geçirmiş olanlarda TPHA pozitifliği %35,7 olarak geçirmeyenlere göre daha yüksek bulundu. Kadın HYB'lerin %7,9'unda (n=10) gebelik mevcut idi. Gebe kadınların %20,0'ında (n=2) TPHA pozitif saptandı. Çocuk doğurma dönemindeki 104 kadının %11,5'inde (n=12) TPHA pozitif saptandı.

Sonuç: Ülkemizde daha önce geniş sayılarla yapılan çalışmalara bakıldığında %24,9 ile en yüksek seropozitiflik düzeyine çalışmamızda ulaşılmıştır. HIV ile yaşayan MSM bireylerde sifiliz seropozitifliği düzeyi %30,1 ile İstanbul'u kapsayan diğer çalışmalardakine benzer şekilde yüksek bulunmuştur. MSM bireylere yönelik sifiliz taraması, tedavisi, bariyer önlemlerin kullanılması, partner bilgilendirilmesi ve tedavisi gibi kontrol önlemlerinin geliştirilmesinin, her iki hastalığın yayılımını kontrol altına alma hususunda anahtar rol oynayabileceği düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: HIV, Sifiliz, Türkiye, MSM

years (mean: 37.0±11.7 years; min-max: 18-81). Regarding their sexual orientation, 35.7% (n=372) were homosexual/bisexual, 37.8% (n=389) were heterosexual, and 27.0% (n=281) were unknown. TPHA was positive in 24.9% (n=259) of 1042 individuals living with HIV. Of the TPHA positive individuals, 95.0% were male (n = 246) and 5.0% were female (n = 13). The sexual orientation of 45.5% (n=112) of TPHA-positive men was homosexual/bisexual, while 29.7% (n=73) was heterosexual and 24.8% (n=61) was not known. Seropositivity was observed to be higher in men who have sex with men (MSM), at 30.1%. There was no difference in terms of TPHA positivity in MSM individuals living with HIV according to age groups (p = 0.329). TPHA positivity was found to be higher in those who had hepatitis B virus infection, at 35.7%, compared to those who had not. Pregnancy was present in 7,9 % (n=10) of female individuals living with HIV. TPHA was detected positive in 20.0% (n=2) of pregnant women. TPHA was detected positive in 11,5 % (n=12) of females in the childbearing period.

Conclusion: The highest seropositivity level of 24.9% was reached in our study when compared with others. The level of syphilis seropositivity in MSM individuals living with HIV was found to be high at 30.1%, similar to other studies done in Istanbul. It can be thought that the development of control measures such as syphilis screening, treatment, use of barrier measures, partner information and treatment for MSM individuals may play a key role in controlling the spread of both diseases.

Key Words: HIV, Syphilis, Türkiye, MSM

GİRİŞ

Treponema pallidum bakterisinin neden olduğu sifiliz, ülkemizde bildirim zorunlu olan cinsel yolla geçen, inkübasyon dönemi ortalama 3 hafta (10-90

gün) olan bir hastalıktır. Primer sifilizde spiroketlerin yerleştiği alanda makül, 1-2 hafta içinde papül ve daha sonra hızla ağrısız, kenarları kalkık akıntısız ülser dönüşen şankr lezyonu izlenir, kendiliğinden 3-6 hafta içinde iz bırakmadan iyileşir (1). Şankrın ilk

ortaya çıkmasından 2-10 hafta sonra mukoza ve ciltte özellikle avuç içi ve ayak tabanlarını da tutabilen deskuame, maküler, papüler (*condyloma lata*) ve/veya püstüler yaygın lezyonların eşlik ettiği yaygın lenfadenopati, ateş, kas ve eklem ağrısı, baş ağrısı gibi konstitüsyonel semptomlarla gidebilen sekonder sifiliz dönemi görülür (1,2). Bu dönemde karaciğer, gastrointestinal sistem, göz, kulak, akciğer tutulumu ve hatta menenjit gibi nörolojik komplikasyonlar görülebildiğinden sifilize “büyük taklit edici” denmektedir. Latent sifiliz, serolojik testlerin pozitif sonuçlandığı fakat kliniğin gösterilemediği dönemi tanımlamaktadır. Tersiyer sifiliz, tedavisiz kalan kişide nörosifiliz, kardiyovasküler ve gomatoz sifiliz olmak üzere, 5-30 yıla varan sürede yavaş ilerleyen yıkıcı inflamatuvar bir dönemdir (1). Sifiliz tanısında ters algoritma benimsenmiş olup her dönemde yüksek duyarlılığa sahip treponemal testler ilk aşamada kullanılmaktadır (1,3). Treponemal test sonucu pozitif ise kişinin tedavi edilip edilmediğinden veya hastalık aktivitesinden bağımsız, hayatının geri kalanında da pozitif sonuçlanır (3).

Ülkemizde en son yayınlanan sifiliz istatistiklerine göre 2022 yılında 3533 vaka bildirilmiş olup, tüm yaş aralıklarında erkek vaka sayısı kadınların 4 ile 5 katı kaydedilmiştir (4). Sifiliz ve HIV enfeksiyonunun karşılıklı birbirlerinin yayılımını kolaylaştırıcı etkisi bulunmaktadır. Sifilizde ortaya çıkan ülserler, HIV geçişini kolaylaştırmaktadır (5,6). HIV enfeksiyonu antiretrovirallerin (ART) kullanımı sayesinde ölümcül bir hastalık olmaktan çıkıp kronik bir hastalık haline gelmiştir. 2007-2016 arasında binlerce çifti kapsayan 3 büyük çalışma ile ART altında olup HIV viral yükü belirlenemeyen kişilerin seronegatif partnerlerine cinsel yolla HIV’i bulaştırmadığı gösterilmiş olup ayrımcılığı önlemek için “Belirlenemeyen=Bulaştırmayan (B=B)” mesajı ile halk sağlığı farkındalığı çalışmaları yapılmaktadır (7). Bu durum prezervatif kullanma gerekliliğini ortadan kaldırdığından Sifiliz başta olmak üzere diğer cinsel yolla bulaşan hastalıkların yayılımına neden olabilmektedir (8).

Sahra altı Afrika’da 2939 HIV ile yaşayan bireyde geleneksel tanı algoritmasına dayalı yapılan sifiliz ko-enfeksiyon oranı %3,1 bulunmuştur. Alkol kullanımı ve eğitim düzeyi düşüklüğü risk faktörü olarak saptanmıştır (9).

Avrupa ülkelerinde yapılan 78 çalışmayı derleyen teknik rapora göre HIV ile yaşayan Erkeklerle seks yapan erkek (MSM) bireylerde Sifiliz prevalansı %14,36 olarak tahmin edilmiştir (10).

Ülkemizde 2010-2018 yılları arasında yedi coğrafi bölge, 16 ili kapsayan 3641 HIV ile enfekte hastada sifiliz seropozitifliği %8 düzeyinde bulunmuş olup, İstanbul için %8,3 olarak saptanmıştır (11)

İstanbul ilinde bulunan farklı merkezlerde HIV ile enfekte bireyler arasında %10,7 ile %23 düzeyinde seropozitiflik düzeyleri gösterilmiştir (12, 13,14,15).

Amacımız HIV enfeksiyonu nedeniyle merkezimizde takip edilen hastalarda Sifiliz seropozitifliği yüzdesini, ülkemizde ve dünyada yapılmış diğer çalışmalarla karşılaştırarak ortaya koymaktır. Bu iki hastalığın yayılmasının önüne geçebilmek için oluşturulacak kontrol önlemlerine ortaya çıkan veriler ile katkı oluşturmak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji HIV polikliniğinde 1985 yılından günümüze kadar HIV enfeksiyonu tanısı almış ve 1995 yılından (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üniversite Hastanesi döneminden itibaren) 2024 yılına kadar takip edilmiş Treponemal test sonucuna ulaşılabilen tüm hastalar çalışmaya dâhil edildi. Sifilize yönelik tanıda ters algoritma benimsenmiş olup “Treponema pallidum hemaglutinasyon assay” (TPHA) ile gerçekleştirilen treponemal test sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir. Hastaların hepatit B virusu ile enfekte olup olmadıklarını gösteren Anti-HBcIgG test sonuçları da çalışmaya dâhil edilmiştir.

Anti-HIV testleri, 1985-2021 yılları arasında mikropartikül enzim immünoassay yöntemi ile Axsym

(Abbott, ABD) cihazı ve kemilüminesans mikropartikül immunoassay (CMIA) yöntemi ile Architect (Abbott, ABD) cihazında gerçekleştirilmiş olup 2021- 2024 yılları arasında ise Elecsys® HIV Duo (Roche, Almanya) kiti kullanılarak HIV 1 p24 antijeni ile birlikte HIV 1 ve HIV 2'ye karşı antikorların kalitatif tayini yapılmıştır.

Reaktif bulunan örnekler doğrulama amacıyla Ulusal AIDS Doğrulama Merkezi'ne gönderilmiştir. Burada, bir başka 4. kuşak ELISA testi olan VIDAS HIV Duo Ultra (bioMérieux, Fransa) ile tekrar test edilmiştir. Reaktif örnekler, Geenius HIV1/2 Supplemental Assay (Bio-Rad, Fransa) gibi hızlı HIV doğrulama testleri ile de doğrulanmıştır. Doğrulama testleri pozitif olan örnekler HIV enfeksiyonu olarak kabul edilmiştir.

İstatistiksel değerlendirme için Jamovi programı kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin değerlendirilmesi için Ki-kare testi uygulanmıştır. Sürekli değişkenler için ise ortalama ölçütleri (ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer) hesaplanmış ve normalite testleri (Kolmogorov-Smirnov) uygulanmıştır. İki grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında, normal dağılım gösterenler Student's t testi, normal olmayan dağılımlar ise Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $<0,05$ kabul edilmiştir.

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:03.11.2023, Karar no: 09.2023.1389).

BULGULAR

1988-2024 yılları arasında Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi HIV polikliniğine başvuran 1302 HIV ile yaşayan erişkin bireyin (HYB) verileri taranmış olup 1042'sine TPHA bakılmış olduğu izlenmiştir. Analizler 1042 kişi üzerinden yapılmıştır.

Cinsel yönelimlerine göre %35,7'si (n=372) homoseksüel/biseksüel, %37,8'i (n=389) heteroseksüel ve %27,0'ı (n=281) bilinmiyor olarak kaydedilmiştir. Yaş medyanı 35,0 yıl (ort:37,0±11,7

yıl; min-maks:18-81)'dir. Diğer özellikler Tablo 1'de verilmiştir.

CD4 T lenfosit sayı medyanı 366, 0 (IQR:342,5)'dir. TPHA antikor pozitif olanların CD4 T lenfosit sayı medyanı 355,5 (IQR:354,5), TPHA antikor negatif olanların CD4 T lenfosit sayı medyanı 367,0 (IQR:338,0) olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,711$).

1042 HYB'in %24,9'unda (n=259) TPHA pozitif olarak sonuçlandı.

TPHA pozitif saptanan HYB'lerin %95,0'ı erkek (n=246), %5,0'ı kadın (n=13) idi. TPHA pozitif olan erkeklerin %45,5'inin (n=112) cinsel yönelimi homoseksüel/biseksüel iken %29,7'sinin cinsel yönelimi (n=73) heteroseksüel, %24,8'inin da cinsel yönelimi (n=61) bilinmemekte olarak kaydedildi. Erkeklerle seks yapan erkeklerde (MSM) seropozitiflik %30,1 olarak izlendi. HIV ile yaşayan MSM bireylerde yaş gruplarına göre TPHA pozitifliği açısından bir fark saptanmadı ($p=0,329$).

Hepatit B virus enfeksiyonu geçirmiş olanlarda TPHA pozitifliği %35,7 olarak geçirmeyenlere göre daha yüksek bulundu.

Kadın HYB'lerin %7,9'unda (n=10) gebelik mevcut idi. Gebe kadınların %20,0'ında (n=2) TPHA pozitif saptandı. Çocuk doğurma dönemindeki 104 kadının %11,5'inde (n=12) TPHA pozitif saptandı.

TARTIŞMA

Ülkemiz ve dünyada yapılan benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında merkezimizde, HIV ile yaşayan bireylerde Sifiliz seropozitiflik düzeyinin %24,9 olmak üzere çok yüksek olduğunu tespit ettik. Yunanistan'da %64,7'si MSM olmak üzere 991 HIV ile enfekte bireyde yapılan çalışmada 94 kişide (%9,4) yeni sifiliz tanısı konulmuş olup, hastaların tamamının erkek olduğu belirtilmiş ve tek risk faktörü olarak MSM olmak sonucu çıkartılmıştır (16).

Dünya genelinde 77 ülkeden 606.000 MSM bireyi kapsayan metaanaliz çalışmasında Sifiliz prevalansının %7,5 olduğu ve bunun kabul edilemeyecek kadar

yüksek bir oran olması nedeniyle acil eylem planı oluşturulması önerilmiştir (17). Bu çalışmada HIV prevalansının %5'ten büyük olduğu ülkelerde sifiliz prevalansının daha yüksek olduğu ve fakir ülkelere göre orta ve yüksek gelir düzeyine sahip ülkelerde prevalansın daha yüksek olması mobilitenin daha

fazla olması ve daha fazla cinsel aktivite fırsatına sahip olunmasına bağlanmıştır. Yeni partner bulma, eş zamanlı çok partnerli olma, mobilite kolaylığı, temas öncesi profilaksi (PrEP) uygulaması nedeniyle prezervatif kullanımının düşmesi gibi nedenler sorumlu tutulmuştur (17).

Tablo 1. HIV ile Yaşayan Bireylerde Sifiliz Seropozitifliğinin İstatistik Değerlendirmesi

	Anti-Treponema pallidum antikor (+) (n / %)	Anti-Treponema pallidum antikor (-) (n / %)	Toplam (n / %)	p değeri
Cinsiyet				
Erkek	246/26,9	670/73,1	916	<0,001
Kadın	13/10,3	113/89,7	126	
Cinsel yönelim				
Heteroseksüel	83/21,3	306/78,7	389	0,013
Homoseksüel/biseksüel (MSM)	112/30,1	260/69,9	372	
Bilinmiyor/belirtilmemiş	64/22,8	217/77,2	281	
CD4 sayısı (n=858)				
50 ve altı	18/29,5	43/70,5	61	0,904
51-100	10/22,7	34/77,3	44	
101-200	22/22,0	78/78,0	100	
201-350	50/25,6	145/74,4	195	
351-500	44/23,8	141/76,2	185	
501 ve üzeri	64/23,4	209/76,6	273	
Yaş				
18-39	153/23,4	500/76,6	653	0,137
40-59	92/26,2	259/73,8	351	
60 ve üzeri	14/36,8	24/63,2	38	
Kadın yaş (n=126)				
18-49 yaş	12/11,5	92/88,5	104	0,327
50 ve üzeri yaş	1/4,5	21/95,5	22	
HIV tanı yılı				
2024-2015	212/24,8	642/75,2	854	0,385
2014-2005	46/26,1	130/73,9	176	
2004-1995	1/9,1	11/90,9	12	
Anti-Hbc IgG (n=653)				
Pozitif	61/35,7	110/64,3	171	<0,001
Negatif	94/19,5	388/80,5	482	
Toplam	259	783		

Ülkemizde konu ile ilgili yapılan belli başlı çalışmalar Tablo-2’de özetlenmiştir. Bu çalışmalarda seropozitiflik düzeyinin % 7,6 ile %23,38 arasında değiştiği izlenmiş olup tüm çalışmalarda, çalışmamızda bulunana benzer şekilde HIV ile yaşayan MSM bireylerde Sifiliz seropozitifliği daha yüksek saptanmıştır (11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20). Ankara’da 2017-2018 yıllarında 84 HIV ile yaşayan bireyde yapılan çalışmada %25 sifiliz seropozitifliği saptanmıştır fakat çalışmaya alınan birey sayısı anlamlı bir sonuç çıkartabilmek için yeterli olmayıp sadece erkeklerden oluşmaktadır (21).

2015-2019 yıllarında İstanbul Avrupa yakasında yapılan bir çalışmada 1057 HIV ile yaşayan bireyde sifiliz seropozitiflik düzeyi %18,3 saptanmış olup 60 yaş üstünde seropozitiflik düzeyi %5,1 ile daha düşük bulunmuştur (13). Yunanistan’da yapılan çalışmada da benzer şekilde 60 yaş üzerinde en düşük seropozitiflik düzeyi kaydedilmiştir (16). Çalışmamızda yaşlar arasında seropozitiflik düzeyi açısından anlamlı farklılık saptanmamış olup, aksine 60 yaş üzerinde istatistiksel anlamlı olmasa da %36,8 ile daha yüksek seropozitiflik düzeyi olduğu izlenmiştir. Merkezimizin ülkemizde kurulmuş ilk HIV takip ve tedavi ünitelerinden olması, uzun

zamandır farklı demografik yapı ve cinsel aktivite alışkanlıklarına sahip HIV ile enfekte bireylerin takip ediliyor olması bu durumun olası sebebi olarak düşünülebilir.

Çalışmamızda HIV ile yaşayan kadınlarda sifiliz seropozitifliği düzeyi %10,3 iken erkeklerde %26,9 olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur (<0,001). Bu farklılık diğer çalışmalarda da benzer şekilde bulunmuş olup bariyer yöntemlerin önplanda cinsel yolla bulaşan hastalıklardan korunma yerine erkeklerin resmi eşleriyle kullandıkları bir doğum kontrol yöntemi olmasına bağlanmıştır (13).

Çalışmaya alınan 1042 HYB’in %35,7’si MSM idi. MSM bireyler arasında seropozitiflik %30,1 ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde MSM olmayan gruba göre daha yüksekti. Bu sonuç ülkemizde yapılan literatürdeki diğer tüm çalışmalarda benzer bulunmuş olup alınacak kontrol önlemleri açısından yol gösterici olduğu düşünülebilir (Tablo 2).

Cinsel yolla geçen bir başka etken olan Hepatit B virusu (HBV) enfeksiyonu geçirenlerde %35,7 olmak üzere anlamlı şekilde sifiliz seropozitiflik düzeyinin literatürle uyumlu ve beklendiği gibi çok daha yüksek olduğu görüldü (20).

Tablo 2. HIV ile Yaşayan Bireylerde Sifiliz Seropozitiflik Düzeyi Çalışmaları

Çalışma	Koenfeksiyon sayısı yüzdesi ve toplam hasta sayısı ve yüzdesi	Kadın/erkek seropozitiflik yüzdesi (%)	MSM grupta seropozitiflik yüzdesi (%)	Yer
Altuntaş Aydın Ö, 2015	40/308 (%12,9)	0/100	21,4	İstanbul
Korkusuz R,2020	194/1057 (%18,3)	2,1/97,9	22	İstanbul
Köksal MÖ, 2020	47/244 (%19,3)	Sadece erkekler alınmış	28,7	İstanbul
Kömür S, 2024	103/1352 (%7,6)	2,9/97,1	Belirtilmemiş	Adana
Öztürk S, 2023	47/201 (%23,38)	4,2/95,8	37,5	İstanbul
Dinç HÖ, 2020	21/195 (%10,7)	13,3/86,7	Belirtilmemiş	İstanbul
Sarıgül F, 2019	291/3641 (%8)	4/96	Belirtilmemiş	Yedi bölge (16 il)
Taşpınar Şen,2023	39/200 (%19,5)	12,5/87,5	25,5	Ankara

Merkezimizde HIV ile beraber yaşayan gebe kadınların %20'sinde TPHA pozitif saptandı. Doğurma çağındaki tüm kadınların ise %11,5'inde TPHA pozitif saptandı. İstanbul'da HIV ile enfekte olmayan 2011 gebeyi kapsayan bir çalışmada hiçbir hastada sifiliz enfeksiyonuna rastlanmadığı belirtilmiştir (22). Latent sifiliz özellikle kadınlarda 5 yıl sonra bile vertikal geçiş ile konjenital sifilize sebebiyet vermekte olduğundan kadınların ve özellikle gebelerin taranması önerilir (1,3). Konjenital sifiliz enfeksiyonunda oluşan inflamasyon, gebe HIV ile enfekte ise HIV'in geçiş riskini arttırabilmektedir (3). Gebe kadınlarda sifiliz taraması ve akabinde tedavisinin verilmesi, konjenital sifilizin önlenmesi amacıyla da önem taşımaktadır. HIV ile yaşayan gebe kadınlarda, çalışmamız sonucu ortaya çıkan yüksek rakam nedeniyle taramaların daha özenli ve rehberlere uyumdan taviz verilmeksizin yapılması

gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Ülkemizde yapılmış geniş hasta sayısına ulaşan çalışmalara bakıldığında %24,9 ile en yüksek seropozitiflik düzeyine çalışmamızda ulaşılmıştır. Bunun sebebi en son yapılan çalışma olmamız olabilir zira çalışmalara bakıldığında yıllar içinde artan bir trend olduğu izlenmiştir. Bu da HIV ile enfekte bireylerdeki sifiliz seropozitifliği düzeylerinin artan HIV sayısı ile korele gittiğini düşündürülebilir.

HIV ile yaşayan MSM bireylerde sifiliz seropozitifliği düzeyi bu çalışmada ve İstanbul'u kapsayan diğer çalışmalarda anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. MSM bireylere yönelik sifiliz taraması ve tedavisinin yanısıra, düzenli prezervatif kullanımı, partnerin bilgilendirilmesi ve tedavisini içeren kontrol önlemlerinin geliştirilmesinin, her iki hastalığın yayılımını kontrol altına alma hususunda anahtar rol oynayabileceği düşünülebilir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:03.11.2023, Karar no: 09.2023.1389).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Radolf JD, Tramont EC, Salazar JC. Syphilis (*Treponema pallidum*): General Principles Mandell, Douglas, And Bennett's Principles And Practice of Infectious Diseases, Ninth Edition Elsevier, Inc. 2020; 2865-97.
2. Panel on Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents With HIV. Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents With HIV. National Institutes of Health, Centers for Disease Control and Prevention, HIV Medicine Association, and Infectious Diseases Society of America. <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-opportunistic-infection>. (Accessed: Sep 2024) [CC1].
3. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, et al. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, MMWR Recomm Rep, 2021;70(4): 39-55.
4. <http://hsgm.saglik.gov.tr> (sifiliz_istatistikleri.pdf (saglik.gov.tr))(Erişim tarihi: 29.09.2024).
5. Wu MY, Gong HZ, Hu KR, Zheng H, Wan X, Li J. Effect of Syphilis Infection on HIV Acquisition: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sex Transm Infect*, 2021; 97: 525-33.

6. Solomon MM, Mayer KH, Glidden DV, Liu AY, McMahan VM, Guanira JV, et al. Syphilis Predicts HIV Incidence Among Men and Transgender Women Who Have Sex with Men in a Preexposure Prophylaxis Trial. *Clin Infect Dis*, 2014; 59: 1020-26.
7. <https://www.unaids.org/en/resources/presscentre/featurestories/2018/july/undetectable-untransmittable>. Undetectable = untransmittable | UNAIDS (Erişim tarihi: 11.10.2024)
8. Byrne M, Akselrod H, Monroe AK, Horberg M, Lucar J, Castel AD et al. Identifying Geographic Areas of Washington, DC, With Increased Potential for Sexual HIV Transmission Among People With HIV With STIs and Concurrent Elevated HIV RNA: Data From the DC Cohort. *Open Forum Infect Dis*, 2022; 18; 9(5):139.
9. Gilbert L, Dear N, Esber A, Iroezindu M, Bahemana E, Kibuuka H, et al. Prevalence and risk factors associated with HIV and syphilis co-infection in the African Cohort Study: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, 2021; 21, 1-7.
10. European Centre for Disease Prevention and Control. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis in Europe. Stockholm: ECDC; 2024.
11. Sangül F, Sayan M, İnan D, Deveci A, Ceran N, Çelen MK et al. Current status of HIV/AIDS-syphilis co-infections: a retrospective multicentre study. *Central European journal of public health*. 2019, 27 (3): 223-8
12. Aydın ÖA, Karaosmanoğlu HK, Sayan M, İnce ER, Nazlıcan Ö. Seroprevalence and risk factors of syphilis among HIV/AIDS patients in Istanbul, Turkey. *Central European journal of public health*, 2015; 23 (1): 65-8.
13. Korkusuz R, Şenoğlu S. Syphilis Seroprevalence and Associated Risk Factors in HIV-infected Individuals. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob*. 2020; 9: 13.
14. Öztürk, S. HIV ile Yaşayan Bireylerde Sifilis Koinfeksiyonu: Üçüncü Basamak Hastane Verileri. *Klimik Journal/Klimik Dergisi*, 2023; 36 (1).
15. Dinç HÖ, Alkan S, Ozbey D, Sirekbasan S, Gareayaghi N, Cihan M, et al. HIV'le İnfekte Bireylerde Sifilis Koinfeksiyonunun Değerlendirilmesi. *Klimik Dergisi*, 33 (3): 292-6.
16. Nanoudis S, Pilalas D, Tziovanaki T, Constanti M, Markakis K, Pagioulas K, et al, Prevalence and Treatment Outcomes of Syphilis among People with Human Immunodeficiency Virus (HIV) Engaging in High-Risk Sexual Behavior: Real World Data from Northern Greece, 2019-2022. *Microorganisms*, 2024; 12, 1256.
17. Tsuboi M, Evans J, Davies EP, Rowley J, Korenromp EL, Clayton T, et al. Prevalence of syphilis among men who have sex with men: a global systematic review and meta-analysis from 2000-20. *The Lancet Global Health*, 2021; 9(8), e1110-e1118.
18. Köksal MO, Beka H, Evlice O, Çiftçi S, Keskin F, Başaran S, et al. Syphilis seroprevalence among HIV-infected males in Istanbul, Turkey. *Revista Argentina de Microbiologia*, 2020; 52(4): 266-71.
19. Kömür SY, Ertürk D, Sevdibaş S, Kuşçu F, İnal AS, Kurtaran B, Taşova Y. Evaluation of HIV and Syphilis Co-infected Cases, Data from a University Hospital. *Current HIV Research*, 2024; 22: 153-7.
20. Taşpınar Şen E, Baştuğ A, Aypak A, Bodur H. The Prevalence of Sexually Transmitted Infections and Related Factors Among People Living with HIV in Turkey. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob*, 2023; 12: 5.
21. Ayaz ÇM, Karakaplan ND, İnkaya AÇ, Çakır B, Ünal S, Zarakolu P. HIV ile yaşayan erkeklerde *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* ve *Mycoplasma genitalium* sıklığının sosyodemografik özellikler ve davranışsal risk faktörleri ile birlikte araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2023; 57 (3): 378-89.
22. Dogan K, Güraslan H, Özel G, Aydan Z, Yasar L. Seroprevalence rates of *Toxoplasma gondii*, rubella, cytomegalovirus, syphilis, and hepatitis B, seroprevalences rate in the pregnant population in Istanbul. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2014; 38 (4), 228.

Should we prefer imipenem relebactam and ceftazidime-avibactam in infections with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*?

Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarında imipenem relebaktam ve seftazidime avibaktamı tercih edelim mi?

Umut Safiye ŞAY COŞKUN¹ (ID), Yelda DAĞCIOĞLU² (ID), Baki TAŞTAN¹ (ID), Ayşenur GÜNEŞ¹ (ID), Büşra BAYAR ÇOŞKUN¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* serve as key reservoirs and transmitters of resistance, contributing to a rise in the antimicrobial-resistant globally. These bacteria have also been classified as urgent priority pathogens in terms of the need for new antibiotics. The purpose of this study was to determine the susceptibility of carbapenem resistant *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii* isolates to imipenem-relebactam and ceftazidime-avibactam as described new drugs.

Methods: This study included a total of 183 isolates, comprising 82 *K. pneumoniae*, 45 *P. aeruginosa*, and 56 *A. baumannii* isolates, which were isolated from various clinical samples. The identification and antibiotic susceptibility testing of the isolates were performed using the Vitek 2 automated system (bioMérieux, France) according to the EUCAST criteria. Each isolate that exhibited resistance to one or more antibiotics from the carbapenem group underwent phenotypic confirmation for carbapenem resistance using the Carbapenem

ÖZET

Amaç: Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* antibiyotik direncin küresel olarak artmasına önemli katkı sağlayan ana rezervuarlar ve direnç taşıyıcıları olarak öne çıkmaktadırlar. Bu bakteriler aynı zamanda yeni antibiyotiklere duyulan ihtiyaç açısından da acil öncelikli patojenler olarak sınıflandırılmıştır. Bu çalışmanın amacı, karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarının, tanımlanan yeni ilaçlar olan imipenem-relebaktam ve seftazidim-avibaktama duyarlılığının belirlenmesidir.

Yöntem: Çalışmaya çeşitli klinik örneklerden izole edilen 82'si *K. pneumoniae*, 45'i *P. aeruginosa* ve 56'sı *A. baumannii* olmak üzere toplam 183 izolat dahil edildi. İzolatların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST kriterlerine göre Vitek 2 otomatik sistemi (bioMérieux, Fransa) kullanılarak yapıldı. Karbapenem grubundan bir veya daha fazla antibiyotiğe direnç tespit edilen her bir izolata Karbapenem inaktivasyon yöntemi (CIM) ve Blue-

¹Tokat Gaziosmanpaşa University, Department of Medical Microbiology, Tokat, Türkiye

²Tokat Gaziosmanpaşa University Training and Research Hospital, Genetic Laboratory, Tokat, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Umut Safiye ŞAY COŞKUN

Muhittin Fisunoğlu Cad., Kaleardı Mah. Ali Şevki EREK Yerleşkesi, Tokat - Türkiye

E-posta / E-mail : umut.saycoskun@gop.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 24.11.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 07.06.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.33269

Şay Coşkun US, Dağcıoğlu Y, Taştan B, Güneş A, Bayar Coşkun B. Should we prefer imipenem relebactam and ceftazidime-avibactam in infections with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*? Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(4): 439 - 448

inactivation method (CIM) and the Blue-carba test (BCT). The susceptibility of all isolates to imipenem-relebactam (35 µg, Liofilchem, Italy), and ceftazidime-avibactam (10/4 µg, Bioanalyse, Turkey) was evaluated using the disk diffusion method according to EUCAST standards.

Results: The resistance to ceftazidime and ceftazidime-avibactam were found to be, respectively, 100%, 3.7% for *K. pneumoniae*, 24.4%, 8.9% for *P. aeruginosa*, and 100%, 98.2% for *A. baumannii*. The resistance rates of isolates to imipenem and imipenem-relebactam were found to be 80.5%, 85.4% for *K. pneumoniae*, 68.9%, 13.3% for *P. aeruginosa*, 100%, 98.2% for *A. baumannii* respectively. The positivity rates for CIM and BCT were determined as 79.3% and 80.5% for *K. pneumoniae*, 9% and 50% for *P. aeruginosa*, and 80.4% and 62.5% for *A. baumannii* isolates, respectively.

Conclusion: Ceftazidime-avibactam has been determined to be effective against carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. Imipenem-relebactam has been found to be effective in *P. aeruginosa* isolates, while being observed to be less effective against *K. pneumoniae*. It was concluded that ceftazidime-avibactam can be used as an alternative option in the treatment of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* infections and imipenem-relebactam can be used as an alternative option in the treatment of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* infections.

Key Words: Imipenem relebactam, ceftazidime-avibactam, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, Carbapenem inactivation method, Blue-carba test

carba testi (BCT) yapıldı. Tüm izolatların imipenem-relebactam (35 µg, Liofilchem, İtalya) ve seftazidime-avibactama (10/4 µg, Bioanalyse, Türkiye) duyarlılığı EUCAST standartlarına göre disk difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Seftazidim ve seftazidim-avibactama karşı direnç sırasıyla *K. pneumoniae* için %100, %3.7, *P. aeruginosa* için %24.4, %8.9 ve *A. baumannii* için %100, %98.2 olarak belirlendi. İzolatların imipenem ve imipenem-relebactam direnç oranları sırasıyla *K. pneumoniae* için %80.5, %85.4, *P. aeruginosa* için %68.9, %13.3, *A. baumannii* için %100, %98.2 olarak saptandı. CIM ve BCT pozitiflik oranları sırasıyla *K. pneumoniae* için %79.3 ve %80.5, *P. aeruginosa* için %9 ve %50, *A. baumannii* izolatları için %80.4 ve %62.5 olarak tespit edildi.

Sonuç: Ceftazidim-avibactam, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ya karşı etkili olarak tespit edilmiştir. İmipenem-relebactam, *P. aeruginosa* izolatlarında da etkili bulunmuştur. Ceftazidim-avibactamın karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, imipenem-relebactamın ise karbapenem dirençli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif bir seçenek olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İmipenem relebactam, Seftazidim-avibactam, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, Karbapenem inaktivasyon yöntemi, Blue-carba testi

INTRODUCTION

ESKAPE refers to a group of pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Pseudomonas aeruginosa*

(*P. aeruginosa*), and *Enterobacter* spp.) that cause the majority of antimicrobial-resistant hospital infections (1,2). Gram-negative ESKAPE bacteria serve as key reservoirs and transmitters of resistance, contributing to a rise in the antimicrobial-resistant nosocomial infections globally (3). These bacteria have

developed resistance to a wide range of antibiotics, including carbapenems and third generation cephalosporins, which are the best medications available for treating multi-drug resistant bacteria. The World Health Organisation has also classified *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, and carbapenem-resistant *K. pneumoniae* as urgent priority pathogens in terms of the need for new antibiotics. Despite the well-known need, there are very few novel antimicrobial medicines in development to treat Gram-negative ESKAPE infections (4).

Carbapenems are broad-spectrum lactam antibacterial drugs that play an important role in the treatment of complicated infections caused by such organisms, particularly against strains that produce extended-spectrum-lactamases (ESBLs) (5). The growth and spread of carbapenem-resistant bacteria, on the other hand, exacerbates the clinical problem of treating these infections (5,6). Polymyxins, tigecycline, and aminoglycosides are routinely used to treat carbapenem-resistant infections, but they have low efficacy and considerable toxicity (7,8). In recent years, the United States Food and Drug Administration (FDA) and the European Medical Agency (EMA) have approved numerous novel antibiotics with predominant activity against Gram-negative bacteria, including ceftazidime-avibactam and imipenem-relebactam (9).

The purpose of this study was to evaluate the susceptibility of carbapenem resistant *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii* isolates to imipenem-relebactam and ceftazidime-avibactam.

MATERIAL and METHOD

Identification and antibiotic susceptibility of the isolates

This study included a total of 183 isolates, including 82 (44.8 %) *K. pneumoniae*, 45 (24.6 %) *P. aeruginosa*, and 56 (30.6 %) *A. baumannii* isolates, identified from various clinical samples sent to the Microbiology Laboratory of Tokat Gaziosmanpaşa

University between December 2016-December 2019. The identification and antibiotic susceptibility testing of the isolates were performed using the Vitek 2 automated system (bioMérieux, France) according to the guidelines of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (10). Each isolate that exhibited resistance or intermediate resistance to one or more antibiotics from the carbapenem group underwent phenotypic confirmation for carbapenem resistance using the Modified carbapenemase inactivation method (CIM) and the Blue-carba test (BCT). The susceptibility of all isolates to imipenem (10 µg, Bioanalyse, Turkey), meropenem (10 µg, Bioanalyse, Turkey), imipenem-relebactam (35 µg, Liofilchem, Italy), and ceftazidime-avibactam (10/4 µg, Bioanalyse, Turkey) was evaluated using the disk diffusion method according to EUCAST standards. The specified zone diameters for *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were used (Figure 1) (10). *Escherichia coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were utilised as quality control strains. Samples sent from intensive care and all clinics were included in the study. Repetitive isolates from identical patient specimens were excluded from this study.

Blue Carba Test

Mueller-Hinton agar was used for the cultivation of the isolates. A five µL loop containing a pure bacterial culture was suspended in a test solution consisting of a 0.04% aqueous solution of bromothymol blue (Sigma) and 0.1 mmol/liter of ZnSO₄ (Sigma), supplemented with 6 mg of Tienam (MSD) (equivalent to 3 mg of imipenem), and adjusted to a final pH 7. The mixture was then incubated at a temperature of 37°C for a duration of two hours. Both the test solution and negative-control solution changed colour, such as yellow or blue, yellow versus green, or green versus blue, the presence of carbapenemase activity was considered positive. Carbapenem-resistant bacteria appeared as blue or green in both solutions (11). The test was repeated for each individual isolate. (Figure 2).

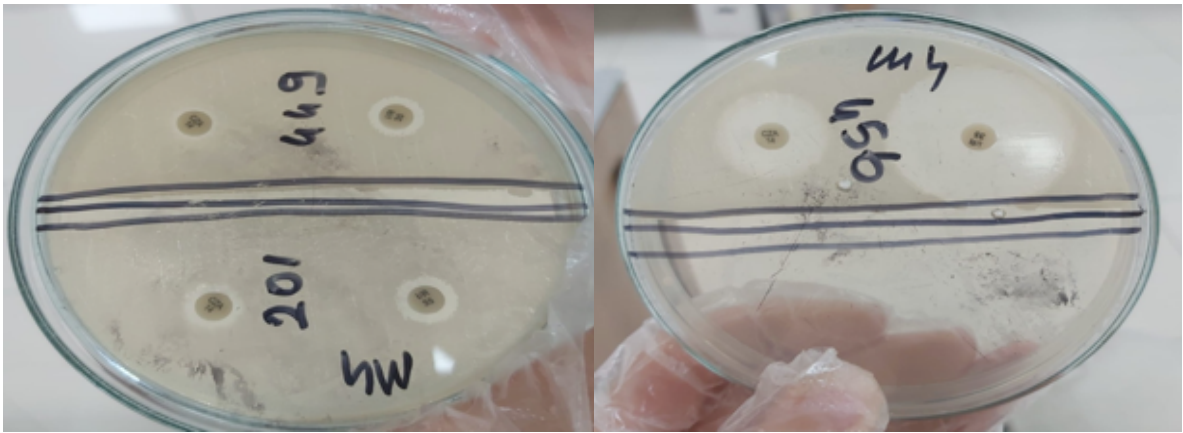


Figure 1. *K. pneumoniae* isolates detected as resistant and sensitive to imipenem relebkatam and ceftazidime avibactam

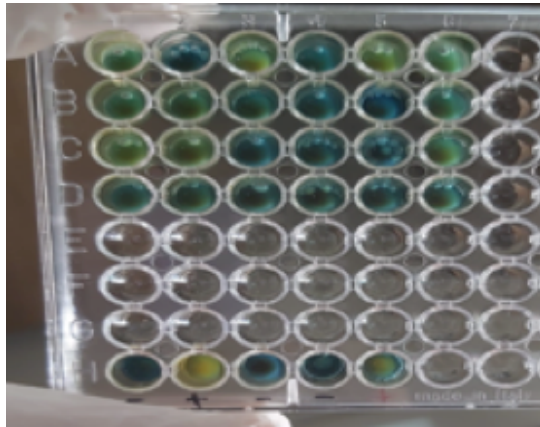


Figure 2. Blue-Carba test results
Carbapenem-resistant bacteria appeared as blue or green
Carbapenem-sensitive bacteria appeared as yellow

Modified Carbapenem Inactivation Method

For each *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* isolates, 10 μ L loopfuls culture and 10 μ g meropenem (Oxoid Ltd, Hampshire, United Kingdom) disk were suspended in 400 μ L of distilled water and incubated at 35°C for four hours. Simultaneously, a 0.5% McFarland suspension of *Escherichia coli* ATCC was spread onto Mueller-Hinton agar and allowed to dry for 3-10 minutes at room temperature. After the incubation the meropenem disk withdrawn from the solution, and streaked onto Mueller-Hinton agar along with *Escherichia coli* ATCC. The plates were incubated at 37°C for two hours. Results were considered positive inhibitory zone diameters ranged

from 0 to 16 mm or there was satellite expansion of colonies measuring 16-18 mm. Negative results were indicated by an inhibitory zone diameter of 19 mm (12) (Figure 3). For *A. baumannii* isolates modified carbapenem inactivation method was used suggested by Zhang et al. To create the inoculum, new bacteria cultivated overnight on LB agar or in broth were inoculated into TSB and adjusted to an OD600 of 8.0 in one mL. The bacteria were centrifuged and resuspended in 200 μ L TSB before incubating on the 10 μ g meropenem (Oxoid Ltd, Hampshire, United Kingdom) disc. The next steps and evaluation of the test were carried out in the same way as the CIM method (13).

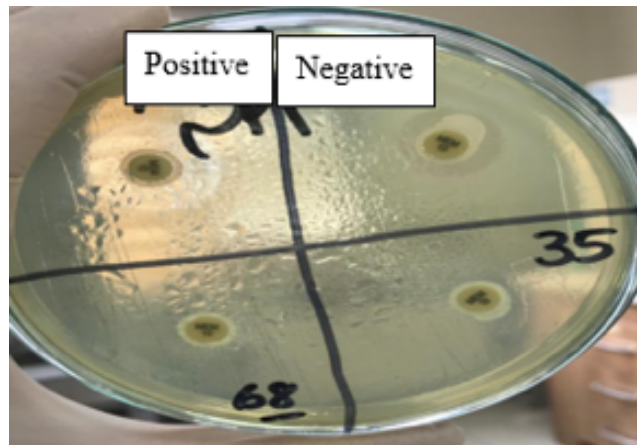


Figure 3. Carbapenem inactivation method results

The data was summarised using as frequencies and percentages within the scope of descriptive analysis.

The study was approved by the Ethics Committee of the Tokat Gaziosmanpaşa University (Date: 16.03.2023 and Number: 23/KA EK/067).

RESULTS

The study included a total of 183 carbapenem-resistant isolates consisting of 82 *K. pneumoniae*, 45 *P. aeruginosa*, 56 *A. baumannii* isolates. The majority of the isolates, 132 in total 72.1%, were obtained from the intensive care unit. The distribution of isolates according to clinical departments is presented in Table 1. The isolates were obtained from various clinical specimens, including tracheal aspirate (60, 32.8%), blood (44, 24%), urine (38, 20.8%), wound (35, 19.1%), sterile body fluid (4, 2.2%), and cerebrospinal fluid (2, 1.1%) specimens.

The resistance rates of isolates to ceftazidime and ceftazidime-avibactam were found to be, respectively, 100% and 3.7% for *K. pneumoniae*, 24.4% and 8.9% for *P. aeruginosa*, and 100% and 98.2% for *A. baumannii*. The resistance rates of isolates to imipenem and imipenem-relebactam were found to be, respectively, 80.5% and 85.4% for *K. pneumoniae*, 68.9% and 13.3% for *P. aeruginosa*, and 100% and 98.2% for *A. baumannii*.

Resistance to ceftazidime-avibactam was 3.7% in all *K. pneumoniae* isolates resistant to ceftazidime, 36.4% in *P. aeruginosa* isolates, and 98.2% in *A. baumannii* isolates. Resistance to imipenem-relebactam was 95.5% in all *K. pneumoniae* isolates resistant to imipenem, 16.1% in *P. aeruginosa* isolates, and 98.2% in *A. baumannii* isolates. The antibiotic resistance rates of all isolates are shown in Table 2.

The positivity rates for CIM and BCT were determined as 79.3% and 80.5% for *K. pneumoniae*, 9% and 50% for *P. aeruginosa*, 80.4% and 62.5% for *A. baumannii* isolates, respectively. The antibiotic resistance rates, along with CIM and BCT positivity, are presented in Table 2.

DISCUSSION

According to the findings, the susceptibility rates of isolates to ceftazidime-avibactam were higher for *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. Additionally, susceptibility to imipenem-relebactam was high in *P. aeruginosa*. Several novel antibiotics with predominant in vitro action against Gram-negative bacteria have been licenced in recent years, although they vary greatly in terms of range of activity, indications, and clinical experience. Ceftazidime avibactam and imipenem

Table 1. Distribution of isolates according to clinics

Clinics	n	%
Internal diseases	42	23
Neurology	23	12.6
Neurosurgery	19	10.4
General surgery	15	8.2
Oncology	14	7.7
Orthopedics	12	6.6
Chest intensive care	10	5.5
Pediatric	9	4.9
Urology	6	3.3
Cardiology	6	3.3
Infection	6	3.3
Gastroenterology	6	3.3
Anesthesia	5	2.7
Palliative care service	4	2.2
Oncology surgery	3	1.5
Others*	3	1,5
Total	183	100

* Gynecology, plastic surgery, radiation oncology

Table 2. Resistance rates of all isolates to antibiotics and Carbapenem Inactivation Method and Blue Carba Test results (%)

	Imipenem	Meropenem	Imipenem-- elebactam	Ceftazidime	Ceftazidime- avibaktam	CIM ¹⁾	BCT ²⁾	CIM positive		CIM negative		BCT positive		BCT negative	
								Imipenem-- relebactam	Ceftazidime- avibaktam	Imipenem-- relebactam	Ceftazidime- avibaktam	Imipenem-- relebactam	Ceftazidime- avibaktam	Imipenem-- relebactam	Ceftazidime- avibaktam
<i>K. pneumoniae</i>	93,9	84,1	80,5	100	3,7	79.3	80,5	98,5	3,1	11.8	5,9	98,5	3	6,3	6,3
<i>P. aeruginosa</i>	68,9	75,6	13,3	26.6	8,9	9	50	75	50	7,3	4,9	10,7	14,3	17,6	.
<i>A. baumannii</i>	100	100	98,2	98.2	98,2	80,4	62,5	97,8	97,8	100	100	100	97,1	95,2	100

1) Carbapenem Inactivation Method

2) Blue Carba Test

relebactam are among these new antibiotics (9).

One of the worldwide public health challenges facing humanity is antimicrobial resistance. Many gram-negative bacteria have developed resistance to carbapenem antibiotics, which are frequently used as a last choice in the treatment of severe infections caused by these organisms (1). Resistance to carbapenems is more common in *K. pneumoniae*, however it is also found in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. According to the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, higher rates of resistance were recorded in the European Region in 2022 (4).

Ceftazidime-avibactam is a combination drug that contains a semi-synthetic third-generation cephalosporin as well as a new non- β -lactam/ β -lactamase inhibitor. Avibactam protects ceftazidime from the hydrolytic activity of a variety of class A, C, and D -lactamases. (14). Relebactam is a new -lactamase inhibitor that inhibits both class A and class C -lactamases (15). Despite having no inherent antibacterial action, relebactam can protect imipenem from degradation by Ambler class A and class C -lactamases, as well as *Pseudomonas*-derived cephalosporinase (16). In vitro, relebactam significantly boosts imipenem's antibacterial activity against ESBL and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) producing Enterobacterales, as well as multidrug resistance (MDR) or carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolates (17).

In the "Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends global surveillance program" relebactam restored imipenem susceptibility of imipenem-nonsusceptible *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. Relebactam had no effect on the number of *Acinetobacter* spp. isolates sensitive to imipenem (18). A total of 150 clinical carbapenem resistance Enterobacterales (CRE) with a large proportion of *K. pneumoniae* isolates were investigated, and 63% were responsive to ceftazidime-avibactam and 62% were susceptible to imipenem-relebactam (19). According to Garca-Fernández et al. imipenem/relebactam inhibited 98.8% of Enterobacterales

isolates and 92.2% of *P. aeruginosa* isolates. In addition, imipenem/relebactam remained efficacious against ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* isolates (76.3%) and imipenem-resistant isolates (71.5%). A total of 75.1% and 46.2% of all multidrug-resistant or difficult-to-treat *P. aeruginosa* isolates were susceptible to imipenem/relebactam, respectively (20). Tamma et al. observed imipenem-relebactam was active against 88% of KPC-producing isolates and ceftazidime-avibactam was active against all of OXA-48-like carbapenemases (21). Hilbert et al. indicated the addition of relebactam raised imipenem susceptibility from 63.8% to 87.0% in *P. aeruginosa* isolates (22). Several in vitro experiments have been conducted to assess the activity of imipenem-relebactam against *P. aeruginosa*. In total, 94% of *P. aeruginosa* were susceptible to imipenem-relebactam. However, sensitivity to imipenem-relebactam was frequently greater than 70% in imipenem-resistant *P. aeruginosa* (23-26). In the current study resistance to imipenem-relebactam was observed 13.3% in *P. aeruginosa* isolates, which was consistent with prior research findings.

In a study conducted in 2021, relebactam was found to restore imipenem activity in KPC or AmpC-producing imipenem resistant *K. pneumoniae* strains. However, relebactam exhibited no activity against MBL-producing isolates. Relebactam restored imipenem susceptibility in 100%, 60%, and 49% of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates that exclusively harbored AmpC, extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), and carbapenemases, respectively. The study emphasized the need for further research to evaluate the activity of relebactam against isolates carrying bla OXA-48 or with altered efflux pump hyperactivity (27). Studies have shown that relebactam is susceptible in all KPC positive CRKPs (27,28). However, while a significant proportion of Oxa 48 positive strains were susceptible to relebactam, all MBL-producing strains were resistant to relebactam. Relebactam was found to have the highest activity on KPC carbapenemase and AmpC

β -lactamase and no activity on MBL genes and efflux pump overactivity (27). In the current study resistance to imipenem-relebactam was reported 80.5% in *K. pneumoniae* isolates. This finding may be related to the possibility that the isolates in this study contained a significant number of MBL genes. Carbapenemases that are frequently identified in carbapenem resistant *A. baumannii* mainly belong to class B and D (29). Therefore there are studies in the literature reporting that relebactam does not potentiate the antibacterial effect of imipenem against carbapenem-resistant *A. baumannii* (18,30,31). In this study, 98.2% of *A. baumannii* isolates were resistant to imipenem relebactam and our results are similar to previous studies.

Ceftazidime-avibactam inhibited 97.8% of all Enterobacterales and 91.7% of *P. aeruginosa* isolates, including those that were resistant to meropenem and ceftazidime (32). According to EUCAST, only ceftazidime was reported as intrinsic resistant for *A. baumannii* (33) and some studies investigated the efficacy of ceftazidime avibactam against *A. baumannii*. (32,34,35) When compared to other Gram-negative bacteria, *A. baumannii* has significantly greater resistance to ceftazidime-avibactam (32,34). Sader et al reported ceftazidime/avibactam exhibited limited activity against *Acinetobacter* spp. (34). MDR *A. baumannii* with blaOXA-51-like genes are totally resistant to ceftazidime-avibactam (36). In the current study, resistance to ceftazidime-avibactam was detected in 98.2% of cases, and the efficacy of ceftazidime-avibactam against *A. baumannii* isolates was found to be very

low, consistent with findings in other studies. This is attributed to the overexpression of AmpC and/or blaOXA-51 β -lactamase by *A. baumannii* isolates (23).

The current study provides in vitro data on the potential of two novel antimicrobial drugs, imipenem-relebactam and ceftazidim-avibactam, as tools for the treatment of carbapenem-resistant infections in *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*. The fact that genotyping resistance and metallo- β -lactamase phenotyping were not conducted represents a limitation of the study. On the other hand, in vitro activity is an element of the complex decision-making process involved in selecting the most effective antibiotic (21).

In conclusion; controlling carbapenem-resistant bacterial infections, which are challenging to treat, plays a vital role, especially in hospitalized patients. Our results suggest that ceftazidime-avibactam could be beneficial and effective against carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. It has been observed that imipenem-relebactam is highly effective in *P. aeruginosa* isolates while less effective against *K. pneumoniae*. The impact of these antibiotics on *A. baumannii* isolates is also found to be quite limited in this study, as in previous research. These findings highlight the importance of conducting more comprehensive research aimed at developing effective diagnosis and treatment strategies against antimicrobial resistance. According to the current study, ceftazidime-avibactam are important alternatives, especially in the treatment of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* isolates.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Ethics Committee of the Tokat Gaziosmanpaşa University (Date: 16.03.2023 and Number: 23/KAEK/067).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514768>.
2. Şimşek Bozok T, Bozok T. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizma dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları: iki yıllık değerlendirme. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2022; 79(4): 606-15.
3. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance [website]. Geneva: WHO; 2022. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
4. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization; 2023. Cataloguing-in-Publication (CIP) data. CIP data are available at <http://apps.who.int/iris>.
5. McCann E, Srinivasan A, DeRyke CA, Ye G, DePestel DD, Murray J, et al. Carbapenem-Nonsusceptible Gram-Negative Pathogens in ICU and Non-ICU Settings in US Hospitals in 2017: A Multicenter Study. *Open Forum Infect Dis*, 2018; 5: ofy241.
6. Tabak YP, Sung A, Ye G, Vankeepuram L, Gupta V, McCann E. Attributable burden in patients with carbapenem-nonsusceptible gram-negative respiratory infections. *PLoS One*, 2020; 15: e0229393.
7. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clin Infect Dis*, 2022; 75(2): 187-212.
8. Asempa TE, Nicolau DP, Kuti JL. Carbapenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Intensive Care Units in the United States: a Potential Role for New β -Lactam Combination Agents. *J Clin Microbiol*, 2019; 57(8): e00535-19.
9. Yusuf E, Bax HI, Verkaik NJ, van Westreenen M. An Update on Eight "New" Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *J Clin Med*, 2021; 10(5): 1068.
10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, 2023. <http://www.eucast.org>.
11. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*, 2013; 51(12): 4281-3.
12. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*, 2015; 10(3): e0123690.
13. Zhang S, Mi P, Wang J, Li P, Luo K, Liu S, et al. The optimized carbapenem inactivation method for objective and accurate detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*, 2023; 14: 1185450.
14. Avycaz (ceftazidime/avibactam) prescribing information Cincinnati, Ohio: Forest Pharmaceuticals, Inc. Google Scholar; 2019. https://media.allergan.com/actavis/actavis/media/allergan-pdf-documents/product-prescribing/Avycaz_Final_PI_CBE-0_10_2019.pdf
15. Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M et al. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem- β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs*, 2018; 78(1): 65-98.
16. Barnes MD, Bethel CR, Alsop J, Becka SA, Rutter JD, Papp-Wallace KM, et al. Inactivation of the *Pseudomonas*-Derived Cephalosporinase-3 (PDC-3) by Relebactam. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018; 62(5): e02406-17.
17. Carpenter J, Neidig N, Campbell A, Thornsberry T, Truex T, Fortney T, et al. Activity of imipenem/relebactam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high colistin resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2019; 74(11): 3260-3.
18. Lob SH, Hackel MA, Kazmierczak KM, Hoban DJ, Young K, Motyl MR, et al. Invitro activity of imipenem-relebactam against gram-negative bacilli isolated from patients with lower respiratory tract infections in the United States in 2015 - Results from the SMART global surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2017; 88(2): 171-6.

19. Nordmann P, Bouvier M, Poirel L. Efficacy of ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam, and imipenem-relebactam combinations against carbapenemase-producing Enterobacterales in Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2023; 42(9): 1145-52.
20. García-Fernández S, Calvo J, Cercenado E, Suárez-Barrenechea AI, Fernández-Billón M, Castillo FJ, Gálvez-Benítez L, et al. Activity of imipenem/relebactam against Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *SMART 2016-2020. Rev Esp Quimioter*, 2023; 36(3): 302-9.
21. Tamma PD, Bergman Y, Jacobs EB, Lee JH, Lewis S, Cosgrove SE, et al. Comparing the activity of novel antibiotic agents against carbapenem-resistant Enterobacterales clinical isolates. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2023; 44(5): 762-7.
22. Hilbert DW, DeRyke CA, Motyl M, Hackel M, Young K. Relebactam restores susceptibility of resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacterales and enhances imipenem activity against chromosomal AmpC-producing species: analysis of global SMART 2018-2020. *BMC Microbiol*, 2023; 23(1): 165.
23. Lapuebla A, Abdallah M, Olafisoye O, Cortes C, Urban C, Quale J, et al. Activity of Meropenem Combined with RPX7009, a Novel β -Lactamase Inhibitor, against Gram-Negative Clinical Isolates in New York City. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015; 59 (8): 4856-60.
24. Karlowsky JA, Lob SH, Kazmierczak KM, Hawser SP, Magnet S, Young K, et al. In vitro activity of imipenem/relebactam against Gram-negative ESKAPE pathogens isolated in 17 European countries: 2015 SMART surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*, 2018; 73(7): 1872-9.
25. Schmidt-Malan SM, Mishra AJ, Mushtaq A, Brinkman CL, Patel R. In Vitro Activity of Imipenem-Relebactam and Ceftolozane-Tazobactam against Resistant Gram-Negative Bacilli [published correction appears in *Antimicrob Agents Chemother*, 2018; 62(8): e00533-18.
26. Mirza HC, İnce Ceviz G. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı sefidrokol, imipenem/relebactam ve diğer antibiyotiklerin in vitro etkinliklerinin karşılaştırılması. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2022; 79(3): 433-42.
27. Mashaly ME, Mashaly GE. Activity of imipenem/relebactam on *Klebsiella pneumoniae* with different mechanisms of imipenem non-susceptibility. *Iran J Microbiol*, 2021; 13(6): 785-92.
28. Canver MC, Satlin MJ, Westblade LF, Kreiswirth BN, Chen L, Robertson A, et al. Activity of imipenem-relebactam and comparator agents against genetically characterized isolates of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019; 63(9): e00672-19.
29. Yu H, Ezepeleta-Lobato G, Han X, Carmona-Cartaya Y, Quiñones-Pérez D. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in China, Latin America and the Caribbean. *MEDICC Rev*, 2022; 24: 59-69.
30. Xu C, Chen T, Zhang S, Zhou C, Liao W, Fang R, et al. In vitro activity of imipenem-relebactam alone and in combination with fosfomycin against carbapenem-resistant gram-negative pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2022; 103(3): 115712.
31. Liang R, Wang D, Hu M, Gu Y, Wang M, Hu D et al. In vitro activity of ceftazidime/avibactam, imipenem/relebactam and meropenem/vaborbactam alone or in combination with polymyxin B against carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antibiot (Tokyo)*, 2023; 76(9): 540-7.
32. Hachem R, Reitzel R, Rolston K, Chafitani AM, Raad I. Antimicrobial Activities of Ceftazidime-Avibactam and Comparator Agents against Clinical Bacteria Isolated from Patients with Cancer. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017; 61(4): e02106-16.
33. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Expected Resistant Phenotypes Version 1.1 March 2022. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2022/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.1_20220325.pdf
34. Sader HS, Castanheira M, Flamm RK, Mendes RE, Farrell DJ, Jones RN. Ceftazidime/avibactam tested against Gram-negative bacteria from intensive care unit (ICU) and non-ICU patients, including those with ventilator-associated pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*, 2015; 46(1): 53-9.
35. Mataracı Kara E, Yılmaz M, Özbek Çelik B. In vitro activities of ceftazidime/avibactam alone or in combination with antibiotics against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Glob Antimicrob Resist*, 2019; 17: 137-41.
36. Savov E, Trifonova A, Kovachka K, Kjosseva E, Strateva T. Antimicrobial in vitro activities of ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam and plazomicin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* - a pilot Bulgarian study. *Infect Dis (Lond)*, 2019; 51(11-12): 870-3.

The effect of medication and lifestyle factors on global burden of disease and mortality in chronic diseases in OECD countries: the case of type 2 diabetes mellitus

OECD ülkelerinde kronik hastalıklarda ilaç kullanımı ve yaşam tarzı faktörlerinin küresel hastalık yüküne ve ölümlere etkisi: tip 2 diyabet örneği

Yasin ARAS¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Chronic diseases refer to long-lasting health problems that are generally difficult to treat. The most common chronic diseases include diabetes, heart disease, hypertension, chronic respiratory diseases, and cancer. These diseases are typically associated with lifestyle factors such as genetic predisposition, poor nutrition, insufficient physical activity, excessive smoking, and alcohol consumption. In addition to physical discomfort, chronic diseases also have psychological and social impacts on individuals. The treatment process usually requires long-term management and patient adherence. Therefore, regular medical check-ups, healthy lifestyle habits, and proper medication dosage are crucial. The prevalence of chronic diseases is increasing in OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development- Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü) countries, and the impact of drug use and lifestyle factors on the global burden of disease and mortality is becoming increasingly important. Type 2 diabetes is an important example in this context. This study aims to examine the impact of medication use and

ÖZET

Amaç: Kronik hastalıklar, genellikle uzun süre devam eden ve tedavi edilmesi zor olan sağlık sorunlarını ifade etmektedir. En yaygın kronik hastalıklar arasında diyabet, kalp hastalıkları, hipertansiyon, kronik solunum yolu hastalıkları ve kanser yer almaktadır. Bu hastalıklar, genel olarak genetik yatkınlık, kötü beslenme, yetersiz fiziksel aktivite, aşırı sigara ve alkol tüketimi vb. yaşam tarzı faktörleriyle ilişkilidir. Kronik hastalıklar, bireylerde fiziksel rahatsızlıkların yanı sıra, psikolojik ve sosyal etkiler de meydana getirmektedir. Tedavi süreci genellikle uzun süreli yönetim ve hasta uyumunu gerektirmektedir. Bu nedenle düzenli hekim kontrolleri, sağlıklı yaşam alışkanlıkları ve uygun dozda ilaç kullanımı önemlidir. OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development- Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü) ülkelerinde kronik hastalıkların yaygınlığı artmakta ve ilaç kullanımı ile yaşam tarzı faktörlerinin küresel hastalık yükü ve ölümler üzerindeki etkisi giderek daha önemli hale gelmektedir. Tip 2 diyabet bu bağlamda önemli bir örnektir. Bu çalışma, tip 2 diyabet yönetiminde ilaç kullanımı ve yaşam tarzı

¹Aksaray University, Department of Health Management, Aksaray, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Yasin ARAS
Aksaray Üniversitesi Bahçesaray Mahallesi, Aksaray - Türkiye
E-posta / E-mail : yasinaras@aksaray.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 10.10.2024
Kabul Tarihi / Accepted : 13.11.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.59751

Aras Y. The effect of medication and lifestyle factors on global burden of disease and mortality in chronic diseases in OECD countries: the case of type 2 diabetes mellitus. Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(4): 449 - 462

lifestyle factors in the management of type 2 diabetes mellitus on the global burden of disease and mortality.

Methods: The study population includes all OECD countries. Medications used in type 2 diabetes mellitus, alcohol consumption, tobacco consumption, obesity, physical inactivity were used as independent variables; type 2 diabetes-related mortality, type 2 diabetes DALYs (Disability-adjusted life years) were used as dependent variables.

Results: Regression analysis showed that lifestyle factors (lnAlc, lnTob, lnObes, lnPInact) and medication use (lnDrug) effected both lnDALY and lnDMort ($p<0.05$).

Conclusion: The effective use of medication and lifestyle changes in the management of type 2 diabetes is an important step in controlling the disease. Therefore, in addition to the use of medication, healthy lifestyle habits should be promoted to prevent and control chronic diseases. These measures can contribute both to improving the health of individuals and to the sustainability of health systems.

Key Words: Type 2 diabetes, global burden of disease, diabetes-related mortality, medication, healthy lifestyle

faktörlerinin küresel hastalık yükü ve ölümler üzerindeki etkisini incelemeyi amaçlamaktadır.

Yöntem: Çalışmanın evrenini tüm OECD ülkeleri oluşturmaktadır. Tip 2 diyabette kullanılan ilaçlar, alkol tüketimi, tütün tüketimi, obezite, fiziksel inaktivite bağımsız değişkenler; tip 2 diyabette ilişkili ölüm oranı, tip 2 diyabette DALYs (Engelliliğe göre ayarlanmış yaşam yılları) bağımlı değişkenler olarak kullanılmıştır.

Bulgular: Regresyon analizi yaşam tarzı faktörlerinin (lnAlc, lnTob, lnObes, lnPInact) ve ilaç kullanımının (lnDrug) hem lnDALY hem de lnDMort'u etkilediğini göstermiştir ($p<0.05$).

Sonuç: Tip 2 diyabet yönetiminde ilaçların etkin kullanımı ve yaşam tarzı değişiklikleri hastalığın kontrol altına alınmasında önemli bir adımdır. Bu nedenle, ilaç kullanımına ek olarak, kronik hastalıkları önlemek ve kontrol altına almak için sağlıklı yaşam tarzı alışkanlıkları teşvik edilmelidir. Bu önlemler hem bireylerin sağlığının iyileştirilmesine hem de sağlık sistemlerinin sürdürülebilirliğine katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: Tip 2 diyabet, küresel hastalık yükü, diyabete bağlı ölümler, ilaç tedavisi, sağlıklı yaşam tarzı

INTRODUCTION

Chronic diseases, also known as non-communicable diseases, are defined by the WHO (World Health Organisation) as the result of a combination of genetic, physiological, environmental and lifestyle (behavioural) factors that tend to be long-term (1). Chronic diseases are long-term conditions that can usually be controlled but not cured. People living with chronic diseases often have to cope with daily symptoms that affect their quality of life, and experience acute health problems and complications that can shorten their life expectancy (2).

In 1990, more than 28 million (57 per cent) of all deaths worldwide were due to chronic diseases (3), whereas today more than 40 million (74 per cent) of all deaths worldwide are due to chronic diseases (1). Furthermore, the number of disability-adjusted life years (DALYs) from chronic diseases increased by 36.6 percent between 1990 and 2016(4).

Type 2 diabetes mellitus is one of the leading chronic diseases, along with cardiovascular disease, cancer and respiratory disease, which account for a significant proportion of deaths and disease burden across the world (1). This chronic disease is particularly associated with a high burden of

disability, causing cardiovascular disease, blindness, kidney failure and lower limb amputation. Type 2 diabetes occurs when the body is unable to control excessive levels of glucose in the blood. In 2021, 6.9% of the adult population in the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) countries will be living with type 2 diabetes. In addition, it is estimated that 48 million adults have undiagnosed type 2 diabetes (5).

A review of the literature shows that the incidence of cancer, cardiovascular disease, chronic respiratory disease and diabetes share similar modifiable (lifestyle) risk factors such as alcohol consumption, body mass index (BMI), smoking, unhealthy diet and physical inactivity (6). An important way to control chronic diseases such as type 2 diabetes is to focus on reducing the risk factors associated with these diseases. Low-cost solutions to reduce common lifestyle risk factors are available to governments and other stakeholders. Monitoring progress and trends in non-communicable diseases and their risks is important to guide policies and priorities (1).

Medication is another way to prevent the devastating effects of type 2 diabetes. In particular, the use of medications that lower blood glucose and blood pressure facilitates the treatment of the disease (7).

In this context, this study aims to examine the impact of medication use and lifestyle factors on the global burden of disease and mortality in the management of type 2 diabetes. Understanding this issue is important for both health professionals and societies, as reducing and controlling the impact of type 2 diabetes is important for the sustainability of health systems.

MATERIAL and METHOD

The aim of this study is to examine the impact of medication use and lifestyle factors on the global burden of disease and mortality in the management of type 2 diabetes.

The variables used in the study were selected from the literature (1,5,7). Information on the relevant variables is presented in Table 1.

Table 1. Variables

Variables	Abbrev.	Expl.	Data From ¹	
Independents	Drugs used in Type 2 Diabetes	lnDrug	Daily dosage per 1000 population (mg)	OECD
	Alcohol consumption	lnAlc	15 age and above population alcohol consumption (Liter)	OECD
	Tobacco consumption	lnTob	Tobacco consumption 15 age and above population who daily smokers (%)	WHO
	Obesity	lnObes	Obese population (%)	WB
	Physical inactivity	lnPInact	Insufficient physical activity population (Crude %)	WHO
Dependents	Type 2 diabetes-related mortality	lnDMort	Mortality rate per 100 000 (Rate)	OECD
	Type 2 diabetes disability-adjusted life years (DALYs)	lnDALY	Disability-adjusted life years per 100 000 population (Rate)	IHME

¹ OECD=Organisation for Economic Co-Operation and Development; WHO= World Health Organization; WB= World Bank; IHME= Institute for Health Metrics and Evaluation

The population of the study consists of all OECD countries. The data covers the years 2010-2015. It is planned to reach the whole population by not selecting a sample. However, Colombia, Costa Rica, Finland, Ireland, Japan, Mexico, Japan, Mexico, Poland, Switzerland and the United States of America, which had missing data on variables and years, were not included in the study. Data were obtained from Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), World Health Organization (WHO), World Bank (WB) and The Institute For Health Metrics And Evaluation (IHME) databases.

Before analysing the data, a logarithmic transformation was applied to the data. This ensured the normality of the data. The Augmented Dickey Fuller (ADF) unit root test was then used to test whether the time series data were stationary. As all variables were found to be stationary at the 95% confidence level ($t=-7.425$; $p<0.05$), the analysis continued without removing the variable. Finally, the Hausman test was performed to select the effect model and the random effect model was selected ($X^2=46.589$; $p>0.05$). The data were analysed in two steps. First, the effect of the independent variables

(lnDrug, lnAlc, lnTob, lnObes, lnPInact) on the global burden of disease (lnDALY) for type 2 diabetes was analysed. In the second step, the effect of the same independent variables on deaths due to type 2 diabetes (lnMort) was analysed. Based on the results obtained, the effects of the independent variables on deaths and burden of disease were evaluated separately. EViews 9.0 software was used to analyse the data.

RESULTS

Descriptive statistics of the variables used in the study are presented in Table 2. Accordingly, the mean values of the variables ranged between 0.03 ± 0.01 and 82.09 ± 4.42 .

The correlations between the variables are presented in Table 3. According to Table 3, the lowest correlation was found between lnDrug and lnObes with 0.02, while the highest correlation was found between lnMort and lnDALY with 0.71. Considering the coefficients, it is determined that there is no multicollinearity problem between the variables.

Table 2. Descriptive Statistics

	lnAlc	lnTob	lnObes	lnPInact	lnDrug	lnDALY	lnMort
Mean	9.49	28.03	57.16	82.09	61.52	0.03	21.15
Std. Dev.	2.79	6.83	6.19	4.42	14.65	0.01	10.62
Obs.	174	174	174	174	174	174	174

Table 3. Correlations Coefficients and Probabilities

	lnAlc	lnTob	lnObes	lnPInact	lnDrug	lnDALY	lnMort
lnAlc	1.00						
lnTob	0.17*	1.00					
lnObes	0.22*	0.07	1.00				
lnPInact	0.13	0.03	0.09*	1.00			
lnDrug	0.18*	0.08	0.02	-0.11	1.00		
lnDALY	0.30*	0.04*	0.07*	0.17*	-0.22*	1.00	
lnMort	0.43*	0.10*	0.02*	0.23*	-0.22*	0.71*	1.00

* $p<0.05$

Table 4 presents the results of the first stage regression analysis. According to Table 4, the model was found to be significant ($p < 0.05$). lnDrug, lnAlc, lnTob, lnObes and lnPInact variables were all found to significantly affect lnDALY. The explanatory rate of the variables in the model was 22%.

Table 5 presents the results of the second stage regression analysis. According to Table 4, the model was found to be significant ($p < 0.05$). lnDrug, lnAlc, logTob, lnObes and lnPInact variables were all found to significantly affect lnMort. The explanatory rate of the variables in the model was 27%.

When Table 4 is analysed, it is seen that lnDrug

has the least contribution to lnDALY and lnObes has the most contribution. When Table 5 is analysed, the least contribution to lnMort is made by lnDrug and the most contribution is made by lnAlc. From this point of view, it can be said that drug use may be less effective compared to other risk factors.

According to the results of Breusch-Pagan-Godfrey test and LM test, it is determined that there is no horizontal cross-section dependence between countries according to both regression models. In this sense, it can be said that the data of the countries that are not included in the study due to missing data will not have any effect on the significance of the models.

Table 4. Regression Analysis Results (First Stage)

Variables	Coefficients	Std. Error	VIF	Prob.
lnAlc	0.015	0.002	2.121	0.001
lnTob	0.021	8.105	1.192	0.032
lnObes	0.312	9.063	1.987	0.007
lnPInact	0.003	0.001	2.012	0.010
lnDrug	-0.001	3.792	3.102	0.001
c	0.013	0.123	2.452	0.023

$R^2=0.220$; $F=10.807$; $p < 0.001$; Durbin-Watson=2.250; Breusch-Pagan-Godfrey:0,211; Breusch-Godfrey Serial Correlation LM test: 0,061; Spesification Test of Hsiao:1,5E148(1,5.10⁻¹⁴⁸)

Table 5. Regression Analysis Results (Second Stage)

Variables	Coefficients	Std. Error	VIF	Prob.
lnAlc	0.250	0.263	1.542	0.001
lnTob	0.326	0.103	1.654	0.002
lnObes	1.714	0.115	2.100	0.031
lnPInact	0.434	0.158	2.521	0.006
lnDrug	-0.097	0.048	3.412	0.044
c	12.878	15.314	1.985	0.040

$R^2=0.271$; $F=13.901$; $p < 0.001$; Durbin-Watson=2.246; Breusch-Pagan-Godfrey:0,300; Breusch-Godfrey Serial Correlation LM test: 0,101; Spesification Test of Hsiao:2,2E234(2,2.10⁻²³⁴).

DISCUSSION

This study analysed the impact of medication use and lifestyle factors on the global burden of disease and mortality in the management of type 2 diabetes. As a result of the analysis, it was found that lifestyle factors (lnAlc, lnTob, lnObes, lnPInact) and medication use (lnDrug) both influence lnDALY. It was found that the burden of type 2 diabetes increased as alcohol consumption, smoking, obesity and physical inactivity increased, and that the burden of type 2 diabetes decreased as drug use increased.

Lifestyle or behavioural risk factors play an important role in the development and progression of several health problems, including type 2 diabetes. Type 2 diabetes is a chronic metabolic disorder characterised by high blood glucose levels and can lead to a number of complications that can increase the burden of disease and cause mortality from the disease.

A review of the literature found studies with similar results. In a study by Knott et al (8), it was found that excessive alcohol consumption can lead to both type 2 diabetes and diabetes-related complications. Alcohol can affect blood glucose levels and contribute to poor glycaemic control. Another study by Wannamethee et al (9) found an indirect link between alcohol consumption and the development of type 2 diabetes. In another study by Carlsson et al (10), excessive alcohol consumption was found to cause the development of type 2 diabetes. A study by Baliunas et al (11) also found that excessive alcohol consumption increased type 2 diabetes. Excessive alcohol consumption may increase the development of type 2 diabetes by affecting blood glucose levels and causing poor glycaemic control (12).

Smoking is a behavioural risk factor associated with a high risk of type 2 diabetes. Nicotine and other chemicals in tobacco smoke can impair insulin function and lead to diabetes by increasing insulin resistance (13). A study by Willi et al (14) found that type 2 diabetes and its complications, such as cardiovascular disease, worsen with increasing

smoking. Another study by Maddatu et al (15) found a significant association between smoking and increased type 2 diabetes. Another study by Yeh et al (16) found a significant association between smoking and type 2 diabetes. A study by Chang (17) revealed that smoking increases the risk of developing type 2 diabetes and aggravates micro- and macrovascular complications of diabetes. In another study by the InterAct Consortium et al (18), past and current smoking was associated with a higher risk of type 2 diabetes in men and women compared to never smokers. Smoking has been shown to contribute to insulin resistance. Smoking is known to cause inflammation in the body. Chronic inflammation can affect the body's ability to use insulin properly. Smoking can have several metabolic effects that can lead to an increased risk of type 2 diabetes. For example, smoking is associated with adverse changes in lipid profiles (high triglycerides and low HDL cholesterol), which are also risk factors for diabetes (19-20).

Obesity is a well-recognised risk factor for the development of type 2 diabetes and has a significant impact on the Disability Adjusted Life Years (DALYs) associated with this chronic disease. Obesity, particularly central or abdominal obesity, is closely associated with insulin resistance. Excess adipose tissue, especially visceral fat, can lead to the release of inflammatory substances that interfere with the body's ability to use insulin effectively. As a result, the pancreas may need to produce more insulin to regulate blood glucose levels. Persistently high insulin levels can eventually lead to insulin resistance, the hallmark of type 2 diabetes (21). A study by Lemieux (22) found that obesity is associated with adverse changes in lipid profiles, including high levels of triglycerides and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol. These lipid abnormalities are commonly seen in people with insulin resistance and have been shown to increase the risk of cardiovascular complications associated with type 2 diabetes. Another study by Mokdad et al (23) found that the increase in the prevalence of obesity was

positively associated with the development of type 2 diabetes. A study by Eckel et al (24) found that being overweight increases the risk of developing type 2 diabetes, although it is not enough on its own. Type 2 diabetes often leads to various complications such as diabetic retinopathy, neuropathy, nephropathy and cardiovascular disease. Obesity increases the severity and progression of these complications. Individuals with obesity and diabetes tend to experience greater disability and poorer quality of life, leading them to live with disability for longer years (25).

Physical inactivity or insufficient physical activity can lead to obesity and insulin resistance, which can lead to the development of type 2 diabetes. A study by Booth et al (26) found that there is a direct link between physical inactivity and an increased risk of diabetes and its complications. Another study by Duclos et al (27) found that regular physical activity is one of the most effective ways to protect against type 2 diabetes. Another study by Gill and Cooper (28) found that high levels of physical activity were associated with a 20-30% reduction in the risk of diabetes. Research suggests that diabetes prevention can be achieved through a range of moderate to vigorous intensity activities, and regular light intensity activity may also be sufficient. A study by Kanaley et al (29) found that different types of physical activity that improve health and glycaemic control in people with type 2 diabetes, including flexibility and balance exercises, have a direct impact on reducing the burden of disease. Moderate-intensity physical activity, such as walking and gardening, appears to be the most common form of activity among adults and can be easily adopted to reduce the risk of type 2 diabetes. Controlling blood glucose levels: Regular physical activity helps muscles use more glucose, which can lower blood glucose levels. This can reduce the risk of type 2 diabetes. Adequate physical activity improves insulin sensitivity, weight control, cardiovascular health, stress and insulin resistance. At the same time, exercise leads to cardiovascular and muscular adaptation (increase in skeletal muscle oxidative

capacity, capillarisation and muscle blood flow). This slows the development of type 2 diabetes (30-32).

The impact of medication use on Disability Adjusted Life Years (DALYs) due to type 2 diabetes is an important issue. Medications play an important role in the management and control of this chronic disease. There are several classes of drugs that are commonly used to treat type 2 diabetes. These medicines work through different mechanisms to help regulate blood glucose levels, increase insulin sensitivity and reduce the risk of complications. Drug selection and effectiveness can vary from person to person, depending on factors such as disease severity, comorbidities and individual response (33). A study by Chehade and Mooradian (34) found that the use of medication together with behavioural risk factors slowed the development of type 2 diabetes more quickly. In a study conducted by Tehrani et al (35), the use of glucose-lowering medications was found to be effective in the management of type 2 diabetes. Another study by Krentz et al (36) concluded that the use of antidiabetic drugs, which are used to reduce insulin resistance and lower blood glucose levels, indirectly reduces the development of type 2 diabetes. Medications prescribed for type 2 diabetes are primarily aimed at improving glycaemic control. Proper glycaemic control is effective in reducing the risk of diabetes-related complications such as cardiovascular disease, neuropathy, retinopathy and nephropathy (37). Medications can play an important role in preventing or delaying the onset of diabetes-related complications, especially if started early and used consistently (38). Well-managed diabetes can increase life expectancy by reducing the risk of premature death associated with uncontrolled diabetes and its complications. Some medications have been shown to have a beneficial effect on overall survival (25). This contributes to the reduction in years of life lost.

This study also found that lifestyle factors (lnAlc, lnTob, lnObes, lnPInact) and medication use (lnDrug) significantly influence type 2 diabetes mortality

(lnMort). It was found that as alcohol consumption, smoking, obesity and physical inactivity increase, type 2 diabetes mortality increases, and as drug use increases, type 2 diabetes mortality decreases.

Although some evidence suggests that moderate alcohol consumption may have potential cardiovascular benefits, including reducing the risk of heart disease and stroke (39-41), this does not apply to people with type 2 diabetes who are at high risk of complications (42). A study by Diem et al (43) found that excessive alcohol consumption makes people more susceptible to death from many diseases, including type 2 diabetes. Other studies by Koppes et al (44) and Blomster et al (45) also found that excessive alcohol consumption causes more deaths from type 2 diabetes compared to those who drink no alcohol and those who drink small amounts. Alcohol can affect blood glucose levels. In some cases, especially if consumed on an empty stomach, it can cause hypoglycaemia (low blood sugar) in people with diabetes. Hypoglycaemia can be life-threatening and, in severe cases, fatal (46). To avoid this risk, it is important to manage alcohol consumption appropriately. In addition, chronic alcohol use can lead to liver damage, including fatty liver disease and alcoholic liver disease. People with type 2 diabetes already have an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease. The combination of diabetes and excessive alcohol consumption can worsen liver complications and lead to an increased risk of death (47).

People with type 2 diabetes have a higher risk of premature death than people without diabetes. A study by Gregg et al (48) found that smoking significantly increased this risk. Another study found that diabetic smokers were more likely to die from cardiovascular disease, infections and other smoking-related conditions than non-smokers (49). Another study by Fagard and Nilsson (50) found that smoking is an important risk factor for chronic diseases and increases mortality in patients with type 2 diabetes. A study by Qin et al (51) found that smoking causes deaths from both diabetes and cardiovascular disease.

The impact of tobacco use on type 2 diabetes-related mortality is a critical public health issue. Smoking and the use of tobacco products are associated with several adverse health effects, including an increased risk of type 2 diabetes and its complications (49).

Obesity has a significant impact on mortality from type 2 diabetes. Obesity is an independent risk factor for mortality in people with type 2 diabetes. The combination of obesity and diabetes significantly increases the risk of premature death. A study by Hu et al (52) found that obese people with diabetes had a higher risk of all-cause death and death from cardiovascular events than non-obese people with diabetes. Obesity increases the already increased risk of death associated with diabetes (53). Another study by Frydrych et al (54) found that individuals with obesity and type 2 diabetes are physiologically frail and have a higher risk of death from infection and sepsis. In a study conducted by Zoppini et al (55) obesity was found to cause a significant increase in deaths due to type 2 diabetes, particularly in individuals under the age of 65. Obesity is strongly associated with an increased risk of complications in people with type 2 diabetes. These complications, including cardiovascular disease, neuropathy, retinopathy and nephropathy, contribute significantly to mortality in people with diabetes. Obesity exacerbates insulin resistance, leading to impaired glycaemic control, which increases the risk of these complications (22). Cardiovascular disease is a leading cause of death in people with diabetes, and obesity is an important determinant of cardiovascular risk.

The impact of physical inactivity on deaths from type 2 diabetes is another important aspect of public health and diabetes management. There is an association between physical inactivity and high mortality from type 2 diabetes. A study by Gregg et al (48) found that a sedentary lifestyle is associated with an increased risk of death from all causes and death from cardiovascular events. Physical inactivity increases the already high risk of death associated with diabetes. In another study by Wei et al (56),

the risk of death was found to be 1.7 times higher in adults who reported being physically inactive than in those who reported being physically active. A study by Bakrania et al (57) found that regular physical activity is an effective way to protect against cardiovascular disease, thereby reducing the risk of death from type 2 diabetes. A study by Fogelholm (58) found that good levels of physical activity reduced deaths from type 2 diabetes and cardiovascular disease. Physical activity plays an important role in improving insulin sensitivity. Regular physical activity helps the body use insulin more effectively. Insufficient physical activity worsens insulin resistance and leads to poor blood glucose control. High blood glucose levels are associated with an increased risk of diabetes-related complications and death (59). Regular physical activity is also important for weight management. Obesity is a major risk factor for type 2 diabetes and its complications. Physical inactivity can lead to weight gain or interfere with weight loss efforts. Obesity is associated with a higher risk of death, particularly from cardiovascular disease, in people with diabetes (60). Physical activity helps to prevent or delay diabetes-related complications such as retinopathy, neuropathy and nephropathy. These complications can have a significant impact on mortality. Inadequate physical activity can increase the risk of complications and reduce life expectancy (59).

The use of diabetes medications in the treatment and management of type 2 diabetes can have a significant impact on mortality. Well-managed diabetes can increase life expectancy by reducing the risk of premature death associated with uncontrolled diabetes and its complications. A study by Zheng et al (25) showed that some antidiabetic drugs have a beneficial effect on overall survival. This contributes to the reduction in years of life lost. Another study by Tzoulaki et al (61) found that a group of drugs used to treat type 2 diabetes significantly reduced deaths from the disease. Another study by Brown et al (62) found that the use of insulin and glucose-lowering drugs reduced deaths from type 2 diabetes.

A study by Rahelić et al (63) found that the use of an antidiabetic drug also reduced deaths from type 2 diabetes. Antidiabetic drugs are prescribed to improve blood sugar control in people with type 2 diabetes. Proper glycaemic control is essential to reduce the risk of diabetes-related complications such as cardiovascular disease, neuropathy, retinopathy and nephropathy (37). Effective glycaemic control through antidiabetic drug therapy can help delay or prevent these complications, reducing years lived with disability and risk of death.

Drug use and obesity both effect DALYs and mortality from type 2 diabetes, but obesity has a stronger impact. Medications (drug use) can help manage blood glucose and reduce complications like cardiovascular disease and neuropathy, thus lowering DALYs and mortality. However, inadequate use of these medications can worsen health outcomes by leaving blood glucose uncontrolled. Obesity, on the other hand, plays a major role in worsening diabetes by increasing insulin resistance, leading to higher blood sugar and a greater risk of severe complications. Excess body fat also promotes inflammation and metabolic stress, which compound health issues in diabetes, thereby driving up both DALYs and mortality. Managing obesity through lifestyle changes and interventions is therefore essential for improving outcomes in type 2 diabetes.

This study is limited to OECD countries only. The results should be evaluated according to the independent and dependent variables used in this study. It may be possible to reach different results with different variables. Many other factors that may affect mortality such as age, sex, treatment, time of diagnosis, etc. were not included in the evaluation. This study was conducted based on data covering the years 2010-2015. Taking these limitations into account in new future studies may increase the scope of the studies and the generalizability of the results.

In conclusion; lifestyle factors and medication use have a significant impact on diabetes-related DALYs and deaths. Obesity, physical inactivity, tobacco use,

alcohol consumption and non-use of antidiabetic medications can lead to the development and progression of diabetes and its complications. Addressing these risk factors through public health measures and individual lifestyle changes, as well as the use of proven medications, is essential to reduce the burden of DALYs and deaths from diabetes and to improve the overall health of the population.

In addition, type 2 diabetes is a heterogeneous disease with multiple underlying pathophysiological processes. Treatment should be individualised according to the degree of hyperglycaemia, hyperinsulinaemia or insulin deficiency. In addition, several factors such as efficacy, safety, affordability and ease of administration should be considered when prescribing a particular therapeutic agent.

Implications for healthcare managers

Healthcare managers play a crucial role in managing type 2 diabetes and reducing the disability adjusted life years (DALYs) and mortality associated with the disease. Some suggestions for healthcare managers are listed below:

- Establish and support multidisciplinary care teams that include endocrinologists, primary care physicians, dietitians, nurses and pharmacists to provide comprehensive care for people with type 2 diabetes.
- Implement patient education programmes that focus on the importance of lifestyle factors, including diet, exercise and stress management. Encourage self-monitoring of blood glucose levels and compliance with medication.
- Develop and promote lifestyle modification programmes that provide guidance on diet, physical activity and weight management. These programmes should be tailored to individual patient needs and preferences.
- Work with community organisations to promote physical activity. Support initiatives that make it easier for individuals to exercise regularly, such as walking groups or fitness classes.
- Provide dietary advice that emphasises balanced, nutritious meals. Increase

consumption of fruits, vegetables and whole grains, while encouraging patients to reduce their intake of sugary and processed foods.

- Ensure that healthcare providers have access to the most up-to-date information on antidiabetic medications and their effectiveness in the management of type 2 diabetes. Promote evidence-based prescribing and monitor patient response to medication.
- Implement a system for regular monitoring of patient progress. This includes monitoring blood glucose levels, weight, blood pressure and other relevant health markers. Adjust treatment plans as needed based on monitoring results.
- Explore the use of telemedicine and remote monitoring tools to provide ongoing care and support to patients, especially those who face barriers to face-to-face visits.
- Recognise the impact of mental health on diabetes management. Integrate mental health services and provide resources for patients dealing with stress, anxiety and depression.
- Promote regular health checks and screenings to identify people at risk of developing type 2 diabetes. Implement preventive measures for high-risk populations.
- Continuously monitor and evaluate the quality of diabetes care. Implement quality improvement initiatives to improve patient outcomes and reduce complications.
- Emphasise a patient-centred approach by involving patients in their own care plans and treatment decisions. Understand cultural, social and economic factors that may affect patients' ability to manage their condition effectively.
- Use data analysis tools to monitor outcomes, identify trends and make data-driven decisions to improve care and reduce DALYs and mortality.
- Work with government agencies, public health organisations and community partners to create a supportive environment for diabetes management, including access to healthy food and safe spaces for physical activity.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. WHO. (2023a). Noncommunicable diseases. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. (Accessed: May 2023).
2. Liu M, Liu S, Wang LJ, Bai YM, Zeng XY, Guo HB, et al. Burden of diabetes, hyperglycaemia in China from to 2016: findings from the 1990 to 2016, global burden of disease study. *Diabetes & Metabolism*, 2019; 45(3): 286-93.
3. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. *Lancet*, 1997; 349(9064): 1498-504.
4. Hay SI, Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 2017; 390(10100): 1260-344.
5. OECD. (2023). Health at a Glance 2023: OECD Indicators, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/7a7afb35-en>.
6. Ng R, Sutradhar R, Yao Z, Wodchis WP, Rosella LC. Smoking, drinking, diet and physical activity—modifiable lifestyle risk factors and their associations with age to first chronic disease. *International Journal of Epidemiology*, 2020; 49(1): 113-30.
7. Munshi M, Nathan D, Schmader KE, Mulder JE. Treatment of type 2 diabetes mellitus in the older patient. UpToDate. Nathan D, Schmader KE, Mulder JE, Eds. Waltham, MA, UpToDate Inc. 2019.
8. Knott C, Bell S, Britton A. Alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of more than 1.9 million individuals from 38 observational studies. *Diabetes Care*, 2015; 38(9): 1804-12.
9. Wannamethee SG, Shaper AG, Perry IJ, Alberti KGMM. Alcohol consumption and the incidence of type II diabetes. *J Epidemiol Commun Health*, 2002; 56(7): 542-8.
10. Carlsson S, Hammar N, Grill V. Alcohol consumption and type 2 diabetes: meta-analysis of epidemiological studies indicates a U-shaped relationship. *Diabetologia*, 2005; 48: 1051-1054.
11. Baliunas DO, Taylor BJ, Irving H, Roerecke M, Patra J, Mohapatra S, et al. Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 2009; 32(11): 2123-32.
12. Ahmed AT, Karter AJ, Warton EM, Doan JU, Weisner CM. The relationship between alcohol consumption and glycemic control among patients with diabetes: the Kaiser Permanente Northern California Diabetes Registry. *J Gen Int Med*, 2008; 23: 275-82.
13. Gao R, Zhan M, Ke S, Wu K, He G, Qi L, et al. Potential risk factors for mild cognitive impairment among patients with type 2 diabetes experiencing hypoglycemia. *Diabet Res Clin Pract*, 2024; 207: 111036.
14. Willi C, Bodenmann P, Ghali WA, Faris PD, Cornuz J. Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 2007; 298(22): 2654-64.

15. Maddatu J, Anderson-Baucum E, Evans-Molina C. Smoking and the risk of type 2 diabetes. *Translation Res*, 2017; 184: 101-7.
16. Yeh HC, Duncan BB, Schmidt MI, Wang NY, Brancati FL. Smoking, smoking cessation, and risk for type 2 diabetes mellitus: a cohort study. *Ann Int Med*, 2010; 152(1): 10-7.
17. Chang SA. Smoking and type 2 diabetes mellitus. *Diabet Metabol J*, 2012; 36(6): 399-403.
18. Spijkerman AM, van der ADL, Nilsson PM, Ardanaz E, Gavrila D, Wareham NJ, et al. Smoking and long-term risk of type 2 diabetes: the EPIC-InterAct study in European populations. *Diabetes Care*, 2014; 37(12): 3164-71.
19. Artese A, Stamford BA, Moffatt RJ. Cigarette smoking: an accessory to the development of insulin resistance. *Am J Life Med*, 2019; 13(6): 602-5.
20. Cho SH, Jeong SH, Shin J, Park S, Jang SI. Short-term smoking increases the risk of insulin resistance. *Scientific Reports*, 2022; 12(1): 3550.
21. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2003; 46: 3-19.
22. Lemieux S. Contribution of visceral obesity to the insulin resistance syndrome. *Can J Appl Physiol*, 2001; 26(3): 273-90.
23. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *Jama*, 2003; 289(1): 76-9.
24. Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, et al. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized?. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2011; 96(6): 1654-63.
25. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Rev Endocrinol*, 2018; 14(2): 88-98.
26. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Comprehensive Physiology*, 2012; 2(2): 1143.
27. Duclos M, Oppert JM, Verges B, Coliche V, Gautier JF, Guezennec Y, et al. Physical activity and type 2 diabetes. Recommendations of the SFD (Francophone Diabetes Society) diabetes and physical activity working group. *Diabet Metabol*, 2013; 39(3): 205-16.
28. Gill JM, Cooper AR. Physical activity and prevention of type 2 diabetes mellitus. *Sports Medicine*, 2008; 38: 807-24.
29. Kanaley JA, Colberg SR, Corcoran MH, Malin SK, Rodriguez NR, Crespo CJ, et al. Exercise/Physical Activity in Individuals with Type 2 Diabetes: A Consensus Statement from the American College of Sports Medicine. *Med Sci Sport Exerc*, 2022; 54(2): 353-68.
30. Kirwan JP, Sacks J, Nieuwoudt S. The essential role of exercise in the management of type 2 diabetes. *Cleveland Clin J Med*, 2017; 84(7 Suppl 1):15.
31. Wilmore JH, Costill DL, Kenney L. *Physiologie du sport et de l'exercice*. De Boeck Superieur, 2017.
32. Meuffels FM, Isenmann E, Strube M, Lesch A, Oberste M, Brinkmann C. Exercise Interventions Combined With Dietary Supplements in Type 2 Diabetes Mellitus Patients—A Systematic Review of Relevant Health Outcomes. *Front Nutr*, 2022; 9: 817724.
33. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*, 2009; 32(1): 193-203.
34. Chehade JM, Mooradian AD. A rational approach to drug therapy of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 2000; 60: 95-113.
35. Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 2016; 12(10): 566-92.

36. Krentz AJ, Patel MB, Bailey CJ. New drugs for type 2 diabetes mellitus: what is their place in therapy? *Drugs*, 2008; 68: 2131-62.
37. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabet Care*, 2015; 38(1): 140-9.
38. American Diabetes Association. 5. Lifestyle management: standards of medical care in diabetes-2019. *Diabet Care*, 2019a; 42(Suppl 1): 46-60.
39. Costanzo S, Di Castelnuovo A, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Alcohol consumption and mortality in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*, 2010; 55(13): 1339-47.
40. Fernandez-Sola J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption. *Nat Rev Cardiol*, 2015; 12(10): 576-87.
41. Chiva-Blanch G, Badimon L. Benefits and risks of moderate alcohol consumption on cardiovascular disease: current findings and controversies. *Nutrients*, 2019; 12(1): 108.
42. Piano MR. Alcohol's effects on the cardiovascular system. *Alcohol Research: Curr Rev*, 2017; 38(2): 219.
43. Diem P, Deplazes M, Fajfr R, Bearth A, Müller B, Christ ER, et al. Effects of alcohol consumption on mortality in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2003; 46: 1581-5.
44. Koppes LLJ, Dekker JM, Hendriks HFJ, Bouter LM, Heine RJ. Meta-analysis of the relationship between alcohol consumption and coronary heart disease and mortality in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 2006; 49: 648-52.
45. Blomster JI, Zoungas S, Chalmers J, Li Q, Chow CK, Woodward M, et al. The relationship between alcohol consumption and vascular complications and mortality in individuals with type 2 diabetes. *Diabet Care*, 2014; 37(5): 1353-9.
46. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2019. *Diabet Care*, 2019b; 42(Suppl 1): 124-38.
47. Targher G, Bertolini L, Chonchol M, Rodella S, Zoppini G, Lippi G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and retinopathy in type 1 diabetic patients. *Diabetologia*, 2010; 53: 1341-8.
48. Gregg EW, Cheng YJ, Saydah S, Cowie C, Garfield S, Geiss L, et al. Trends in death rates among US adults with and without diabetes between 1997 and 2006: findings from the National Health Interview Survey. *Diabet Care*, 2012; 35(6): 1252-7.
49. Huxley RR, Peters SA, Mishra GD, Woodward M. Risk of all-cause mortality and vascular events in women versus men with type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabet Endocrinol*, 2015; 3(3): 198-206.
50. Fagard RH, Nilsson PM. Smoking and diabetes—the double health hazard!. *Primary Care Diabetes*, 2009; 3(4): 205-9.
51. Qin R, Chen T, Lou Q, Yu D. Excess risk of mortality and cardiovascular events associated with smoking among patients with diabetes: meta-analysis of observational prospective studies. *Int J Cardiol*, 2013; 167(2): 342-50.
52. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *Obstetrical Gynecolog Survey*, 2002; 57(3): 162-4.
53. Abdullah A, Peeters A, de Courten M, Stoelwinder J. The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabet Res Clin Pract*, 2010; 89(3): 309-19.
54. Frydrych LM, Bian G, O'Lone DE, Ward PA, Delano MJ. Obesity and type 2 diabetes mellitus drive immune dysfunction, infection development, and sepsis mortality. *J Leukocyte Biology*, 2018; 104(3): 525-34.

55. Zoppini G, Verlato G, Leuzinger C, Zamboni C, Brun E, Bonora E, et al. Body mass index and the risk of mortality in type II diabetic patients from Verona. *Int J Obes*, 2003; 27(2): 281-5.
56. Wei M, Gibbons LW, Kampert JB, Nichaman MZ, Blair SN. Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes. *Ann Int Med*, 2000; 132(8): 605-11.
57. Bakrania K, Edwardson CL, Khunti K, Henson J, Stamatakis E, Hamer M, et al. Associations of objectively measured moderate-to-vigorous-intensity physical activity and sedentary time with all-cause mortality in a population of adults at high risk of type 2 diabetes mellitus. *Prevent Med Rep*, 2017; 5: 285-8.
58. Fogelholm M. Physical activity, fitness and fatness: relations to mortality, morbidity and disease risk factors. A systematic review. *Obes Rev*, 2010; 11(3): 202-21.
59. Boulé NG, Weisnagel SJ, Lakka TA, Tremblay A, Bergman RN, Rankinen T, et al. Effects of exercise training on glucose homeostasis: the HERITAGE Family Study. *Diabet Care*, 2005; 28(1): 108-14.
60. Williamson DF, Thompson TJ, Thun M, Flanders D, Pamuk E, Byers T. Intentional weight loss and mortality among overweight individuals with diabetes. *Diabet Care*, 2000; 23(10): 1499-504.
61. Tzoulaki I, Molokhia M, Curcin, Little MP, Millett CJ, Ng A, et al. Risk of cardiovascular disease and all cause mortality among patients with type 2 diabetes prescribed oral antidiabetes drugs: retrospective cohort study using UK general practice research database. *Bmj*, 2009; 339.
62. Brown JB, Nichols GA, Glauber HS, Bakst A. Ten-year follow-up of antidiabetic drug use, nonadherence, and mortality in a defined population with type 2 diabetes mellitus. *Clin Therapeut*, 1999; 21(6): 1045-57.
63. Rahelić D, Javor E, Lucijanić T, Skelin M. Effects of antidiabetic drugs on the incidence of macrovascular complications and mortality in type 2 diabetes mellitus: A new perspective on sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors. *Annal Med*, 2017; 49(1): 51-62.

Polikistik over sendromlu hastanın diyet tedavisi: Bir olgu sunumu

Diet therapy in a patient with polycystic ovary syndrome: A case report

Seniha ÇUKUROVALI SOYKURT¹ (ID)

ÖZET

Bu yazıda polikistik over sendromu tanısı ile izlenen olgunun, beslenme tedavisinin önemi ve uygulamasının tartışılması amaçlanmıştır. Hasta Üniversitenin Beslenme ve Diyetetik Polikliğine başvurmuştur. Kadın doğum uzmanı tarafından polikistik over sendromu tanısı almıştır. Var olan hastalığına yönelik tıbbi beslenme tedavisi uygulanmıştır. Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin metabolik bozukluklardan biri olup tanımlanması zor heterojen bir hastalıktır. PKOS hastalarında ağırlık kontrolü sağlanması hastalığın semptomlarının hafiflemesi ve komorbid hastalıkların riskini azaltmada büyük önem taşımaktadır. Her durumda, olguların diyetisyen kontrolünde düzenli vücut ağırlığı takibinin yapılması, diyete uyumunun kontrol edilmesi ve hastanın doktor kontrolleriyle birlikte biyokimyasal bulguların yapılarak kontrolünün sağlanması tercih edilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Polikistik over sendromu, diyet tedavisi, ağırlık yönetimi

ABSTRACT

In this article, it is aimed to discuss the importance and application of nutritional therapy in a case diagnosed with polycystic ovary syndrome. The patient applied to the University's Nutrition and Dietetics Clinic. She was diagnosed with polycystic ovary syndrome by her gynecologist. Medical nutrition therapy was applied for his existing disease. Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine metabolic disorders in women of reproductive age and is a heterogeneous disease that is difficult to define. Weight control in PCOS patients is of great importance in relieving the symptoms of the disease and reducing the risk of comorbid diseases. In all cases, it should be preferred to regularly monitor the body weight of the patients under the supervision of a dietician, check the compliance with the diet, and ensure the control of the patient by making biochemical findings together with the doctor's checks.

Key Words: Polycystic ovary syndrome, diet therapy, weight management

8. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresinde 'Polikistik Over Sendromlu Hastanın Diyet Tedavisi: Bir Olgu Sunumu' başlıklı sözel bildiri olarak sunulmuştur. Tam metin kitapçığında da yayınlanmıştır.

¹Bahçeşehir Kıbrıs Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Lefkoşa, KKTC



İletişim / Corresponding Author : Seniha ÇUKUROVALI SOYKURT
Bahçeşehir Kıbrıs Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Lefkoşa, KKTC
E-posta / E-mail : seniha.cukurovali@kstu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 07.11.2023
Kabul Tarihi / Accepted : 03.12.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.66909

Çukurovalı Soykurt S. Polikistik over sendromlu hastanın diyet tedavisi: Bir olgu sunumu. Türk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(4): 463 - 466

GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS) ilk olarak 1935 yılında tanımlanmıştır. Üreme çağındaki kadınlarda görülen, metabolik ve endokrin bozukluklara neden olabileceği belirtilen heterojen bir hastalıktır. PKOS patofizyolojisi bilinmeyen bir hastalıktır. Genetik ve çevresel faktörlerin etkisi olduğu görülmektedir, obezite, insülin direnci, hormonal faktörlerle birleşerek PKOS fizyolosine katkıda bulunmaktadır (1). İdeal vücut ağırlığını korumaya yardımcı olacak düşük kalorili, düşük yağlı ve düşük glisemik indeksli diyet; trans yağ, doymuş yağ, beyaz şeker ve rafine un tüketimini azaltmak gibi diğer bazı beslenme stratejileri de PKOS ile ilişkili anomalileri (luteinize edici hormon, folikül uyarıcı hormon, testosteron vb.) iyileştirmeye yardımcı olmaktadır (2).

OLGU SUNUMU

Yirmi iki yaşında bekar kadın hasta insülin direnci nedeniyle endokrin uzmanı tarafından diyetle yönlendirildi. Özgeçmişinde bilinen bir hastalığı, düzenli kullandığı ilaç yoktur. Hasta Üniversitenin Beslenme ve Diyetetik Polikliniği'ne başvurmuştur. Kadın doğum uzmanı tarafından polikistik over sendromu tanısı almıştır. HOMA- IR değeri 5.2, insülin açlık 22 mL, TSH 4.24 mL, vitamin B12 191 mL, D vitamini 13,7 ng/mL prolaktin değeri 30,80 ng/mL değerlerindedir. Fiziksel muayenesinde vücut ağırlığı 60,35 kg, boy uzunluğu 150 cm olarak ölçülmüştür. Öz geçmişinde haşimato hastalığı olduğu bilinmekteydi. Ayrıca endokrin uzmanı boğaz muayenesinde haşimato başlangıç örneği olduğunu bildirmiştir. Bu olguda, hastanın genel beslenme durumu değerlendirilerek yaşına, cinsiyetine ve fiziksel aktivite düzeyine uygun enerji ihtiyacı göz önünde bulundurulmuş ve özellikle posa, demir, folat, B12 vitamini yönünden ihtiyacını karşılayacak bir beslenme düzeni oluşturulmuştur. İnsülin direncini tedavi etmeye yönelik olarak bir beslenme düzeni planlanmıştır. Hasta beslenmesinin yanında egzersiz yapmaya da başlamıştır. Altı aylık beslenme tedavisinden sonra tekrardan biyokimyasal bulgularını yaptırdığı zaman prolaktin seviyesinin 30,80 ng/mL'den 18-96 ng/mL'ye düşmüştür. 25-OH vitamin D değeri 13,7'den 35,8 ng/mL'ye

yükselmiştir. HOMA- IR değeri 2,5 mL'ye düşmüştür. Hastadan alınan veriye göre gece yemek ataklarının olmadığını söylemiştir. Hasta bu tıbbi beslenme tedavisi ile devam ettiği sürece herhangi bir durum ile karşı karşıya gelmemiştir. Tekrardan endokrin muayeneye gittiği zaman tiroit örneğinin düzeldiği görülmüştür. Hastanın izlem süresince vücut ağırlığı (kg), boy uzunluğu (cm), ilgili bazı biyokimyasal bulguları değerlendirilmesi Tablo 1'de verilmiştir.

TARTIŞMA

PKOS (Polikistik Over Sendrom)'un beslenme tedavileri ile ilgili yapılan çalışmalarda en çok araştırılan diyet modellerinden biri de Akdeniz diyetidir. Bir çalışmada aşırı kilolu PKOS'lu hastalarda düşük karbonhidratlı Akdeniz diyet tedavisi düşük yağlı diyet tedavisi ile karşılaştırılmıştır. Düşük karbonhidratlı Akdeniz diyetinin adet döngüsünü önemli ölçüde düzelttiği, antropometrik parametreleri iyileştirdiği ve bozulmuş endokrin seviyelerini düzelttiği ve genel etkinliğinin önemli ölçüde daha iyi olduğu bildirilmiştir. Aşırı kilolu PKOS'lu hastaların klinik tedavisinde düşük karbonhidratlı Akdeniz diyet modelinin kullanılması önerilmiştir (3).

Başka bir çalışmada ise metabolik olarak sağlıklı ve sağlıklı obez PKOS'lu hastalar karşılaştırılmıştır. PKOS'u olan metabolik olarak sağlıklı obezlerin sağlıklılarla aynı enerji alımına rağmen daha düşük miktarda; kompleks karbonhidrat, lif, doymamış yağ asiti, MUFA, n-3 PUFA aldığı ve daha yüksek miktarda; basit karbonhidrat, toplam yağ, SFA, PUFA ve n-6 PUFA görülmüştür. Metabolik olarak sağlıklı obezlerin daha düşük Akdeniz Diyetine bağlılık gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca bu bireylerin daha yüksek visseral adiposite indeksi ve yağlı karaciğer indeksleri olduğunu, C reaktif protein, testosteron, insülin ve HOMA-IR gibi metabolik parametrelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (4).

Bu olguda, diyetten önce basit karbonhidrat ağırlıklı beslenmekteydi. Hastanın genel beslenme durumu değerlendirilerek yaşına, cinsiyetine ve fiziksel aktivite düzeyine uygun enerji ihtiyacı göz önünde bulundurulmuş ve özellikle posa, demir, folat, B12 vitamini yönünden ihtiyacını karşılayacak bir beslenme düzeni oluşturulmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. İzlem süresince hastanın vücut ağırlığı, boy uzunluğu, ilgili bazı biyokimyasal bulgular ve planlanan diyet programının örneği ile izlem süresince besin tüketim kayıtlarının değerlendirilmesi

Değişkenler	Normal Aralık	Tanı	3.ay	6.ay
Antropometrik ölçümler				
Vücut ağırlığı (kg)	-	60,35	55,2	50
Boy uzunluğu (cm)	-	150	150	150
Biyokimyasal bulgular				
Açlık kan şekeri (Glukoz) (mg/dL)	74-109	98	88	88
HOMA- IR	<2.5	5.2	4.6	2.5
Prolaktin (ng/mL)	5.18-26.53	30.80	18.96	12
Hba1c(mg/dL)	< %5.7	5.5	4.8	3.5
Vitamin B ₁₂ (pg/mL)	201-1046	191	226	445
25 Hidroksi vitamin D (µg/L)	30-100	13.7	35.8	55
TSH (mIU/mL)	0.77-5.64	4.24	3.24	2.5
Serbest T4 (ng/dL)	0.65-1.06	0.95	0.86	0.70
Enerji ve besin öğeleri				
Enerji (kcal/gün)	1500	1800	1617	1498
Karbonhidrat (enerji %)	50	48	53	57
Protein (enerji %)	15	14	17	15
Yağ (enerji %)	35	38	30	28

Enerji ve besin öğeleri başlığı altında normal aralık başlığı altında belirtilen enerji ve besin öğeleri olgu için planlanan diyetin örneğini göstermektedir. Diğerleri hastanın diyet öncesi (tanı sırasında) ve izlem süresince üç günlük besin tüketim kayıtlarının değerlendirmesidir. Olgunun üç ay izlemindeki enerji ve besin öğeleri değerleri sağlıklı beslenmeye geçişinde alınan üçer günlük besin tüketim kayıtlarının ortalamasıdır.

Çin'de aşırı kilolu polikistik over sendromu (PKOS) hastalarında düşük karbonhidratlı bir diyet modeliyle birlikte bir Akdeniz diyetinin terapötik etkisini belirlemek 72 kişi ile yapılan bir çalışmanın sonucunda düşük karbonhidratlı ve Akdeniz diyeti kombinasyonunu aşırı kilolu PKOS hastaları için iyi bir tedavi olduğunu, adet döngüsünü önemli ölçüde düzelttiğini, antropometrik parametrelerini iyileştirdiğini ve bozulmuş endokrin seviyelerini düzelttiğini ve genel etkinliğinin önemli ölçüde daha iyi olduğunu göstermiştir (5).

PKOS tanısı alan 14 fazla kilolu kadın, 12 hafta boyunca fitoekstraktlar (KEMEPHY) içeren ketojenik Akdeniz diyetine tabi tutulduğunda 12 hafta sonra, antropometrik ve vücut kompozisyonu ölçümleri, vücut ağırlığında (- 9,43 kg), VKİ (- 3,35), yağ vücut kütlesi, yağsız vücut kütlesi, visseral yağ dokusu (8,29 kg) ve yağ dokusunda, önemli bir azalma olduğunu ortaya koydu. Yağsız vücut kütlesinde önemli, hafif bir azalma oldu. HOMA-IR'de önemli bir iyileşme ile birlikte glikoz ve insülin kan seviyelerinde önemli bir düşüş gözlemlendi. HDL düzeylerinde artışla birlikte

trigliseritler, toplam kolesterol ve LDL'de önemli bir düşüş gözlemlendi (6). PKOS'lu kadınlarda diyet müdahalesi ile ilgili çalışmaların çoğunda diyet kompozisyonundan ziyade enerji kısıtlamasına odaklanılmıştır. İnsülin direncini iyileştirmek üzere tasarlanmış diyet modifikasyonlarının tek başına enerji kısıtlamasını içeren diyet modifikasyonlarından daha fazla fayda sağladığı düşünülmektedir. PKOS'lu genç erişkinlerin yaşam kalitesini araştıran sistematik bir derlemede göre vücut ağırlığı ve beden kütle indeksi (BKİ) değerlerinin normal sınırlara getirilmesi ile yaşam kalitesinde de olumlu yönde düzelmeye görülmüştür. 2019 yılında İran'da Shishehgar ve arkadaşları tarafından, yirmi dört hafta boyunca PKOS'u olan kadınlarda ve PKOS'lu olmayan kadınlarda hipokalorik düşük glisemik indeks diyetinin antropometrik değişkenler ve insülin direnci üzerindeki etkilerini karşılaştırmayı ve bu diyetin PKOS'lu kadınların klinik ve hormonal özelliklerine etkisini araştırmayı amaçlayan bir vaka-kontrol çalışması yapılmıştır. Diyet içeriği karbonhidrattan gelen enerji toplam enerjinin %50'si, proteinden gelen enerji toplam enerjinin %20'si ve yağdan gelen enerji

toplam enerjinin %30'u olacak şekilde hazırlanmıştır. GI değeri yüksek gıda maddelerinin bir listesi hazırlanmış ve tüm katılımcıların yüksek GI gıdaları tüketmelerinin yasaklandığı bir diyet uygulanmıştır. Bir diyetisyen tarafından tüm katılımcılara yiyecek alışverişi listesi hazırlanmış ve yeme davranışı eğitimi verilmiştir. Bu çalışma sonucunda, enerji kısıtlı bir düşük glisemik indeksli diyetinin, PKOS'lu ve PKOS'suz aşırı kilolu kadınların antropometrik ve metabolik özellikleri üzerinde benzer faydalı etkilere sahip olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca, polikistik over sendromuna sahip olan kadınlarda, bu diyetin uygulanmasından altı ay sonra hem menstrual siklusun düzene girdiği hem de hiperandrojenizmin klinik ve biyokimyasal özellikleri düzeldiği bildirilmiştir. Ek olarak yapılan bu çalışma sonucunda bulunan bulgular, PKOS'lu

kadınların metabolik sorunlar veya bu bozukluğa eşlik eden duygusal yeme sorunları nedeniyle vücut ağırlığı kaybında güçlüklerle karşılaşabileceğini bildiren çalışmaların bulgularıyla çelişmektedir. PKOS'lu obez kadınların, PKOS'lu olmayanlara kıyasla vücut ağırlığı kaybında daha fazla zorluk yaşadıkları varsayılmış olsa da PKOS'lu kadınları bu diyetle uymaktan caydıran bir hipotez olduğu sonucuna ulaşılmıştır (7). Bu olguda vücut ağırlığı kaybı ile açlık kan şekeri ve HOMO-IR'de benzer iyileşmeye sahip olduğunu bulunmuştur

Sonuç olarak, polikistik over sendromlu hastanın diyet tedavisinin diyetisyen kontrolünde sıkı bir şekilde izlenmesi diyetle uyumun artırılmasını sağlayarak üç ay gibi kısa bir sürede klinik bulguların düzelmesi sağlanabilmektedir.

TEŞEKKÜR

Hastanın tedavisinde desteğini esirgemeyen Uzm. Dr. Emine Çelen'e teşekkür ederim.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu olgu sunumu için Kıbrıs Sağlık ve Toplum Bilimleri Üniversitesi'nden 15.03.2021 tarihinde KSTU/2021/0100 sayılı etik kurul onayı ve 18.03.2021 tarihinde hastadan Bilgilendirilmiş Onam Formu alınmıştır

KAYNAKLAR

1. Brakta S, Lizneva D, Mykhalchenko K, Imam A, Walker W, Diamond MP, et al. Perspectives on polycystic ovary syndrome: is polycystic ovary syndrome research underfunded? *J Clin Endocrinol Metab*, 2017; 102(12): 4421-7.
2. Tripathi S, Singh M, Jain M. Nutritional perspective of polycystic ovarian syndrome: A review study. *Curr Med Res Pract*, 2020; 10 (2), 65-9.
3. Barrea L, Arnone A, Annunziata G. Adherence to the Mediterranean Diet, Dietary Patterns and Body Composition in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Nutrients*, 2019; 11(10): 22-78.
4. Barrea L, Muscogiuri G, Pugliese G, de Alteriis G, Colao A, Savastano S. Metabolically Healthy Obesity (MHO) vs. Metabolically Unhealthy Obesity (MUO) Phenotypes in PCOS: Association with Endocrine-Metabolic Profile, Adherence to the Mediterranean Diet and Body Composition. *Nutrients*, 2021; 13 (11):3925.
5. Mei S, Ding J, Wang K, Ni Z, Yu J. Mediterranean Diet Combined With a Low-Carbohydrate Dietary Pattern in the Treatment of Overweight Polycystic Ovary Syndrome Patients. *Front Nutr*, 2022; 4 (9): 1-12.
6. Paoli A, Mancin L, Giacona MC, Bianco A, Caprio M. Effects of a ketogenic diet in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Transl Med*, 2020; 18(1): 104.
7. Shishehgar F, Mirmiran P, Rahmati M, Tohidi M, Ramezani Tehrani F. Does a restricted energy low glycemic index diet have a different effect on overweight women with or without polycystic ovary syndrome? *BMC Endocr Disord*, 2019; 19(1): 93.

Aşının önemi ve aşı tereddütü sorunu

Importance of vaccine and vaccine hesitancy problem

Asuman TEZEL KAHRAMAN¹ (ID), Şeyma Aliye KARA¹ (ID)

ÖZET

Halk sağlığının en önemli bileşenleri; temiz su, sanitasyon ve aşı ile önlenbilir hastalıklara karşı bağışıklamanın sağlanmasıdır. Aşılama programları, aşıyla önlenbilir hastalıkların ve bu hastalıklara bağlı gerçekleşen ölümlerin önlenmesi açısından en önemli ve en maliyet etkili toplum sağlığı müdahalelerinden biridir. Ülkemizde 2008 yılında yayınlanan genelge ile son halini alan programda amaçlanan süreç 'Bağışıklama hizmetlerinde temel amaç; toplumda, özellikle bebek ve çocuklarda aşı ile korunulabilir hastalıkların ortaya çıkışını engellemek, dolayısıyla bu hastalıklardan kaynaklanan ölümlerin ve sakatlıkların önüne geçmektir ve temel hedef aşısız çocuk bırakmamak' şeklindedir. Ulaşılabilir aşı hizmetlerine rağmen, aşılamanın reddedilmesi veya kabul edilmesinde gecikme ise aşı reddi olarak tanımlanmıştır. Zamanla giderek arttığı bilinen aşı reddi, Dünya Sağlık Örgütü'ne göre küresel düzeyde önemli bir tehdittir, en önemli halk sağlığı sorunları arasında yer almaktadır. İletişim ve medya araçları ile ilgili nedenler, birey ve grup etkileri, aşı ve aşılama ile ilgili etkiler aşı kabulünü etkileyen en önemli başlıklardır. Bu yüzden nedenleri saptamak

ABSTRACT

The most important components of public health are the clean water, sanitation and immunization against preventable diseases through vaccination. Vaccination programs are one of the most important and cost effective intervention prevention that elimination of infectious diseases, reducing the morbidity and mortality of diseases, and the development of a healthy society. The aim of this programs, which took its final form published in 2008 in our country, that is 'The main purpose of immunization services is to prevent the emergence of preventable diseases in the society, especially infants and children, and therefore to prevent deaths and disabilities caused by these diseases, and the main goal is not to leave unvaccinated children'. Rejection or delay in accepting vaccines despite accessible vaccination services is defined as vaccine refusal. Vaccine hesitations and refusals, which are known to increase gradually over time that are an important threat at the global level according to the World Health Organization and are among the most important public health problems. Reasons related to communication and media tools, individual and group effects, vaccine and vaccination effects are the most

¹Pursaklar İlçe Sağlık Müdürlüğü, Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Şeyma Aliye KARA
Gökay Sokak, Saray Fatih Mahallesi, No: 1, Pursaklar, Ankara - Türkiye
E-posta / E-mail : s.aliye.turkmen@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 31.01.2023
Kabul Tarihi / Accepted : 27.12.2023

DOI ID : 10.5505/TurkJHijyen.2024.64624

Tezel Kahraman A, Kara ŞA. Aşının önemi ve aşı tereddütü sorunu. Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(4): 467 - 476

ve nedene yönelik planlar yapmak oldukça önemlidir. Günümüzde halk sağlığının ve sağlık sunucularının öncelikli hedeflerinden biri sağlık okuryazarlığının artırılması ve sağlık iletişiminin iyileştirilmesi olarak görülmektedir. Yapılacak yasal düzenlemeler aşılama ve toplum bağışıklığına katkıda olumlu artışlara neden olacak olsa da asıl hedef doğru iletişim yöntemleri ile halkın sağlık okuryazarlığının artırılması ve öz sorumluluğunun geliştirilmesi olmalıdır. Böylece bu derlemede aşının önemi ve aşı reddi ile nedenleri, bu durumun etkileri ile ilgili sonuçların gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aşılama, aşının önemi, aşı tereddütü, aşı reddi

important topics that affect vaccine acceptance. In this regard, it is very important to determine the causes and to make plans for the cause. Today, one of the primary goals of public health and health providers is seen as increasing health literacy and improving health communication. Although the legal regulations to be made will lead to positive increases, the main goal should be to increase the health literacy of the people and to develop their self-responsibility through correct communication methods. Thus, in this review, it was aimed to review the results about vaccine refusal, causes of vaccine refusal and effects of this condition.

Key Words: Vaccination, importance of vaccine, vaccine hesitancy, vaccine refusal

GİRİŞ

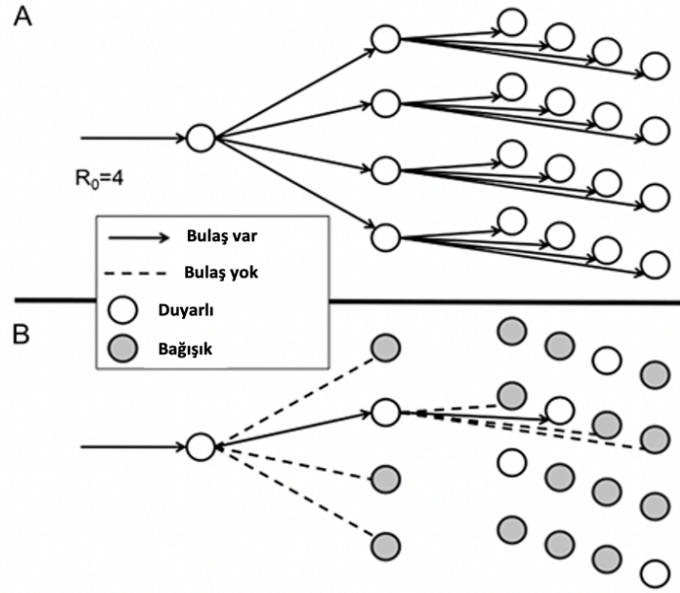
Halk sağlığı kavramı, Winslow tarafından 1923'de "organize edilmiş toplum çalışmaları sonunda çevre sağlık koşullarını düzelterek, bireylere sağlık bilgisi vererek, bulaşıcı hastalıkları önleyerek, hastalıkların erken tanı ve tedavisini sağlayarak, sağlık örgütleri kurarak, toplumsal çalışmaları her bireyin sağlığını sürdüreceği bir yaşam düzeyini sağlayacak biçimde geliştirerek hastalıklardan korunmayı, yaşamın uzatılmasını, beden ve ruh sağlığı ile çalışma gücünün artırılmasını sağlayan bir bilim ve sanat" olarak tanımlanmıştır. Organize toplum çalışmalarıyla bireyin ve toplumun sağlıklı bir yaşam sürmesini sağlamayı amaçlayan bir bilim olarak halk sağlığının en önemli sorunlarından biri bulaşıcı hastalıklardır (1). Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, dünya üzerinde insan sağlığına en çok katkısı olan iki uygulamadan biri aşılar diğeri ise suyun dezenfeksiyonudur (2). Aşılama; zayıflatılmış virüs ya da bakterilerin ya da bunların antijenik parçalarının vücuda verilerek yapay bağışıklık elde edilmesidir (3). Aşı hem bireyin bağışıklanmasını sağlarken hem de aşılınmamış

kişilerin, aşılanan kişiler sayesinde, hastalık etkeni ile temaslarının azalması sonucu, toplumda o hastalığın görülme sıklığının azalmasını sağlar. Böylece toplum bağışıklanması gerçekleşmiş olur (4). Dolayısı ile bağışıklama hizmetleri ve aşılama programları, aşıyla önlenemez hastalıkların ve bu hastalıklara bağlı gerçekleşen ölümlerin önlenmesi açısından en önemli ve en maliyet etkili toplum sağlığı müdahalelerinden biridir (5).

Toplumsal bağışıklıktaki önemli bir terim olan "temel çoğalma/üreme sayısı" (R_0), tamamen duyarlı bir topluma giren bulaşıcı hastalığa sahip bir bireyin bulaştırıcılık dönemi boyunca meydana getireceği yeni bulaşıcı bireylerin sayısını ifade etmektedir.

Örneğin; $R_0 = 4$ olan bir hastalık için, tamamen duyarlı bir topluma giren bulaşıcı bir birey 4 yeni bireye hastalığı bulaştıracaktır. Toplumun $(R_0 - 1) / R_0$ hesabındaki kısmı (bu örnek için $(4 - 1) / 4 = 3 / 4 = 0.75$) bağışık ise bu hastalığın zaman içindeki insidansı sabit kalacaktır.

Toplumsal bağışıklık eşiği olarak bilinen bu oranın üzerine çıktığında ise hastalığın insidansı azalacaktır (4, 6) (Şekil 1).



Şekil 1. Toplumsal Bağışıklama (4)

Toplumsal bağışıklık düzeyine ulaşmak için temel çoğalma katsayısı yanında etkili ve kapsayıcı aşılarda kullanımda olması gerekmektedir. Aşı etkinliği; ideal koşullar altında aşı olanların aşısızlara göre bahsi geçen hastalık insidansındaki azalma yüzdesidir. Aşı etkililiği ise aşının gerçek hayattaki etkisini gösteren durumdur ki aşının temini, depolanması, taşınması ile son kullanıcıya uygulanana kadar geçen sürenin tamamını oluşturmaktadır. Mevcut hiçbir aşı mükemmel etkinliğe ve etkililiğe sahip değildir. Toplumda elde ettiğiniz aşılama düzeyleri ile bağışıklık düzeyleri aynı değildir. Aşı kapsayıcılığı toplumda aşılanların yüzdesidir, direk bağışıklık durumunu vermez (7). Ulaşılabilir aşı hizmetlerine rağmen, aşıların reddedilmesi veya kabul edilmesinde gecikme ise aşı reddi olarak tanımlanmıştır (8).

Aşı ve aşıyla önlenebilir hastalıkların zaman içindeki değişimine en iyi örneklerden biri kızamık hastalığıdır. Günümüzde birçok hekim aşı varlığı ve yaygın kullanılıyor olması nedeniyle kızamık olgusu görmemektedir. Kızamık aşısı bulunmadan

önce özellikle Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde neredeyse herkes kızamık hastalığını geçirmekteydi ve her yıl hastaların yüzlercesi kızamıktan hayatını kaybetmekteydi. Ancak ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin (CDC) açıklamasına göre ülke genelinde 2019 başından bu yana görülen toplam kızamık vakaları 626'yı bulmuş ve son 25 yılın en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Vaka artışının sorumlusu aşı tereddütleri olarak gösterilirken, bu süreçte kızamıkla mücadele için zorunlu aşı şartı getirildiği bildirmiştir. Japonya'da ise 1974 yılında çocukların %80'ine boğmaca aşısı uygulanmakta iken aynı yıl bütün ülkede sadece 393 boğmaca olgusu bildirilmiş, boğmaca ilişkili ölüm kayıtlara geçmemiştir. Daha sonra aşılanan kişi sayısı oldukça azalmış ve aşılama hızı %10'a kadar düşmüştür. Böylece 1979 yılında 13.000'den fazla kişi boğmacaya yakalanmış, bunların 41'i ölmüştür. Rutin aşılamaya dönüldüğünde ise hastalık sayılarının yeniden düştüğü rapor edilmiştir (9).

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin (ECDC) kızamık vaka sayılarını paylaşmış, bu hastaların çok büyük bir bölümünün aşısız olduğunu ortaya koymuştur. Sadece Avrupa'dan 1 Mart 2017 ve 28 Şubat 2018 arasında 14813 kızamık vakası bildirilmiştir. Kızamık vakaları en fazla Romanya (1709 hasta), Yunanistan (1463 hasta), Fransa (1346 hasta) ve İtalya'da (411 hasta) görülmektedir. Aşı durumu bilinen vakalar incelendiğinde bunların %86'sı aşısız olarak tespit edilmiştir (10).

Türkiye'de kızamık vakalarında artış görülmektedir; 2016 yılında 9 kızamık vakası görülürken, 2018 raporunda kızamık vakalarının 36'sı yabancı olmak üzere toplamda 84'e yükseldiği, 2020 yılında ise 316 yerli vaka, 301 yabancı vaka olduğu bildirilmiştir (11).

Ülkemizde 2011 yılında 183 aile çocuklarına aşı yapılmasını istemezken, 2017 yılında bu sayı 23650'e yükselmiştir. Aşı olmak istememe ve tereddüt yaşama durumu ülkemizde altı yılda 130 kat artmıştır. Aşılama hızımız 1993 yılında %77 iken 2015 yılında arzu edilen seviyelere; %97'ye ulaşmış ancak bu hız 2017 yılında %95'e gerilemiştir ve istenilen sınır değerde kalmış olup tehlike çanları çalmaya başlamıştır (12).

Asgari olarak sunulması gereken temel sağlık hizmetleri olarak düşünüldüğünde bağışıklama hizmetleri; yılda yaklaşık 3 milyon ölümü önlediği tahmin edilmektedir (13). Bu yönüyle de en maliyet etkin sağlık yatırımlarından biri olarak kabul edilebilir (14).

Ülkemizde Genişletilmiş Bağışıklama Programı (GBP)

Çıkarılan genelge ile 2008 yılında son halini alan program ile amaçlanan süreç 'Bağışıklama hizmetlerinde temel amaç; toplumda, özellikle bebek ve çocuklarda aşı ile korunulabilir hastalıkların ortaya çıkışını engellemek, dolayısıyla bu hastalıklardan kaynaklanan ölümlerin ve sakatlıkların önüne geçmektir ve temel hedefin aşısız çocuk bırakmamak olduğu unutulmamalıdır.' şeklindedir (15).

Bu kapsamda GBP ile boğmaca, difteri, tetanos,

kızamık, kızamıkçık, kabakulak, tüberküloz, çocuk felci, suçiçeği, hepatit A, hepatit B ile Streptococcus pneumoniae ve Haemophilus influenzae tip b'ye bağlı invaziv hastalıkları ve bunlara bağlı ölümleri azaltarak bu hastalıkları kontrol altına almak ve hatta tamamen ortadan kaldırmak amacıyla hassas yaş gruplarına enfeksiyona yakalanmalarından önce ulaşım ve bağışıklanmalarını sağlamak için yapılan aşılama hizmetlerini içerir. Genişletilmiş Bağışıklama Programı'nın yürütülmesi, hastalık kontrol programının hedeflerine yönelik olarak aşılama, hastalıkların izlemi, aşı ve aşı uygulamaları için gereken malzemenin temini gibi temel bileşenleri içermektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından programın hedef stratejileri belirlenmekte, lojistik ihtiyaçlar temin edilmekte ve İl Sağlık Müdürlüklerine dağıtım yapılmaktadır. İl düzeyinde hizmetler, İl Sağlık Müdürünün başkanlığında, içerisinde il ve ilçe aşı sorumluları ile soğuk zincir sorumluları, hekim ve hekim dışı sağlık personelinin yer aldığı bir ekip anlayışıyla yürütülmektedir. Bu kapsamda; aşılama planlarının hazırlanması, izlenmesi ve değerlendirilmesi, aşılama hizmetlerinde görevli personelin ve toplumun eğitimine yönelik çalışmalarının yürütülmesi, aşı ve enjektör ihtiyaçlarının belirlenmesi, stok ve soğuk zincirin takibi sağlanmaktadır (16).

Bu çalışmalar, program kapsamındaki tüm hastalıkların azalmasını sağlamış olsa da en önemli çıktılardan birisi çocuk felci (poliomiyelit) eradikasyonudur. Türkiye'de son çocuk felci vakası Kasım 1998 yılında görülmüştür ve DSÖ 2002 yılında ülkemizin polio hastalığından arındırıldığını duyurmuş, Avrupa Bölgesi Polio'dan Arındırılmış Bölge Sertifikası ile belgelendirilmiştir (17).

Ulusal aşılamanın hedeflerinin başında ise şunlar gelmektedir; her bir antijen için etkinliği korunmuş aşı ile ülke genelinde %95 aşılama hızına ulaşmak ve devamlılığını sağlamak, 12-23 aylık bebeklerin %90'ını tam aşıli hale getirmek, 5 yaş altı (0-59 aylık) aşısız ya da eksik aşıli çocukları tespit edip aşılama, okul çağı çocuklarının rapel aşılarını tamamlamak, ülkenin poliomiyelitten arındırılmış durumunu

sürdürmek, maternal ve neonatal tetanozu elimine etmek, aşı güvenliğini sürdürmek, kayıt bildirim sistemini güçlendirmek, Toplumun katılımını sağlamak şeklindedir (16).

Diğer yandan ülkemizde böylesine köklü bir aşı tarihi ve oldukça güçlü kurgulanmış ve bugüne kadar oldukça başarılı bir şekilde uygulanmış bir bağışıklama politikası varken son yıllarda bulaşıcı hastalıklarla mücadelede buzdağının görünmeyen kısmını oluşturan aşı redlerinin gittikçe artmasından korkulmaktadır.

Ulusal aşı takvimine yeni bir aşının eklenebilmesi için ise ilgili aşının DSÖ'nün yayınladığı bazı kriterleri sağlaması gerekmektedir (Şekil 2) (18).

Bu aşı ile ilgili şu sorular olumlu yanıtlanmalıdır:

1. Söz konusu hastalık bir halk sağlığı sorunu mu?

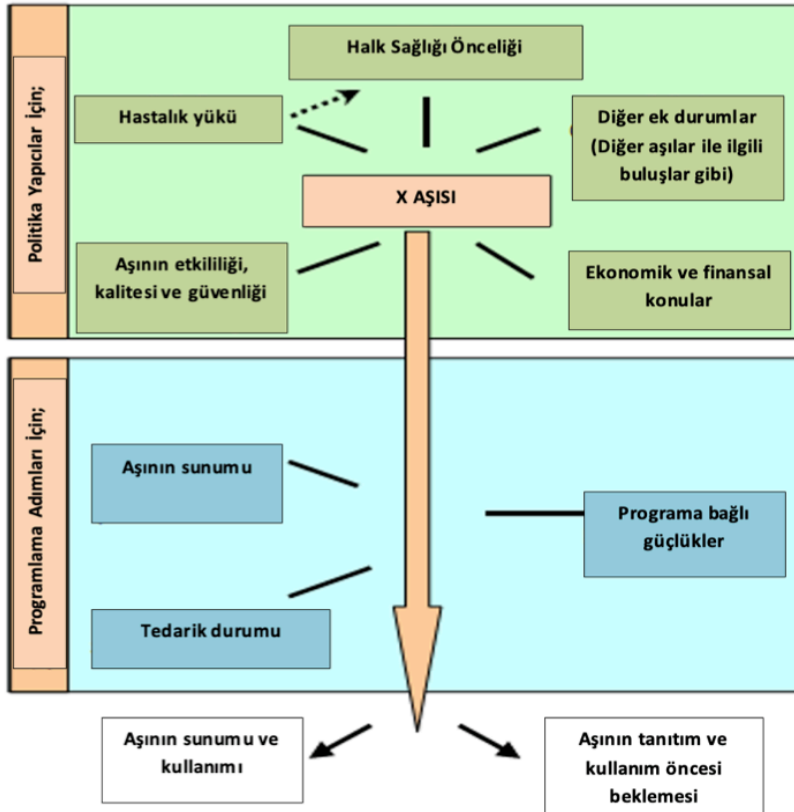
2. Koruma için etkili ve güvenilir olduğu kanıtlanmış bir aşı var mı?

3. Hastalığın kontrolünü sağlayabilecek daha maliyet-etkin bir yöntem var mı?

4. Aşılama ülkede maliyet-etkin mi? Sonuçları öngörülebilir mi?

5. Ülkenin ulusal aşı programı yeterince güçlü mü?

Ülke bir aşı ile aşılansmaya başladıktan sonra aşı temini ve finansmanı açısından sürdürülebilir olması oldukça önemlidir (18). Ülkelere ait ulusal aşı takvimi uygulamalarının temel amacı; doğan her bebeğin aşı takvimine uygun olarak yukarıda sayılan on hastalığa karşı bağışıklanması ve tam aşıli olmasıdır. Bu uygulamanın ülke genelinde her yerde eşit olarak yapılması gerekmektedir (15).



Şekil 2. Ulusal Aşı Takvimine Yeni Bir Aşının Eklene Şeması (18)

Aşı Tereddütü ve Reddi Kavramı

Edward Jenner'in aşığı keşfini takiben 1800'lü yılların başlarında yaygın aşılama başlamış, 1840-1853 yılları arasındaki aşılama ile ölüm ve sakatlıkların azalması üzerine İngiltere'de aşılama zorunlu hale getirilmiştir. Hemen akabinde ise Londra'da kurulan Anti-Aşı Derneği (Anti-Vaccination League) aşı karşıtlarının çekirdeğini oluşturmuştur. Aşı zorunluluğunun 14 yaşına genişletilmesiyle ise aşı karşıtları kişisel hak ve özgürlüklerin ihlal edildiğini öne sürerek Zorunlu Aşı Karşıtları Derneği'ni (Anti-Compulsory Vaccination League) kurmuşlardır. Aşı karşıtlarının 1870-1880'li yıllarda çıkardığı kitaplar, broşürler, dergiler aşılama oranlarında küçümsenmeyecek düzeyde azalmalara neden olmuştur. Örneğin Stokholm'de 1872 yılı aşılama hızı %40 civarında kalmıştır. Fakat iki yıl sonra şehirde ortaya çıkan büyük bir salgın, aşılamamın

yeniden yaygınlaştırılmasını sağlamıştır. Ancak bu aşı karşıtı çalışmalar son bulamamış ve sonunda 1898 yılında İngiltere yasalarında "vicdani ret" kavramı olarak kendine yer bulabilmiştir. Günümüzde de aşı karşıtlarının ortaya koyduğu gerekçelerin 19. yüzyıldakiler ile büyük oranda benzediği görülmektedir (19). Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü aşı reddini global sağlık açısından en büyük 10 tehdit arasında saymaktadır (20).

Aşı hizmetlerinin var olması ve erişilebilir olmasına rağmen aşıların kabul edilmesinde veya reddedilmesinde gecikme olması ile kişi, yer zaman ve aşılar göre değişkenlik gösteren bir durum olarak karşımıza çıkan aşı tereddütü süreç olarak da değerlendirilebilir (8). Bu süreçte en uç noktalar tam red ve tam kabul noktalarıdır. Arada kalan herkes aslında tereddüt ediyor / temkinli yaklaşıyor şeklinde düşünülebilir (Şekil 3).



Şekil 3. Aşı Kabul Süreci (20)

Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü tarafından oluşturulan Aşı Eylem Planı içinde bahsedilen aşılar ile ilgili red/tereddüt durumu küresel düzeyde oldukça büyük tehdit olarak görülmektedir (21).

DSÖ ise aşı kabulünü etkileyen faktörleri 3 gruba ayırmaktadır;

1. Bağlamsal Etkiler (İletişim ve medya araçları, toplum üzerinde etkili kişiler, aşı karşıtı/destekleyicisi lobiler, sosyodemografik özellikler, politikalar/yasalar, coğrafi engeller gibi)

2. Birey ve Grup Etkileri (Geçmiş aşı uygulamaları ile ilgili tecrübeler, sağlık ve önleyici uygulamalara ilişkin inanç ve yaklaşımlar, bilgi ve/veya farkındalık, sağlık sistemi ve sağlayıcılara güven, kişisel deneyimler gibi.)

3. Aşı ve Aşılamaya Ait Etkiler (Bilimsel kanıtlara dayalı riskler/yararlar, uygulama şekli, aşılama takviminin güncel durumu, sağlık çalışanlarının rolü, maliyet gibi.) (22).

Bu faktörlere bağlı olarak aşılama yüzdeleri ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Afganistan, Pakistan, Nijerya, Hindistan'da aşılama oranları %70-80'ler civarında iken, Avrupa ve Amerika'da genel olarak %90'ın üzerindedir (23).

İletişim ve medya araçları, aşı karşıtlarının kendilerini öne çıkarmaları için önemli bir kaynaktır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde, erişkinlerinin %55'inin sağlık hakkındaki bilgilerini internet üzerinden edindiği belirtilmiştir. 2001 yılında, arama motorları üzerinden yapılan bir araştırmada, 7 arama motorunda ilk 10 sonuç incelenmiş ve bu sitelerin %43'ünün aşı karşıtı siteler olduğu saptanmıştır (24).

Nüfus ve Sağlık Araştırması 2013 verilerine göre hiçbir aşı yaptırmamış olma durumu 13-26 aylık çocuklarda 2008'de 20 bin dolayında (%1.6) iken 2013'te 37 binlere (%2.9) çıkmıştır. Hiç aşılanmamış olma, yoksul ve eğitimsiz gruplar gibi dezavantajlı gruplarda ise daha çok artış göstermektedir (25). Ayrıca annenin eğitim seviyesi yükseldikçe aşılama hızının arttığı da başka bir araştırmayla gösterilmiştir (26).

Ülkemizde 2020 ve 2021 yıllarında ayrı ayrı yayınlanan makalelere göre özellikle çocukluk aşıları ile ilgili tutumun en önemli belirleyicisinin ebeveyn (yalnızca anne değil) olduğu belirtilmiştir. Ebeveynlerin tercihlerini ise psikolojik süreçler, aşıya güvenmeme, toplumsal roller ve bazı politik nedenler etkileyebilmektedir. (27, 28).

2015'de Ordu'da yaşayan bir savcının ikiz bebeklerine aşı yaptırmaması üzerine aile sağlık ve sosyal il müdürlüğü çocuklar için sağlık önlemi davası açtı. İkizlerin babası bireysel hak ihlali ve onam alınma zorunluluğu getirilmesi isteği ile karşı dava açtı ve bu davayı kazandı. Gazetelerde ve sosyal medyada 'İkiz bebeklerine aşı yaptırmayan savcının hukuk zaferi' olarak yansıtılan bu durum, aşı karşıtı grup hareketlerini ve söylemlerini artırmıştır (23). Bu olayla birlikte aşı redleri daha da artmaya başlamış olup, sosyoekonomik düzeyi yüksek bir grup ailede de aşı redleri gözlemlenmektedir.

Tıp fakültesi öğrencilerinde yapılan bir çalışmaya

göre tıp fakültesi öğrencilerinin aşı tereddütü olan bireylerle iletişim için kendilerini yeterli düzeyde hazır hissetmedikleri tespit edilmiştir (29). Klinik hekimlerinde yapılan bir çalışmaya göre de benzer bulgular elde edilmiştir (30). Hekim ve hekim adaylarının bilgi eksikliklerinin ve aşı ile ilgili endişelerinin giderilmesi ile aşıya yönelik savunuculuk misyonlarını yerine getirebilmeleri için mezuniyet öncesi ve sonrası aşilar ile ilgili düzenli ve yapılandırılmış eğitimlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Aşı reddi nedenleri

Ülkemiz dışında yapılan çeşitli çalışmalar incelendiğinde aşı redlerinin en önemli nedenleri şu şekilde sıralanabilir:

1. Aşılar civa, alüminyum, eter, antibiyotik ve birçok kimyasal içerir ve bunlar otizm ve benzeri hastalıklara neden olur
2. Aşı üreten firmalar çok büyük gelirler elde ettiği için art niyetli bir 'Pazar' olabilir
3. Aşılama yerine hastalık geçirilerek daha iyi bağışıklık sağlanır
4. Tamamlayıcı ve alternatif tıp daha etkin ve yan etkisi daha azdır
5. Çocukların bağışıklık sistemi daha tam gelişmemiştir ve aşılar bağışıklık sistemine zarar verir
6. Aşıların etkinliğine ve güvenilirliğine inanmama
7. Aşıların yan etkilerinin olabileceğine inanma
8. Bazı 'dini, felsefi etkinlik kazanmış kişilerin aşıların zararlı olduğunu anlatması (23).

2018 yılında yapılan Ulusal Aşı Çalıştay'ında ise ülkemizde aşı redlerinin başlıca nedenleri olarak; aşı içeriğine güvenmeme, yan etkilerinden korkma, dini sebepler, yurtdışı kökenli aile mensubu olma, medyada yer alan olumsuz haberler sıralanmıştır (31).

İstanbul'da 0-24 ay bebeğin ebeveynlerinin aşı redlerini inceleyen 2018 yılında yapılmış bir çalışmada katılımcıların yarısına yakını aşıların içerisinde zararlı maddeler olduğuna inandıklarını ifade etmiştir bunu dini inançlar (%22.8), Aşının yararlı/gerekli olduğuna inanmama (22.8), aşıların başka hastalıklara neden

olduğuna inanma (%20.7) ve aşıların ilaç firmaları tarafından maddi amaçlı üretildiğini düşünme (%14.1) takip etmektedir (32).

Yıllık canlı doğum sayısı ortalama 2900 olan Erzincan ilinde birinci basamak sağlık hizmeti sağlayıcılarından alınan sözel verilere göre 2016, 2017 yılı ve 2018 ilk 6 ayında toplam çocukluk çağı aşı reddi sayısı 39 olduğu belirtilmiştir. Bunlardan 17'si hiç aşılanmamış çocuklarken, 22 çocuk eksik aşıdır. Yapılan incelemede en sık reddedilen aşılar karma (Difteri, Boğmaca, Tetanoz, Polio, Hemofilus influenza B), konjuge pnömokok ve oral polio aşıları iken en sık reddetme nedeninin ebeveynlerin aşıların içerisinde zararlı maddeler olduğunu düşünmeleri şeklindedir.

Dünyada da birçok örnek mevcuttur; Avustralya'da 2017'de yapılan bir diğer çalışmada ise aşı reddi nedenleri, aşı yan etkisinden korkma (%35,9), aşı etkinliğinden şüphelenme (%35,9) ve ilaç endüstrisine güvensizlik (%23,1) olarak sıralanmıştır (33).

Hindistan'da eksik aşı ya da aşısız çocukların aşılanmama nedenlerinin başında aşı hakkında bilgi eksikliği (%52,4) ve aşıların yan etkileri (%28,8) geldiği bildirilmiştir (34).

Chan ve arkadaşlarının Malezya'da yaptıkları dört yıllık değerlendirmeleri sonucunda ise dini inançları nedeniyle çocukluk çağı aşılarının çocuklarına yapılmasını reddeden annelerin sıklığının 2013 yılında %78 iken 2015 yılında %67'ye düştüğü belirtilmiştir (35).

Birçok çalışmanın sonucunda bildirildiği gibi aşıların içerisinde bulunan cıva ve benzeri maddelerin otizme yol açtığı inancı da aşı reddinin önde gelen gerekçelerinden biri ve ilk kez ortaya atılışı, 1998 yılında Dr. Andrew Wakefield'in bir İngiliz tıp dergisinde bir makale yayınlarak kızamık-kızamıkçık-kabakulak aşısının otizme yol açtığını öne sürmesi ile gerçekleşmiştir. İlerleyen dönemde İngiltere'deki hakemli akademik tıp dergilerinden birinde yayınlanan karşı makalelerle Wakefield'in çalışmasının kurgusunun doğru olmadığı ve gerçekleri yansıtmadığı ortaya konulmuş ve doktor meslekten ihraç edilmiştir (36). Yine de Amerika hükümeti 2001'de, T.C. Sağlık Bakanlığı ise 2009 yılında

aşılanma oranlarının düşmesini önlemek amacı ile cıvasız aşıya geçildiğini bildirmiştir (15).

Avrupa'da yapılan bir çalışmaya göre aşı tereddütü yalnızca Avrupa bölgesine özel bir durum değildir şeklinde belirtilmiştir. Bu makaleye göre de aşı tereddütü, sağlık riskleriyle ilgili yanlış algılamalardan ve kişilerin politik görüşler, din, felsefe gibi temellere dayandırdıkları dünya görüşleri ile ilgili olarak ortaya çıkmaktadır (37).

Yayınlanan bir görüş yazısına göre COVID-19 pandemisi ve daha önceki pandemiler de aşı tereddütü üzerinde çeşitli yönlerde etki etmiş olabilirler. Bu süreçte çocukluk çağı aşılarına erişebilirlik durumları, maliyet etkinlikleri gibi başlıklar da göz ardı edilmemelidir denilmiştir (38).

Ülkemizde Aşı Reddi ve Hukuki Süreç

Zorunlu aşı uygulaması konusunda ülkemizde gerçekleşen bireysel Anayasa Mahkemesi başvurusu sonucunda Mahkeme; Anayasa'nın 17. Maddesi ile güvence altına alınan maddi ve manevi varlığın korunması ve geliştirilmesi hakkını ihlal ettiğine hükmetmiştir (39). Bu karar sonrası zorunlu aşılanmanın reddedilmesiyle sağlık tedbiri kararı alınması ve uygulanabilmesi için sürecin Aile ve Sosyal Politikalar İl Müdürlüğüne iletilmesi gerekmektedir. Aşı uygulamasına izin verilmemesi, aşılanmanın reddi halinde, izlem ve aşı durumunu gösteren aşı reddi belgelerinin doldurulup, ilgililere teslim edilmesi yeterli bulunmuştur (40). Ülkemizde süreç halen yetkili kurumlarca bu şekilde yürütülmeye devam etmektedir.

SONUÇ

Bahsedildiği üzere aşı gibi toplumun sağlığını korumak adına vazgeçilmez uygulamalar için politika sunucuları tarafından düzenlemeler yapılsa da tereddütler ve redler başarıyı engelleyebilmektedir. Aşı redlerinin halk sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturduğu göz ardı edilemez ve her sorunun çözülebilmesi için nedenlerinin ortaya konulması gerektiği gerçeği aşı redleri konusunda da geçerlidir. Geçmişte dini inanç kökenli nedenlerin yerini günümüzde medya araçlarının yanlış kullanımı sonucu orta çıkan bilgi kirliliği almıştır. Aşılanma sürecindeki

kararlar için dışsal öneri ve tavsiyelerin daha çok dikkate alındığı düşünüldüğünde, özellikle çocukluk çağı aşı uygulamasını yapan birinci basamak sağlık personelinin doğru ve uygun şekilde bilgilendirilmesi ile bu bilgiyi ebeveynlere sunabilmesi basamakları oldukça önemlidir (41). Tabii ki hekim hasta iletişimi kadar medya araçları ile sağlanan kitle iletişimi de bu konuda vazgeçilmez ve en önemli anahtarlardan olacaktır. Aşıların kullanıma girdiği yıllardan bu yana farklı gerekçelerle aşılama olgusunu karalanmakta; raslantısal nedenlerle açıklanacak bulgulara

dayanarak aşıları zararlı ilan edildiği görülmektedir. Günümüzde halk sağlığının ve sağlık sunucularının başlıca sorunlarının çözümü bu konuda da olduğu gibi doğru basamakların izlenerek sağlık okuryazarlığının artırılması ve sağlık iletişiminin iyileştirilmesi olarak görülmektedir. Yapılacak yasal düzenlemeler her ne kadar aşılama sıklığında olumlu artışlara neden olsa da asıl hedef doğru iletişim yöntemleri ile halkın sağlık okuryazarlığının artırılması ve öz sorumluluğunun geliştirilmesi olmalıdır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Halk Sağlığı Temel Bilgiler. Güler Ç, Akın L, Ankara Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Genişletilmiş II. Baskı, Ankara, 2012
2. Türk Tabipleri Birliği, Aşı Kütüphanesi, İnternet: http://www.ttb.org.tr/kutuphane/asi_rehberi.pdf, Erişim: 12.01.2023.
3. Kutlu R. Çocukluk Çağı Aşıları Childhood Vaccinations. Türkiye Klinikleri J Fam Med Special Topics, 2017; 8(5): 311-8.
4. "Herd Immunity": A Rough Guide Paul Fine Ken Eames David L. Heymann Clinical Infectious diseases, 2011;52(7):911-6.
5. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Aşının Yararları, İnternet: <https://asi.saglik.gov.tr/genel-bilgiler/27-ashinin-yararları.html>, Erişim: 03.01.2023.
6. Kutlu HH, Altındış M. Aşı Karşıtlığı FLORA 2018; 23(2): 47-58.
7. Hekimoğlu C, Aşı epidemiyolojisi: Aşı ve aşılamanın etkileri için epidemiyolojik ölçütler, https://jag.journalagent.com/turkhijyen/pdfs/THDBD_73_1_55_70.pdf, Erişim: 18.11.2023
8. World Health Organization SAGE meeting of October 2014 vaccine, İnternet: https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/october/SAGE_working_group_revised_report_vaccine_hesitancy.pdf?ua=1, Erişim: 07.01.2023
9. Centers for Disease Control and Prevention, What if stop, İnternet: <https://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/whatifstop.htm/>, Erişim: 03.01.2023.
10. European Centers for Disease Control and Prevention, Measles - Annual Epidemiological Report for 2018, İnternet: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/measles-annual-epidemiological-report-2018#:~:text=İn%202018%2C%2017%20822%20cases,measles%20cases%20during%20the%20year>, Erişim: 07.01.2023.
11. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, Kızamık, İnternet: <https://www.klimik.org.tr/2018/04/24/turkiyede-3-ayda-55-kizamik-vakasi/> Erişim: 06.01.2023.
12. Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2020, <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/43399,siy2020-tur-26052022pdf.pdf?0>, Erişim: 07.01.2023.
13. Güçlü S. Arslan S. Çocuklarda Aşı Uygulamaları: Güncel Bir Gözden Geçirme, Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2018; 8(1): 34-43.
14. World Health Organization, Immunization, [İnternet] <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/immunization>
15. T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Genişletilmiş Bağışıklama Programı, İnternet: <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/1117,gbp genelge2008pdf.pdf?0>

16. Genişletilmiş Bağışıklama Programı ve COVID-19, Internet: <https://covid19asi.saglik.gov.tr/TR-77803/genisletilmis-bagisiklama-programi-gbp.html>, Erişim: 06.01.2023.
17. WHO, UNICEF, World Bank. State of the World's Vaccines And Immunization, 3rd Ed. Geneva, World Health Organization, 2009.
18. Vaccine Introduction Guidelines, Adding a vaccine to national immunization programme; decision and implementation, Geneva, WHO: 2005
19. Hussain A, Ali S, Ahmed M, et al. (July 03, 2018) The Anti-vaccination Movement: A Regression in Modern Medicine . Cureus 10(7): e2919. DOI 10.7759/cureus.2919
20. World Health Organization, Ten Threats to Global Health in 2019, Internet: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>, Erişim: 06.01.2023.
21. World Health Organization SAGE meeting immunization, Internet: <https://www.who.int/groups/strategic-advisory-group-of-experts-on-immunization/covid-19-materials>, Erişim: 09.01.2023
22. Dubé E, Gagnon D, Ouakki M, Bettinger JA, Witteman HO, MacDonald S, et al. Canadian Immunization Research Network. Measuring vaccine acceptance among Canadian parents: A survey of the Canadian Immunization Research Network. Vaccine, 2018 Jan 25;36(4):545-52.
23. Bozkurt HB. Aşı Reddi Genel Bir Bakış ve Literatürün Gözden Geçirilmesi. Kafkas Tıp Bil Derg, 2018; 8(1): 71-6.
24. Argüt N, Yetim A, Gökçay G. Aşı Kabulünü Etkileyen Faktörler. Çocuk Dergisi, 2016; 16(1): 16-24.
25. Türk Tabipleri Birliği, Aşı Konusunda Yaşanan Tereddütler, Aşı Reddi ve Aşı Karşıtlığı Konusunda Etik Kurul Görüşü, Internet: http://www.ttb.org.tr/makale_goster.php?Guid=c21adfbce1c4-11e8-b159-336a7b2d6c99, Erişim: 10.01.2023.
26. Adisa OP, Akinleye CA, Obafisile CI, Oke OS. Childhood immunization perception and uptake among mothers of under-five children attending in Osogbo, South Westera, Nigeria. Research Journal of Health Science, 2016, 4(3): 186.
27. Aygün E, Tortop HS. Ebeveynlerin Aşı Tereddüt Düzeylerinin ve Karşıtlık Nedenlerinin İncelenmesi. Güncel Pediatri, 2020; 18(3): 300-16.
28. Tanrıku Y, Tanrıku G. Aşı Tereddütü ve Ebeveynlerin Tutumları, Balıkesir Health Sciences Journal / BAUN Health Sci J, <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.777829>, Erişim: 19.01.2023.
29. Çağlar M, Tıpta Uzmanlık Tezi, Üç Tıp Fakültesi Son Sınıf Öğrencilerinin Aşı Karşıtlığıyla İlgili Farkındalıklarının Değerlendirilmesi, 2021.
30. Yılmaz Akar S, Zeren Öztürk G. Hekimlerin aşı ve aşı karşıtlığı hakkında bilgi, tutum ve davranışlarının değerlendirilmesi. FLORA 2020; 25 (4): 516-26.
31. Ulusal Aşı Çalışmayı Sonuç Raporu, 2018, Ankara.
32. Hazır E. 0-24 Aylık bebek/çocukların ebeveynlerinin aşı red sıklığı ve nedenleri, YLT İstanbul, 2018.
33. Sandhofer MJ, Robak O, Frank H, Kulning J. "Vaccine hecintancy in Austria: A cross-sectional survey", Wiener Klinische Wocherschn, 2017, 129(1-2): 59-64.
34. Kumar D, Aggarwal A, Gomber S. "Immunization status of children admittet to a tertiary-care hospital of North India: reasons for partial immunization or non- immunization", Journal Population Nutrition, 2010, 28(3): 300-304.
35. Chan HK, Soelar SA, Md Ali SM, Ahmad F, Abu Hassan MR. "Trends in Vaccination Refusal in Children Under 2 years of age in Kedah, Molaysio:A4-year Review from 2013 to2016", Asia Pac Journal Public Health, 2017.
36. Türkiye'de aşı karşıtlığı artıyor, Internet: <https://www.dw.com/tr/turkiyede-asi-karsitligi-artiyor/a-43363918>, Erişim: 19.01.2023.
37. Florian S, Charlie C, Benjamin AL, Jason R. The politics of vaccine hesitancy in Europe, European Journal of Public Health, Volume 32, Issue 4, August 2022, Pages 636-642
38. Truong J, Bakshi S, Wasim A, Ahmad M, Majid U. What factors promote vaccine hesitancy or acceptance during pandemics? A systematic review and thematic analysis. Health Promot Int, 2022 Feb 17; 37(1): daab105.
39. Aysal M. T.C.Anayasa Mahkemesi. Halime Sare Aysal Başvurusu Genel Kurul Kararı. Resmi Gazete (Internet). 2015. s. 19. Erişim adresi: <http://www.kararlaryeni.anayasa.gov.tr/BireyselKarar/Content/3153eea8-45d4-405d-904e-278df6360d37?wordsOnly=False>.
40. İzlem/Aşı Durumu Bilgilendirme Onay Formu, Internet: http://www.batmanhsm.gov.tr/upload/formlar/EK-7_izlem-asi_durumu_bilgilendirme_onam_formu.pdf, Erişim: 16.01.2023
41. Baran A, Nur F, Orhon E, Topbaş M. Aşı İletişimi. Mart 2022.

Gizemli bakteri lejyonella: Büyük silah cephanesine sahip bir ordu mu?

Mysterious bacteria legionella: An army with a big arms armory?

Gönül ASLAN¹ (ID)

ÖZET

Lejyonella cinsi bakteriler ilk olarak 1976 yılında Philadelphia'da düzenlenen Amerikan Lejyonu kongresi sırasında, (Bellevue-Stratford Hotel'dekalanlar arasında) görülen büyük bir şiddetli pnömoni salgını sonrasında Dr. Joseph McDade tarafından izole edilmiştir. lejyonellalar, insanlarda kendiliğinden iyileşen ateşli hastalık (Pontiac ateşi) ve ölümcül pnömoniye (Lejyoner hastalığı) neden olabilen çevresel Gram-negatif bakterilerdir. *Legionella pneumophila* toplum ve hastane kökenli pnömoninin önemli bir nedenidir. lejyonella ile kontamine olmuş aerosollerin solunması ile alveolar makrofajlar veya epitel hücreleri tarafından basiller fagosite edilir. Lejyoner hastalığı, alveolar makrofajlar içine alınan basilin Dot/Icm genleri tarafından kodlanan Tip 4 Sekresyon Sistemi sayesinde fagolizozomal füzyonu önleyerek, lejyonella içeren vakuol oluşturması bu vakuol içinde konak immün mekanizmalarından kaçarak çoğalmasından kaynaklanır. Lejyonella türü bakterilerinin genomunun en ilgi çekici yönü, amiplerdeki parazitliği sırasında gen transferi yoluyla kazandığı, çoğu ökaryotik kökene sahip olan motiflerdir. Lejyonellalar horizontal gen transferi ile kazandıkları bu motifler sayesinde çevresel faktörlere

ABSTRACT

The bacterium of the genus Legionella were first detected during the American Legion convention held in Philadelphia in 1976, following a large outbreak of severe pneumonia (among residents of the Bellevue-Stratford Hotel) isolated by Dr. Joseph McDade. Legionella is an environmental Gram-negative bacterium that can cause spontaneously healing febrile illnesses (Pontiac fever) and fatal pneumonia (Legionnaires' disease) in humans. *Legionella pneumophila* is an important cause of community- and hospital-acquired pneumonia. It is phagocytosed within alveolar macrophages or epithelial cells by inhalation of aerosols contaminated with Legionella. Legionnaires' disease is caused by the bacilli engulfed in alveolar macrophages forming a vacuole containing Legionella by preventing phagolysosomal fusion, thanks to the Type 4 Secretion System encoded by the Dot/Icm genes, and its proliferation within this vacuole by escaping the host immune mechanisms. The most interesting aspect of the Legionella bacterium's genome is the motifs, most of which are of eukaryotic origin, that it acquired through gene transfer during its parasitism in amoebae. Thanks to the motifs obtained by horizontal

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Mersin, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Gönül ASLAN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Çiftlikköy, Mersin - Türkiye
E-posta / E-mail : drgaslan@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 12.12.2023
Kabul Tarihi / Accepted : 18.04.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2024.04864

Aslan G. Gizemli bakteri lejyonella: Büyük silah cephanesine sahip bir ordu mu? Turk Hij Den Biyol Derg, 2024; 81(4): 477 - 492

ve konak immünesine karşı direncini artıracak inanılmaz sayıda virülans faktörüne başka bir deyişle adeta “büyük silah cephanesine sahip bir ordu”ya sahip olmuşlardır. Ayrıca bu ökaryotik motifler bakterilere; olağanüstü adaptasyon stratejileri geliştirme kapasitesi kazandırır. Biyofilm ve amip içinde hayatta kalmaları, onları yoğun dezenfeksiyon uygulamalarından koruyarak, çevresel faktörlere karşı dirençlerinin artışına da neden olur. Lejyonellaların, bulaşıcı faz ve enfektif olmayan replikatif faz olmak üzere bifazik yaşam döngüsü; fizyolojik, morfojenetik ve metabolik değişim yeteneklerini de ortaya koymaktadır. Amip ve makrofajlar içindeki enfeksiyon döngüsü benzerliği çevresel amiplerin adeta bir “eğitici” görevi yaptığını düşündürmektedir. Bu derlemede, lejyonellanın amipleri ve makrofajları enfekte etme yetenekleri, virülans/hayatta kalma stratejileri, enfeksiyon mekanizmaları, konak immünesi ve lejyonella immünopatogenezine ait güncel bilgilerin gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Lejyonella, *Legionella pneumophila*, virülans faktörü, immünopatogenez

gene transfer, Legionella bacteria have an incredible number of virulence factors that will increase their resistance to environmental factors and host immunity, that is, “an army with a huge arsenal”. Moreover, these eukaryotic motifs also apply to bacteria; Provides the capacity to develop exceptional adaptation strategies. Their survival in biofilms and amoebae protects them from intensive disinfection practices and increases their resistance to environmental factors. The two-phase life cycle of Legionella includes the infectious phase and the non-infective replicative phase; It also reveals physiological, morphogenetic and metabolic change abilities. Amoebae and macrophages suggests that environmental amoebae act as an “educator” the similarity of the infection cycle between. It is aimed to review current information on the abilities of Legionella to infect amoebae and macrophages, virulence/survival strategies, infection mechanisms, host immunity and Legionella immunopathogenesis.

Key Words: Legionella, *Legionella pneumophila*, virulence factor, immunopathogenesis

GİRİŞ

Lejyonella cinsi bakteriler ilk kez 1976 yılında Philadelphia’da, Amerika’nın bağımsızlık yıldönümü kutlamaları sırasında, Amerikan Lejyonerleri arasında oluşan atipik pnömoni salgınından izole edildi. Temmuz 1976’da, Philadelphia Pensilvanya’da Amerikan Lejyonu kongresinde, Bellevue-Stratford Hotel’de kalanlar arasında ciddi bir solunum yolu hastalığı salgını meydana geldi. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) hastalık kontrol ve önleme merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC), salgının nedenini belirlemek için kapsamlı bir epidemiyolojik ve mikrobiyolojik araştırma yürüttü. Aylar süren yoğun araştırmaların ardından (6 ay sonra),

CDC mikrobiyoloğu Dr. Joseph McDade tarafından otopsi yapılan akciğer dokusundan, salgının kaynağı Gram-negatif organizma izole edildi (1-3). Toplamda 34 ölümün gerçekleştiği ve 200’den fazla kişinin etkilendiği bu gizemli pnömoniye, Lejyoner toplantısı sırasında olduğu için Lejyoner hastalığı (LH), izole edilen Gram negatif bakteriye; pnömoni oluşturduğu ve salgın Philadelphia’da Amerikan Lejyonerleri’nde ortaya çıktığı için *Legionella pneumophila* adı verilmiştir (4). 1977’de Lejyonella’nın keşfi ve ardı ardına kültür ortamlarının geliştirilmesi, lejyonellanın çevresel örneklerden izolasyonu daha önce çözülmemiş solunum yolu hastalığı salgınlarının geriye dönük incelenmesine yol açmıştır. Bakteri kültürünün yapılabilmesi ve izolasyonu

pnömoni ile ilişkili diğer lejyonella türlerinin hızlı bir şekilde sınıflandırılmasını sağlamıştır (5). Salgın sonrası hayatta kalanlarda lejyonellaya karşı oluşan antikörlerin tespit edilmesiyle, solunum yolu enfeksiyonu salgınından sorumlu ajanının lejyonella olduğu kanıtlanmıştır. Lejyoner hastalığının nedeni kesin olarak belirlendikten sonra, bilim adamları 1976'dan önce meydana gelen sebebi belirlemediği benzer salgınların kaynağının lejyonella ile ilişkisini araştırmaya başladılar. CDC araştırmacıları, böylece Philadelphia ve Pontiac'ta görülen ateşli hastalık salgınlarının aynı organizmadan kaynaklandığını tespit ettiler. "Pontiac ateşi", ismini ilk vakanın görüldüğü Michigan'daki Pontiac şehrinde almıştır. Pontiac Sağlık Departmanında 1968 temmuz ayında [inkübasyon süresi 36 saat olan, yaklaşık 2-5 gün içinde geçen, ateş, baş ağrısı, miyalji, halsizlik ve hafif grip ile karakterize] bir salgın hastalık meydana gelmiş, sağlık departmanında görevli 100 kişiden 95'inin dahil olduğu toplamda 144 kişi etkilenmiştir. 32 Pontiac ateşi vakasından alınan serumlarda lejyonella antikörlerinin tespit edilmesiyle lejyonellanın; pnömoni yanı sıra Pontiac ateşine de neden olduğu ortaya konulmuştur (2,6).

Bundan sonra, diğer birçok lejyonella türü ardı ardına tanımlanmış ve artık tanımlanan türlerin neredeyse yarısının [72 tür, LPSN-List of Prokaryotic Names with Nomenclature, www.bacterio.net (12 Şubat 2024'de erişildi) temel alınmıştır] hastane kökenli veya toplum kökenli pnömoniden sorumlu ajanlar olduğu belirlenmiştir. *L. pneumophila* dünya çapında LH vakalarının %91.5'ine neden olarak ilk sırada yer alır ve serogrup 1 (LP sg1) en büyük oranı (%84) oluşturur. *Legionella bozemanæ*, *Legionella micdadei* ve *Legionella longbeachæ* ikinci en yaygın etiyolojik ajanlardır ve dünyadaki lejyonellozis vakalarının yalnızca %2-7'sini oluştururlar (7,8). *L. longbeachæ* dünya çapındaki vakaların yaklaşık %1'ini oluştururken, ilginç bir şekilde Avustralya ve Yeni Zelanda'daki vakaların %50-60'ını oluşturmaktadır. Ancak son 10 yılda *L. longbeachæ* enfeksiyonunun neden olduğu vakalar Avrupa'da da giderek artan

oranda rapor edilmektedir (9,10). *L. longbeachæ*, kapsüllü ve toprakta doğal olarak bulunan tek tür olması nedeniyle diğer lejyonellalardan ayrılır. *L. pneumophila* ve *L. longbeachæ* arasında insan hastalığının ciddiyeti açısından farklılıklar belgelenmemiş olsa da toprak metazoaları ile birlikte evrimleşmesinin bir sonucu olarak *L. longbeachæ* ile enfeksiyonun daha öldürücü olduğu düşünülmektedir (11).

Lejyonellalar büyük ölçüde çevresel patojenlerdir ve doğal yaşam alanları tatlı su rezervuarları, nemli toprak, saksı toprağı/kompost ve gübrelerdir. Ayrıca sıhhi tesisat sistemleri, klima üniteleri, küvetler ve duşlar gibi insan yapımı su sistemlerinde de bulunmaktadır (12). Duyarlı konağın lejyonella içeren aerosol halindeki suyu soluması veya aspire etmesiyle insanlarda solunum yolu hastalığına neden olur (13). Şu ana kadar yalnızca bir şüpheli vaka dışında insandan insana bulaş bildirilmemiştir (12). İnsandan insana bulaş vakasının bildirilmemesi, *L. pneumophila*'nın insanları enfekte etmeye tamamen adapte olmadığını göstermektedir (14). Hayvanların serumunda lejyonella antikörleri tespit edilmesine rağmen belgelenmiş hiçbir zoonotik bulaşma vakası bildirilmemiştir. Lejyonellanın çevresel kaynaklarına uzun süren maruziyet, insanlarda birkaç ay boyunca ve herhangi bir klinik semptomu neden olmadan 10 yıla kadar ölçülebilir seviyelerde kalabilen antikörlerin üretimini tetikler. Çalışmalar, sağlıklı popülasyonlarda lejyonella antikör düzeylerinin %1-45 arasında olduğunu göstermiştir (12,15).

Fakültatif hücre içi patojeni olan *L. pneumophila* toplum ve hastane kökenli pnömoninin önemli bir nedenidir. Enfeksiyon için belirlenen risk faktörleri; 50 yaşından büyük olma, erkek cinsiyet, kronik akciğer hastalığı, sigara ve alkol kullanımı, immün sistemi baskılayan herhangi bir hastalığın olması veya immüsupresyona neden olacak ilaç kullanılması (organ transplantasyonu, kortikosteroid ve benzeri ilaçların kullanımı, maligniteler, diabetes mellitus vb), hastanelerde cerrahi işlemler sırasında uygulanan genel anestezi ve endotrakeal entübasyonlardır (9).

Lejyonella enfeksiyonu aynı zamanda toplumsal ortamlarda şiddetli pnömoninin en yaygın nedenlerinden biridir ve lejyonella, hastane kaynaklı pnömoni vakalarının %40'ından izole edilmiştir (14,15).

Lejyonellanın patojenik türleri, lejyonella içeren aerosoller yoluyla insanda lejyonelloz adı verilen bir hastalığa neden olabilir; kendini sınırlayan grip benzeri Pontiac ateşi ve alveolar makrofajları enfekte ederek ciddi pnömoni oluşturan LH olmak üzere hastalığın iki biçimi vardır. Lejyonella, su ortamlarında sıklıkla biyofilm içerisinde veya protozoa paraziti olarak bulunan fırsatçı bir patojendir (7,13,16,17). Çeşitli amip cinsleri ile uzun süreli etkileşim ve kapsamlı ortak evrim, lejyonellayı insanları enfekte etmek için patojenik hale getirir ve ayrıca virülans farklılaşması ve heterojenite de kazandırır. Geleneksel olarak replikasyon süreçlerinin ve insan makrofaj enfeksiyonlarının başlatılmasında rol oynayan patogenez ile ilişkili proteinler virülans faktörleri olarak kabul edilir. “Virülans faktörleri” hem doğal hem de tesadüfi konakların enfeksiyonunda etkilidir. Bu faktörler lejyonellanın yaşam döngüsünde önemli roller oynarlar ve bakterilerin hayatta kalması için gereklidirler. *L. pneumophila* ökaryotik hücrelerde hayatta kalabilmek ve çoğalabilmek için Dot/Icm genleri tarafından kodlanan özel bir Tip IV salgılama sistemine (T4SS) ihtiyaç duyar (7,16).

Bu derlemede, lejyonellanın amipleri ve makrofajları enfekte etme yetenekleri, virülans ve hayatta kalma stratejileri, enfeksiyon mekanizmaları, konak immünitesi ve lejyonella immünopatogenezine ait güncel bilgilerin gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

Lejyonella virülans faktörleri ve patogenezi

L. pneumophila'nın protozoa ve memeli konak hücrelerine bağlanması, hücre içinde hayatta kalması, replikasyonu ve hücreden hücreye yayılma özellikleri lejyonella enfeksiyonlarının patogenezinde etkilidir. Çevresel su örneklerindeki suşlar, serbest yaşayan amiplerde de hayatta kalabildiği için seçici baskıya bağlı olarak daha fazla virülans genleri ve faktörleri

edinebilir. Bu nedenle lejyonella virülansının evriminde amiplerin “eğitim alanı” olarak önemli olduğu vurgulanmaktadır (14).

Lejyonella yüzey virülans faktörleri

L. pneumophila'nın konak hücreye (makrofajlar ve protozoan hücreler) yaklaşması, bağlanması ve istilası hücresel enfeksiyon döngüsündeki kritik adımlardır. Adezinler, T4SS ve T2SS proteinleri, flagellum, pili, enzimler, bazı dış zar proteinleri ve lipopolisakaritler (LPS) dahil olmak üzere çok sayıda faktör bu süreçlere katkıda bulunur. *L. pneumophila*'nın hücre yüzeyinde, dış membran kesecikleri (OMV'ler), peptidoglikanla ilişkili lipoprotein (PAL), majör hücreyle ilişkili fosfolipaz A/lisofosfolipaz A (PlaB), majör salgılanan fosfolipaz (PlaA), PlaC, MOMP, makrofaj enfektivite güçlendirici (macrophage infectivity potentiator: Mip), Hsp60 ve FeoB bulunmaktadır. Bu faktörler *L. pneumophila*'nın konak hücrelerine başarılı bir şekilde kolonizasyonu, sonrasında hücreye giriş, replikasyon ve LH oluşumunda etkili olmaktadır (Tablo-1) (14,18).

Yüzeyle ilişkili bakteriyel proteinler hücre dışı ve hücre içi konak proteinlerini hedef alır ve enfeksiyonun farklı aşamalarına katkıda bulunur. *L. pneumophila*'nın hücre yüzeyindeki proteinler, patojen-konak etkileşimlerinde merkezi bir rol oynar. *L. pneumophila*'nın makrofaj tarafından tanınması, adezyonu ve kompleman aracılı fagositozu, konak hücre reseptörleri CR1 ve CR3 aracılığıyla gerçekleşir (19).

Yüzey virülans faktörlerinden, MOMP; Lejyonellanın konak hücrelere bağlanmasını, OMV; paketlenmiş materyallerin ökaryotik hücrelere bağlanmasını ve girişini sağlar. LPS ve PAL proinflatuar sitokinlerin salgılanmasını uyarır, FeoB, Fe²⁺ alımında etkili olur. Mip ise bakterilerin doku bariyerlerini aşmasında etkin rol oynamaktadır. PlaB ise *L. pneumophila*'nın akciğerlerde replikasyonunu ve dalağa yayılmasını teşvik etmektedir (Tablo 1)(14).

Tablo 1. Lejyonella virülans faktörleri (14)

Virülans geni/faktörü	Genin kazandırdığı virülans özelliği
LPS	İnsan monositik hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını indükler
MOMP: Major Dış Membran Proteini	Lejyonellanın konak hücrelere bağlanmasında önemli bir rol oynar
Flagella (<i>flaA</i>)	Basilin alveoller ve akciğerde yayılması, biyofilm oluşturma ve çevre koşulları uygun olmadığında hayatta kalma yeteneğini düzenler
Mip geninin kodladığı protein	Memeli ve protozoan fagositlerine karşı hücre içi öldürmeye direnç kazandırır
<i>cpxRA</i>	Tip IVB salgılama sistemi tarafından efektör proteinlerin salgılanması için gerekli faktörü düzenler
<i>iraA</i> gen lokusu tarafından kodlanan metil transferaz	Bakteriyel hücre içi enfeksiyon için gereklidir
<i>iraB</i> lokusu tarafından kodlanan varsayımsal demir-peptit taşıyıcısı	Demir yüklü peptitler aracılığıyla yüksek değerlikli demirin alımında rol oynayabilir
<i>RtxA</i> geninin kodladığı protein	Yapışma, istila, sitotoksiste ve gözenek oluşumunu sağlar
<i>Lvh</i> geni	Virülan bakterinin konak hücreye bağlanmasına yardımcı olan tip IVA salgı sisteminden türetilen bir proteini kodlar
Dot/Icm geni	Konak hücrelerde lejyonellanın replikasyonundan sorumlu olan TIVB salgı sisteminden türetilen bir proteini kodlar.
<i>enhC</i>	Hücre duvarı bütünlüğünün korunması, lejyonellanın hücre içi büyümesinin kolaylaştırılması
<i>Hsp60</i>	<i>L. pneumophila</i> 'nın fagositozuna aracılık eder
Tip IV pili (<i>lpnE</i>)	<i>L. pneumophila</i> 'nın makrofaj içine girişi, <i>L. pneumophila</i> vakuolünün replikasyonunda, biyofilm gelişiminde etkili
<i>LpnE</i> (<i>rtxA</i>)	<i>L. pneumophila</i> 'nın insan hücrelerine bağlanmasına aracılık eder
<i>LadC</i>	Makrofajlara yapışma

LPS

LPS *L. pneumophila*'nın serogrubunu ve patojenik özelliklerini belirlemektedir. LPS, oligosakkarit yapıda bir O zinciri ve glikolipit yapıda lipit A'dan oluşur. Yüksek heterojeniteye sahip O zinciri, *L. pneumophila*'nın sınıflandırılmasını (15 serogrup) sağlamaktadır (18). *L. pneumophila*'nın LPS'si, bileşimi ve düşük endotoksik potansiyeli nedeniyle diğer bakterilerinkinden önemli ölçüde farklıdır. Membrana bağlı lipit A, özellikle uzun zincirli ve dallanmış yağ asitlerinden oluşur. Bu

nedenle LPS, bakteriyi konak hücre zarına sabitleyen bir yapışma faktörü olarak görev yapabilir. Ayrıca patojenin lizozomal sindirimden kaçmasına da katkı yapar. Lejyonellanın LPS'leri diğer Gram (-) bakterilerinkinden farklıdır. Enfeksiyonun evresine bağlı olarak hidrofilik/hidrofobik olmak üzere iki farklı formunu ifade edebilir. Daha hidrofilik varyant, lejyonellanın fagozoma yakınlığını kolaylaştırırken, hidrofobik form, konak hücre zarlarına yapışmanın yanı sıra bakterinin aerosollerde hayatta kalmasını ve bulaşmasını kolaylaştırır (19,20).

Flagella

Legionella spp. genelde polar ve/veya lateral flagella aracılığıyla hareket eder. Flagella hareketi sayesinde bakterinin yeni konak hücrelere erişimi kolaylaşır, akciğer ve alveollere yayılımı artar. Flagellin geni *flaA*'nın transkripsiyonu, alternatif sigma faktörü σ^{28} *fliA* tarafından sıcaklığa bağlı olarak düzenlenir. *flaA* ekspresyonunda aminoasit miktarı, ortamın viskozitesi ve ozmolaritesi gibi çevresel faktörler de etkilidir. *fliA*, *L. pneumophila*'nın biyofilm oluşturma yeteneğini ve çevre koşulları uygun olmadığında hayatta kalma yeteneğini düzenler. Flagella aynı zamanda konak bağışıklığına etkiler. *flaA* delesyonunda amip ve insan hücrelerinde bakterinin proliferasyonunun zayıfladığı gösterilmiştir. Flagella, hücre yüzeyindeki Toll benzeri reseptör 5 (TLR5) gibi çeşitli konak reseptörler tarafından tanınarak doğal bağışıklıkta etkin rol oynayan alveolar makrofajları aktive eder. TLR5, polimorfonükleer nötrofillerin (PMN'ler) alveollerde toplanmasını uyararak bakteri klirensini sağlar (19,20).

Mip

Mip, 24 kDa'lık temel bir yüzey proteindir. *L. pneumophila*'nın genetik olarak tanımlanmış ilk virülans faktörüdür. *L. pneumophila* Mip mutantlarında, makrofajlar, epitelyal hücreler ve amipler dahil olmak üzere ökaryotik hücrelerde replikasyon kapasitesinin zayıfladığı gösterilmiştir. Yaklaşık 20 yıldır lejyonellanın moleküler tanı ve tiplendirilmesi için bir hedef olarak Mip nükleotid dizisi kullanılmaktadır (19).

Tip I, II ve IV Salgı Sistemleri

Lejyonellanın protistlerde ve çevrede hayatta kalma süreçleri, bakteriye hücre içi replikasyon dahil sayısız virülans özelliği kazandırmıştır. *L. pneumophila* yüzey proteinleri aracılığıyla konak hücre membranıyla etkileşim sağlayarak virülans faktörlerini hücre dışı boşluğa veya doğrudan konak hücre sitozolüne salgılayabilmektedir. Lejyonellalar, hücresel ve doku patogenezinde etkili farklı salgı sistemlerine sahiptir (19).

T1SS; *Lss* *sT1SSlssXYZABD* lokusu tarafından kodlanır. Basilin konak hücreye kayma hareketiyle girişine, istila ve hücre içi replikasyona katkıda bulur. Çeşitli amip türlerinde, alveoler makrofajlarda ve akciğer epitel hücrelerinde hücre içi yaşam döngüsünde önemli bir rol oynar. Patojenin akciğer dokusunda persistensine katkıda bulunur ve konağın kemokin ve sitokin tepkisini azaltır. Ayrıca düşük sıcaklıklarda *L. pneumophila*'nın üremesini ve biyofilm oluşumunu düzenler (7,19).

T2SS; *lsp* lokusu tarafından kodlanır. Kayma hareketinin oluşumunda ve yüzey aktif maddelerin salgılanmasında rol oynar. Bu yüzey aktif maddeler ayrıca antibakteriyel özellik sergiler ve *L. pneumophila* için diğer lejyonella türlerine göre seçici bir avantaj yaratır. T2SS, farklı amip türlerinin optimal enfeksiyonu için gerekli olan M4 çinko metaloproteazProA, PlaAPlaC, RNAzlar ve NttA-E gibi 25'ten fazla efektör proteinin düzenlemesini yapar (19).

T4SS; *Dot/Icm* genleri tarafından eksprese edilir, *L. pneumophila*'nın tüm yaşam döngüsü için gerekli olan en önemli salgı sistemidir. *L. pneumophila* tarafından serbest yaşayan protozoaları parazitileştirmek için geliştirilen virülans stratejileri, memeli makrofajları içinde çoğalma yeteneği kazandırmıştır. *L. pneumophila* fagositoz sırasında, lizozomal bozulmayı önlemek için vakuolünü hızla yeniden şekillendirir ve LCV adı verilen hücre içi replikatif bir niş oluşturur. *L. pneumophila* LCV biyogenezi ve hücre içi replikasyon için, T4SS tarafından konak hücrelerde salgılanan üç yüzden fazla bireysel efektör proteini kullanır (21,22). Bu proteinlerin tümü virülans faktörleri olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, özellikle insan makrofajları içinde enfektivite veya replikasyon için gerekli olan genlere sahip *L. pneumophila* mutantları, aynı zamanda protozoalarda bakteriyel enfektiviteyi ve hücre içi sağkalımı ciddi şekilde zayıflatmıştır. Virülans faktörleri hem doğal hem de tesadüf konak enfeksiyonlarında rol almaktadır ve bakterilerin hayatta kalması için gereklidir (7). T4SS besin alımı, lizozomal etkiyi önleme, LCV'nin biyogenezi ve hücre içi replikasyon için gereklidir. Bazı *L. pneumophila*

efektörleri, paradoksal olarak makrofajlardaki pro-inflamatuar bağışıklık tepkilerini güçlendirir (22).

Efektör proteinler bakterinin hücre içine giriş-çıkışını kontrol eder, fagolizozom füzyonunu bozar ve ökaryotik hücredeki vezikül taşınması, sinyal iletimi, gen ekspresyonu ve protein transasyonu, hücre iskeleti dinamiği, otofaji, apoptoz yolları gibi birçok kritik süreci manipüle eder. İlginç bir şekilde, T4SS efektörlerinin yakın zamanda mitokondriyal FoF1-ATPase aktivitesinin ATP hidrolizini tersine çevirdiği gösterilmiştir. Bu, patojenin konak hücre ölümünü tam olarak zamanlamasını bile sağlayacağını göstermektedir (19,23).

Başlıca salgı proteini ProA

ProA ilk olarak 1981'de Thompson ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve *L. pneumophila* 1-6 serogruplarında analiz edilmiştir. Kobaylarda ProA'nın bakteriyel replikasyondaki, hastalığın seyri ve akciğer dokusunun nekrozu üzerindeki etkileri gösterilmiştir. ProA, virülans düzenlemesine, konak doku bozulmasına ve bağışıklıktan kaçınmaya aracılık eder. Lejyoner hastalığı sırasında, bazal laminadaki kollajen IV ve hücre yapışma proteini vitronektin gibi yapısal konak hedeflere bağlı olarak doku bozulmasına neden olur. ProA aynı zamanda konak proteazların kontrolü için önemli olan α 1-antitripsin'i de parçalar. Ayrıca ProA hemolitik özellikler sergiler ve bağışıklıktan kaçınmaya önemli ölçüde katkıda bulunur. Çinko metalloproteaz-ProA sadece humoral serum bileşenlerini ve kemokinleri (IL-2, IL-6, TNF- α) parçalamakla kalmaz, aynı zamanda spesifik yüzey reseptörlerinin bu sinyal molekülleri aracılığıyla çeşitli bağışıklık hücrelerini uyarmasını ve çoğalmasını da etkiler. Proteaz, konak hedeflerinin yanı sıra, *L. pneumophila*'nın hücre içi yaşam döngüsü sırasında önemli bir rol oynayan diğer bakteriyel proteinleri de etkiler. Ekzojen flagellanın bölünmesi yoluyla TLR5 aracılı bağışıklık tepkisi ve dolayısıyla sitokin ekspresyonu azaltır. ProA, LCV'de lipid bozulmasına ve amino asit sentezine katkıda bulunan PlaA/PlaC ve LapA gibi virülans faktörlerini aktive edebilir. ProA'nın PMN ve monosit kemotaksisini

bozarak, reaktif oksijen radikalleri üretimini engelleyerek dolayısıyla da oksidatif patlamayı engelleyerek bakteriyel eliminasyonu engelleyebildiği gösterilmiştir (19).

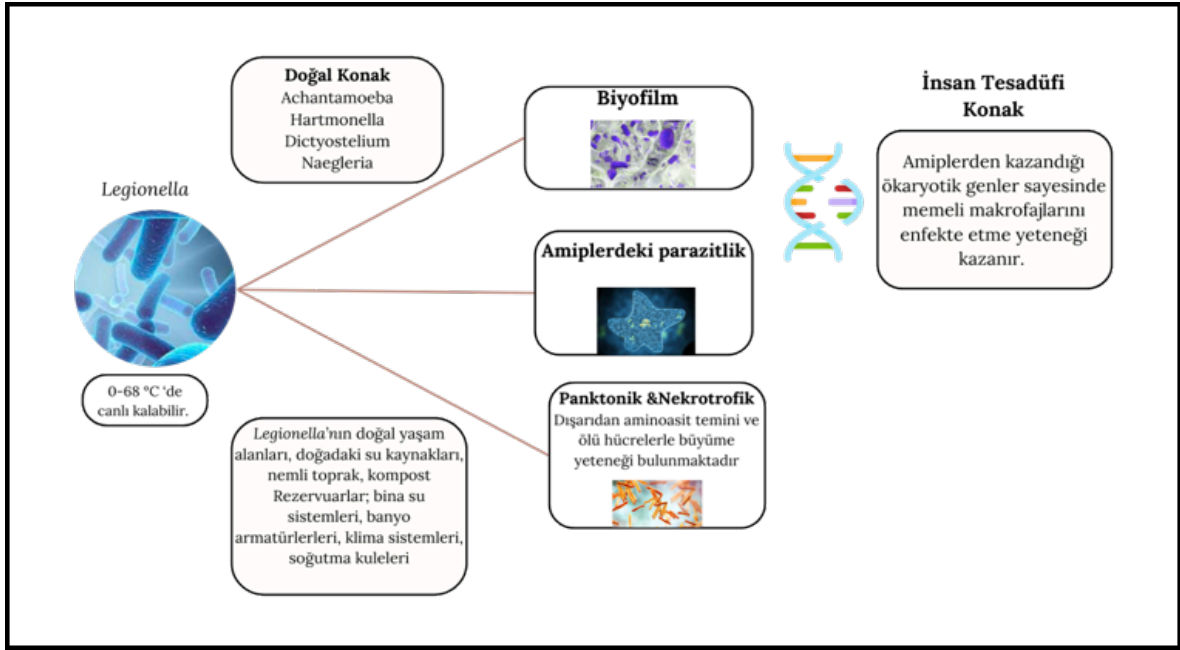
Lejyonellalar üzerinde çok sayıda çalışmalar yapıldığı için ayrıntılı olarak bahsettiğimiz ve Tablo 1'de ismi ve fonksiyonu geçen faktörler dışında "büyük silah cephanesine sahip gizemli bakteri" olarak anılabilecek nitelikte çok sayıda virülans faktörüne sahiptir.

Lejyonella türlerinin çeşitli ortamlarda adaptasyon stratejileri: *Legionella* spp., sıcaklık, besinlere erişim, metabolitlerin varlığı ve habitat gibi çeşitli çevresel faktörlere bağlı olarak pleomorfizm (çubuk şeklinde, kokoid ve filamentli formlar olarak) sergileme ve farklı trofik seviyelerde gelişme yeteneğine sahiptir. Lejyonella cinsine ait bakteriler 0-68°C arasındaki sıcaklıklarda hayatta kalabilmekte ve 20-42°C arasında fizyolojik gelişim sürdürebilmektedir. Antarktika'daki Japon araştırma istasyonu Syowa yakınındaki buzul göllerinde yaşayan mikrobiyal topluluklarda bile lejyonella türlerinin varlığı gösterilmiştir (Şekil 1)(12) .

Lejyonella, genellikle biyofilmlerle ilişkili veya amiplerin içinde çoğalan tatlı su ekosistemlerinde bulunur. *L. pneumophila* klinik izolatu ile yapılan çalışmalar bu bakterinin, *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* spp. ve *Pseudomonas fluorescens* gibi mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm içerisinde girme yeteneği olduğunu göstermiştir (12).

Lejyonellanın doğal rezervuarı ve barınağı sulu ortamlarda serbest yaşayan amiplerdir (Şekil 1)(5,14). *L. pneumophila*, çevredeki *Acanthamoeba castellanii*, *Verbamooeba vermiformis* veya *Hartmanella vermiformis* gibi çevresel protozoalarda yaşayan ancak fırsatçı bir şekilde tesadüfen alveolar makrofaji enfekte edebilen fakültatif bir hücre içi patojendir (10).

Lejyonellaların biyofilm oluşturmaları ve amip içinde hayatta kalmaları, onları yoğun dezenfeksiyon uygulamalarından koruyarak, çevresel faktörlere karşı dirençlerinin artışına böylece de halk sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmalarına neden olmaktadır (12).



Şekil 1. Lejyonella türlerinin çeşitli ortamlarda adaptasyon stratejileri*

*Bu çizim Selin Sezer Güllü tarafından yapılmıştır.

Lejyonella, hem doğal konağı olan protozoayı hem de insan makrofajlarını benzer moleküler mekanizmaları kullanarak enfekte eder (7). *L. pneumophila* Dot/Icm genleri tarafından kodlanan T4SS sistemi sayesinde tek hücreli amipler ve insan monosit / alveolar makrofajları içindeki çoğalma ve fagolizozom oluşumundan kaçarak konak bağışıklık fonksiyonlarını manipüle edebilme yeteneği kazanır (10). Besinlerini endoplazmik retikulum ve mitokondriden alırlar. Patojen için birincil karbon kaynağı olan aminoasitlerin seviyesi düştüğünde, bakteri, hücreyi terk etmesine ve yeni bir konak aramasına olanak tanıyan bir flagellum üretir (Şekil 2). Lejyonella türlerinin protozoadaki parazitliği sırasında gen transferi yoluyla kazandığı ökaryotik motifler çevresel faktörlere ve konak immünesine karşı direncini artırır. *Legionella* spp. aynı zamanda dışarıdan aminoasit temini ile ölü hücrelerde nekrotrofik olarak büyüme yeteneği de göstermektedir (12).

Antropojenik ortamlar: Banyo armatürleri, duşlar, jakuziler, sıhhi tesisat ağları, yüzme havuzları, sağlıklı yaşam merkezleri, su rekreasyon alanları, soğutma kuleleri ve klima sistemleri gibi insan yapımı su kaynakları klinik açıdan önemli lejyonella suşları için rezervuar oluşturabilmektedir. İnsanlarda enfeksiyon, bu kaynakların ürettiği lejyonella bakterilerini içeren aerosollerin solunmasıyla oluşmaktadır. Teknolojik dolaşımdaki suyun sıcaklığını düşürmek için kullanılan soğutma kuleleri, lejyonella içeren biyoaerosollerin jeneratörü olarak nitelendirilmektedir (5,12,14).

Lejyonella virülansında genom çeşitliliği ve korunmuş proteinler: *L. pneumophila* suşlarında yapılan karşılaştırmalı genomik analizler, genomların oldukça yüksek esneklik ve çeşitliliğe sahip olduğunu, yaklaşık 3000 proteinin kodlandığını ve her suş için yaklaşık 300 genin (%10) spesifik olduğunu göstermiştir. Farklı lejyonella türleri arasında daha yüksek genomik farklılıklar vardır. Örneğin, *L. longbeachae*, *L. pneumophila* Paris, Lens,

Philadelphia ve Corby suşları ile karşılaştırıldığında, genlerinin %65,2'si ortologken, yalnızca %34,8'inin spesifik olduğu ortaya konmuştur. Genomların son derece dinamik doğası, lejyonella genomunun genetik materyallerinin horizontal kalıtım dışında başka yollarla da elde edebileceğini düşündürmektedir. *L. pneumophila* genomunda çok sayıda korunmuş ökaryotik benzeri protein ve işlevsel olarak konak hücre proteinlerini taklit eden virülans genleri tanımlanmıştır. İnsan makrofajlarının ve protozoanın hücre içi replikasyonunda önemli roller oynayan Dot/Icm T4SS kodlayan genlerin büyük çoğunluğu ökaryotik-homologdur. Horizontal gen transferi ve mutasyonlar ökaryotik benzeri proteinlerin birikmesine katkıda bulunmuştur (3,7,21). Lejyonella genomları arasındaki çeşitliliğe rağmen Dot/Icm T4SS yüksek oranda korunmuştur ve tüm virülen türlerde mevcuttur. Ancak lejyonella efektör repertuarlarının boyutu ve bileşimi oldukça değişkendir. Örneğin, *L. pneumophila* ve *L. longbeachae*'nin efektör repertuarlarında yalnızca %50'lik bir örtüşme bulunmaktadır (3,23).

Patogenez

Lejyonellanın konak hücrelerine bağlanması, geleneksel ya da sarmal fagositozu, endositik yolu kullanarak fagolizozomal füzyondan kaçışı ve bifazik yaşam döngüsü patogenez için önemli basamaklardır. Patojen kökenlerin genomunda bulunan ve patojen olmayan kökenlerde bulunmayan, patojenite ada lokusu olarak adlandırılan bir dizi virülans faktörü, lejyonella patojenitesi ile ilişkilendirilmiştir (14).

Konak Hücrelerine Bağlanma

L. pneumophila'nın konak hücrelerine ilk bağlanması çeşitli bakteriyel faktörler tarafından güçlendirilir. *L. pneumophila*'nın hem amip hem de memeli hücrelerine adezyonunu ve invazyonunu kolaylaştıran faktörler; T1SS, tip IV pili, iç zarla ilişkili bir protein, periplazmik proteini kodlayan *rtxA* lokusu, *pilEL* lokusu, *ladC* ve *enhC*'dir. Majör dış membran proteini olan porin proteini (MOMP) ve kollajen

benzeri bir protein olan Lcl, *L. pneumophila*'nın memeli hücre adezyonuna katkıda bulunur. Bununla birlikte, *L. pneumophila*, hücre içine alınmada, MOMP, Fc reseptörleri ile kompleman reseptörleri CR1 ve CR3'e bağlanarak konak faktörlerden de yararlanır. Kompleman ve Fc reseptörleri *L. pneumophila*'nın makrofajlara girişi için önemlidir. Çünkü CR1, CR3 veya Fc reseptörleri, antikor aracılığıyla fagositozu ve nötralizasyonu bozar. *L. pneumophila*'nın konak hücrelerine ilk bağlanması hem konak hem de bakteriyel faktörler tarafından kolaylaştırılmaktadır (3).

Lejyonella Fagositozu

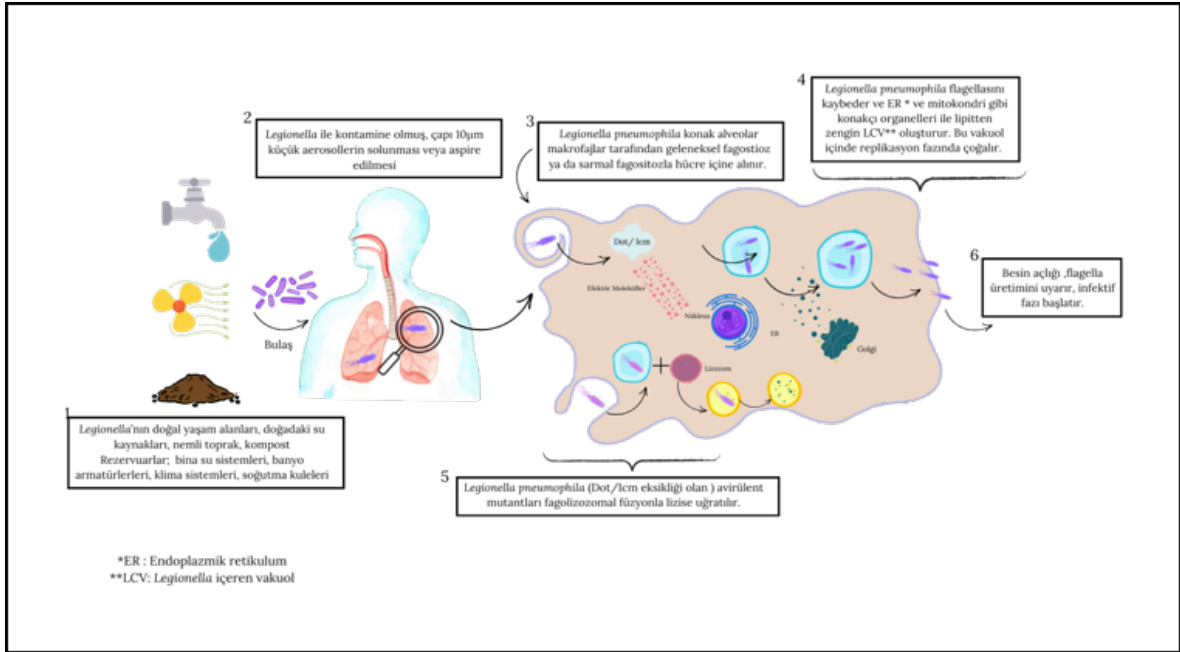
L. pneumophila konak hücreye bağlandıktan sonra geleneksel fagositoz veya lejyonellaya özgü sarmal fagositoz (Şekil 2) olarak adlandırılan özel bir mekanizma ile hücre içine girer. *L. pneumophila*'nın fagositozu, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) aracılı aktin polimerizasyonuna dayanan aktif bir işlemdir. PI3K'nin veya aktin polimerizasyonunun kimyasal inhibisyonu, *L. pneumophila* fagositozunu bozar. Koroninler adı verilen aktin bağlayıcı proteinler de *L. pneumophila*'nın patogenezinde önemli olan atipik fagositozu destekler. Ayrıca bu aşamada Dot/IcmT4SS de etkin rol alır (3,16).

Endositik Yoldan Kaçmak

L. pneumophila, endositik yoldan kaçmak, fagolizozomal füzyonunu önlemek, konakta türetilen besinleri almak ve lejyonella içeren vakuol (LCV) biyogenezi için sayısız virülans mekanizmasını kullanır. Lizozomal öldürmeye karşı ilk savunma hattı, patojen içeren fagozomların endolizozomal olgunlaşmasının önlenmesidir. Bunların çoğuna, Dot/Icm T4SS tarafından konak hücrelere transloke edilen bakteriyel efektör proteinler aracılık eder (Şekil 2). Avirülen (Dot/Icm eksikliği olan) *L. pneumophila* içeren fagozomlarda alımdan 15 dakika sonra lizozomal membran belirteçlerinin aracılık ettiği endolizozomal olgunlaşma hızla gerçekleşerek bakteri lizise uğratılmaktadır (Şekil 2) (16). Virülen

L. pneumophila'nın efektör proteinleri; bakterinin fagolizozomal füzyondan kaçınmasına, konak hücrede vakuoler asitleşmenin baskılanmasına ve veziküler trafiğin modüle edilmesine aracılık eder. Konaktan kaynaklı amino asitleri kullanarak LCV oluşturur. *L. pneumophila* efektörü olan SidK, lizozomlara yerleşir ve v-ATPaz aktivitesini modüle ederek vakuolar asitleşmeyi (SidK, WipB, Lem4)

baskılar, otofajiyi bloke eder, veziküler trafiği (VipD, SidK, RidL) modüle ederek LCV biyogenezinde (LidA, Sec22 ve Arf1'in tümü) rol oynar; dolayısıyla ER'den türetilen keseciklerin toplanması ve endolizozomal olgunlaşmayı bloke edip lizozomal füzyonun inhibisyonuyla, *L. pneumophila*'nın replikatif nişini oluşturur (3,11).



Şekil 2. *L. pneumophila* Patogenezini*

*Bu çizim Selin Sezer Güllü tarafından yapılmıştır.

L. pneumophila'nın Bifazik Yaşam Döngüsü

Lejyonellanın bir bulaşıcı fazı ve bir de enfektif olmayan replikatif fazı arasında değişen bifazik / iki fazlı bir yaşam döngüsü bulunmaktadır (Şekil 2). Bifazik yaşam bakterinin fizyolojik, morfojenetik ve metabolik değişikliklerini ifade eder. Aslında, bakteri hücre duvarında, şeklinde ve hareketliliğinde belirgin morfojenetik değişikliklerle beraber hücrede enerji açısından zengin polimerlerde artar. Virülan lejyonella, konvansiyonel ya da sarmal fagositoz mekanizması ile fagosite edilir (Şekil 2), *L. pneumophila* flagellasını kaybeder, fagolizozomdan çıkar, ardından mitokondri, ER gibi konak hücre

organelleri ve lipitten zengin LCV oluşturur ve bu vakuol içinde replikasyon fazında çoğalmaya başlar (Şekil 2). Konak hücrede besin maddelerinin tükenmesi *L. pneumophila*'da besin açlığı oluşması morfolojik değişimi uyarır, bakteri flagella üretmek enfektif ve sitotoksik faza geçiş yapar (Şekil 2), vakuoler membranı parçalayarak hücre dışı ortama salınır, serbest yaşayan bakteriler ya yeni bir döngü başlatır, ya panktonik formda kalır ya da yapay ortamda biyofilm içinde canlılığını sürdürür. Dış ortamda hayatta kalmak ve yeni uygun bir konağın istilası için gerekli olan enfektif özelliklerin ekspresyonunu aktive eder. Başarılı bir şekilde yeni

bir hücre içi niş oluşturduktan sonra *L. pneumophila* replikatif formuna geri dönerek yeni bir döngü başlatır. Özetle, bakteriler besin açısından zengin koşullarda replikatif faza ve besin kıtlığı durumunda durağan faza girerler. Besin eksikliği olan konaktan çıktıktan sonra lejyonella çevreye dağılır ve replikasyon için uygun, koruyucu bir hücre içi niş sunan yeni bir konak hücrede enfeksiyonu yeniden oluşturur (16,24).

Lejyonella, fagositoz yapma yeteneği bulunan çok sayıda amip türünde ve memeli hücrelerinde çoğalma yeteneğine sahiptir. Burada LCV olarak bilinen, membrana bağlı ayrı bir replikatif niş oluştururlar. Bu karmaşık hücre içi bölme, bakterilerin fagolizozomal bozulmadan kaçmasını, hücre içi savunmalardan korunmasını ve replikasyonu desteklemek için besinlerin kullanılmasını sağlar. Bunları yapabilmek için lejyonella, virülansla ilişkili proteinleri, farklı salgı sistemlerini kullanır. T2SS ve T4SS tüm lejyonella suşları tarafından kodlanırken, T1SS yalnızca *L. pneumophila* tarafından salgılanır. T2SS ve T4SS, *L. pneumophila* enfeksiyon patogenezinde önemli rol oynadıkları için daha kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (9).

L. pneumophila'nın hastalığa neden olan temel bakteriyel virülans faktörlerinden biri, üç yüzden fazla bakteriyel efektör proteini konak sitozolüne ileten T4SS'dir. T4SS, Dot/Icm genleri tarafından kodlanır. T4SS eksikliği olan suşlar, hızla endositik yola gidip lizozomlarla birleşerek parçalandıkları için hücre içinde çoğalamazlar. Fonksiyonel T4SS'ye sahip bakteriler, konak membran trafiğini manipüle ederek, fagolizozomal füzyondan hızla kaçır ve bakteriyel replikasyonu destekleyen ER türevli organel olan LCV içinde çoğalırlar (4).

İmmün Mekanizmalar

L. pneumophila enfeksiyonu genellikle doğal bağışıklık mekanizmaları tarafından kontrol edilir, ancak enfeksiyonun başlangıç döneminde bakteriyel replikasyon kısıtlanamazsa ciddi pnömöniye neden olabilir (25).

Konak, patojeni algılamak/tanımak ve yok etmek

için doğal bağışıklık mekanizmalarını kullanır. Konak hücreleri *L. pneumophila*'yı / patojeni tanımada birden fazla patern tanıma reseptörlerini (PRR'lerini) kullanır. Konak-patojen ilişkisinde ilk tanıma patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP'ler) ve PRR'leri arasındaki güçlü moleküler etkileşim yoluyla gerçekleşir. PRR'ler, plazma membranında veya endozomal membranlarda bulunan TLR'lerden oluşmaktadır. PAMP'lerin PRR (TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9) tarafından tanınması, enfeksiyonun kontrol altına alınmasına katkıda bulunacak NF-κB yolağı ile sinyal üretim basamaklarını ve proinflatuar sitokinlerin üretimini aktive eder. TLR5, bakteri flagellasını tespit ederek enfeksiyonun başlangıcında nötrofillerin akciğere göçünü artırır (3,22,26).

Nükleotid bağlama ve oligomerizasyon domain proteini (Nucleotide-binding and oligomerization domain protein: NOD) 1 ve NOD2, sitozolik peptidoglikanı tespit eder ve protein kinaz 2'nin (Receptor Interacting Protein Kinase 2:RIP2) aracılığıyla NF-κB'nin aktivasyonunu sağlar (Şekil 3). RIP2 aracılı sinyal iletim bozulması, akciğerde nötrofil sayısının azalmasına dolayısıyla da *L. pneumophila* yükünün artmasına neden olur. Uzun süreli NF-κB ve mitojenle aktiveleşen protein kinaz [mitogen-activated protein kinas (MAPK)] aktivasyonu proinflatuar yanıtı indükler (Şekil 3)(3, 22).

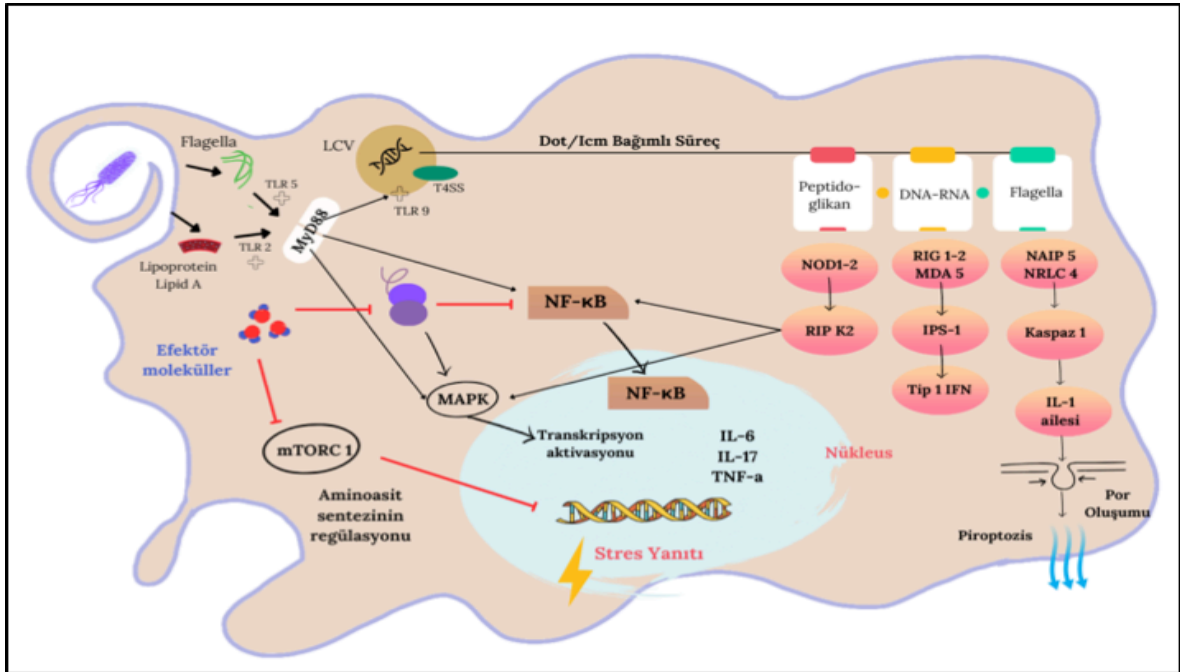
Retinoik asitle indüklenebilir gen-1 (Retinoic-acid inducible gene-1:RIG-I) benzeri helikazlar (like helicases:RLH'ler), melanom farklılaşmasıyla ilişkili gen-5 (melanoma-differentiation-associated gene-5: MDA5) ve RIG-I tarafından sitozolik nükleik asitlerin tanınması makrofajın *L. pneumophila*'yı tespit etmesini sağlar. RIG-I/MDA5'in interferon-β promoter stimülatörü-1 (interferon-β promoter stimulator-1: IPS-1) aktivasyonu, proinflatuar sitokinlerin ve tip-I interferonların (IFN-I) üretimi artar (Şekil 3) (3,22)

Bakteriyel enfeksiyona karşı konakçı savunmasında kritik rol oynayan sitozolik reseptörler NAIP5(NLR family, apoptosis inhibitory protein 5) /NLR4 (NLR-family, CARD domain-containing protein 4)

bakteri flagellası etkileşime girer. NAIP5 ve NLRC4 reseptörlerinin patojeni algılamasıyla efektör kaspaz-1 ve kaspaz-8 aktive olur; bunun sonucunda, IL-1B ve IL-18 salgılanır, konak hücre duvarında porlar oluşur, piroptozis ve hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 3) (3,22).

Enfekte makrofajlar tarafından üretilen sitokinler ve kemokinler aracılığı ile Plazmasitoid dendritik hücreler (Plasmacytoid dendritic cell: pDC) akciğere toplanır. Bakterilerin TLR/NLR aracılığıyla pDC'yi aktive etmesi ya da enfekte makrofajların sitokin üretimini uyarması; *L. pneumophila*'nın doğrudan veya dolaylı olarak öldürülmesi için nötrofilleri, NK'ları ve makrofajları aktive eder. Fare modellerinde, *L. pneumophila* enfeksiyonu nötrofiller, monositler ve dendritik hücreler dahil inflamatuvar miyeloid hücrelerin ve NK, NKT, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin akciğere toplanmasıyla karakterize güçlü hücresel cevaba neden olur. CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri, *L. pneumophila*'ya karşı konak savunmasına katkıda bulunur (3,4,19)

L. pneumophila'ya karşı konak savunmasında proinflamatuvar sitokinler çok önemli bir rol oynar. Bu sitokinlerden özellikle IFN- γ ve TNF- α , lejyonellanın immün temizlenmesinden sorumludur. *L. pneumophila*, replikasyonunu engelleyen (immün sistemi aktive edici) sitokinlerin (IFN- γ , TNF- α) ve hayatta kalmasını sağlayan (immünsüprese edici) sitokinlerin (IL-10) lokal dengesini kontrol eder. Monositler tarafından üretilen IL-12 ve lejyonella ile enfekte akciğerdeki NK hücrelerinin ürettiği IFN- γ , alveoler *L. pneumophila* enfeksiyonunun eliminasyonunda çok önemlidir. *L. pneumophila* enfeksiyonuna yanıt olarak yüksek seviyelerde TNF- α üretilir. TNF aracılı sinyal iletimi kaybı, akciğerde bakteriyel klirensi olumsuz etkiler. TNF- α akciğerde, enfekte olmamış inflamatuvar monositler ve nötrofiller tarafından üretilir ve enfekte makrofajlarda antimikrobiyal savunmayı aktive eder. TNF- α , *L. pneumophila* eliminasyonunda için IFN- γ ve IFN-1 ile sinerji oluşturur (3,4,19).



Şekil 3. *L. pneumophila*'nın konak hücresi tarafından tanınması ve doğal bağışıklık yanıtı *

*Bu çizim Selin Sezer Güllü tarafından yapılmıştır.

Edinsel immünite

Her ne kadar LH sırasında akciğerdeki bakteriyel enfeksiyonu sınırlamak için güçlü bir inflamatuvar yanıt kritik olsa da enfeksiyonun temizlenmesi için T ve B lenfositlere de ihtiyaç vardır. Primer enfeksiyon sırasında, CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositleri immün kontrol için kritik öneme sahiptir, çünkü CD4⁺ ve/veya CD8⁺ T lenfositlerin tükenmesi bakteriyel yükün ve mortalitenin artmasına neden olmuştur (4,5).

Primer enfeksiyonun kontrolünde antijene spesifik bir T lenfosit yanıtının etkisi henüz açıklanmamış olsa da LH'dan iyileşen hastalarda *L. pneumophila*'ya spesifik edinsel immün yanıt gelişmektedir. Edinsel immüntenin başlamasıyla, farklılaşmış Th17 ve Th1 lenfositler akciğerlere gelir ve IL-17 ve IFN- γ üretir. CD8⁺ T hücreleri ek olarak bir IFN- γ kaynağıdır ve makrofajların, M1 makrofajlara (M1'ler fagositoz yapar, M2'ler düzenleyici) polarizasyonunu sağlar (3,4,19).

Hem hastalar hem de laboratuvar hayvanları, *L. pneumophila* enfeksiyonuna yanıt olarak antikorlar üretir. Karakterize edilen başlıca antijenler lipopolisakkarit, Msp/ProA proteaz, flagellin, Hsp60 ve OmpS'dir. İlk çalışmalar, *L. pneumophila*'ya karşı aşılarda geliştirilmesinde bu antijenlerden bazılarının potansiyellerini araştırmış ve bazı antijenlerle hayvan enfeksiyon modellerinde önemli umut vaat eden sonuçlar alınmıştır. Ayrıca aşı çalışmaları, *L. pneumophila* enfeksiyonunda bakterilerin akciğerden temizlenmesinde hem antikor hem de hücre aracılı bağışıklığın rolü olduğunu destekleyen bilgiler vermiştir. Bakterilerle aktif aşılama veya hiperimmün serumla pasif immünizasyon, akciğerdeki bakteri yükünün azalmasına önemli katkı sağlamıştır. LH'de enfeksiyon başlangıcında IgM antikorları ve ardından da IgG üretilir. Spesifik antikorların varlığı fagositozu güçlendirir (5, 27). A/J fare modelinde yapılan çalışmalarda *L. pneumophila* ile birincil enfeksiyonlarda, bronşiyol-alveoler lavaj sıvısında yalnızca IgA bulunurken, serumda önce IgM sonrasında IgG saptandığı belirtilmiştir. Bunu akciğerde hafıza

B hücrelerinin oluşumu takip eder. Hem IgG hem de IgA alt sınıfları *L. pneumophila* enfeksiyonuna karşı koruyucudur (3,4,28). *L. pneumophila* antikorlarının LH önlemeye ve tedavi etmeye yardımcı olacağı düşünülmektedir (26).

L. pneumophila bakteriyel membranın bileşenlerini içeren 30 yeni spesifik B lenfosit antijeni tanımlanmıştır. Kobayların *L. pneumophila* Hsp60 veya OmpS ile aşılması *L. pneumophila* enfeksiyonuna kısmi koruma sağlar. Ancak lejyonella enfeksiyonuna karşı kazanılmış bağışıklık tepkisi oldukça zayıftır ve uzun süreli bağışıklık sağlamaz (3,21).

Dünya Sağlık Örgütü'nün Eylül 2022 raporuna göre Lejyoner hastalığının genel ölüm oranı, enfekte olan tüm kişiler arasında %5-10 ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda %40-80'dir. Doğru vaka yönetimi, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ölüm oranını %5-30'a düşürebilir (29). Konak risk faktörleri, geç tanı ve yetersiz bakım yapılan yapay su sistemleri gibi çeşitli değişkenlerin bir sonucu olarak Lejyoner hastalığının görülme sıklığı her yıl artmaktadır. İnsidansları kontrol etmek ve hastalık yönetimini iyileştirmek için bakteriyel virülans faktörlerini, konak savunma mekanizmalarını ve konak-patojen etkileşimini anlamak hayati önem taşımaktadır (30,31).

SONUÇ

L. pneumophila, 0-68 °C arasındaki sıcaklıklarda hayatta kalabilen, amipleri, diğer protozoaları doğal konak olarak kullanan, ancak aynı zamanda insan makrofajlarını da enfekte edebilen, tedavi edilmediğinde duyarlı bireylerde genellikle ölümcül seyreden ciddi bir zatürre olan Lejyoner hastalığına neden olan hücre içi fırsatçı bir patojendir. *L. pneumophila*, planktonik formda veya biyofilm oluşturarak tatlı su habitatlarında hatta dışarıdan aminoasit temin ederek ölü hücrelerde nekrotrofik olarak büyüme yeteneğini de göstermektedir. *L. pneumophila*, yaşam döngüsü boyunca karşılaştığı çevresel koşullara güçlü adaptasyon yeteneği ile farklı konak nişlerinde başarılı bir şekilde çoğalmak

ve ayrıca hücre dışı ortamlarda hayatta kalmak için karmaşık mekanizmalar geliştirmiştir. *L. pneumophila* iki fazlı virülen olmayan replikatif ve virülen infeksiyöz yaşam döngüsü arasındaki geçişte, karmaşık süreçleri yönetir. LCV içerisindeki besinden zengin ortam bakterilerin çoğalmasını destekler. Besin ve aminoasit tükenmesiyle *L. pneumophila*, tükenmiş konaktan kaçmak, hücre dışı ortamda belirsiz bir süre boyunca

hayatta kalmak ve sonunda yeni bir enfeksiyon döngüsü başlatmak için en uygun donanıma sahiptir. Sayısız virülans mekanizması, salgı sistemleri, efektör molekülleri adeta “büyük silah cephanesine sahip bir ordu gibi” replikasyonu engelleyecek konak immün sistem mekanizmalarını inhibe etme ve hayatta kalma yeteneği geliştirmiştir.

TEŞEKKÜR

Şekillerin çizimini yapan Doktora Öğrencim Selin Sezer Güllü'ye teşekkür ediyorum.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. <https://thelegionnaireslawyer.com/history-legionnaires-disease/>
2. Cunha BA. Legionnaires' disease: clinical differentiation from typical and other atypical pneumonias. *Infect Dis Clin North Am*, 2010; 24(1):73-105.
3. Chauhan D, Shames SR. Pathogenicity and Virulence of Legionella: Intracellular replication and host response. *Virulence*, 2021; 12(1):1122-1144.
4. Liu X, Shin S. Viewing Legionella pneumophila Pathogenesis through an Immunological Lens. *J Mol Biol*, 2019; 4;431(21):4321-44.
5. Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL. Molecular pathogenesis of infections caused by Legionella pneumophila. *Clin Microbiol Rev*, 2010; 23(2):274-98.
6. Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW Jr, Kassanoff I. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol*, 1978; 107(2):149-60.
7. Yang JL, Li D, Zhan XY. Concept about the Virulence Factor of Legionella. *Microorganisms*, 2022; 11(1): 74.

8. Ülger M, Tezcan Ülger S, Bekçi A, Nar Ötgün S, Delialioğlu N, Aslan G. Gemilerin Su Sistemlerinden İzole Edilen Legionella Türleri ve Moleküler Karakterizasyonu [Legionella Species Isolated in the Water Systems of Ships and Their Molecular Characterization]. *Mikrobiyol Bul*, 2022; 56(1):11-24.
9. Mondino S, Schmidt S. Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of Legionella. *Annu Rev Pathol*, 2020; 24;15:439-66.
10. Gomez-Valero L, Buchrieser C. Intracellular parasitism, the driving force of evolution of Legionella pneumophila and the genus Legionella. *Genes Immun*, 2019; 20(5):394-402.
11. Shames SR. Eator Be Eaten: Strategies Used by Legionella to Acquire Host-Derived Nutrient and Evade Lysosomal Degradation. *Infect Immun*, 2023; 18;91(4):e0044122.
12. Kanarek P, Bogiel T, Breza-Boruta B. Legionellosis risk-an overview of Legionella spp. habitats in Europe. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022; 29(51):76532-42.
13. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*, 2002; 15(3):506-26.
14. Zhu QY. Legionella pathogenesis and virulence factors. *Annals of Clinical and Laboratory Research*, 2015; 3(2):15.
15. Graham FF, Hales S, White PS, Baker MG. Review Global seroprevalence of legionellosis a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 2020; 10(1): 7337.
16. Lama A, Drennan SL, Johnson RC, Rubenstein GL, Cambronne ED. Identification of Conserved ABC Importers Necessary for Intracellular Survival of Legionella pneumophila in Multiple Hosts. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017; 30;7:485.
17. Palusińska-Szys M, Cendrowska-Pinkosz M. Pathogenicity of the family Legionellaceae. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2009; 57(4):279-90.
18. Kowalczyk B, Petzold M, Kaczyński Z, Szuster-Ciesielska A, Luchowski R, Gruszecki WI, et al. Lipopolysaccharide of Legionella pneumophila Serogroup 1 Facilitates Interaction with Host Cells. *Int J Mol Sci*, 2023; 27;24(19):14602.
19. Scheithauer L, Karagöz MS, Mayer BE, Steinert M. Protein sociology of ProA, Mip and other secreted virulence factors at the Legionella pneumophila surface. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023; 2;13:1140688.
20. Talapko J, Frauenheim E, Juzbašić M, Legionella pneumophila-Virulence Factors and the Possibility of Infection in Dental Practice. *Microorganisms*, 2022; 24;10(2):255.
21. Franco IS, Shuman HA, Charpentier X. The perplexing functions and surprising origins of Legionella pneumophila type IV secretion effectors. *Cell Microbiol*, 2009; 11(10):1435-43.
22. Ngwaga T, Chauhan D, Shames SR. Mechanisms of Effector-Mediated Immunity Revealed by the Accidental Human Pathogen Legionella pneumophila. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021; 3;10:593823.
23. Schuelein R, Ang DK, vanDriel IR, Hartland EL. Immune Control of Legionella Infection: An in vivo Perspective. *Front Microbiol*, 2011; 3;2:126.
24. Oliva G, Sahr T, Buchrieser C. The Life Cycle of L. pneumophila: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018; 19;8:3.
25. Ataide MA, Manin GZ, Oliveira SS, Guerra RO, Zamboni DS. Inflammasome activation and CCR2-mediated monocyte-derived dendritic cell recruitment restrict Legionella pneumophila infection. *Eur J Immunol*, 2023; 53(2):e2249985.

26. Misch EA. Legionella: virulence factors and host response. *Curr Opin Infect Dis*, 2016 ; 29(3):280-6.
27. Iliadi V, Staykova J, Iliadis S, Konstantinidou I, Sivykh P, Romanidou G, et al. Legionella pneumophila: The Journey from the Environment to the Blood. *J Clin Med*, 2022; 18;11(20):6126.
28. Joller N, Spörri R, Hilbi H, Oxenius A. Induction and protective role of antibodies in Legionella pneumophila infection. *Eur J Immunol*, 2007; 37(12):3414-23.
29. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/legionellosis>.
30. Ayesha A, Chow FW, Leung PH. Role of Legionella pneumophila outer membrane vesicles in host-pathogen interaction. *Front Microbiol*, 2023; 25;14:1270123.
31. Bozok T, Kurt CB, Bekci A, Ülger ST, Aslan G. "Çevresel Su Örneklerinden İzole Edilen Legionella Türlerinde Virülansta Etkili Olan Rtxa, Enhc Ve Mip Genlerinin Varlığının Araştırılması" 7. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 4. Ulusal Viroloji Günleri 1-5 Kasım 2023, LaBlanche Island Bodrum Oteli, 187: 673.

81. CİLT YAZAR İNDEKSİ / 81. ISSUE AUTHOR INDEX

A	ÇALIŞKAN A.1/23	GÖK A.3/253
AKÇİL OK M.3/317	ÇİFTÇİ İH.1/91	GÖKMEN D.4/419
AKDAĞ İ.2/201	ÇUKUROVALI SOYKURT B.4/463	GÜLER E.1/11
ARAS Y.4/449	D	GÜNAYDIN E. ...3/329-4/369-4/379
ASLAN G.1/103-4/477	DAĞCIOĞLU Y.4/439	GÜNER R.3/279-4/387
ATAK BOLATASLAN B.4/431	DELİKANLI KIYAK B.4/369	GÜNEŞ A.4/439
AVCI K.2/175	DEMİR ÇELEBİ M.3/317	GÜNEŞ ALTUNTAŞ E.2/121
AYHAN M.3/279	DEMİR E.1/53	GÜRBÜZ Y.1/31
AYPAK A.4/387	DEMİR M.1/23	H
B	DEMİR S.1/79	HABİLOĞLU AD.1/31
BADDAL B.1/11	DOĞANÇ FB.4/409-4/431	HASANOĞLU İ.4/387
BAL C.4/387	DOĞANYİĞİT Z.4/419	HOCA M.3/317
BALBALOĞLU H.1/45	DUMLU AB.3/269	HÖKELEK M.3/243
BALEVİ A.3/253	E	İ
BAYAR COŞKUN B.4/439	ELİBOL İLERİ C.2/12	İLKİ A.4/409-4/431
BAYIR T.2/189	ERDEM ERİŞİ F.1/53	İSLAMOĞLU F.3/243
BAYRAM G.2/145-3/259	EREL Ö.4/387	İSLAMOĞLU MS.3/243
BEYAZ B.1/53	ERGİN Ç.1/23	K
BOSTAN K.1/67	ERSOY L.1/103	KAHRAMAN KILBAŞ EP.1/91
BURSALI F.3/287	ERTÜRK ŞENGEL B.4/409-4/431	KAHVECİ S.4/419
BÜYÜKSİRİT BEDİR T.3/297	ESER F.4/387	KALELİ İ.1/23
C - Ç	F	KARA ŞA.4/467
CAN B.4/409-4/431	FARHADI H.2/135	KARAALP C.1/79
CERİT Ç.3/269	G	KARADAŞ A.2/121
COŞKUN B.3/279	GİDER Ö.2/225	KARATAŞ YENİ D.3/253
ÇAĞLAR N.1/67	GONCAGÜL G. ...3/329-4/369-4/379	KARDOĞAN Ö.4/379

81. CİLT YAZAR İNDEKSİ / 81. ISSUE AUTHOR INDEX

KARIMI P.2/135
KAYA KALEM A.4/387
KAYAASLAN B.4/387
KHANI M.2/135
KILBAŞ İ.1/91
KİBAR U.2/121
KORTEN V.4/409-4/431
KÖSEM A.2/201

M

MARAL T.2/205
MEŞECİ EB.4/409-4/431
METE E.1/23
MOUSAVINEZHAD MH.2/135
MURSALOĞLU KAYNAR P.4/379

N

NAMLI BOZKURT EN. ...2/145-3/259

O - Ö

OKAN OFLAMAZ A.4/419
OKUR O.2/189
ÖNDER Ö.2/225
ÖNER SZ.1/23
ÖRS YILDIRIM N.1/3
ÖZDEMİR H.1/23
ÖZDEMİR M.2/205
ÖZDEMİR SALCI ES.3/329
ÖZDURAN G.3/317
ÖZKAN Ö.2/189

ÖZLÜK ÇILAK G.2/161
ÖZTÜRK A.2/201
ÖZTÜRK İ.1/79
ÖZTÜRK Ö.4/419

P

PORSUK AÖ.3/269
POTINDJI TMF.1/11

R

RAHİMİFARDIN S.2/135

S - Ş

SAĞLAM A.1/67
SALKIN H.4/399
SAVALAN A.3/307
SEZER A.4/387
SİLİ U.4/409-4/431
ŞAHİN T.4/351

ŞAKAR C.1/31
ŞAY COŞKUN US.4/439
ŞENCAN İ.1/31
ŞENER A.2/201
ŞEVİK M.3/339

T

TAŞTAN B.4/439
TEMİZER İA.1/53
TEZEL KAHRAMAN A.4/467
TUNÇEL T.4/409-4/431
TÜKENMEZ TİGEN E. ...4/409-4/431

TÜRKER PF.3/317

U - Ü

UÇAR F.2/201
UÇAR S.4/419
ÜNVER ALÇAY A.1/67
ÜNVER ULUSOY T.1/31

Y

YAĞCI ÇAĞLAYIK D.4/409-4/431
YAPAR F.2/121
YILDIRIM M.2/215
YILMAZ G.4/387
YILMAZ Ö.1/53
YILMAZ S.2/215-4/419
YILMAZ Y.2/189
YÜCESAN B.2/189

TELİF HAKKI DEVİR FORMU / COPYRIGHT TRANSFER FORM



HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Makale Türü/Article Type:/...../20...

(...) Araştırma/Research (..) Derleme/Review (..) Olgu Sunumu/Case Report

(..) Editöre Mektup/Letter to Editor (..) Teknik Rapor/Technical Report

Makale Başlığı/Article Entitled :

Sayın Editör,

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;

1. Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orjinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Makalenin; derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
3. Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
4. Yayın haklarının Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here, we affirm and warranty as the author(s) of this manuscript submitted to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology that;

1. The article I / We submitted to the Bulletin is original and responsibilities are belong to us ethically and scientifically,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under the evaluation of this bulletin,
3. The article contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal rights and copyrights,
4. The article publishing rights belong to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.

(...1) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...2) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...3) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...4) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...5) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

Not / Note :

1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)
2. Formu aşağıdaki adrese gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below or deliver personally

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 E Blok Park Girişi 06100 Sıhhiye-ANKARA-TURKEY

Tel/Phone : +90 312 565 55 80

Faks/Fax : +90 312 565 55 91

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

