



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 79 ■ Sayı/Number 2 ■ Yıl/Year 2022

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND  
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü adına

On behalf of General Directorate of Public Health

Doç. Dr. Fatih KARA, Genel Müdür (General Director)

## EDİTÖR

EDITOR IN CHIEF

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

## EDİTÖR YARDIMCILARI

DEPUTY EDITORS

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

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

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

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

## YAYIN KURULU

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

Dr. Edibe Nurzen NAMLI BOZKURT (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

## İSTATİSTİK EDITÖRLERİ

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 EDITÖRÜ

ENGLISH LANGUAGE EDITOR

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

## TEKNİK KURUL

TECHNICAL BOARD

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

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

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

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

## HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

### Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

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

### Baskı ve Cilt / Press and Binding :

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

### Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

### Basım Tarihi / Date of Publication :

Haziran - 2022 / June - 2022

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç

Anna PAPA, Yunanistan

Aziz SANCAR, ABD

Cristina DOMINGO, Almanya

Daniel MOTLHANKA, Botsvana

Dwight D. BOWMAN, ABD

Isme HUMOLLI, Kosova

Isuf DEDUSHAJ, Kosova

Iva CHRISTOVA, Bulgaristan

Johan LINDH, İsveç

Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail

Manfred WEIDMANN, İngiltere

Paul HEYMAN, Belçika

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba

Sıraç DİLBER, İsveç

Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya

Takashi AKAMATSU, Japonya

Varalakshmi ELANGO, Hindistan

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Alanya

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Ankara

Banu ÇAKIR, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Afyonkarahisar

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Cemile SÖNMEZ, Ankara

Çağatay GÜLER, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Ebubekir CEYLAN, Ankara

Emrah RUH, Kıbrıs

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fehminaz TEMEL, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnaz ÇULHA, Hatay

Gülnur TARHAN, Adıyaman

Hakan ABACIOĞLU, İzmir

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

Hanefi ÖZBEK, İzmir

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

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

## I) AMAÇ VE KAPSAM

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

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

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

## II) YAYIN İLKELERİ

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

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

Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.

## III) TELİF VE LİSANS

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

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

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

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi tarafından yayımlanan tüm makaleler, Creative Commons Alıntı GayriTicari-Türetilmez 4.0 Uluslararası (CC BY-NC-ND 4.0) lisansına tâbidir. Bu Lisans, makalenin uygun şekilde belirtilmesi, kullanımın ticari olmaması ve herhangi bir değişiklik veya uyarılama yapılmaması koşuluyla, herhangi bir ortamda kullanıma, dağıtılmasına ve çoğaltılmasına izin verir. Lisansın koşulları hakkında daha fazla bilgi için lütfen bakınız: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>. Bu lisans altında yayımlanan materyalin ticari amaçlı kullanım (satış vb.) durumunda telif hakkı sahibi ve yazar haklarının korunması için izin gereklidir. İçerik bilimsel 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 yayınlanan bilimsel yazılara, Creative Commons Alıntı-GayriTicari-Türetilmez 4.0 Uluslararası Lisansı çerçevesinde ücretsiz erişilebilir. Dergimiz, hakem değerlendirmesinden geçmiş bilimsel literatürün, herkese

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

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

## V) ÜCRET POLİTİKASI

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

## VI) ETİK KURALLAR

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

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

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

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

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

## VII) YAZI DİLİ

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

## VIII) YAZIM KURALLARI

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

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

Yayımlanmak üzere gönderilecek yazılar;

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

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

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

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

a. Yazının başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.

b. Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

Tel : (0312) 565 55 79

Faks : (0312) 565 55 91

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

şirkette bir ilişki yoksa, başvuru yazısında belirtilmelidir.

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

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

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

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

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

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

## 8. Araştırma yazıları;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

15. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

## I) AIM and SCOPE

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

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

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

## II) PUBLISHING POLICY

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

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

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

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

## III) COPYRIGHT and LICENSING

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

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

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

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

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

## IV) OPEN ACCESS POLICY

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

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

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

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

## V) PRICE POLICY

Article submission, evaluation and publication are free.

## VI) ETHICAL RULES

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

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

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

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

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

## VII) LANGUAGE of the JOURNAL

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

## VIII) WRITING RULES

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

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

Articles to be submitted for publication;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## ETİK İLKELER VE YAYIN POLİTİKASI

### ETİK İLKELER

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

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

### ÇIKAR ÇATIŞMASI POLİTİKASI

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'nin editör incelemesi, uluslararası editör organizasyonları (ICMJE, EASE, WAME, COPE, CSE,...) tarafından belirlenen İyi Editörlük Uygulamalarına uygundur. WAME, yayın sürecinde (makalenin gönderilmesi, hakem incelemesi, editör kararları ve yazarlar, hakemler ve editörler arasındaki iletişim) yazar, hakem veya editörlerin, süreçteki sorumluluklarını (akademik dürüstlük, çalışmanın yürütülmesinde ve raporlanmasında 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 79

Fax : +90 312 565 55 91

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

## YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız.

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

## TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

### CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

Furthermore, please check.

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

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

INDEX COPERNICUS  
INTERNATIONAL

Scopus

ResearchGate

CAS<sup>®</sup>

A division of the American Chemical Society

Google  
scholar beta

Academic Journals Database  
disseminating  
quality controlled scientific knowledge

EBSCO  
HOST Electronic  
Journals  
Service

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

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

TUBITAK  
ULAKBİM

TÜRK MEDLINE

TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

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

medoanet  
Mediterranean Open Access Network

Open  
J-Gate

## İLETİŞİM

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

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

Tel: 0312 565 55 79

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

## CORRESPONDENCE

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

Faks: 0312 565 55 91

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

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



## ■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Covid-19 pandemisinde antibiyotik kullanımının hastane enfeksiyonlarında mikroorganizma dağılımına ve antibiyotik direncine etkisi  
The effect of antibiotic use on microorganism distribution and antibiotic resistance in nosocomial infections in the Covid-19 pandemic  
Arif Doğan HABİLOĞLU, Gönül ÇİÇEK ŞENTÜRK, Yunus GÜRBÜZ, Ezgi Gizem ŞİBAR, Esengül ŞENDAĞ, Nilgün ALTIN, İrfan ŞENÇAN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.71135 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 175 - 186 


---

2. COVID-19 costs: an example of province in Turkey  
COVID-19 maliyetleri; Türkiye'de bir il örneği  
Hüseyin ASLAN, İsmail ŞİMŞİR, Elif KÖSE, Gülşen TOPAKTAŞ  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.17048 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 187 - 198 

---

3. İlaç ve gıda takviyelerinin içerikleri hakkında kullanıcıların bilgi ve talep düzeyinin ölçülmesi  
Measuring level of information and demand of users about the content of drug and food supplements  
Vildan ÖZCAN, Ayşe Arzu ŞAKUL, Hanefi ÖZBEK  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.12269 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 199 - 208 

---

4. Dışkı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanan *Clostridium difficile* Toksin B sonuçlarının değerlendirilmesi  
Evaluation of *Clostridium difficile* Toxin B results by polymerase chain reaction from stool specimens  
Pınar ŞAMLIOĞLU, Arzu BAYRAM, Güliz DOĞAN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.77785 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 209 - 216 

---

5. Evaluation of antinuclear antibodies in pregnant women with abortion with toxocariasis and toxoplasmosis in Iran  
İran'da toksokariyaz ve toksoplazmozlu düşük yapan gebelerde antinükleer antikörlerin değerlendirilmesi  
Zahra SOHRABİ, Vahid RAİSSİ, Gita ALİZADEH, Soudabeh ETEMADİ, Omid RAİSİ, Mohammad Reza BAGHERPOOR, Zahra Babaei SAMANI, Fatemeh PARANDIN, Zeinab HÂSHEMİBAGHI, Hossein YOUSEFNIA, Asmaa İBRAHİM  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.69009 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 217 - 228 

---

6. Samsun Bafra Devlet Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde endotrakeal aspirat kültüründe üreyen *Acinetobacter baumannii* suşları ve COVID-19 etkisi (2019-2020)  
*Acinetobacter baumannii* strains grown in endotracheal aspirate culture in Samsun Bafra State Hospital intensive care units and the effect of COVID-19 on *Acinetobacter baumannii* strains (2019-2020)  
Seda GÜDÜL HAVUZ  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.48753 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 229 - 242 

---

7. Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in rat blood cells: preventive effects of ferulic acid  
Rat kan hücrelerinde dimetoat'ın neden olduğu oksidatif stres ve DNA hasarı: ferulik asit'in koruyucu rolü  
Hatice BAŞ, Fatma GÖKÇE APAYDIN, Suna KALENDER, Gülizar AYDOĞDU, Çağlar ADIGÜZEL, Hakkı TAŞTAN, Yusuf KALENDER  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.09734 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 243 - 254 

---

8. Enflamatuvar belirteç olarak HCRP ve Sistatin C'nin obezitede böbrek fonksiyonları izleminde kullanılması  
Use of HCRP and Cystatin C as inflammation markers in the follow-up of kidney functions in obesity  
Serpil ÇEÇEN, Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, Can İLGİN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.35651 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 255 - 266 

---

9. Sub-Kronik stresin neden olduğu depresyon ve anksiyete bozukluklarında tDAS'ın etkileri  
The effects of tDCS on depression and anxiety disorders induced by Sub-Chronic stress  
Güven AKÇAY, Narin DERİN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.06641 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 267 - 278 

10. Determination of doxorubicin amount conjugated to mPEG-b-PCL copolymer via pH sensitive hydrazone bond  
pH duyarlı hidrazon bağıyla mPEG-b-PCL kopolimerine konjuge edilen doksorubisin miktarının belirlenmesi  
Gülhan IŞIK, Ayşen TEZCANER, Nesrin HASIRCI, Aysel KIZILTAY  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.04317 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

279 - 292



11. The antiproliferative and cytotoxic effects of curcumin on human cervical cancer Hep2C cell line  
Kurkuminin insan servikal kanseri Hep2C hücre hattı üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkileri  
Filiz SUSUZ ALANYALI, Mehmet ALKAN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.47154 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

293 - 300



## ■ Olgu Sunumu / Case Report

12. Detection of *Salmonella enteritidis* in a immunocompetent patient with myocarditis  
Miyokardit tanılı immünokompetan hastada *Salmonella enteritidis* saptanması  
Fatih Emin ÖZTÜRK, Yasin YILDIZ, Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.38159 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

301 - 306



13. Köpek ısırığı sonrası gelişen *Pasteurella multocida*'ya bağlı yumuşak doku enfeksiyonu olgusu  
A soft tissue infection case due to *Pasteurella multocida* that developed after a dog bite  
Ferhan KORKMAZ, Gülen GÜLOĞLU ÇAMAŞ, Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.67790 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

307 - 312



## ■ Derleme / Review

14. Oral kaviteye yerleşen parazitler  
Parasites of the oral cavity  
Başak KARASU, Özcan ÖZKAN, Ayşegül TAYLAN ÖZKAN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.71473 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
15. Türkiye'de kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbı alanında kalite göstergelerinin geliştirilmesi  
Development of quality indicators in the field of blood banking and transfusion medicine in Turkey  
Ayşe SAKIOĞLU, Sibel ELDEMİR, İsmail Yaşar AVCI  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.62444 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

313 - 320



321 - 332









# Covid-19 pandemisinde antibiyotik kullanımının hastane enfeksiyonlarında mikroorganizma dağılımına ve antibiyotik direncine etkisi

The effect of antibiotic use on microorganism distribution and antibiotic resistance in nosocomial infections in the Covid-19 pandemic

Arif Doğan HABİLOĞLU<sup>1</sup> (ID), Gönül ÇİÇEK ŞENTÜRK<sup>1</sup> (ID), Yunus GÜRBÜZ<sup>1</sup> (ID), Ezgi Gizem ŞİBAR<sup>1</sup> (ID), Esengül ŞENDAĞ<sup>1</sup> (ID), Nilgün ALTIN<sup>1</sup> (ID), İrfan ŞENCAN<sup>1</sup> (ID)

## ABSTRACT

**Amaç:** İki yılı aşkın süredir tüm dünyayı etkisi altına alan COVID-19 pnömonisi sağlık sistemini ciddi boyutlarda zorlamıştır. Sağlık hizmeti sunumunun tehlikeye girdiği bu dönemde uygun antibiyotik kullanımı geri planda kalmıştır. Bu çalışma ile pandemi döneminde değişen antibiyotik kullanımının hastane enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların dağılımı ve değişen antibiyotik dirençleri üzerine etkisininin araştırılması amaçlandı.

**Yöntem:** Çalışma Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesinde gerçekleştirildi. 2016-2020 yılları arasında *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp'nin etken olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonlar değerlendirildi. Hastalar 2016 yılı 1. grup, 2017 yılı 2. grup, 2018 yılı 3. grup, 2019 yılı 4. grup ve 2020 yılı 5. grup şeklinde sınıflandırıldı. Gruplar hastane kaynaklı enfeksiyon etkenlerinin oranı, direnç durumları ve ilgili yıllarda kullanılan antibiyotik miktarları açısından birbirleri ile karşılaştırıldı. Anlamlı farklılığın sadece 5. yılda gösterildiği faktörler pandemi döneminde değişen

## ÖZET

**Objective:** COVID-19 pneumonia, which has affected the whole world for more than two years, has forced the health system. In this period, when the delivery of health services is in danger, the use of appropriate antibiotics has remained in the background. With this study, we wanted to investigate the effect of changing antibiotic use during the pandemic period on the distribution of microorganisms that cause nosocomial infections and changing antibiotic resistances.

**Methods:** The study was carried out in the Dışkapı Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital. Hospital-acquired infections caused by *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. between 2016 and 2020 were evaluated for our study. We classified the patients in 2016 as 1st group, 2017 as a 2nd group, 2018 as a 3rd group, 2019 as a 4th group, 2020 as a 5th group. The groups were compared with each other in terms of the rate of hospital-acquired infection, their resistance status and the amount of antibiotics used in the relevant years. The factors that showed significant difference

<sup>1</sup>Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Arif Doğan HABİLOĞLU

Dışkapı Yıldırım Beyazıt EAH, Enfeksiyon Hast. ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara - Türkiye  
E-posta / E-mail : arifhabiloglu@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 06.01.2022  
Kabul Tarihi / Accepted : 09.02.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.71135

Habiloğlu AD, Çiçek Şentürk G, Gürbüz Y, Şibar EG, Şendağ E, Altın N, Şencan İ. Covid-19 pandemisinde antibiyotik kullanımının hastane enfeksiyonlarında mikroorganizma dağılımına ve antibiyotik direncine etkisi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(2): 175 - 186

sağlık hizmetlerine atfedildi ve irdelendi.

**Bulgular:** Çalışmamızda en fazla kullanılan antibiyotik 150,72 DDD ile seftriaksondu. En sık kullanılan ikinci ve üçüncü antibiyotik sırasıyla piperasilin + tazobaktam ve levofloksasindi. Pandemi dönemine atfedilen piperasilin + tazobaktam kullanım miktarı 5. grupta, 1, 2, 3 ve 4. gruplara göre anlamlı düzeyde daha yüksektir. Pandemi döneminde meropenem, levofloksasin ve kolistin kullanım miktarı artmıştı. Ancak ikili karşılaştırmalarda 5. grup diğer grupların tümü ile farklılık göstermediği için 5. gruptaki bu artış pandemi dönemine atfedilmedi. Hastane enfeksiyonları etkeni olarak yıllara göre *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* yüzdeleri karşılaştırıldı. Özellikle pandemi dönemine ait bir dağılım değişikliği görülmedi. Mikroorganizmaların antibiyotik direnç oranlarındaki değişimi açısından *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* için pandemi dönemine ait değişim görülmedi. *K. pneumoniae* ve *E. coli* için 5. gruptaki Piperasilin direnç oranı, 1, 2, 3 ve 4. gruplara göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu. Piperasilin + tazobaktam kullanımı ile *K. pneumoniae* ve *E. coli* için piperasilin direnci arasında pozitif korelasyon görüldü.

**Sonuç:** Çalışmamızda hastanemiz bünyesinde Piperasilin + tazobaktam ve levofloksasin kullanımının pandemi döneminde ciddi boyutlarda arttığını tespit ettik. Antimikrobiyal direnç açısından ise artan antibiyotik kullanımına paralel bir artış söz konusu değildi. Pandemi döneminde artan antibiyotik tüketim miktarının tetikleyeceği dirençli suşlar, önümüzdeki yıllarda da takibi gereken bir sorun olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Covid-19, antibiyotik direnci, hastane enfeksiyonu

only in the 5th year were attributed to the changing health services during the pandemic period and were examined.

**Results:** The most commonly used antibiotic in our study was ceftriaxone with a DDD of 150.72. Piperacillin + tazobactam and levofloxacin were the second and third most commonly used antibiotics, respectively. The amount of piperacillin + tazobactam use attributed to the pandemic period is significantly higher in the 5th group than in the 1st, 2nd, 3rd and 4th groups. Meropenem, levofloxacin, and colistin, which had increased usage during the pandemic period, were not attributed to the pandemic period since they did not differ with all other groups in pairwise comparisons. There was no change in the rates of microorganisms causing hospital infections for the pandemic period. Piperacillin resistance rate at 5th group for *K. pneumoniae* and *E. coli* was significantly higher than at 1, 2, 3 and 4 groups. There was a positive correlation between the use of piperacillin/tazobactam and piperacillin resistance for *K. pneumoniae* and *E. coli*.

**Conclusion:** In our study, we found that the use of piperacillin/tazobactam and levofloxacin in our hospital increased significantly during the pandemic period. There was no significant increase in the correlation between increasing antibiotic use and antibiotic resistance. Resistant strains, which will be triggered by the increasing amount of antibiotic consumption during the pandemic period, will be a problem that should be followed up in the coming years.

**Key Words:** Covid-19, antibiotic resistance, nosocomial infections

## GİRİŞ

Antimikrobiyal direnç, küresel salgının ortaya çıkmasından önce de varolan COVID-19 pandemisinin gölgesinde kalan bir tehlikedir (1). Pandemi

yönetiminde yaşanan krizlerde antimikrobiyal yönetim programları geri plana atılmış ve bunun sonucunda COVID-19 pnömonisi tedavisinde bilinçsizce antibiyotik kullanımına yol açmıştır (2). Antibiyotik kullanım miktarları pandemi döneminde

artmıştır (3).

Artan antibiyotik kullanımı ile artan antimikrobiyal direnç riski ile çoğunlukla birbiriyle ilişkilidir (4). Antibiyotiklerin gereksiz ve artan miktarlarda kullanımı antibiyotik direnci gelişimine katkı sağlar ve antibiyotiklerin hayat kurtarıcı etkisini zayıflatır (5). Direnç artışına bağlı olarak mortalite, morbidite ve tıbbi maliyetlerin artması kaçınılmaz hale gelmektedir (6). Dünya Sağlık Örgütü 2019'da antimikrobiyal direnci sağlık sistemleri için en büyük tehditlerden biri olarak değerlendirdi (7).

Antibiyotik direnci 21. yüzyılın global problemi olup, bununla baş etmek için antimikrobiyal yönetim programları uygulamalıdır (8). Antibiyotik kullanımını ve direnç modellerini takip etmek, etkili antimikrobiyal yönetim programlarının önemli bir adımıdır (9). Bu çalışma ile pandemide artan antibiyotik kullanımı, bunun antimikrobiyal direnç üzerindeki etkisini araştırmayı ve antibiyotik kullanımının iyileştirilmesi için yardımcı olmayı amaçladık.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma 2016-2020 yılları arasında *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. etken olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonlar ile takip edilen hastaları kapsamaktadır. Her bir yıllık süreçte hastane etkeni olarak tespit edilen *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. suşları bir grubu temsil etmekteydi. Çalışmaya dahil edilen suş sayısı toplamda 1967 idi. 2016 yılında tespit edilen 474 suş 1. grup, 2017 yılında tespit edilen 445 suş 2. grup, 2018 yılında tespit edilen 445 suş 3. grup, 2019 yılında tespit edilen 329 suş 4. grup ve 2020 yılında tespit edilen 274 suş 5. grubu oluşturuyordu. Tüm gruplar hastane kaynaklı enfeksiyon etkenlerinin oranı, direnç durumları ve ilgili yıllarda kullanılan antibiyotik miktarları açısından birbirleri ile karşılaştırıldı. Sadece 5. yıl için anlamlı farklılık gösteren faktörler pandemi dönemindeki değişen sağlık hizmetlerine atfedildi ve irdelendi.

Çalışma üçüncü basamak hizmet veren 700 yataklı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesinde gerçekleştirildi.

Çalışma Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu tarafından 28/06/2021 tarihinde 114/12 karar no ile onaylandı.

Hastane ilişkili enfeksiyonlar hastaneye kabul sırasında olmayan ve inkübasyon döneminde bulunmayan enfeksiyonlar olarak tanımlandı. Santral kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (SKİKDİ), ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP), kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonları (KİUSİ) ve cerrahi alan enfeksiyonu (CAE) takip edilen hastane ilişkili enfeksiyonları oluşturmaktaydı ve hastane enfeksiyonları Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (CDC) tanı kriterlerine göre tanımlandı (10). Ocak 2016 ile Aralık 2020 tarihleri arasında hastane enfeksiyonlarının tanısı ve takibi kıdemli enfeksiyon uzmanı öncülüğünde aynı ekip ile yapıldı.

Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıkları için otomatize sistem kullanıldı (VITEK, bioMérieux, Hazelwood, MO). Antibiyotiklerin duyarlılıkları Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi önerilerine göre belirlendi. Kolistin ve tigesiklin duyarlılığı ve minimum inhibitör konsantrasyonları, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi önerisi doğrultusunda mikrodilüsyonu ile belirlendi (11).

Hastane eczanesinin elektronik veri tabanından alınan tüketilmiş oral ve parenteral antibiyotikler: geniş spektrumlu olmayan sefalosporinler (sefazolin), geniş spektrumlu sefalosporinler (seftriakson), üreidopenisilin (piperasilin), anti-psödomonal/betalaktamaz inhibitörü olan piperasilin/tazobaktam (PTZ) aminoglikozit (amikasin), karbapenemler (imipenem, meropenem ve ertapenem), florokinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin) ve polimiksinler (kolistin). Antibiyotik tüketimi, üç aylık periyotlarla her bir antibiyotik için yatarak tedavi gören 1000 gün başına tanımlanan günlük doza (DDD) göre standardize edildi (12). Hastanede yatan hasta günleri hastanenin idari veri

tabanından alındı.

İstatistiksel analizler SPSS (IBM SPSS Statistics 24) adlı paket program kullanılarak yapılmıştır. İstatistik analizler normal dağılan değişkenler için ortalama  $\pm$  standart sapma verilerek yapıldı. İstatistik analizler normal dağılıma uymayan değişkenler için ortanca (minimum-maksimum) verilerek yapıldı. Analizde, iki bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Mann-Whitney U” test (Z-tablo değeri); üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Kruskal-Wallis H” test ( $\chi^2$ -tablo değeri) ve “ANOVA” test (F-tablo değeri) yöntemi kullanılmıştır.

## BULGULAR

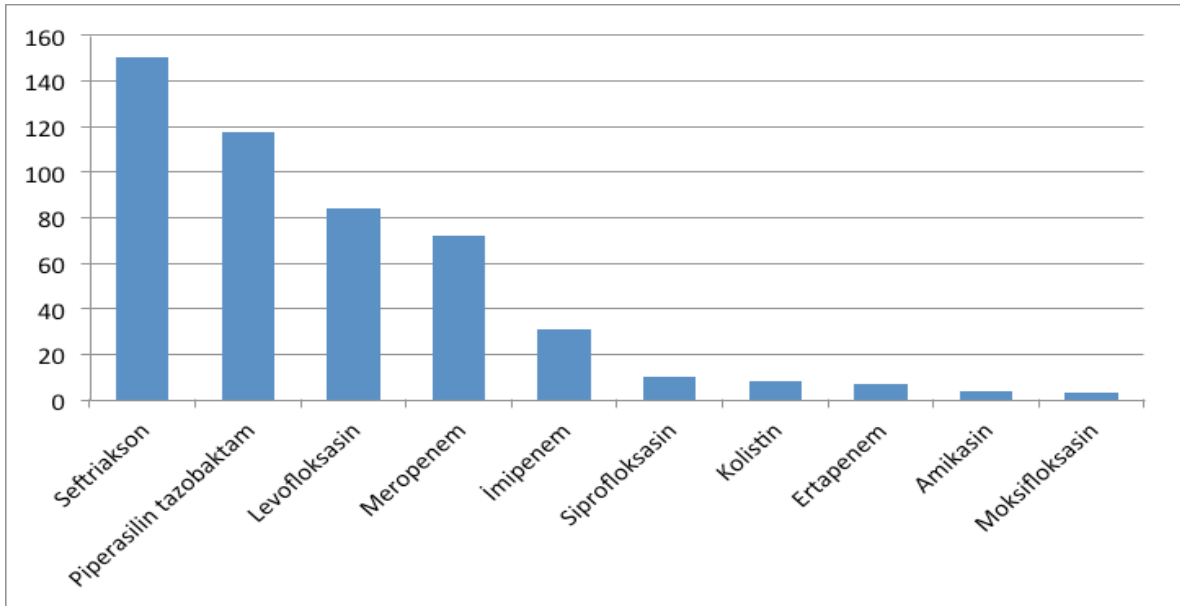
### Antibiyotik kullanım miktarı ve seyri

Çalışmamızda 2020 yılında en fazla kullanılan antibiyotiğin 150,72 DDD ile seftriakson olduğu görüldü (Şekil-1). İkinci en sık kullanılan antibiyotik 117,34 DDD ile piperasilin tazobaktam, üçüncü ise 84,14 DDD ile levofloksasindi.

PTZ antibiyotik kullanım miktarı açısından yıllar içinde anlamlı farklılık görülmüştür ( $F=3,412$ ;  $p=0,036$ ) (Tablo-1). Anlamlı farkın hangi gruptan kaynaklandığını tespit etmek için varyansların homojenliği dikkate alınarak yapılan karşılaştırmalar sonucunda; 1, 2, 3 ve 4.yıl ile 5.yıl arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. PTZ antibiyotik kullanım miktarı 5. yılda, 1, 2, 3 ve 4.yıllara göre anlamlı düzeyde daha yüksektir.

Meropenem için de yıllara göre kullanım miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ( $F=10,415$ ;  $p<0,001$ ) (Tablo-1). Karşılaştırmalar sonucunda; 1, 2 ve 3.yıl ile 5.yıl arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. 5.yıl meropenem antibiyotik kullanım miktarı, 1, 2 ve 3.yıla göre anlamlı düzeyde daha yüksektir. Fakat 4. yıl ile 5. yıl arasında anlamlı fark bulunamadığından pandemi dönemi antibiyotik kullanım değişikliğine atfedilemedi.

Yıllara göre levofloksasin antibiyotik kullanım miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ( $F=4,208$ ;  $p=0,018$ ) (Tablo-1).



Şekil 1. 2020 yılı antibiyotik kullanım miktarları (DDD)

Yapılan karşılaştırmalar sonucunda; 1 ve 4.yıl ile 5.yıl arasında anlamlı farklılık görüldü. 5.yıl levofloksasin antibiyotik kullanım miktarı, 1 ve 4.yıla göre anlamlı düzeyde daha yüksektir.

Kolistin antibiyotik kullanımı için de yıllar içinde anlamlı farklılık tespit edilmiştir (F=6,679; p=0,003) (Tablo-1). Anlamlı farkın tespiti için yapılan

karşılaştırmalar sonucunda; 1, 2 ve 3.yıl ile 5.yıl arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. 1, 2 ve 3.yıl Kolistin antibiyotik kullanım miktarı, 5.yıla göre anlamlı düzeyde daha yüksektir. 4. yıl ile 5. yıl arasında anlamlı fark bulunamadı ve pandemi dönemi ile ilişkilendirilmedi.

**Tablo 1.** Yıllara göre antibiyotik kullanım miktarlarının karşılaştırılması

Antibiyotik miktarı	1.yıl	2.yıl	3.yıl	4.yıl	5.yıl	p*
Seftriakson	236,06±30,42	174,27±37,69	195,93±10,89	164,59±36,06	150,72±41,00	F=4,069 p=0,020 [1-5]
Piperasilin tazobaktam	48,60±11,63	57,12±3,38	57,65±5,08	68,51±5,38	117,41±34,12	F=11,077 P<0,001 [1,2,3,4-5]
İmipenem	43,91±7,68	39,44±3,33	34,83±8,18	16,46±2,90	31,23±23,60	F=3,135 p=0,046 [1-4]
Meropenem	35,70±6,21	38,59±6,65	43,98±9,17	55,37±6,41	72,26±14,84	F=10,415 P<0,001 [1,2,3-5]
Ertapenem	7,08±2,12	6,86±1,15	9,10±2,86	9,65±2,39	7,11±1,12	F=1,634 p=0,217
Amikasin	7,19±1,92	5,89±1,74	3,59±1,14	3,52±0,65	3,79±1,27	F=5,464 p=0,006 [1-3,4,5]
Siprofloksasin	8,88±3,41	13,67±1,62	10,62±0,99	12,26±1,22	10,11±6,45	F=1,209 p=0,348
Levofloksasin	14,69±3,55	24,61±5,93	23,96±5,53	21,10±6,42	84,14±61,09	F=4,208 p=0,018 [1,4-5]
Moksifloksasin	3,94±1,56	5,92±1,68	4,54±2,23	3,95±1,65	2,96±0,75	F=1,750 p=0,192
Kolistin	15,13±3,32	13,21±1,61	13,50±1,36	9,77±2,72	8,46±0,62	F=6,679 p=0,003 [1,2,3-5 [1-4]

\*Normal dağılıma sahip olan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında "ANOVA" test (F-tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır.

### Hastane enfeksiyonlarına sebep olan mikroorganizmaların değişimi

Yıllara göre hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan mikroorganizma oranları değerlendirildi. Yıllara göre *A. baumani*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* yüzdeleri karşılaştırıldı. 2020 yılında

önceki her bir yıla göre *A. baumani*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* oranları arasında farklılık yoktu (p:0,209, p:0,279, p:0,182). *K. pneumoniae* için 2016 yılına göre 2018 ve 2020 yıllarında artış vardı (p:0,021) (Tablo-2). Pandemi dönemine ait mikroorganizma dağılım değişikliği gözlenmedi.

Tablo 2. Yıllara göre hastane enfeksiyonları etkeni olan mikroorganizma oranlarının karşılaştırılması

Değişken	1.yıl	2.yıl	3.yıl	4.yıl	5.yıl	p*	
<i>Acinetobacter baumani</i>	29,1	36,9	32,5	29,8	33,9	0,209	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,2	11,5	9,0	11,6	8,8	0,279	-
<i>Enterobacter spp.</i>	8,9	6,5	6,5	8,2	5,1	0,125	-
<i>E. coli</i>	17,5	20,4	16,0	16,4	15,7	0,182	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16,7	15,7	21,7	17,6	21,5	0,021	[2-3,5]

\*Kruskal-Wallis H test

### Mikroorganizmaların pandemi döneminde direnç oranlarındaki değişim

A. baumannii için 2020 yılında önceki yıllara göre artan bir direnç oranı tespit edilmedi (Tablo-3). P. aeruginosa için 2020 yılında önceki yıllara göre değişen bir direnç oranı tespit edilmedi (Tablo-4). E. coli için yıllara göre piperasilin dirençli suşların oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ( $\chi^2=20,760$ ;  $p<0,001$ ) (Tablo-5). Karşılaştırmalar sonucunda 5.yıldaki piperasilin direnç oranı, 1, 2, 3 ve 4.yıldakine göre anlamlı düzeyde daha yüksek tespit edildi (Şekil-2). K. pneumonia için de yıllara göre piperasilin dirençli suşların farklılık gösterdiği görüldü ( $\chi^2=19,256$ ;  $p=0,001$ ) (Tablo-6). İstatistiksel olarak; 5.yıldaki piperasilin direnç oranı, 1, 2, 3

ve 4.yıldakine göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu (Şekil-2).

### Antibiyotik kullanımı ile direnç değişiminin korelasyonu

Pandeminin başladığı 2020 yılı için önceki dört yıla göre piperasilin+tazobaktam kullanımı artmışken, yine 2020 yılı için önceki dört yıla göre K. pneumoniae ve E. coli için piperasilin direnci anlamlı olarak artış gösterdi. PTZ kullanımı ile K. pneumoniae ve E. coli için piperasilin direnci arasında pozitif korelasyon görüldü ( $p<0,01$ ).

Levofloksasin duyarlılığı rutin olarak çalışılmadığından direnç düzeyindeki değişikliği değerlendirilmedi.

Tablo 3. Acinetobacter baumannii'nin yıllara göre direnç oranlarının karşılaştırılması

	1.yıl		2.yıl		3.yıl		4.yıl		5.yıl		p*
	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	
Amikasin	93,81±6,40	92,8 [80,0-100,0]	97,19±4,26	100,0 [88,9-100,0]	91,49±9,97	92,8 [70,6-100,0]	83,32±16,21	86,6 [60,0-100,0]	84,61±17,56	87,5 [50,0-100,0]	$\chi^2=7,304$ $p=0,121$
Meropenem	93,81±6,40	92,8 [80,0-100,0]	99,40±2,06	100,0 [92,9-100,0]	92,37±6,00	92,6 [82,4-100,0]	89,06±11,11	88,2 [66,7-100,0]	94,04±6,70	96,4 [83,3-100,0]	$\chi^2=11,644$ $p=0,020$ [2-1,3,4]
Imipenem	96,30±6,32	96,2 [80,0-100,0]	99,40±2,06	100,0 [92,9-100,0]	93,38±5,07	92,9 [92,4-100,0]	88,28±11,04	86,6 [73,3-100,0]	96,70±6,43	96,2 [81,8-100,0]	$\chi^2=13,844$ $p=0,008$ [2-3,4]
Kolistin	0,47±1,60	0,0 [0,0-5,7]	2,97±5,21	0,0 [0,0-16,7]	1,19±4,12	0,0 [0,0-14,3]	00,00±0,00	00,0 [00,0-00,0]	00,00±0,00	00,0 [00,0-00,0]	$\chi^2=1,889$ $p=0,756$

\*Normal dağılıma sahip olmayan iki bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında "Mann-Whitney U" test (Z-tablo değeri); üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında "Kruskal-Wallis H" test ( $\chi^2$ -tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır.

Tablo 4. *Pseudomonas aeruginosa*'nın yıllara göre direnç oranlarının karşılaştırılması

Direnç yüzdesi	1.yıl		2.yıl		3.yıl		4.yıl		5.yıl		p*
	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	
Siproflaksasin	75,58±23,62	75,7 [42,9-100,0]	44,19±30,58	33,3 [0,0-100,0]	45,23±29,19	42,2 [0,0-100,0]	41,53±31,68	50,0 [0,0-100,0]	38,33±39,48	42,2 [0,0-100,0]	$\chi^2=10,977$ $p=0,027$ [1-2]
Amikasin	19,09±19,30	17,1 [0,0-50,0]	23,77±17,34	25,0 [0,0-50,0]	25,69±29,61	12,5 [0,0-66,7]	11,25±18,11	0,0 [0,0-50,0]	18,94±32,08	0,0 [0,0-100,0]	$\chi^2=3,453$ $p=0,485$
Piperasilin	41,53±33,59	46,4 [0,0-100,0]	53,33±27,39	50,0 [33,3-100,0]	45,23±24,48	50,0 [0,0-75,0]	49,31±31,76	50,0 [0,0-100,0]	36,51±40,62	25,0 [0,0-100,0]	$\chi^2=1,034$ $p=0,905$
Piperasilin + tazobaktam	29,79±27,87	25,4 [0,0-80,0]	43,63±22,12	33,3 [20,0-100,0]	37,78±24,76	33,3 [0,0-75,0]	45,14±31,76	45,0 [0,0-100,0]	36,51±40,62	25,0 [0,0-100,0]	$\chi^2=2,075$ $p=0,722$
Meropenem	37,07±23,83	41,4 [0,0-75,0]	49,33±20,32	45,0 [28,6-100,0]	37,78±32,68	33,3 [0,0-100,0]	36,81±29,06	36,7 [0,0-100,0]	16,67±32,49	0,0 [0,0-100,0]	$\chi^2=8,908$ $p=0,063$
Imipenem	50,22±28,75	50,0 [0,0-100,0]	50,46±25,74	41,7 [25,0-100,0]	41,02±30,99	33,3 [0,0-100,0]	34,03±30,96	36,7 [0,0-100,0]	25,76±40,39	0,0 [0,0-100,0]	$\chi^2=6,336$ $p=0,175$

\*Normal dağılıma sahip olmayan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında "Kruskal-Wallis H" test ( $\chi^2$ -tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır.

Tablo 5. *E.coli*'nin yıllara göre direnç oranlarının karşılaştırılması

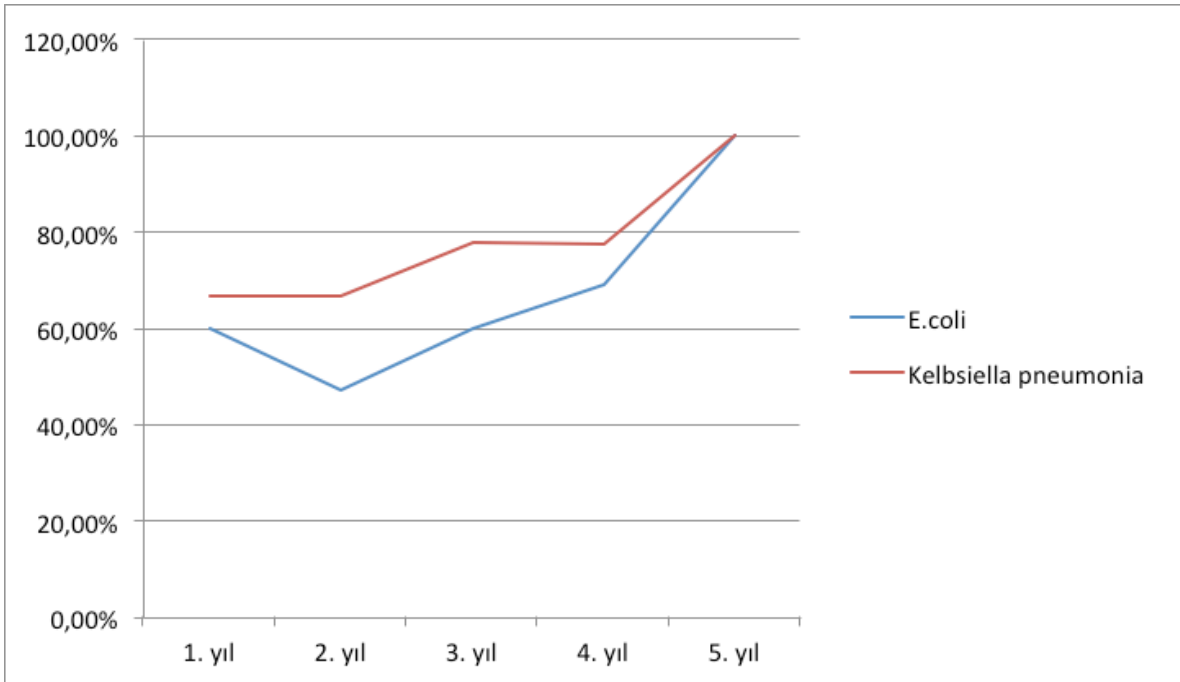
Direnç yüzdesi	1.yıl		2.yıl		3.yıl		4.yıl		5.yıl		p*
	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	
Siproflaksasin	-	-	-	-	57,23±26,67	63,3 [0,0-87,5]	66,87±28,03	66,7 [0,0-100,0]	83,75±19,32	90,0 [50,0-100,0]	$\chi^2=6,714$ $p=0,035$ [3-5]
Amikasin	2,71±6,52	0,0 [0,0-20,0]	7,50±10,01	3,8 [0,0-33,3]	9,19±10,41	6,3 [0,0-28,6]	19,23±30,74	0,0 [0,0-100,0]	12,08±16,58	0,0 [0,0-50,0]	$\chi^2=3,874$ $p=0,423$
Piperasilin	55,63±22,43	60,0 [20,0-100,0]	51,14±19,19	47,2 [25,0-83,3]	53,07±23,86	60,0 [0,0-83,3]	67,31±28,71	69,0 [0,0-100,0]	91,36±12,06	100,0 [75,0-100,0]	$\chi^2=20,760$ $P<0,001$ [1,2,3,4-5]
Piperasilin + tazobaktam	37,64±19,18	33,3 [20,0-80,0]	28,57±15,69	31,0 [0,0-50,0]	40,38±18,14	41,4 [0,0-66,7]	54,19±29,14	50,0 [0,0-100,0]	36,57±28,42	25,0 [0,0-100,0]	$\chi^2=7,681$ $p=0,104$
Meropenem	6,31±10,82	0,0 [0,0-33,3]	6,30±7,95	0,0 [0,0-18,2]	5,14±9,47	0,0 [0,0-25,0]	11,14±15,31	3,8 [0,0-50,0]	5,36±10,04	0,0 [0,0-25,0]	$\chi^2=1,889$ $p=0,756$
Imipenem	4,44±6,87	0,0 [0,0-16,7]	5,14±7,70	0,0 [0,0-18,2]	5,49±8,26	0,0 [0,0-20,0]	10,64±19,31	0,0 [0,0-50,0]	3,27±7,98	0,0 [0,0-25,0]	$\chi^2=1,172$ $p=0,883$
Seftriakson	54,17±19,84	50,0 [20,0-83,3]	55,38±24,35	61,1 [0,0-92,3]	63,87±24,53	69,0 [0,0-87,5]	69,62±27,28	69,00 [0,0-100,0]	74,72±28,35	75,0 [0,0-100,0]	$\chi^2=9,720$ $p=0,045$ [1,2-5]

\*Normal dağılıma sahip olmayan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında "Kruskal-Wallis H" test ( $\chi^2$ -tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır.

Tablo 6. *Klebsiella pneumoniae*'nin yıllara göre direnç oranlarının karşılaştırılması

Direnç yüzdesi	1.yıl		2.yıl		3.yıl		4.yıl		5.yıl		p*
	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	$\bar{X} \pm S.S$	Medyan [Min-Max]	
Siproflaksasin	68,98±21,77	66,7 [33,3-100,0]	65,88±19,64	66,7 [33,3-100,0]	74,58±18,50	75,0 [40,0-100,0]	72,34±16,20	70,7 [50,0-100,0]	77,42±28,86	80,4 [0,0-100,0]	$\chi^2=3,804$ p=0,433
Amikasin	31,96±20,63	33,3 [0,0-63,6]	17,57±15,25	19,4 [0,0-40,0]	15,16±14,48	13,3 [0,0-40,0]	18,69±15,07	20,8 [0,0-50,0]	27,00±17,04	29,2 [0,0-50,0]	$\chi^2=7,362$ p=0,423
Piperasilin	66,34±19,53	66,7 [33,3-100,0]	70,13±20,40	66,7 [40,0-100,0]	75,54±16,05	77,8 [42,9-100,0]	77,69±20,21	77,5 [50,0-100,0]	97,42±6,04	100,0 [83,3-100,0]	$\chi^2=19,256$ P<0,001 [1,2,3,4-5]
Piperasilin + tazobaktam	65,81±18,71	66,7 [33,3-100,0]	64,28±19,60	66,7 [33,3-100,0]	73,31±19,26	77,8 [28,6-100,0]	65,06±24,90	75,0 [0,0-90,0]	77,90±28,33	77,5 [0,0-100,0]	$\chi^2=5,569$ p=0,234
Meropenem	37,51±19,90	36,7 [0,0-66,7]	30,86±22,35	29,2 [0,0-80,0]	49,53±14,82	50,0 [28,6-66,7]	38,65±19,12	45,0 [0,0-66,7]	50,17±30,58	50,0 [0,0-100,0]	$\chi^2=6,665$ p=0,155
Imipenem	35,98±21,01	36,7 [0,0-66,7]	30,23±19,65	29,2 [0,0-60,0]	43,52±15,07	41,0 [25,0-66,7]	32,82±19,57	33,3 [0,0-57,1]	50,46±33,25	45,0 [0,0-100,0]	$\chi^2=4,161$ p=0,385
Seftriakson	83,96±12,85	82,9 [66,7-100,0]	74,56±17,75	70,8 [50,0-100,0]	79,28±16,32	81,7 [50,0-100,0]	85,14±17,52	91,7 [50,0-100,0]	84,92±26,69	100,0 [0,0-100,0]	$\chi^2=5,974$ p=0,201

\*Normal dağılıma sahip olmayan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında "Kruskal-Wallis H" test ( $\chi^2$ -tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır.

Şekil 2. *E.coli* ve *Klebsiella pneumoniae* yıllara göre piperacilin direnç değişimi



## TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda PTZ ve levofloksasin kullanımının pandemi dönemince ciddi boyutlarda arttığı tespit edildi. Buna karşılık artan antibiyotik kullanımına oranla mikroorganizmalarda artan bir direnç oranı görülmedi. Bu çalışma pandemi döneminde antibiyotik kullanımındaki değişikliğinin, antibiyotik direnci düzeylerindeki kısa vadeli etkisini göstermektedir. Buna rağmen bu sonuçlar, antimikrobiyal direnç gelişiminde artan antibiyotik kullanımının etkisini tekrar düşünmeye sevk etmektedir.

Pandemi döneminde hastanemizde kullanılan antibiyotiklerden PTZ ve levofloksasin kullanım miktarında belirgin artış vardı. Levofloksasin toplum kökenli pnömonilerde rehberler tarafında ampirik tedavide önerilmektedir (13). PTZ ise çoklu ilaç direnci olan mikroorganizmalar için risk taşıyan hastalarda antipseudomonal betalaktam olarak önerilmektedir (14). Hastanelere pandemi süresince başvuran pnömoni hastalarındaki artış, pnömoni tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin tüketiminde artışı yanında getirmiştir. Langford ve arkadaşları tarafından yürütülen bir metaanaliz çalışmasında 2020 yılı Nisan ayından önce covid 19 nedeniyle hastaneye yatırılan hastaların %71.9'unun antibiyotik aldığı ancak bunların yalnızca %6.9'unun bakteriyel enfeksiyonlar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (15). Pandemi döneminde COVID-19 için spesifik tedavinin olmaması kritik hastalarda antibiyotik kullanımı yönünde baskıya sebep olmuştur (16). Sağlık sistemi üzerinde oluşan öngörülme boyutlardaki yük sebebiyle sağlık hizmeti sunmakta birçok ülke sorun yaşamakta ve buna bağlı mortalite artmaktadır (17). Pandeminin sağlık sistemi üzerindeki bu artan yük, antimikrobiyal direnç dahil diğer tüm sağlık sorunlarının ikinci plana atılmasının en büyük sebebi gibi görünmektedir (18). Artmış olan PTZ kullanımı, artmış PTZ direncinde anlamlı bir artış söz konusu değildi. Ulusal hastane enfeksiyonları sürveyans ağı (UHESA) verilerine göre 2016-2020 yılları arasında *P. aureginosa*, *K. pneumonia* ve *E. coli* için PTZ direnç

değişimi sırasıyla %48,73-51,62, %74-79,82 ve 49,62-31,97 olup çalışmamıza benzer şekilde belirgin bir farklılık bulunmamaktaydı (19). Önceki çalışmalarda da artan PTZ kullanımının piprasilin+tazobaktam direncini etkilemediği gösterilmişti (20).

Artan levofloksasin kullanımının çalışmamızda siprofloksasin direncini etkilemediği görülmüştür. UHESA verilerinde de *P. aureginosa*, *K. pneumonia* ve *E. coli* için siprofloksasin direnci, 2020 yılında özellikle artan bir eğilim göstermemiştir (19). Sedlakova ve ark. bize benzer şekilde kinolon kullanımı ile siprofloksasin direnci arasında bir ilişki olmadığını göstermişler (21). Literatürde florokinolonların artan kullanımı, gram-negatif basillerde daha yüksek siprofloksasin direnci ile ilişkilendiren çalışmalar da mevcuttur (22,23). Yang ve ark. artan levfloksasin kullanımının da tüm kinolonlara dirençli suşların seçildiğini bildirmişlerdir (24). Aksine Kim ve ark. ise hastaneler arasında kinolon kullanımı ile kinolon direncinin negatif korelasyon gösterdiği bildirdiler (25). Mulder ve ark. siprofloksasin direncini kinolon kullanımı ile ilişkili bulmamış; kalsiyum takviyeleri ve proton pompa inhibitörü kullanımı ile ilişkili bulmuşlardır (26). Antimikrobiyal direnç gelişiminde antibiyotik kullanım miktarı direnç gelişimini sağlayan tek parametre olmadığından, literatürde bu şekilde zıt verileri görmek mümkündür.

Çalışmamızdaki kısıtlılıklar; birincisi, bu çalışma 700 yataklı, 58 yıldır hizmet vermekte olan 3. basamak bir hastanede yapıldı. Bu nedenle, antibiyotik tüketiminin ve antimikrobiyal direnç oranının fazla olduğu bir merkezdi. İkinci olarak, sadece antibiyotik tüketimi ile antimikrobiyal direnç arasındaki ilişki değerlendirildi. Bazı antibiyotiklerin tüketimi, antimikrobiyal direnci tek başına indüklemeyebilir. Üçüncü kısıtlılık ise özellikle pandemi dönemi değerlendirildiği için, son bir yıldaki antibiyotik miktarındaki artış ile antimikrobiyal direnç ilişkisi irdelendi. Pandemi süresinde kullanımı belirgin olarak artmış olan antibiyotikler daha uzun sürede dirençli suşların baskın olarak hastane enfeksiyonu etkeni olabileceğinden optimal sonucu yansıtmayabilir.

Sonuç olarak, antimikrobiyal direnç sorunu pandemi döneminde geri plana itilse bile sağlık sisteminin önündeki en büyük tehditlerden biridir. Antimikrobiyal direnci antibiyotik tüketim miktarı dışında birçok faktörün etkileyebileceğini unutmamak gerekir. Pandemi döneminde artan antibiyotik tüketim

miktarının tetikleyeceği dirençli suşların baskın hale gelme sorunu, önümüzdeki yıllarda daha görünür hale gelecektir ve direnç modellerini yakından takip etmek gerekir. Şüphesiz ki çok merkezli ve daha geniş bir çalışma bu konuda bize daha sağlam veriler sunacaktır.

### ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:28.06.2021 ve Karar No: 114/12).

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Adebisi, Y. A., Jimoh, N. D., Ogunkola, I. O., Uwizeyimana, T., Olayemi, A. H., Ukor, N. A., et al. The use of antibiotics in COVID-19 management: a rapid review of national treatment guidelines in 10 African countries. *Trop Med Health*. 2021;49(1):51.
2. Iwu CJ, Jordan P, Jaja IF, Iwu CD, Wiysonge CS. Treatment of COVID-19: implications for antimicrobial resistance in Africa. *Pan Afr Med J*. 2020;35(2):119.
3. <https://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html>. Accessed date: 6 June 2021.
4. Llor C, Bjerrum L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf*. 2014;5(6):229-41.
5. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. Accessed date: 22 June 2021.
6. Kollef MH. Broad-spectrum antimicrobials and the treatment of serious bacterial infections: getting it right up front. *Clin Infect Dis*. 2008;47(1):3-13 Sabtu N, Enoch DA, Brown NM. Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? *British Medical Bulletin*, 2015;116:105-13.
7. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Accessed date: 15 June 2021.
8. Sabtu, N., Enoch, D. A., Brown, N. M. Antibiotic resistance: what, why, where, when and how?. *British medical bulletin*. 2015;116(1):105-113.
9. <https://www.cdc.gov/getsmart/healthcare/pdfs/core-elements.pdf> / Accessed 30 May 2021.
10. [https://www.whocc.no/ddd/definition\\_and\\_general\\_considera/](https://www.whocc.no/ddd/definition_and_general_considera/). Accessed 18 October 2021.
11. <http://www.socinorte.com/wp-content/uploads/2013/03/Criterios-de-IN-2013.pdf>. Accessed 15 May 2021.
12. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_11.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf). Accessed 22 May 2021.
13. Metlay, J. P., Waterer, G. W., Long, A. C., Anzueto, A., Brozek, J., Crothers, K., et al. Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia. An official clinical practice guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2019;200(7):45-67.
14. Kalil, A. C., Metersky, M. L., Klompas, M., Muscedere, J., Sweeney, D. A., Palmer, L. B. et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical Infectious Diseases*, 2016; 63(5):61-111.
15. <https://www.idsociety.org/covid-19-real-time-learning-network/disease-manifestations--complications/co-infection-and-Antimicrobial-Stewardship/>. Accessed 25 June 2021.
16. Nieuwlaat, R., Mbuagbaw, L., Mertz, D., Burrows, L. L., Bowdish, D. M., Moja, L., et al. Coronavirus Disease 2019 and antimicrobial resistance: parallel and interacting health emergencies. *Clinical Infectious Diseases*, 2021;72(9):1657-9.
17. Hamid, H., Abid, Z., Amir, A., Rehman, T. U., Akram, W., & Mehboob, T. Current burden on healthcare systems in low-and middle-income countries: recommendations for emergency care of COVID-19. *Drugs & Therapy Perspectives*, 2020;36(10):466-8.
18. Blandino, G. Cancer at the time of the COVID-19 hurricane. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2020;39(1):74.
19. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/bulasici-hastaliklar/shie/shie-liste/shie-raporlar.html>. Accessed 30 May 2021.
20. Lee, J., Oh, C. E., Choi, E. H., Lee, H. J. The impact of the increased use of piperacillin/tazobactam on the selection of antibiotic resistance among invasive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *International Journal of Infectious Diseases*, 2103; 17(8): e638-e643.

21. Sedláková MH, Urbánek K, Vojtová V, Suchánková H, Imwensi P, Kolář M. Antibiotic consumption and its influence on the resistance in Enterobacteriaceae. *BMC Res Notes*. 2014;7:454.
22. Zemkova M, Kotlarova J, Merka V, Cermak P, Vlcek J, Jebavy L. Emergence of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates at the department of clinical hematology. *New Microbiol*. 2007;30(4):423-30.
23. Merlin, C. Reducing the consumption of antibiotics: would that be enough to slow down the dissemination of resistances in the downstream environment?. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:33.
24. Yang, P., Chen, Y., Jiang, S., Shen, P., Lu, X., Xiao, Y. Association between the rate of fluoroquinolones-resistant gram-negative bacteria and antibiotic consumption from China based on 145 tertiary hospitals data in 2014. *BMC infectious diseases*, 2020, 20(1):269.
25. Kim, B., Kim, Y., Hwang, H., Kim, J., Kim, S.W. and Bae, I.G. (2018) Trends and Correlation between Antibiotic Usage and Resistance Pattern among Hospitalized Patients at University Hospitals in Korea, 2004 to 2012: A Nationwide Multicenter Study. *Medicine*, 97, e13719.
26. MULDER, Marlies, et al. Risk factors for resistance to ciprofloxacin in community-acquired urinary tract infections due to *Escherichia coli* in an elderly population. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 72.1: 281-HŞ9.

## COVID-19 costs: an example of province in Turkey

### COVID-19 maliyetleri; Türkiye’de bir il örneği

Hüseyin ASLAN<sup>1</sup> (ID), İsmail ŞİMŞİR<sup>1</sup> (ID), Elif KÖSE<sup>1</sup> (ID), Gülsen TOPAKTAŞ<sup>2</sup> (ID)

#### ABSTRACT

**Objective:** The Coronavirus Disease (COVID-19) pandemic continues to negatively affect Turkey, as it does many other areas all over the world. One effect of COVID 19 has been the significant expenditure increases in health services in post-pandemic countries. Our aim for this study was the following: determining the frequency of outpatient, inpatient, and intensive care treatment in COVID-19 cases, the factors affecting the rates of inpatient and, intensive care treatments, and examining the changes in healthcare costs according to patient characteristics.

**Methods:** This research is a cross-sectional record review. The universe of this study is composed of outpatients and inpatients that have been treated after being diagnosed with COVID 19 as from March 11, the date the pandemic was first seen in Turkey, to November 30, 2020. Within the scope of the study, data relating to the COVID-19 diagnosis, comorbidity, age (<50 and ≥50), and gender were obtained from all primary, secondary, and tertiary healthcare institutions in the province.

**Results:** When the invoices of the inpatients who received no intensive care treatment were examined, it was found that the bills of the male patients aged 50 years

#### ÖZET

**Amaç:** Coronavirüs Hastalığı (COVID-19) pandemisinin tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de olumsuz etkili olmuştur. COVID 19’un etkilerinden biri, pandemi sonrası ülkelerde sağlık hizmetlerinde yapılan önemli harcama artışları olmuştur. Bu çalışmadaki amacımız; COVID 19 vakalarında ayaktan, yatarak ve yoğun bakımda tedavi sıklığını, yatarak ve yoğun bakım tedavi oranlarını etkileyen faktörleri belirlemek ve hasta özelliklerine göre sağlık bakım maliyetlerindeki değişimleri incelemektir.

**Yöntem:** Bu araştırma, kesitsel bir kayıt incelemesidir. Bu çalışmanın evrenini, pandeminin Türkiye’de ilk görüldüğü 11 Mart 2020 tarihinden 30 Kasım 2020 tarihine kadar COVID-19 tanısı konularak tedavi gören, ayaktan ve yatarak tedavi gören hastalar oluşturmaktadır. Sakarya ilindeki tüm birinci, ikinci ve üçüncü basamak sağlık kuruluşlarından COVID-19 tanısı, komorbidite, yaş (<50 ve ≥50) ve cinsiyet bilgileri alınmıştır.

**Bulgular:** Yatarak tedavi alan hastalardan hiç yoğun bakım tedavisi almayanların hasta faturalarına bakıldığında 50 yaş ve üzeri erkek ve komorbiditesi olan hastaların faturalarının istatistiksel olarak anlamlı

<sup>1</sup>Sakarya University of Applied Sciences, Faculty of Health Sciences, Department of Health Management, Sakarya  
<sup>2</sup>Ministry of Health, General Directorate of Health Services, Department of Education and Certification, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Gülsen TOPAKTAŞ

Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Eğitim ve Sertifikasyon Dai. Başk., Ankara - Türkiye  
E-posta / E-mail : gulsentopaktass@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 28.02.2022  
Kabul Tarihi / Accepted : 07.03.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.17048

Aslan H, Şimşir İ, Köse E, Topaktaş G. COVID-19 costs: an example of province in Turkey  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(2): 187 - 198

and older and those with comorbidities were statistically significantly higher. In the patient groups receiving both clinical and intensive care, the mean amount of invoices of female patients and those aged 50 and older were found to be higher ( $p < 0.05$ ). In addition to, In all other patient groups, it has been determined that the invoice amounts are below the patient costs, that is, the invoice amounts do not cover the patient cost.

**Conclusion:** The disease is more severe in those aged 50 and older, those with comorbidities, and it is more severe and more common in males. Consequently, bill amounts and costs of these patients were found to be higher than those of the opposing groups. As a result, the rate of men getting the COVID-19 disease is higher than women. The disease is more severe in males in hospitalized patients, in  $\geq 50$  age group, and in patients with comorbidities. In parallel with these, the invoice amounts and costs of these patients are higher than the opposite groups. In general, the treatment costs of the patients are higher than the invoice amounts and they carry great risks for the future in ensuring the sustainability of the service. Ensuring sustainability in healthcare services depends on the ability of healthcare institutions to obtain invoices to cover their costs. COVID-19 not only creates a big economic burden for reimbursement institutions but also brings a great economic burden for the institutions that provide the service.

**Key Words:** COVID-19, cost, Turkey

derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Hem klinik hem de yoğun bakımda tedavi alan hasta gruplarında ise kadın hastaların, 50 yaş ve üzerindekiilerin fatura ortalamaları yüksek saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Ayrıca, diğer tüm hasta gruplarında fatura tutarlarının, hasta maliyetlerinin altında olduğu yani fatura tutarlarının hasta maliyetini karşılamadığı tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Hastalık 50 yaş ve üzerindekiilerde, ek hastalığı olanlarda daha şiddetli; erkeklerde ise hem daha şiddetli ve hem de daha sık görülmektedir. Sonuç olarak bu hastaların fatura tutarları ve maliyetleri, kıyasladığımız gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, erkeklerin COVID-19 hastalığına yakalanma oranı kadınlardan daha yüksektir. Hastalık hastanede yatan,  $\geq 50$  yaş grubunda ve komorbiditesi olan erkek hastalarda daha şiddetli seyretmektedir. Bunlara paralel olarak bu hastaların fatura tutarları ve maliyetleri kıyaslanan gruplara göre daha yüksektir. Genel olarak hastaların tedavi maliyetleri fatura tutarlarından daha yüksek olup hizmetin sürdürülebilirliğini sağlamada gelecek için büyük riskler taşımaktadır. Sağlık hizmetlerinde sürdürülebilirliğin sağlanması, sağlık kurumlarının maliyetlerini karşılayacak ücret alabilmelerine bağlıdır. COVID-19, geri ödeme kurumları için büyük ekonomik yük oluşturması yanında hizmet veren kurumlara da büyük bir ekonomik yük getirmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, maliyet, Türkiye

## INTRODUCTION

COVID-19, the biggest epidemic of the twenty-first century, had major negative effects on public health and its systems. As soon as COVID-19 threatening public health started, countries have experienced major disruptions in the management of COVID-19

cases, the provision of routine health services and health financing. With the onset and rapid spread of the pandemic, patient beds and intensive care beds, which were initially reserved for ordinary healthcare services, started to serve pandemic patients with special arrangements (Bhatt et al., 2020; Tandon et al., 2020). It is known that countries have increased

health expenditures in the post-pandemic era. With the emergence of the pandemic, it is thought that there is an increase in both public health expenditures and out-of-pocket health expenditures (Tandon et al., 2020).

COVID-19 is a disease with a high rate of acute respiratory distress and multiple organ failure and death in advanced stages (Chen et al., 2020). It is stated that COVID-19 is more severe and has worse outcomes, especially in people with diabetes, hypertension, chronic heart disease, respiratory diseases, and middle-aged to elderly patients (Bhatt et al., 2020; Garg et al., 2020; Liu et al., 2020; Muniyappa & Gubbi, 2020; Nurchis et al., 2020; Wang et al., 2020). In addition, there is information indicating the disease is more severe and has a higher mortality rate in patients with cancer (Robilotti et al., 2020). Therefore, it is thought that the rate and cost of inpatient treatment and the need for intensive care treatment are higher in patients who have underlying conditions. This is because hospitalization in the ICU generally costs 3-4 times more than the general ward on daily bases (Oostenbrink et al., 2003)

Covid-19 was first diagnosed on March 11th, 2020 and there isn't any official information relating to anyone who caught the disease before that date in Turkey (T.C. Sağlık Bakanlığı COVID-19 Bilgilendirme Platformu, 2020). COVID-19 cases in Turkey are treated according to the condition of the patient, not regarding whether they are an inpatient or an outpatient. The physician decides on the method of treatment according to the clinical condition of the patient, taking into account the existing chronic diseases and age. It is known that the medical characteristics and needs of outpatient patients, inpatients or in need of intensive care as well as their treatment costs are different from each other (Jin et al., 2021).

The COVID-19 pandemic has had major negative consequences on both health financing systems and healthcare institutions worldwide. The rapid spread of the disease, the lack of a well-defined treatment,

the necessity of intensive care treatment in patients, and the long hospitalization periods create an unexpected burden on the healthcare financing systems of countries. The treatment of COVID-19 is very costly for service providers, and for sustainable health services, healthcare providers are required to receive an invoice amount from healthcare financing institutions in a ratio that is adequate to cover the cost. Efficient use of resources is required in terms of effective delivery of health services (Tandon et al., 2020).

In this study, our aim is to determine the frequency of outpatient, inpatient, and intensive care treatment of COVID-19 cases, and to determine the factors affecting the rates of inpatient and intensive care treatments, along with examining the changes in healthcare costs according to the patient characteristics.

## MATERIAL and METHOD

This research is a cross-sectional record review. The universe of this study is composed of outpatients and inpatients that have been treated after being diagnosed with COVID-19 from March 11, the date the pandemic was first seen in Turkey, to November 30, 2020. The permission required for the research was obtained from the Ministry of Health of Turkey (MoH), Sakarya University Non-Invasive Ethics Committee of Medicine Faculty (Date: 04.09.2020 and Number: 715522473/050.01.04/467)

The data for this research was obtained from the Information Processing Unit of the Sakarya Provincial Health Directorate. Within the scope of the study, data relating to COVID-19 diagnosis, comorbidity, age (<50 and ≥50), and gender were obtained from all primary, secondary, and tertiary healthcare institutions in Sakarya Province between a specified date ranges. Patients' diagnoses; Obtained according to ICD10 as Hypertensive diseases (I10-I15), ischemic heart diseases (I20-I25), Malignant neoplasms (C00-C96), Diabetes disease (E09-E14), and Chronic

renal failure (N18) and included in the analysis. In addition, invoice and cost data of inpatients were also obtained. The Social Security Institution (SGK) determines the pricing of health services in Turkey. The prices of drugs, medical equipment/devices, laboratory services, radiology services, and all medical services used for patient treatments are determined according to the Health Implementation Communiqué (SUT) issued by the SGK. Health institutions invoice all the services they provide, all medicines and medical supplies they use at these SUT prices. However, according to the invoicing rules of the SGK, there are some billing restrictions to prevent the health expenditures from showing too much. Institutions providing health services record their health services with SUT prices, but they cannot reflect all of them on the invoice due to invoicing limitations.

In this study, patient costs were calculated over the total amount of all medications, medical supplies, laboratory services, radiology services, and all other medical services used according to the SUT prices. The invoice amounts were obtained from the invoices issued by the health service institutions to the SGK. Then the calculations were converted to dollar-denominated, based on the Central Bank of the Republic of Turkey's (TCMB) buying rate of exchange of USDs in 2020, which was 7.01 Turkish Liras.

### Statistical Analysis

In the first stage of the study, the descriptive characteristics of all patients who received outpatient and inpatient treatments were examined, categorical data were expressed as numbers and percentages, and continuous variables were expressed as mean  $\pm$  SD. The  $2 \times 2$   $\chi^2$  test was used to compare the hospitalization rates of the patient groups and to determine whether the status of receiving intensive care treatment differs according to patient characteristics. The Mann-Whitney U test was used to determine whether patients' invoices and costs varied with patient characteristics. The confidence interval in the study was determined as

95%, significance value was determined as  $p < 0.05$  (Alpar, 2020).

## RESULTS

In Table 1, descriptive information about gender, age, malignant neoplasm and chronic disease groups for all outpatients and inpatients and the  $\chi^2$  test analysis results regarding the comparison of hospitalization rates of these patient groups are given. According to the results of the study; it can be said that the hospitalization rate of female patients (5.1%) is higher than that of male patients (4.8%), and this is statistically significant ( $\chi^2=2.806$ ;  $p<0.05$ ).

Male patients (55.1%) were found to have higher rates of inpatient treatment than females, and patients aged 50 years and older (67.5%) than patients under the age of 50. Of the inpatients, 7.6% consist of hypertensive disease, 3.3% ischemic heart disease, 1.6% malignant neoplasm, 6.4% diabetes, and 2.6% chronic renal failure. According to these results, hospitalization rates were found to be higher in male patients,  $\geq 50$  age group, along with patient groups with hypertension, neoplasm, diabetes and chronic kidney diseases, compared to the opposite groups.

Descriptive statistics and  $\chi^2$  test analysis results of patient groups pertaining to all patients receiving treatment in clinical and intensive care are given in Table 2. According to the findings shown in Table 2, the rate of receiving intensive care treatment in male patients aged over 50 years with hypertension, heart disease, diabetes, and chronic kidney disease was found to be higher than the patients in the opposite group. Fig 1. Bar Chart of number of inpatients and outpatients and hospitalization rate by months (1 March- 30 November 2020). It can be said that the overall number of patients increased generally during the period between March 11, when the first COVID-19 case was seen in Turkey, and November 30, 2020. The low number of tests in the first months of the disease and the fact that the first months coincide with the



**Table 1.** Comparison of hospitalization rates of COVID-19 patients according to demographic and medical features

Patient Groups	Outpatient Treatment (n / %)	Inpatient Treatment (n / %)	Total (n / %)	$\chi^2$	df	p
Female	56110 / 43.8	2983 / 44.9	59093 / 43.9	2.806	1	0.048*
Male	71883 / 56.2	3663 / 55.1	75546 / 56.1			
<50 age	97281 / 76.0	2160 / 32.5	99441 / 73.9	6192,928	1	<0.001*
≥50 age	30712 / 24.0	4486 / 67.5	35198 / 26.1			
Hypertensive Diseases (no)	125051 / 97.7	6144 / 92.4	131195 / 97.4	699,936	1	<0.001*
Hypertensive Diseases (yes)	2942 / 2.3	502 / 7.6	3444 / 2.6			
Ischemic Heart Diseases (no)	127006 / 99.2	6424 / 96.7	133430 / 99.1	468,641	1	<0.001*
Ischemic Heart Diseases (yes)	987 / 0.8	222 / 3.3	1209 / 0.9			
Malignant Neoplasms (no)	127584 / 99.7	6542 / 98.4	134126 / 99.6	258,129	1	<0.001*
Malignant Neoplasms (yes)	409 / 0.3	104 / 1.6	513 / 0.4			
Diabetes Mellitus (no)	125651 / 98.2	6218 / 93.6	131869 / 97.9	666,392	1	<0.001*
Diabetes Mellitus (yes)	2342 / 1.8	428 / 6.4	2770 / 2.1			
Chronic Renal Failure (no)	127565 / 99.7	6476 / 97.4	134041 / 99.6	706,427	1	<0.001*
Chronic Renal Failure (yes)	428 / 0.3	170 / 2.6	598 / 0.4			
Total	127993 / 100.0	6646 / 100.0	134639 / 100.0			

\*p&lt;0,05

**Table 2.** Clinical and intensive care treatment distributions according to the demographic and medical characteristics of the patients

Patient Groups	Clinic (n / %)	Clinic + Intensive Care (n / %)	$\chi^2$	df	p	
Female	2686 / 90.0	297 / 10.0	2983 / 100.0	16.553	1	<0.001*
Male	3180 / 86.8	483 / 13.2	3663 / 100.0			
<50 age	2035 / 94.2	125 / 5.8	2160 / 100.0	109.340	1	<0.001*
≥50 age	3831 / 85.4	655 / 14.6	4486 / 100.0			
Hypertensive Diseases (no)	5451 / 88.7	693 / 11.3	6144 / 100.0	16.405	1	<0.001*
Hypertensive Diseases (yes)	415 / 82.7	87 / 17.3	502 / 100.0			
Ischemic Heart Diseases (no)	5692 / 88.6	732 / 11.4	6424 / 100.0	21.665	1	<0.001*
Ischemic Heart Diseases (yes)	174 / 78.4	48 / 21.6	222 / 100.0			
Malignant Neoplasms (no)	5788 / 88.5	754 / 11.5	6542 / 100.0	17.943	1	<0.001*
Malignant Neoplasms (yes)	78 / 75.0	26 / 25.0	104 / 100.0			
Diabetes Mellitus (no)	5523 / 88.8	695 / 11.2	6218 / 100.0	29.142	1	<0.001*
Diabetes Mellitus (yes)	343 / 80.1	85 / 19.9	428 / 100.0			
Chronic Renal Failure (no)	5732 / 88.5	744 / 11.5	6476 / 100.0	15.009	1	<0.001*
Chronic Renal Failure (yes)	134 / 78.8	36 / 21.2	170 / 100.0			
Total	5866 / 88.3	780 / 11.7	6646 / 100.0			

\*p&lt;0,05

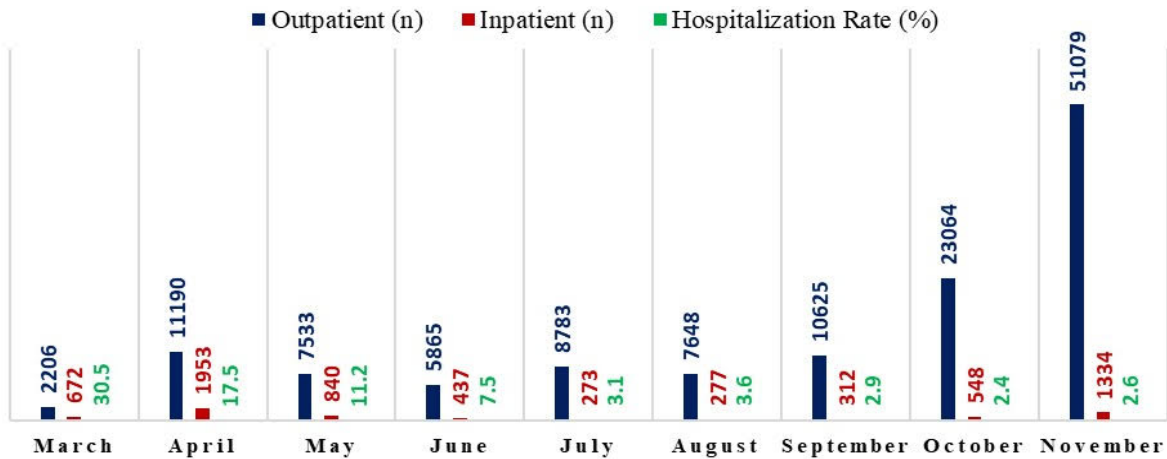


Figure 1. Bar chart of number of inpatients and utpatients and hospitalization rate by months (1 March - 30 November 2020)

summer months may be a partial explanation for the prevalence of the disease and the low number of patients seen in the first months. However, it is evident that the disease started to increase rapidly in the autumn months. When we look at the rates of inpatient treatment in patients with COVID-19, it is seen that there is a decrease over the months. Uncertain situations such as the disease being new worldwide and not knowing how to treat it can be said to be effective in this (See, Fig 1).

When the invoices of the inpatients who received no intensive care treatment were examined (See Table 3), it is found that the amounts of the invoices of male patients, patients aged over 50 years, and patients with hypertensive disease, ischemic heart disease, malignant neoplasm disease, diabetes and chronic kidney failure in diagnosis groups were higher than those of the opposite group patients. It was concluded that the average bill amount of the female patients was higher than that of the male patients, and the bills of the patients aged over 50 years were higher than the patients aged under 50 years in the patient groups treated in the intensive care unit. However, the difference between the invoice amounts of the patients with hypertension disease, ischemic heart disease, malignant neoplasm disease,

diabetes and kidney failure disease and those who do not have was found to be not statistically significant.

Comparison of patient costs by patient groups is given in Table 4. For patients who received only clinical treatment, the difference between the costs of male and female patients was not statistically significant. Despite that, the costs of the patient groups aged over 50 years, patients with hypertension, heart disease, neoplasm, diabetes, and chronic renal failure were higher than the opposite groups. In the patient groups receiving intensive care treatment, only the cost of patients aged over 50 years was found to be higher and statistically significant compared to patients under 50 years. On the other hand, the cost differences in the other groups were not statistically significant.

The results pertaining to the average invoice amounts by patient groups and their average costs calculated according to SUT prices along with cost coverage rates of patient invoices of the patients who received COVID-19 treatment are given in Table 5. While cost coverage rates of invoices are around 93% in patients receiving only clinical treatment, this rate is around 79% in patients receiving both clinical and intensive care treatment. It was found that the average bill amount was higher than the average

costs (approximately 121%) in patients who received treatment only in the clinic and were diagnosed with malignant neoplasms. In all other patient groups, it

has been determined that the invoice amounts are below the patient costs, that is, the invoice amounts do not cover the patient costs.

**Table 3.** Comparison of invoice amounts of patients receiving treatment only in clinics and both clinical and intensive care according to patient groups

Clinic Patient Groups	N	Mean (\$)	Sum (\$)	U	z	p
Female	2686	845.7	2271611.3	4098976	-2.658	0.008*
Male	3180	941.2	2992952.2			
<50 age	2035	552.4	1124047.7	2419721	-23.945	<0.001*
≥50 age	3831	1080.8	4140515.8			
Hypertensive Diseases (no)	5451	872.7	4757102.7	822980	-9.264	<0.001*
Hypertensive Diseases (yes)	415	1222.8	507460.8			
Ischemic Heart Diseases (no)	5692	880.8	5013248.4	335269	-7.268	<0.001*
Ischemic Heart Diseases (yes)	174	1444.3	251315.1			
Malignant Neoplasms (no)	5788	886.3	5130034.2	159375	-4.466	<0.001*
Malignant Neoplasms (yes)	78	1724.7	134529.3			
Diabetes Mellitus (no)	5523	866.9	4787756.9	648903	-9.801	<0.001*
Diabetes Mellitus (yes)	343	1390.1	476806.6			
Chronic Renal Failure (no)	5732	881.6	5053498.8	254842	-6.667	<0.001*
Chronic Renal Failure (yes)	134	1575.1	211064.7			
Total	5866	897.5	5264563.5			
Clinic + Intensive Care Patient Groups	N	Mean (\$)	Sum (\$)	U	z	p
Female	297	2580.0	766268.6	66219	-1.802	0.070
Male	483	2117.8	1022912.7			
<50 age	125	1614.9	201865.2	28076	-5.572	<0.001*
≥50 age	655	2423.4	1587316.1			
Hypertensive Diseases (no)	693	2290.4	1587277.1	28053	-1.056	0.291
Hypertensive Diseases (yes)	87	2320.7	201904.2			
Ischemic Heart Diseases (no)	732	2309.9	1690829.7	16879	-0.456	0.649
Ischemic Heart Diseases (yes)	48	2049.0	98351.6			
Malignant Neoplasms (no)	754	2295.3	1730647.1	9227	-0.509	0.611
Malignant Neoplasms (yes)	26	2251.3	58534.2			
Diabetes Mellitus (no)	695	2262.3	1572274.7	26753	-1.420	0.156
Diabetes Mellitus (yes)	85	2551.8	216906.6			
Chronic Renal Failure (no)	744	2287.5	1701933.0	12647	-0.564	0.573
Chronic Renal Failure (yes)	36	2423.6	87248.3			
Total	780	2293.8	1789181.3			

\*p<0,05

**Table 4.** Comparison of costs of patients receiving treatment only in clinics and both clinical and intensive care according to patient groups

Clinic Patient Groups	N	Mean (\$)	Sum (\$)	U	z	p
Female	2686	910.8	2446354.0	4218573	-0.807	0.420
Male	3180	1006.5	3200739.1			
<50 age	2035	637.6	1297610.7	2717129	-19.128	<0.001*
≥50 age	3831	1135.3	4349482.3			
Hypertensive Diseases (no)	5451	936.4	5104057.6	876920	-7.642	<0.001*
Hypertensive Diseases (yes)	415	1308.5	543035.4			
Ischemic Heart Diseases (no)	5692	944.9	5378178.8	365389	-5.899	<0.001*
Ischemic Heart Diseases (yes)	174	1545.5	268914.2			
Malignant Neoplasms (no)	5788	956.5	5536191.6	182643	-2.900	0.004*
Malignant Neoplasms (yes)	78	1421.8	110901.4			
Diabetes Mellitus (no)	5523	935.2	5165197.2	700325	-8.112	<0.001*
Diabetes Mellitus (yes)	343	1404.9	481895.8			
Chronic Renal Failure (no)	5732	945.3	5418584.8	269908	-5.890	<0.001*
Chronic Renal Failure (yes)	134	1705.3	228508.2			
<b>Total</b>	<b>5866</b>	<b>962.7</b>	<b>5647093.0</b>			
Clinic + Intensive Care Patient Groups	N	Mean (\$)	Sum (\$)	U	z	p
Female	297	2986.6	887011.1	66204	-1.807	0.071
Male	483	2825.2	1364587.0			
<50 age	125	2352.9	294110.0	29297	-5.043	<0.001*
≥50 age	655	2988.5	1957488.0			
Hypertensive Diseases (no)	693	2890.6	2003209.0	29773	-0.188	0.851
Hypertensive Diseases (yes)	87	2855.0	248389.0			
Ischemic Heart Diseases (no)	732	2905.0	2126423.6	16898	-0.443	0.658
Ischemic Heart Diseases (yes)	48	2607.8	125174.4			
Malignant Neoplasms (no)	754	2847.3	2146840.2	8849	-0.844	0.399
Malignant Neoplasms (yes)	26	4029.1	104757.8			
Diabetes Mellitus (no)	695	2907.1	2020432.3	27970	-0.799	0.424
Diabetes Mellitus (yes)	85	2719.6	231165.7			
Chronic Renal Failure (no)	744	2886.8	2147770.2	13190	-0.153	0.878
Chronic Renal Failure (yes)	36	2884.1	103827.8			
<b>Total</b>	<b>780</b>	<b>2886.7</b>	<b>2251598.0</b>			

\*p&lt;0,05

Table 5. Cost coverage rates of patient invoices according to patient groups

Clinic Patient Groups	N	Mean (invoice) (\$)	Mean (cost) (\$)	Cost coverage ratio of the invoice (%)
Female	2686	845.7	910.8	92.86
Male	3180	941.2	1006.5	93.51
<50 age	2035	552.4	637.6	86.62
≥50 age	3831	1080.8	1135.3	95.20
Hypertensive Diseases (no)	5451	872.7	936.4	93.20
Hypertensive Diseases (yes)	415	1222.8	1308.5	93.45
Ischemic Heart Diseases (no)	5692	880.8	944.9	93.21
Ischemic Heart Diseases (yes)	174	1444.3	1545.5	93.46
Malignant Neoplasms (no)	5788	886.3	956.5	92.66
Malignant Neoplasms (yes)	78	1724.7	1421.8	121.31
Diabetes Mellitus (no)	5523	866.9	935.2	92.69
Diabetes Mellitus (yes)	343	1390.1	1404.9	98.94
Chronic Renal Failure (no)	5732	881.6	945.3	93.26
Chronic Renal Failure (yes)	134	1575.1	1705.3	92.37
<b>Total</b>	<b>5866</b>	<b>897.5</b>	<b>962.7</b>	<b>93.23</b>
Clinic + Intensive Care Patient Groups	N	Mean (invoice) (\$)	Mean (cost) (\$)	Cost coverage ratio of the invoice (%)
Female	297	2580.0	2986.6	86.39
Male	483	2117.8	2825.2	74.96
<50 age	125	1614.9	2352.9	68.64
≥50 age	655	2423.4	2988.5	81.09
Hypertensive Diseases (no)	693	2290.4	2890.6	79.24
Hypertensive Diseases (yes)	87	2320.7	2855.0	81.29
Ischemic Heart Diseases (no)	732	2309.9	2905.0	79.52
Ischemic Heart Diseases (yes)	48	2049.0	2607.8	78.57
Malignant Neoplasms (no)	754	2295.3	2847.3	80.61
Malignant Neoplasms (yes)	26	2251.3	4029.1	55.88
Diabetes Mellitus (no)	695	2262.3	2907.1	77.82
Diabetes Mellitus (yes)	85	2551.8	2719.6	93.83
Chronic Renal Failure (no)	744	2287.5	2886.8	79.24
Chronic Renal Failure (yes)	36	2423.6	2884.1	84.03
<b>Total</b>	<b>780</b>	<b>2293.8</b>	<b>2886.7</b>	<b>79.46</b>

### Strengths and limitations of the study

This is the first study to evaluate the costs in Turkey. Therefore, it is valuable in terms of guiding the planning. The first limitation of the research is that it is conducted in only one province. The second limitation is that treatment costs are calculated by SUT prices.

### DISCUSSION and CONCLUSION

The aim of the present study is to determine the frequency of outpatient, inpatient and intensive care treatment of COVID-19 cases to determine the factors affecting the rates of inpatient, and intensive care treatment, as well as examine the changes in healthcare costs according to patient characteristics.

The originality of the present study lies in the fact that as far as we know we are the first to study and examine the treatment costs, invoice amounts, demographic and medical data concomitantly related to COVID-19 patients in Turkey. In the city, with a population of more than one million, data on COVID-19 costs were obtained from all outpatient and inpatients from all primary, secondary and tertiary healthcare institutions. The comorbidities of the patients, which may have an impact on healthcare costs, were also evaluated. Similar to the literature, it has been found that patients with advanced age, hypertension, ischemic heart disease, cancer, diabetes, and chronic kidney disease have a high frequency of hospitalization, and factors such as these increase the need for intensive care. In the literature, the incidence of COVID-19 is similar in men and women, or slightly higher in men. The course of the disease is more severe in men (Wenham et al., 2020).

According to the results of the research, it can be said that COVID-19 disease is more common in men than women and this finding is compatible with the literature (Bhatt et al., 2020; Liu et al., 2020). Additionally, although the rate of male patients receiving inpatient treatment is lower than that of women, the disease progressed more severely in males and they received more intensive care treatment. This

finding is also compatible with the literature indicating the disease is more severe in male patients (Sharma et al., 2020; Wenham et al., 2020). Saying that the number of patients with at least one or more comorbidity is higher than male patients would be effective in this finding. The majority of COVID-19 patients are aged less than fifty years. It is noteworthy that the amount of the invoices of male patients receiving treatment only in clinics is higher than those of female patients, but the amount of the invoices of female patients receiving treatment in both clinic and intensive care are higher than those of male patients. In parallel with this, although the treatment costs of male patients who receive treatment only in the clinic are higher than the costs of female patients, it is observed that the costs of female patients receiving intensive care and clinical treatment are higher than the costs of male patients.

It can be said that the rate of inpatient treatment in patients aged 50 years and over is approximately six times higher than the rate of inpatient treatment within the age group under than 50. This is in line with the literature (Garg et al., 2020; Grasselli et al., 2020)

Likewise, it was found that patients aged 50 years had a high rate of intensive care treatment. Patient invoices and patient costs were found to be higher in patients  $\geq 50$  years of age, as expected. This situation can be explained by the higher rates of comorbidity in patients  $\geq 50$  years of age. Comorbidities such as hypertension, ischemic heart disease, cancer, diabetes, and chronic kidney disease are known to affect hospitalization rates and the course of the disease (Garg et al., 2020; Grasselli et al., 2020; Liu et al., 2020; Sharma et al., 2020). In this study, it was observed that comorbidities increase the rates of inpatient treatment and the need for intensive care treatment. In other words, it was found that the disease progressed more severely in these patients. In parallel with these, it was observed that the invoice amounts were generally higher in the patient groups with comorbidities who received both only clinical and clinical and intensive care treatment together. In this respect, the invoice amount of the patient groups is higher in the patient groups with

comorbidity that receive only clinical treatment and both clinical and intensive care treatment.

When the cost data of the patients are examined, it is seen that comorbidities increase the treatment costs of patients who receive both clinical and intensive care treatment. Although the bills of the group without heart and cancer disease were found to be lower in the patient bills, it is seen that the costs of cancer patients were higher. Although the costs of patients with cancer disease are high, the lower invoice amounts are due to the invoicing criteria determined by the SUT in the country.

When the first documented cases of COVID-19 in Turkey are examined, there was a relative decline in the frequency of hospitalization with the escalation of cases in October in comparison with the spring and summer periods. It can be said that this is related to the increase in knowledge about the disease and its treatment, as well as the reduction of the indications for inpatient treatment and the constant hospital bed capacities despite the increase in the number of cases.

In this study, only the treatment costs of COVID-19 were included in the scope of the evaluation, and the expenditures made by the hospitals due to COVID-19 disease other than the treatment against the high contagiousness of the disease and the risk of advanced life, the costs caused by the patients' out-of-pocket expenses and labor losses were not taken into consideration. In general, COVID-19 patient costs were higher than the invoice amounts in patients who received both clinical and intensive care treatment. On the contrary, it has been observed that the invoices of cancer patients who receive treatment only in the clinic are higher than the treatment costs. In other words, it can be said that health institutions operate at a loss in the COVID-19

battle except for the patients with cancer receiving treatment only in the clinic. Therefore, invoice amounts of the institutions providing health services should meet the treatment costs is paramount to the sustainability of health services, which is an urgent matter that health policymakers and reimbursement institutions should take the necessary steps.

On the other hand, the warnings to stay at home, which help enforce positive practices, and the fact that people do not leave the house with prohibitions, are among the positive aspects of the cost that should be taken into account. The fact that COVID-19 is seen more frequently over the age of 50 and is also seen in people of active working age are among financially negative aspects (Nurchis et al., 2020).

As a result, the rate of men getting the COVID-19 disease is higher than women. The disease is more severe in males in hospitalized patients, in  $\geq 50$  age group, and in patients with comorbidities. In parallel with these, the invoice amounts and costs of these patients are higher than the opposite groups. In general, the treatment costs of the patients are higher than the invoice amounts and they carry great risks for the future in ensuring the sustainability of the service. Ensuring sustainability in healthcare services depends on the ability of healthcare institutions to obtain invoices to cover their costs. COVID-19 not only creates a big economic burden for reimbursement institutions but also brings a great economic burden for the institutions that provide the service.

It may be suggested to make direct and indirect cost calculations for future studies. It is an inevitable fact for the sustainability of health services the payment for invoices by reimbursement institutions to the service providers would be at a rate that meets the minimum treatment costs.

#### ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* The study was approved by the Sakarya University Non-Invasive Ethics Committee of Medicine Faculty (Date: 04.09.2020 and Number: 715522473/050.01.04/467).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Alpar, R. (2020). Spor Sağlık ve Eğitim Bilimlerinden Örneklerle Uygulamalı İstatistik ve Geçerlik Güvenirlilik - SPSS de Çözümleme Adımları ile Birlikte-. Detay Yayıncılık.
- Bhatt AS, Moscone A, McElrath EE, Varshney AS, Claggett BL, Bhatt DL, et al. Fewer Hospitalizations for Acute Cardiovascular Conditions During the COVID-19 Pandemic. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(3), 280-8.
- Brahmbhatt, M., & Dutta, A. (2008). On SARS type economic effects during infectious disease outbreaks. *World Bank Policy Research Working Paper*, 4466.
- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*, 395(10223), 507-13.
- Darab MG, Keshavarz K, Sadeghi E, Shahmohamadi J, Kavosi Z. (2021). The economic burden of coronavirus disease 2019 (COVID-19): evidence from Iran. *BMC Health Services Research*, 21(1), 1-7.
- Garg S, Kim L, Whitaker M, Cummings C, Holstein R, Prill M, et al. *MMWR - Hospitalization Rates and Characteristics of Patients Hospitalized with Laboratory-Confirmed Coronavirus Disease 2019 – COVID-NET, 14 States, March 1-30, 2020. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69(15), 458-64.
- Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA*, 323(16), 1574-81.
- Jin H, Wang H, Li X, Zheng W, Ye S, Zhang S, et al. Economic burden of covid-19, china, january-march, 2020: A cost-of-illness study. *Bulletin of the World Health Organization*, 99(2), 112-24.
- Lee JW, McKibbin WJ. Estimating the global economic costs of SARS. *Learning from SARS: Preparing for the next Disease Outbreak: Workshop Summary*, 92-109.
- Liu H, Chen S, Liu M, Nie H, Lu H. Comorbid Chronic Diseases are Strongly Correlated with Disease Severity among COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Aging and Disease*, 11(3), 668-78.
- Muniyappa R, Gubbi S. COVID-19 pandemic, coronaviruses, and diabetes mellitus. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 318(5), E736-E741.
- Nurchis MC, Pascucci D, Sapienza M, Villani L, D'ambrosio F, Castrini F, et al. Impact of the Burden of COVID-19 in Italy: Results of Disability-Adjusted Life Years (DALYs) and Productivity Loss. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(12), 4233.
- Oostenbrink JB, Buijs-Van der Woude T, van Agthoven M, Koopmanschap MA, Rutten FF. Unit costs of inpatient hospital days. *Pharmacoeconomics*, 21(4), 263-71.
- Robilotti EV, Esther B, Mead PA, Rolling T, Perez-Johnston R, Bernardes M, et al. Determinants of COVID-19 disease severity in patients with cancer. *Nature Medicine*, 26(8), 1218-23.
- Sharma G, Volgman AS, Michos ED. Sex Differences in Mortality From COVID-19 Pandemic. *JACC: Case Reports*, 2(9), 1407-10.
- T.C. Sağlık Bakanlığı COVID-19 Bilgilendirme Platformu. (2020).
- Tandon A, Ivatts S, Cowley P, Roubal T, Dodd R, Pepperall J, et al. Economic Contraction from COVID-19 in the Pacific: Implications for Health Financing. *Health Systems & Reform*, 6(1), e1847991 (6 pages).
- Wang X, Fang X, Cai Z, Wu X, Gao X, Min J, et al. Comorbid Chronic Diseases and Acute Organ Injuries Are Strongly Correlated with Disease Severity and Mortality among COVID-19 Patients: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Research*, 2020(Article ID 2402961), 1-17.
- Wenham C, Smith J, Morgan R. (2020). COVID-19: the gendered impacts of the outbreak. In *The Lancet* (Vol. 395, Issue 10227, pp. 846-848). *Lancet Publishing Group*.



# İlaç ve gıda takviyelerinin içerikleri hakkında kullanıcıların bilgi ve talep düzeyinin ölçülmesi

## Measuring level of information and demand of users about the content of drug and food supplements

Vildan ÖZCAN<sup>1</sup> (ID), Ayşe Arzu ŞAKUL<sup>2</sup> (ID), Hanefi ÖZBEK<sup>3</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** İlaçların ve gıda takviyelerinin prospektüslerine bakıldığında içeriklerinin kullanıcıya tam olarak aksettirilmediği görülmektedir. Bu nedenle ilaç veya gıda takviyesi kullanacak kişi, bunların içeriğinde kendi inanç ve kültürüne uygun olmayan bir madde olup olmadığı hakkında güvenilir bir bilgiye erişme imkanına sahip olamamakta; böyle bir şeyi arzu etse dahi bu bilgilere nereden erişeceği konusunda yeterli bir bilgiye ulaşamamaktadır. İnternet ortamındaki bilgiler ise genel itibarıyla bilimsel yeterlilikten yoksun, yeterli bir denetimden geçmemiş bir bilgi kirliliği görünümü arz etmektedir. Bu çalışmanın amacı ilaç ve gıda takviyesi ürünlerin içeriklerinin kullanıcıların kendi ihtiyaçları doğrultusunda şeffaflaştırılması hususundaki düşünce ve tercihlerini belirlemektir.

**Yöntem:** Araştırmanın örneklemini eczanelere başvuran 888 reçete sahibi oluşturdu. 16 soruluk anket verileri toplandı. Veriler tanımlayıcı ve analitik istatistik yöntemleriyle değerlendirildi.

**Bulgular:** Katılımcılar ortalama 40,05 yaşında, %92,9'u şehir veya büyük şehirlerde yaşayan, %62,2'si kadın olan gönüllülerden oluşmaktaydı. Katılımcıların eğitim seviyesi, %54,9 ilköğretim ve %43,2 yüksek

### ABSTRACT

**Objective:** When the medicine leaflets of drugs and food supplements are examined, it is seen that the contents are not fully reflected to the user. For this reason, the person who will use drugs or food supplements does not have the opportunity to access reliable information about whether there is a substance in their content that is not suitable for their own belief and culture; even if he wishes for such a thing, he cannot reach sufficient information about where to access this information. The information on the Internet, on the other hand, presents an information pollution appearance that lacks scientific competence in general and has not been adequately audited. The aim of this study is to determine the opinions and preferences of the users regarding the transparency of the contents of pharmaceutical and food supplement products in line with their own needs.

**Methods:** The sample of the study was made by 888 prescribers who applied to pharmacists, and the answers given to the questionnaire with 16 questions gave the results of the study. The data were evaluated by descriptive and analytical statistical methods.

**Results:** Participants consisted of volunteers with an average age of 40.05, 92.9% living in cities or big

\* İlaç ve Gıda Takviyelerinin İçerikleri Hakkında Kullanıcıların Bilgi ve Talep Düzeyinin Ölçülmesi başlıklı Yüksek Lisans tezinin özetidir.

<sup>1</sup>İstanbul Medipol Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji AD, İstanbul

<sup>2</sup>İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AD, İstanbul

<sup>3</sup>İzmir Bakırçay Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AD, İzmir



**İletişim / Corresponding Author :** Hanefi ÖZBEK

Gazi Mustafa Kemal Mahallesi Kaynaklar Caddesi Seyrek - Menemen / İzmir - Türkiye

E-posta / E-mail : hanefi.ozbek@bakircay.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 08.02.2022

Kabul Tarihi / Accepted : 30.03.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.12269

Özcan V, Şakul AA, Özbek H. İlaç ve gıda takviyelerinin içerikleri hakkında kullanıcıların bilgi ve talep düzeyinin ölçülmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(2): 199 - 208

öğretim olarak tespit edildi. Gönüllülerin %33,2'si her gün veya haftada en az bir gün ilaç kullanırken %66,8'i hastalandıkça veya nadiren ilaç kullandığını beyan etti. Katılımcıların %92,7'si ilaç kullanmak gerektiğinde hekim veya eczacıya başvuracağını, %92,7'si her zaman veya ihtiyaç olduğunda prospektüs okuduğunu, %92,2'si ilaçların içeriği ile ilgili olarak kendilerini hekim veya eczacının bilgilendirmesi gerektiği kanaatinde olduğunu, %44,5'i ilaç konusunda sağlık meslek mensuplarıncı bilgilendirildiğini bildirdi. Gönüllülerin %94,8'i ilaç veya gıda takviyesinde bağımlılık yapıcı madde, alerjik reaksiyona sebep olabilecek bir içerik, alkol veya domuzdan elde edilmiş ürün olup olmadığını bilmek istediğini, böyle bir ürün bulunduğunu öğrenmeleri durumunda katılımcıların %80,8'i önerilen tedaviye veya gıda takviyesine alternatif yollar arayacağını, %10,8'i ise tedaviyi reddedeceğini bildirdi.

**Sonuç:** Kullanıcıların ilaç veya gıda takviyelerine ait içerikleri gösteren bilgilerin kendi inanç ve kültürlerinin gerekliliklerini de yansıtacak şekilde prospektüslere girmesini istedikleri sonucuna varıldı. Prospektüsler hazırlanırken bu konunun da dikkate alınması, hem hasta hakları hem de tüketici hakları yönünden dikkate alınması gerekli bir husus olarak değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İlaç, gıda takviyesi, prospektüs içeriği, alkol, uyuşturucu madde, domuz ürünü

cities, and 62.2% women. The educational level of the participants was 54.9% primary education and 43.2% higher education. When 33.2% of volunteers used medication at least once a day or week, 66.8% stated that they sick or rarely used medication. When 92.7% of the participants read the medicine leaflet or read the medicine leaflet whenever necessary, 92.7% of the participants thought that they should inform the physician or pharmacist about the contents of the drugs, 44.5% of the drug the health professions were informed about it. 94.8% of the volunteers wanted to know whether they were addictive substances in medicines or food supplements, a substance that could cause allergic reaction, alcohol or pigs, 80.8% of the participants would search for alternative ways, 10.8% he would deny the treatment.

**Conclusion:** It was concluded that patients wanted the information showing the contents of medicines or food supplements to enter the pamphlets to reflect the requirements of their religious beliefs. Considering this issue while preparing the medicine leaflets has been considered as an issue that needs to be taken into account both in terms of patient rights and consumer rights.

**Key Words:** Medicine, food supplement, medicine leaflet content, alcohol, drug, pig product

## GİRİŞ

İlaçlar, canlı sistemleri kimyasal düzeyde etkileyen maddelerdir (1). Geniş anlamıyla ilaç, tıpta kullanılan ve biyolojik etkinliği olan (biyoaktif) saf bir kimyasal maddeyi ya da ona eşdeğer olan bitkisel veya hayvansal kaynaklı, standart miktarda aktif madde içeren bir doğal karışımı ifade eder (2). Gıda takviyeleri veya takviye edici gıdalar Türk Gıda Kodeksinde ve ilgili Yönetmelikte tanımlanmıştır (3).

İlaçların prospektüs, kullanma talimatı (KT) veya kısa ürün bilgisinde (KÜB) ilaçların içeriği ile ilgili bilgiler bulunmaktadır. Ancak bu bilgiler ilaç kullanıcıları tarafından okunduğunda genel itibarıyla net olarak anlaşılabilir değildir. Örneğin bir ilacın KÜB'ünden alıntılanan ve o ilacın içeriğindeki yardımcı maddelerden bahseden cümle şöyledir: Koloidal susuz silika, magnezyum stearat, kroskarmeloz sodyum, mikrokristalin selüloz, hidroksipropil metil selüloz, titanyum dioksit, propilen gliserol, etil selüloz

(4). Başka bir ilacın içeriğindeki yardımcı maddeler ise şunlardan ibarettir: Sodyum sülfat anhidrus, mısır nişastası, arap zıncı, CMC, magnezyum stearat, propilen glikol, etil alkol, F.D.C. Yellow no.5 (E 102) (5). Yukarıda sayılan kimyasal madde isimlerinden selüloz ile etil alkolden başkasının sağlık meslek mensubu olmayan kullanıcının zihninde bir karşılığı bulunduğunu söylemek güçtür. Bir gıda takviyesinin internet ortamındaki reklamında ise içeriği hakkında bulunabilen bilgi “portakal aromalı, vitamin ve balık yağı şurubu” şeklindedir (6).

Yukarıdaki örneklerden de anlaşılacağı gibi gerek ilaçların gerekse gıda takviyelerinin içerikleri kullanıcıya tam olarak aksettirilmemektedir. İlaç veya gıda takviyesi kullanacak kişi bunların içeriğinde kendi inanç ve kültürüne uygun olmayan bir madde olup olmadığı hakkında güvenilir bilgiye erişme imkanına da pek sahip olamamakta; böyle bir şeyi istese bile bu bilgilere nereden erişeceğini bilememektedir. İnternet ortamındaki bilgiler ise genel itibarıyla bilgi kirliliğinden başka bir işe yaramamaktadır.

İlaç ve gıda takviyelerinin içeriklerinin açık ve anlaşılır olmasının, hastanın bunları kullanma hususunda vereceği kararlarda aktif rol oynayarak, hastanın hekim ve eczacılara olan güvenini; aynı zamanda hastanın ilaç kullanımındaki farkındalığını ve uyuncunu artırabileceği düşünülmektedir. Zira hastaya klinik uygulamalar veya ilaçlar hakkında bilgi vermenin ve onunla iyi bir iletişim kurmanın hasta memnuniyetini arttıracığı bilinmektedir (7). Bu araştırmanın amacı, eczaneye gelen hastaların ilaçlar ve gıda takviyelerinin içerikleri hakkındaki bilgi düzeylerini, bilgi edinme kaynaklarını ve bu konudaki taleplerini araştırmak; böylece ilaç ve gıda takviyelerinin içeriklerinin şeffaflaştırılması hususunda kullanıcıların düşüncelerini ve tercihlerini ortaya koymaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmanın örneklemini İstanbul’un farklı semtlerindeki (Bağcılar, Çengelköy, Esenyurt,

Eyüpsultan, Fatih, Gaziosmanpaşa, Kadıköy, Maltepe, Ümraniye ve Üsküdar) on farklı eczaneye gelen ve ankete katılmayı kabul eden toplam 888 reçete sahibinden oluşmuştur. Eczane seçimi İstanbul’un Avrupa ve Anadolu yakasında olmak üzere iki yakayı da kapsayacak şekilde yapılmış, gönüllüler için çalışmaya katılmayı kabul etmeleri yeterli sayılmıştır.

## Veri Toplama Araçları

Anket soruları (16 adet) ilaç ve gıda takviyeleri ile ilgili makale, kitap ve web sayfaları incelenerek hazırlanmıştır. İlk dört soru demografik bilgileri içermekte, sonraki sorular ise ilaçlarla ve gıda takviyeleri ile ilgili sorulardan meydana gelmektedir. Çalışma öncesinde, çalışmayı kabul eden eczanelerde anketin doldurulmasına eşlik edecek kişi (eczacı ve/veya yardımcısı) anket hakkında ve anketin uygulanması konularında bilgilendirildi.

## İstatistik Analiz

Vverilerin analizi Statistical Package of Social Sciences (SPSS) 18.0 istatistik paket programında yapılmış; veriler ortalama, standart sapma, sayı ve yüzde (%) kullanılarak özetlenmiştir. Sayısal olarak ölçülen değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu One-Sample Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edilmiş, verilerin normal dağılım göstermediği ( $p>0,05$ ) saptandığından sayısal ölçülen verilerin karşılaştırılmasında parametrik olmayan testler kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark Mann-Whitney U ve Pearson Ki-kare testi ile analiz edilmiş,  $p<0,05$  olasılık değeri anlamlı kabul edilmiştir. Değişkenler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile test edilmiş,  $p<0,001$  olasılık değeri anlamlı kabul edilmiş; ilişkinin gücü ( $r$ ) 0,10-0,25 arasında ise çok zayıf, 0,26-0,50 arasında ise zayıf, 0,51-0,69 arasında ise orta, 0,70-0,89 arasında ise kuvvetli ve 0,90’ın üzerinde ise çok kuvvetli bir ilişki bulunduğu şeklinde yorumlanmıştır (8). Güç (power) analizi için G\*Power 3.1.9.2. istatistik paket programından yararlanılmıştır (9, 10).

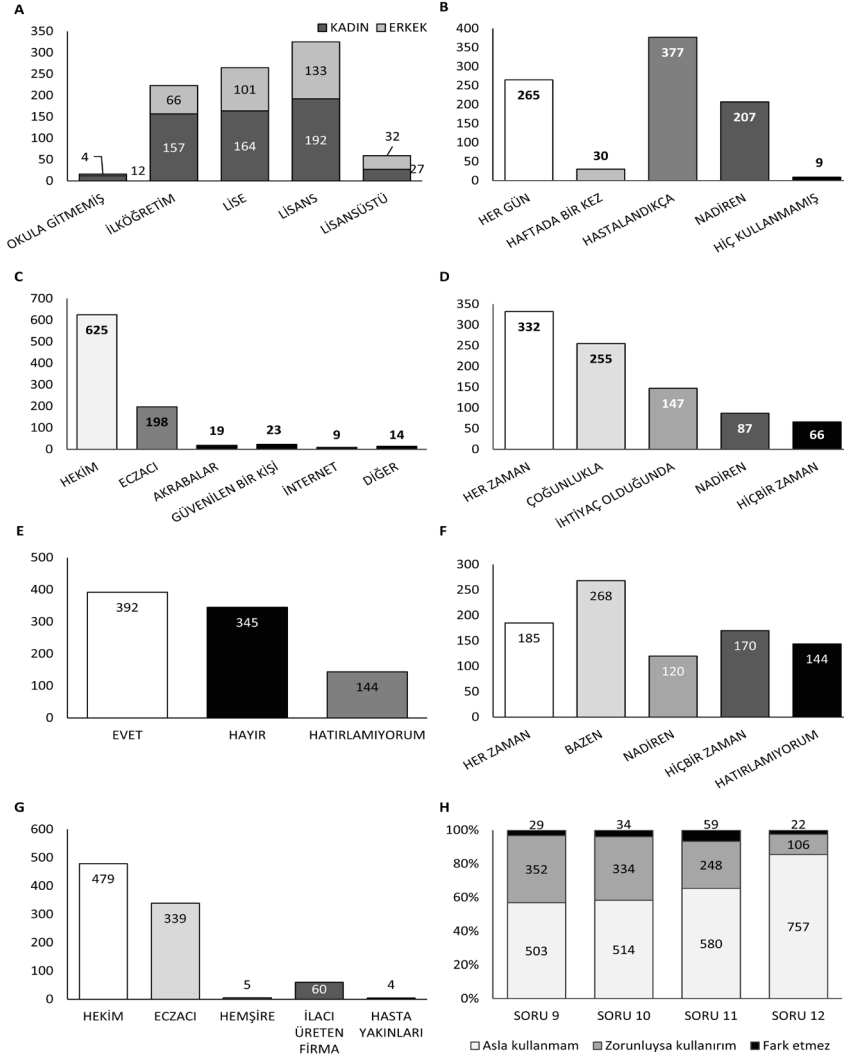
Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile

gerçekleştirilmiştir (Tarih: 16.04.2015 ve Karar No: 218).

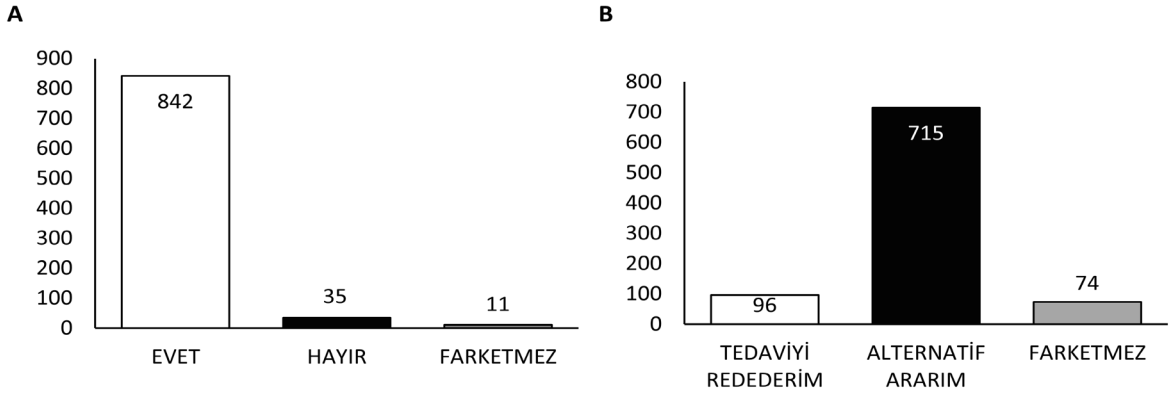
## BULGULAR

Araştırmaya dahil edilen gönüllü sayısı 888 kişi olup genel yaş ortalaması  $40,05 \pm 13,62$ , yaş aralığı ise

18-91 olarak tespit edilmiştir. Gönüllülerin %62,2'si kadın, %37,8'si erkektir ( $p < 0,05$ ). Ankete verilen cevapların istatistik değerlendirmeleri Şekil 1, Şekil 2 ve Tablo 1'de verilmiştir. Bu çalışmanın güç analizi, değişkenlerin birbiriyle olan korelasyonu üzerinden G\*Power istatistik paket programı kullanılarak %90,78 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 1.** İlk on iki soruya verilen cevaplar. A. Soru 1 ve 2; Gönüllülerin eğitim durumlarına ve cinsiyetlerine göre dağılımı ( $p < 0,001$ ), B. Soru 3; Gönüllülerin ilaç kullanma sıklığı ( $p < 0,001$ ), C. Soru 4; İlaç kullanmak gerektiğinde en çok başvuru kaynak listesi ( $p < 0,001$ ), D. Soru 5; İlaçların prospektüsü, kullanma talimatı veya kısa ürün bilgilerini okuma alışkanlığı ( $p < 0,001$ ), E. Soru 6; Verilen ilaç(lar) hakkında yakın geçmişte bilgilendirilme durumu ( $p < 0,001$ ), F. Soru 7; Verilen ilaç(lar) hakkında uzak geçmişte bilgilendirilme durumu ( $p < 0,001$ ), G. Soru 8; İlaçlarla ilgili bilgilendirmeyi yapacak kişi veya kurumlar ( $p < 0,001$ ), H. Soru 9; Bağımlılık yapıcı madde bulunması durumunda gönüllülerin tavrı ( $p < 0,001$ ), Soru 10; Alerjen madde bulunması durumunda gönüllülerin tavrı ( $p < 0,001$ ), Soru 11; Alkol bulunması durumunda gönüllülerin tavrı ( $p < 0,001$ ), Soru 12; Domuz ürünü bulunması durumunda gönüllülerin tavrı ( $p < 0,001$ ).



**Şekil 2.** A. Soru 13; Bağımlılık yapıcı madde, alerjik reaksiyona sebep olabilecek bir içerik, alkol veya domuz içerikli bir madde olup olmadığını bilmek ister misiniz sorusunun cevapları ( $p < 0.001$ ), B. Soru 14; İlaç veya gıda takviyesinin içeriğinin öğrenilmesi durumunda gönüllülerin tavrı ( $p < 0.001$ ).

**Tablo 1.** Anket sorularının korelasyon analizi (anlamli bulunan ilişkiler koyu renkte işaretlenmiştir).

Değişkenler	Soru Numaraları															
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Yaş	KK	,060	<b>-,368**</b>	<b>-,100**</b>	<b>-,400**</b>	-,058	,006	-,014	,042	-,047	-,002	-,043	<b>-,075*</b>	<b>-,073*</b>	,014	-,026
	p	,072	<b>,000</b>	,003	<b>,000</b>	,086	,864	,685	,211	,163	,952	,197	,026	,031	,677	,439
2	KK		<b>,123**</b>	-,003	,082*	,074*	<b>,147**</b>	,085*	,076*	,039	-,033	,033	<b>,111**</b>	,031	<b>,090**</b>	,076*
	p		<b>,000</b>	,919	,015	,027	<b>,000</b>	,011	,024	,245	,331	,329	,001	,358	,007	,024
3	KK			<b>,207**</b>	<b>,253**</b>	,092**	<b>-,136**</b>	,027	-,025	,037	<b>,089**</b>	<b>,162**</b>	<b>,223**</b>	<b>,220**</b>	-,048	<b>,141**</b>
	p			<b>,000</b>	<b>,000</b>	,006	<b>,000</b>	,418	,456	,269	,008	<b>,000</b>	<b>,000</b>	<b>,000</b>	,149	<b>,000</b>
4	KK				<b>,113**</b>	,015	<b>-,127**</b>	,004	-,054	-,038	-,049	-,038	<b>,088**</b>	<b>,096**</b>	-,038	,074*
	p				,001	,649	<b>,000</b>	,908	,109	,255	,145	,265	,009	,004	,253	,029
5	KK					,036	-,032	<b>,122**</b>	<b>,110**</b>	,004	-,038	,069*	,038	,049	-,035	,013
	p					,288	,335	<b>,000</b>	,001	,910	,263	,039	,262	,145	,292	,706
6	KK						<b>,186**</b>	,014	-,019	<b>,184**</b>	,079*	<b>,110**</b>	,033	,026	<b>,106**</b>	,021
	p						<b>,000</b>	,689	,575	<b>,000</b>	,019	,001	,322	,441	,002	,531
7	KK							<b>,123**</b>	<b>,098**</b>	,025	,069*	,056	,014	-,009	<b>,116**</b>	,018
	p							<b>,000</b>	,003	,461	,039	,094	,677	,784	,001	,598
8	KK								<b>,508**</b>	,015	,006	,053	,057	,044	,065	,031
	p								<b>,000</b>	,652	,853	,116	,094	,197	,053	,362
9	KK									,009	-,054	-,004	,023	-,019	,029	-,011
	p									,793	,107	,915	,503	,564	,396	,734
10	KK										,080*	<b>,106**</b>	,041	-,007	,001	-,021
	p										,018	,002	,217	,838	,971	,542
11	KK											<b>,411**</b>	<b>,310**</b>	<b>,197**</b>	,010	<b>,130**</b>
	p											<b>,000</b>	<b>,000</b>	<b>,000</b>	,774	<b>,000</b>
12	KK												<b>,380**</b>	<b>,203**</b>	-,005	<b>,123**</b>
	p												<b>,000</b>	<b>,000</b>	,874	<b>,000</b>
13	KK													<b>,498**</b>	<b>,071*</b>	<b>,283**</b>
	p													<b>,000</b>	,035	<b>,000</b>
14	KK														<b>,114**</b>	<b>,339**</b>
	p														,001	<b>,000</b>
15	KK															<b>,122**</b>
	p															<b>,000</b>

KK: Korelasyon katsayısı (r); \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda gönüllülerin %29,8'inin her gün, %3,4'ünün ise haftada bir kez ilaç kullanma alışkanlığında olduğu saptanmıştır. Bu iki grup bir arada ele alındığında gönüllülerin %33,2'sinin haftada en az bir kez ilaç kullandığı, kalan %66,8'inin ise hastalandıkça veya nadiren ilaç kullandığı ya da hiç ilaç kullanmadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca gönüllülerin yaşı arttıkça ilaç kullanma sıklığının da arttığı, ancak eğitim seviyesi arttıkça ilaç kullanma sıklığının azaldığı şeklinde anlamlı bir ilişki saptanmıştır ( $p<0,01$ ). İlaç Endüstrisi İşverenler Sendikası (EİS)'in yaptırmış olduğu ve Türkiye'yi temsil eden bir araştırmada ilaç kullanan hastalarda yaş arttıkça ilaç kullanma oranının da arttığı bildirilmekte olup bulgularımızı destekler mahiyettedir (11, 12).

Çalışmamızda, ilaç kullanmak gerektiğinde gönüllülerin %70,4'ünün hekimlere, %22,3'ünün eczacılara başvurduğu görülmektedir. Bu iki grup bir arada ele alındığında ise gönüllülerin %92,7'sinin ilaç kullanmak gerektiğinde sağlık profesyonellerine danıştığı sonucu çıkmaktadır. Başka bir araştırmada da benzer sonuçlar elde edilmiş olup bulgularımızı destekler niteliktedir (13).

Gönüllü popülasyonunun toplam %17,2'sinin prospektüs ve KT okuma alışkanlığının hiç olmadığı veya nadiren olduğu, kalan %82,8'inin ise her zaman veya ihtiyaç durumunda bunları okuduğu anlaşılmaktadır.

Veriler incelendiğinde gönüllülerin %44,5'inin sağlık meslek mensuplarınca ilaç konusunda bilgilendirildiği, kalan %55,5'inin ise bu konuda bilgilendirilmediği anlaşılmaktadır. Verilen ilaç(lar)la ilgili olarak gönüllülerin uzak geçmişte (çok daha önceden) bilgilendirilmesi durumu sorgulanmaktadır. Buna göre gönüllülerin %20,9'unun her zaman, %30,2'sinin ise bazen bilgilendirildiği, kalan %48,9'unun ise nadiren veya hiçbir zaman bilgilendirilmediği ya da hastaların bu konuda herhangi bir şey hatırlamadığı görülmektedir. Gönüllülerin hatırladıkları en yakın geçmişteki ilaç aldıkları

zaman sorgulandığı için bilgiler taze olup bu oran daha güvenilir olarak düşünülebilir. Her iki şekildeki verilere bakıldığında hastaların yarısından fazlasının ilaçlar konusunda bilgilendirilmediği hususu ortaya çıkmaktadır. Hekimler üzerinde yapılan bir çalışmada çalışmaya katılan hekimlerin %64,4'ünün ilacın uygulama şeklini, %5,5'inin ilacın günlük dozunu, %62,1'inin tedavi süresini ve %40,2'sinin ise ilacın ne zaman bırakılması gerektiği hususunu hastalarına her zaman açıkladıkları bildirilmiştir (14). Hastalar ile hekimlerin ilaçlar hususunda bilgilendirme yönünden verdikleri oranlar arasında fark gözükse de duygusal olarak verilmiş cevaplar elendiğinde bu oranların birbirine yakın olduğu, yapılan çalışmanın bizim çalışmamızla paralellik gösterdiği söylenebilir.

İlaç kullanma hususunda hekime veya eczacıya danışanlar, ilaçlar hakkındaki bilgilendirmeden hekim veya eczacıların sorumlu olduğu cevabını vermişlerdir. Hukuksal açıdan da hastayı ilaç konusunda aydınlatmaktan hekim ve eczacı sorumludur (15). Dolayısı ile çalışmamızdaki gönüllülerin hekim ve eczacının danışmanlığı ile ilgili cevaplarının isabetli olduğu görülmektedir.

Gönüllülerin %56,9'u bağımlılık yapıcı maddelere karşı "asla kullanmam" cevabını vermiştir. Gönüllülerin %39,8'inin "zorunluysa kullanırım" ve %3,3'ünün de "fark etmez" şeklindeki cevapları ise kişilerin uyuşturucu kullanmaya meyilli olma durumu yönünden düşündürücüdür.

Alerjen madde içeren ilaç veya gıda takviyesi kullanma hususunda gönüllülerin %37,9'unun "zorunluysa kullanırım" seçeneğini işaretlemesi sağlık meslek mensuplarına mutlak güven hususunda önemli bir veri olarak değerlendirilmiştir.

Kullanılacak ilaç veya gıda takviyesinde alkol bulunması konusunda "asla kullanmam" cevabını veren gönüllülerin %65,4 oranında olması, toplumun alkol konusunda hassas olduğu yönünde değerlendirilmiştir.

Şekil 1H'daki veriler domuz ve domuz ürünlerini kullanma konusunda, ilaç veya gıda takviyesinde kullanılacak olsalar bile gönüllülerin bu ürünleri

%85,5 oranında reddettiği yönündedir. Bu oran, toplumda inançlarına göre hareket eden kesimin büyük bir yekun tuttuğunu göstermesi açısından önemli bir veri olarak değerlendirilebilir. Ayrıca şekil 1H'deki 9, 10, 11 ve 12'nci sorulara verilen cevaplar birlikte ele alındığında, domuzdan elde edilmiş ürün bulunması durumunda ilacı veya gıda takviyesini asla kullanmayacaklarını söyleyenlerin; ilaç veya gıda takviyelerinde bağımlılık yapıcı madde, alerjen veya alkol bulunması hallerinde bunları asla kullanmayacaklarını ifade edenlerden daha yüksek olması ayrıca dikkat çekmektedir.

Gönüllülerin eğitim durumu ile 10, 11 ve 12'nci sorulara verilen cevaplar arasında pozitif yönde, zayıf kuvvette bir ilişki bulunmuştur. Buna göre eğitim seviyesi arttıkça ilaçların içinde alerjen madde, alkol veya domuzdan elde edilmiş madde olup olmasının önemsiz oranı anlamlı derecede yüksek bulunmuş ( $p<0,001$ ), ancak 11. soru (ilaç veya gıda takviyesinde bağımlılık yapıcı madde bulunması) ile eğitim seviyesi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p>0,001$ ). İçişleri Bakanlığı Emniyet Genel Müdürlüğü'nün "2017 Türkiye Uyuşturucu Raporu (2016 verileri)" başlıklı raporunda Türkiye genelinde 2014 yılında uyuşturucu ile ilgili toplam 77.664 olay, 2015 yılında toplam 73.017 olay ve 2016 yılında toplam 81.222 olay meydana geldiği bildirilmiştir (16). Türkiye nüfusunun 80 milyon civarında olduğu ve uyuşturucu ile ilgili olay sayısının da yıllık 80 bin civarında olduğu düşünüldüğünde uyuşturucu kullanımı ile ilgili yaklaşık %0,1 gibi bir oranla karşılaşılmaktadır. Buradaki her bir vakanın aslında çok daha fazla sayıda uyuşturucu müptelasına karşılık geleceği varsayıldığında yukarıdaki verilerin çalışmamızdaki (Şekil 2A) verilerle yaklaşık olarak benzerlik göstereceği söylenebilir.

T.C. Sağlık Bakanlığı'nın 2013 yılında yayımladığı 2011 yılında 20.898 kişiden elde edilen verilerle yapılmış bir çalışmada çalışmaya katılanların %87'sinin hiç alkol kullanmadığı, %8'inin ayda bir kez veya daha az alkol kullandığı, %3'ünün ise ayda 2-4 kez alkol kullandığı bildirilmiştir (17). Buna

göre çalışmaya katılanların toplamda %13'ü alkol kullanmaktadır. Bizim çalışmamızda gönüllülerin %65,4'ü ilaç veya gıda takviyesinde alkol bulunması durumunda bunları asla kullanmayacağını, %28'i ise zorunluysa kullanacağını belirtmiş, %6,7'si ise fark etmez şeklinde cevap vermiştir. Yani %34,7 oranında gönüllünün ilaç veya gıda takviyesi içerisinde alkol bulunması durumunda bunu kullanma potansiyeli olduğu anlaşılmaktadır. Sağlık Bakanlığının verileri çalışmamızdaki verilerle karşılaştırıldığında alkol kullanım oranı aslında %13 iken, ilaç veya gıda takviyesi adı geçtiğinde alkolle karşı duyarlılığın bir anda azaldığı ve bunları kullanabilirim diyenlerin %34,7'ye kadar çıktığı görülmektedir. Bu durumda ilaç veya gıda takviyesi şeklindeki olumlu algının insanların alkol konusundaki düşüncelerini veya hassasiyetlerini etkileyebileceği söylenebilir.

Çalışmamızda ilaç veya gıda takviyesinde domuzdan elde edilmiş ürün varsa gönüllülerin %85,5'i asla kullanmam, %12'si zorunluysa kullanırım ve %2,5'i ise fark etmez şeklinde cevap vermişlerdir (Şekil 1H). Domuz ürünlerinin Türkiye'de yiyecek olarak kullanılması hususundaki net verilere ulaşılamamıştır. Hatay İli'nde yaşayan farklı dini inançlara sahip 376 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada Musevi katılımcıların %12'sinin, Hristiyan katılımcıların %76,3'ünün ve Müslüman katılımcıların %2,6'sının domuz etini yemeklerinde kullandıkları saptanmıştır (18). Hatay İli'nde yapılan bir çalışmanın tüm Türkiye'ye temsil etmesi düşünülemez. Ancak bizim çalışmamızın İstanbul'da gerçekleştirilmesi ve burada da farklı inançlara mensup kişilerin bulunması sebebiyle (bu kişilerin İstanbul nüfusundaki oranları da dikkate alındığında) bu çalışmanın bizim çalışmamızdaki bulguları kısmen de olsa açıklayabileceği söylenebilir. Buna göre çalışmamızdaki katılımcıların %85,5'i domuzdan elde edilmiş ürünleri asla kullanmayacağını beyan ederken kalan %14,5'lik dilimdeki katılımcıların büyük çoğunluğu zorunluysa kullanabileceklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda domuz ürünlerinin yiyecek olarak değil de ilaç veya gıda takviyesi olarak

sorulmasının domuzdan elde edilmiş ürünlerle ilgili algıyı yumuşattığı, bu yüzden belki daha az olması beklenen oranın %14,5'lere çıktığı düşünülebilir.

Şekil 2A'da ilaç veya gıda takviyesinde bağımlılık yapıcı madde, alerjik reaksiyona sebep olabilecek bir içerik, alkol veya domuz içerikli bir madde olup olmadığını bilmek ister misiniz sorusunu katılımcıların %94,8'inin "evet" olarak cevaplama, ilaç veya gıda takviyesi içeriğinin ilaç prospektüsü, KT veya KÜB'teki şekliyle ya da gıda takviyelerinde verildiği kadarıyla değil; daha detaylı ve daha açık bir şekilde verilmesini istediği şeklinde yorumlanabilir. Sattar ve arkadaşlarının 100 hasta ve 100 hekim ile yaptığı bir çalışmada hastaların %98'inin domuz ya da sığırdan elde edilmiş ürünler içeren ilaçlarla ilgili sağlık çalışanları tarafından bilgilendirilmek istedikleri anlaşılmıştır. Doktorların ise %70'inin hastalarını domuz ya da sığırdan elde edilmiş madde içeren ilaçları reçete ederken bilgilendirmelerinin önemli olduğunu düşündükleri görülmüştür (19). İlgili araştırmada ve bizim çalışmamızda dikkat çeken yüksek oranlar, hastaların domuzdan elde edilen maddelerle ilgili hassasiyetlerini ortaya koyma yönünden paraleldir.

Şekil 2B'de ilaç veya gıda takviyesi içeriğinin öğrenilmesi durumunda gönüllülerin gösterecekleri tavra ait cevaplar verilmiş olup katılımcıların %91,6'sının tedaviyi veya gıda takviyesini reddedeceği veya bunların alternatifini arayacağı anlaşılmaktadır.

Şekil 2A'da "ilaç veya gıda takviyesinde bağımlılık yapıcı madde, alerjik reaksiyona sebep olabilecek bir içerik, alkol veya domuz içerikli bir madde olup olmadığını bilmek ister misiniz" sorusuna gönüllülerin %94,8'i "evet", %3,9'u "hayır" ve %1,2'si "fark etmez" cevabını vermiştir. Türk Tabipler Birliğinin Hekimler ve Tabip Odası Yöneticileri için

hazırladıkları mevzuatta, aydınlanmış onam genel çerçevesinde ve özerklik ilkesi kapsamında, kişilerin ya da toplulukların kendilerine ilişkin konularda, kendi değerlerine dayanarak kararlar vermelerinin önemi belirtilmiştir (20). İnsan Hakları Evrensel Bildirgesi'nde (25. Madde) insanların sağlık hakkı için: "Her şahsın gerek kendisi gerekse ailesi için, yiyecek, giyim, mesken, tıbbi bakım, gerekli sosyal hizmetler dâhil olmak üzere sağlığı ve refahını temin edecek uygun bir hayat seviyesine ve işsizlik, hastalık, sakatlık, dulluk, ihtiyarlık veya geçim imkânlarından iradesi dışında mahrum bırakacak diğer hallerde" güvenliğe hakkı vardır." denilmektedir (21). Türk Hukuku'nda da sağlık hakkı 1961 ve 1982 Anayasalarında temel hak olarak tanınmış (22), Hasta Hakları Yönetmeliği'nde hastanın tedavisi ve ilaçları hakkında "bilgilendirilme hakkı"ndan bahsedilmiştir (23).

Sonuç olarak dikkate alındığında hastaların, kendilerine verilen ilaçlar veya gıda takviyelerinin hastaların, kendilerine verilen ilaçlar veya gıda takviyelerinin içerikleri yönünden, bunların yalnızca genel bir şekilde değil hastaların inançlarının gerektirdiği zorunluluklar doğrultusunda da zenginleştirilmiş bir prospektüs bilgisine sahip olmayı istedikleri görülmektedir. Katılımcıların bu isteği hem İnsan Hakları Bildirgesi'nde hem Türk Hukuku'nda bir hak olarak da bulunmaktadır. Dolayısı ile gerek ilaç prospektüslerinin gerekse gıda takviyelerine ait içerik bilgilerinin bu yönde detaylandırılması gerektiği sonucu ortaya çıkmaktadır. Ürünlere ait prospektüsler hazırlanırken bu konunun da gözönünde bulundurulması, hem hasta hakları yönünden hem de tüketici hakları yönünden dikkate alınması gerekli önemli bir husustur.



## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:16.04.2015 ve Karar No: 218).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB, Katzung & Trevor Farmakoloji, 6. Baskı Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul, s:1, 2005.
2. Kayaalp SO, Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1. Cilt, 13. Baskı, Pelikan Yayıncılık, Ankara, s:3, 2012.
3. Takviye Edici Gıdaların İthalatı, Üretimi, İşlenmesi ve Piyasaya Arzına İlişkin Yönetmelik. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/05/20130502-14.htm> (erişim tarihi: 15.07.2018).
4. KLAMOKS BID 1000 mg 14 film tablet Kısa Ürün Bilgisi PDF Dosyası. <http://www.ilacrehberi.com/pdfs/klamoks-bid-1000-mg-14-film-tablet-b11e/kub/> (erişim tarihi: 15.07.2018).
5. DRAMAMINE 50 mg 12 tablet Kısa Ürün Bilgisi PDF Dosyası. <http://www.ilacrehberi.com/pdfs/dramamine-50-mg-12-tablet-8c38/kub/> (erişim tarihi: 15.07.2018).
6. Voonka Tween Multivitamin - Balık Yağı Şurubu 150ml. <http://www.eczane.com.tr/voonka-tween-multivitamin-balik-yagi-surubu> (erişim tarihi: 15.07.2018).
7. Akpınar S, Hasta-Eczacı İlişkisi Algı Düzeyi İle Hastanın Eczaneye Güveni, Sadakati, Ve Memnuniyeti Arasındaki İlişki, Yüksek Lisans Tezi, Beykent Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, İşletme Yönetimi Ana Bilim Dalı Hastane Ve Sağlık Kurumları Yönetimi, s: 23, 2015.
8. Hayran O, Özbek H, Sağlık Bilimlerinde Araştırma ve İstatistik Yöntemler, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, s: 257-80, 2021.
9. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A, G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behavior Research Methods, 39, 175-91, 2007.
10. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG, Statistical power analyses using G\*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. Behavior Research Methods, 41, 1149-60, 2009.
11. Yapıcı G, Balıkcı S, Uğur Ö, Birinci basamak sağlık kuruluşuna başvuranların ilaç kullanımı konusundaki tutum ve davranışları, Dicle Tıp Derg, 38(4): 458-65, 2011.

12. İlaç Endüstrisi İşverenler Sendikası (İEİS) Basın Açıklaması, Ülkemizin “İlaç Kullanım Davranışları” Belirlendi. <http://www.ieis.org.tr/ieis/tr/press/14/ulkemizin-ilac-kullanim-davranislari-belirlendi> (erişim tarihi: 15.07.2018).
13. Demirbağ BC, Timur M, Bir Grup Yaşlının İlaç Kullanımı İle İlgili Bilgi, Tutum ve Davranışları, Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi, 11(1): 1-8, 2012.
14. Saygılı M, Özer Ö, Hekimlerin Akılcı İlaç Kullanımına Yönelik Bilgi, Tutum ve Davranışlarının Değerlendirilmesi, Hacettepe Sağlık İdaresi Dergisi, 18(1): 35-46, 2015.
15. Özel Ç, Özcan Büyüktanır BG, Akılcı İlaç Kullanımında Hekimin ve Eczacının Hastayı Aydınlatma Yükümlülüğü, İÜHF M C. LXVI, S.2, s. 327-44, 2008.
16. T.C. İçişleri Bakanlığı, Emniyet Genel Müdürlüğü, 2017 Türkiye Uyuşturucu Raporu (2016 verileri), Ankara 2017.
17. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Kronik Hastalıklar ve Risk Faktörleri Sıklığı Çalışması, Ed: Ünal B, Ergör G, Ankara 2013.
18. Canbolat C, Yaman M, Hatay İlinde Yaşayan Faklı Dini İnançlara Mensup Bireylerin Gastronomik Etkileşimi, Journal of Tourism and Gastronomy Studies, 5(1): 96-104, 2017.
19. Sattar SP, Ahmed MS, Madison J et al., Patient and Physician Attitudes to Using Medications with Religious Forbidden Ingredients, SAGE, 38(11):1830-5, 2004.
20. Türk Tabipler Birliği (TTB), Aydınlatılmış Onam Kılavuzu. [http://www.ttb.org.tr/mevzuat/index.php?option=com\\_content&view=article&id=983:0nam&Itemid=65](http://www.ttb.org.tr/mevzuat/index.php?option=com_content&view=article&id=983:0nam&Itemid=65) (erişim tarihi: 15.07.2018).
21. ZUNICEF, İnsan Hakları Evrensel Beyannamesi. [https://www.unicef.org/turkey/udhr/\\_gi17.html](https://www.unicef.org/turkey/udhr/_gi17.html) (erişim tarihi: 15.07.2018).
22. Temiz Ö, Türk Hukukunda Bir Temel Hak Olarak Sağlık Hakkı, Ankara Üniversitesi SBF Dergisi, 69(1): 165-88, 2014.
23. Hasta Hakları Yönetmeliği. <http://www.tard.org.tr/assets/hukuk/hastahaklari.pdf> (erişim tarihi: 15.07.2018).

## Dışkı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanan *Clostridium difficile* Toksin B sonuçlarının değerlendirilmesi

### Evaluation of *Clostridium difficile* Toxin B results by polymerase chain reaction from stool specimens

Pınar ŞAMLIOĞLU<sup>1</sup> (ID), Arzu BAYRAM<sup>1</sup> (ID), Güliz DOĞAN<sup>1</sup> (ID)

#### ÖZET

**Amaç:** *Clostridium difficile*, fekal-oral yolla yayılan Gram-pozitif, anaerop, spor oluşturan bir bakteridir. Asemptomatik taşıyıcılık veya hafif diyareden psödomembranöz enterokolit gibi hayatı tehdit eden hastalıklara kadar çeşitli klinik tablolara neden olur. *C. difficile*, Amerika'da ve Avrupa'da antibiyotikle ilişkili ishale neden olan hastane enfeksiyonunun en yaygın nedenidir. A ve B olarak isimlendirilen iki toksin üretebilir. Toksin üreten suşlar megakolon, perforasyon veya septik şoka neden olan daha ciddi hastalık tablosuna yol açabilmektedir. Tanıda uygulaması daha kolay, hızlı sonuç elde edebileceğimiz, yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip moleküler yöntemlerin kullanılması son yıllarda yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu çalışmada dışkı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanan *C. difficile* sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Laboratuvarımıza *C. difficile* enfeksiyonu şüphesiyle Ocak 2017 ile Eylül 2018 tarihleri arasında gelen 109 dışkı örneği GeneXpert *C. difficile* PZR (Cepheid, CA, AD) yöntemi ile test edilmiştir. Elde

#### ABSTRACT

**Objective:** *Clostridium difficile* is a Gram-positive, anaerobic, spore-forming bacterium that spreads via the fecal-oral route and causes asymptomatic carriage or mild diarrheal diseases such as pseudomembranous enterocolitis. *C. difficile* is the commonest cause of nosocomial and antibiotic-associated diarrhea in North America and Europe. It can produce two toxins called A and B. Strains producing toxins can lead to a more serious disease picture that causes megacolon, perforation or septic shock. The use of molecular methods with high specificity and sensitivity has become widespread in recent years. The use of molecular methods with high specificity and sensitivity, which are easier to apply in diagnosis, and to obtain rapid results, has become widespread in recent years. In this study, it was aimed to evaluate *C. difficile* results determined by polymerase chain reaction (PCR) from stool samples.

**Methods:** 109 fecal samples that came to our laboratory between January 2017 and September 2018 on suspicion of *C. difficile* infection were tested with the GeneXpert *C. difficile* PCR (Cepheid, CA, AD)

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir



İletişim / Corresponding Author : Pınar ŞAMLIOĞLU

Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yenişehir İzmir - Türkiye

E-posta / E-mail : pinar.samlioglu@saglik.gov.tr

Geliş Tarihi / Received : 15.08.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 20.04.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.77785

Şamlioğlu P, Bayram A, Doğan G. Dışkı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanan *Clostridium difficile* Toksin B sonuçlarının değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(2): 209 - 216

edilen veriler pozitif, negatif veya geçersiz sonuç olarak yorumlanmıştır.

**Bulgular:** Toplam 109 örnek test edilmiştir. Dışkı örneklerinin 66 (%61)'i erkek, 43 (%39)'ü kadın hastalara aittir. Örnek istenen hastaların 25 (%23)'ü 65 yaş üstü 36 (%33)'sı 18 yaşın altındaydı. Gelen örneklerin 26 (%24)'sü yoğun bakım ünitelerinden, 60 (%55)'i servislerden ve 23 (%21)'ü polikliniklerden laboratuvarımıza gelmiştir. 109 dışkı örneğinden 9 (%8)'ü *C. difficile* PZR testiyle toksin B pozitif, 100 (%92)'ü negatif bulunmuştur.

**Sonuç:** Nozokomiyal diyarelerin en önemli nedeni *C. difficile*'dir. Enfeksiyonun temel predispozan faktörü antibiyotik kullanımınıdır. Profilaksi veya tedavi amacıyla bir doz bile olsa antibiyotik kullanılması *C. difficile* enfeksiyonu gelişmesi için yeterli olabilmektedir. PZR ile hızlı ve doğru tanı konması tedaviye erken başlanması açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *C. difficile*, ishal, psödomembranöz enterokolit, PCR

method. The data obtained are interpreted as positive, negative or invalid results.

**Results:** A total of 109 samples were tested. 66 (61%) of the stool samples belonged to male and 43 (39%) female patients. Twenty-five (23%) of the patients were under the age of 18 and 36 (33%) under the age of 18 years. Of the samples, 26 (24%) were from intensive care units, 60 (55%) were from services and 23 (21%) were from polyclinics. It was found 109 from stool samples. 9 (8%), *C. difficile* PCR test toxin B positive, 100 (92%) negative.

**Conclusion:** The most important cause of nosocomial diarrhea is *C. difficile*. The main predisposing factor of infection is the use of antibiotics. Prophylaxis or even one dose of antibiotic therapy may be sufficient for the development of *C. difficile* infection. Rapid and accurate diagnosis by PCR is important for early initiation of treatment.

**Key Words:** *C. difficile*, diarrhea, pseudomembranous enterocolitis, PCR

## GİRİŞ

*Clostridium difficile* Gram-pozitif, anaerop, sporlu bir basildir. Komplikasyonsuz hafif ishal, ölümcül seyredabilen toksik megakolon ve kolon perforasyonuna kadar değişen farklı klinik sonuçlar ile ilişkilidir. *C. difficile*, hastane kaynaklı ishalin başlıca nedenidir. Artmış morbidite-mortaliteye neden olabilen salgınlardan sorumludur (1, 2). 1978 yılında ilk defa "Psödomembranöz kolit" ve "antibiyotik ile ilişkili ishal" olgularında *C. difficile* tanımlanmış ve özellikle klindamisin ve linkomisin kullanımı ile semptomların daha erken görüldüğü bildirilmiştir. Sağlıklı bir yetişkinde kolonun bakterisi

florası genellikle *C. difficile* kolonizasyonuna dirençlidir. Ancak, normal kolon florası değiştiğinde kolonizasyona karşı bu direnç kaybedilir. Kolon florasındaki bozulmanın en yaygın risk faktörü antibiyotiklere maruz kalmaktır (3,4).

*C. difficile* ilişkili enfeksiyon patogeneğinde primer risk faktörleri; 65 yaş üstü olmak, son üç ay içinde uzun süreli antibiyotik kullanımı ve uzun süre hastanede yatmaktır. Sekonder risk faktörleri arasında ise hastaya nazogastrik tüp uygulanması, sigara kullanımı, asit azaltan ajanlar (proton pompa inhibitörleri, H2 reseptör antagonistleri), malign hastalıklar, kemoterapi tedavisi bulunmaktadır (5). Sağlıklı yetişkinlerin %0-3'

ünün, sağlıklı yenidoğanların %25-80' inin dışısında bulunmaktadır. Hastanede yatan hastaların %20 'sinde; psödomembranöz koliti olan hastaların ise %95-100' ünde dışıda *C. difficile* pozitif olarak bildirilmektedir. *C. difficile* ilişkili kolit en yaygın görülen nozokomiyal enfeksiyonlardan biridir (6).

*C. difficile*'nin en önemli özelliklerinden biri ısı ve kuruluğa karşı dirençli spor oluşturması ve bu formların hastane ortamında uzun süre canlı kalabilmesidir. Spor formları hastanelerde kolayca yayılabilmekte ve uzun dönem bakım ünitelerinde salgınlara neden olabilmektedir (7).

*C. difficile*'nin toksin A ve toksin B üreten toksijenik suşları olduğu gibi, toksin üretmeyen non-toksijenik suşları da vardır. Toksin üreten *C. difficile* suşları yetişkinlerde antibiyotikle ilişkili ishal ve psödomembranöz kolitin en sık sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır (8).

Temel virülans faktörleri toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) potansiyel sitotoksik aktivite gösterir. Hücre iskeletinin önemli proteinleri olan Ras ve Rho proteinlerini glikozilasyon ile inaktive ederler. Bu proteinlerin glikozilasyonu hücre iskeletinin bozulmasına, hücre içindeki bağların kopmasına ve permeabilite artışı ile birlikte sekretuar ishal oluşmasına neden olmaktadır (9). Etki mekanizmaları benzer olan bu toksinler, endositozla bağırsak epitel hücresine girmekte ve hücrede aktin iskeletini etkileyerek hücre ölümüne neden olmaktadır. Toksinlerin, aynı zamanda birtakım sitokinlerin salgılanmasına, böylece enflamatuvar yanıtın gelişmesine ve psödomembranların oluşmasına yol açtıkları da anlaşılmıştır (10).

Son yıllarda, toksin A ve toksin B dışında "hipervirulent" ve florokinolona dirençli suşların neden olduğu *C. difficile* salgınları da görülmüştür (11).

*C. difficile*'nin tanımlanmasında hücre kültürü, sitotoksisite nötralizasyon testleri, toksijenik kültür, toksin-antijen tanımlama, nükleik asit amplifikasyon testleri ve toksin genlerinin tanımlanması gibi çeşitli laboratuvar tanı yöntemleri mevcuttur. Sitotoksik

kültür özel laboratuvar donanımı gerektiren, zaman alıcı emek yoğun bir yöntemdir (12). ELISA yöntemi daha ucuz, daha hızlı olduğu ve daha çabuk sonuç verdiği için tercih edilmektedir (13). ELISA yöntemi hızlı sonuçlanır, kullanımı kolaydır, ancak düşük duyarlılığa sahiptir (14).

Son yıllarda *C. difficile* toksin B genini doğrudan hedef alan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamaları geliştirilmiştir. Bu moleküler yöntem ELISA yöntemiyle karşılaştırıldığında daha yüksek duyarlılık ve özgünlüğe sahiptir.

*C. difficile* enfeksiyonlarına hızlı ve doğru bir şekilde tanı konması, hem hastaya hızlı tedavi başlanması bakımından hem de bakterinin hastane içi yayılımının önlenmesi açısından çok önemlidir (15).

Bu çalışmada hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gelen dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR yöntemi ile saptanan *C. difficile* sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2017- Eylül 2018 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında *C. difficile* enfeksiyonu şüphesi olan kişilerden alınan 109 dışkı örneği gerçek zamanlı (RT)-PZR yöntemi ile test edilmiştir. Dışkı örnekleri test öncesi eğer hemen çalışılmayacaksa 2°C - 4°C arasında saklanmıştır. Analizler sırasında bakterinin yapısında bulunan toksin B genini (tcdB) saptamayı hedefleyen GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA, AD) *C. difficile* test sistemi kullanılmıştır.

GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA, AD) *C. difficile* test sistemi *C. difficile* şüphelenilen hastalardan gelen (sıvı veya yumuşak) dışkı örneklerinden toksin B gen dizilerinin hızlı tespiti için kullanılan in vitro tanı testidir. Otomatik RT-PZR kullanılır. Sistem testleri çalıştırmak ve sonuçları

görüntülemek için önceden yüklenmiş bir yazılımdır.

Kullanılan bir kartuş, reaktifleri ve numune işlem kontrollerini içerir. Numune işlem kontrolünde; SPC ve PCC olarak adlandırılan iki kontrol mevcuttur. **SPC: Sample Processing Control;** Hedef bakterilerin yeterli bir şekilde işlenmesini kontrol etmek ve test içindeki inhibitörlerin varlığını izlemek için kullanılır. **PCC: Probe Check Control;** Prob kontrolüdür. Reaktif rehidrasyonunu ve boya stabilitesini kontrol etmek için kullanılır. Kartuşta PCR tüpünün dolmasını, probu doğrular

Test çalışmasına başlarken örneği kartuşa eklemek için her ikisi ambalajından çıkarılıp dışkı örneği alınmış eküvyon numune reaktifi içine yerleştirildi. Şişenin kapağı kapatılıp yüksek hızda 10 sn vorteksleildi. Kartuş kapağı açılıp temiz bir transfer pipeti ile numune reaktifinin tüm içeriği Xpert *C. difficile* test kartuşunun içine boşaltıldı. Reaktif 1, kullanılacak kartuşun birinci bölmesine, reaktif 2, kartuşun ikinci bölmesine eklendi. Tekrar vorteksleildi. Kartuş kapağı kapatılıp barkodu tarandı ve RT-PZR çalışması için GeneXpert cihazına yerleştirildi. Numuneyi kartuşa ekledikten sonra 30 dakika içinde test başlatıldı. İşleminin sonunda elde edilen veriler pozitif, negatif veya geçersiz olarak yorumlandı.

## BULGULAR

Araştırmada 66 (% 61)'sı erkek, 43 (%39)'ü kadın hastalara ait toplam 109 örnek test edilmiştir. Örnek istenen hastaların 25 (%23)'ünün 65 yaş üstü 36 (%33)'sının 18 yaşın altında olduğu görülmüştür. Örneklerin 26 (%24)'sı yoğun bakım ünitelerinden, 60 (%55)'i servislerden ve 23 (%21)'ü polikliniklerden laboratuvarımıza gelmiştir. Test edilen 109 dışkı örneğinden 9 tanesi (%8) *C. difficile* PZR testiyle toksin B pozitif bulunurken, 100 tanesinin (%92) negatif olduğu tespit edilmiştir.

Test sonucu pozitif olduğu saptanan 9 hastadan 6'sının 18 yaşın altında olduğu, bu hastaların birinin erkek, beşinin kadın oldukları belirlenmiştir. Hastaların dördü Çocuk Gastroenteroloji servisinde, ikisi Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları servisinde tedavi altındaydı. Test sonucu pozitif çıkan üç hastadan biri 88 yaşında kadın hasta olduğu, Anestezi Yoğun Bakım'da bulunduğu, diğer ikisi ise 71 ve 87 yaşlarında erkek hastalar oldukları, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nde tedavi gördükleri belirlenmiştir.

Tablo 1'de hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı, Tablo 2'de *C. difficile* GeneXpert PZR sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 1. Hastaların yaş-cinsiyet dağılımı

	Sayı	Yüzde
18 yaş altı	36	%33
65 yaş üstü	25	% 23
Kadın	43	%39
Erkek	66	% 61

Tablo 2. *C. difficile* GeneXpert PCR sonuçları

109 örnek	Sayı	Yüzde
<i>C. difficile</i> PCR POZİTİF	9	%8
<i>C. difficile</i> PCR NEGATİF	100	%92

## TARTIŞMA ve SONUÇ

*C. difficile*, enfeksiyöz nazokomiyal ishallerde en sık tanımlanan ajandır. Antibiyotik kullanımının *C. difficile* ile ilişkili ishallerde en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir (15). *C. difficile*'yi bu derece önemli yapan spor yapabilme özelliği ve sporlarının enfektivitelerini kaybetmeden çevrede uzun süre canlı kalabilmesidir. (16). Nükleik asit amplifikasyon testleri hızlı sonuç vermesi, yüksek duyarlılık ve özgünlükleri nedeniyle *C. difficile* teşhisi için Amerika Birleşik Devletleri'nde tercih edilen yöntem haline gelmiştir (17,18). Dışkıda *C. difficile* toksin araştırması için altın standart doku kültüründe sitopatik etkinin gösterilmesidir. Doku kültürü ile toksin araştırılması zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir(19).

Japonya'da yapılan bir çalışmada dört aylık süre içinde çeşitli hastanelerde yatan 124.484 hastada PZR yöntemiyle dışkı kaynaklı *C. difficile* toksini araştırıldığı, toksin B pozitif 23 (% 13,8) izolat bulunduğu bildirilmiştir (20). Çalışmamızda ise 100 hastadan 9 (%8)'unda *C. difficile* toksin B saptanmıştır. Geranato ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, bizim de çalışmamızda kullandığımız Cepheid GeneXpert yöntemiyle çalışıldığı ve 310 örnekten 55 (%17,7)'inde *C. difficile* toksin B pozitif saptandığı belirtilmiştir (21).

Sadeghi Fard ve ark. tarafından yapılan çalışmada *C. difficile*'nin toksijenik suşlarının prevalansı %6,1, Lotfian ve ark., tarafından yapılan bir başka çalışmada ise %5,8 olarak bildirilmiştir (22, 23). Bu sonuçları bizim çalışmamızla kıyasladığımızda

oldukça düşük oranlar olarak değerlendirilmiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada *C. difficile* diyare ile hastanede yatan hastaların %18,2'inden izole edilmiştir. Bu bizim çalışmamızla kıyaslandığında oldukça yüksek bir orandır (24). Garcia ve ark'ın Brezilya'da yaptığı bir çalışmada, ishallerde hastalarda toksijenik *C. difficile* suşlarının prevalansı %13,8 olarak bildirilmiştir (25). Sachu ve ark. Hindistan'da PZR ile 660 hastadan %9,7'inde *C. difficile* pozitif bulmuştur (26). Almanya'da yapılan bir çalışmada diyareli hastalarda *C. difficile* prevalansı %11,1 olarak saptanmıştır (27).

*C. difficile*'ye bağlı ishal sıklığını araştırmak için ülkemizde yapılan çalışmalarda toksin A-B pozitifliğinin %3,2 ile %24 arasında olduğu bildirilmektedir (5). Bu çalışmada *C. difficile* pozitiflik oranı %8 bulunmuş olup Türkiye'den bildirilen çalışmalar ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Kültür yöntemi, ELISA ve RT-PZR'ın karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalarda PZR yönteminin duyarlılığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Barbut ve ark. toplam 52 hastanın 38 (%32,5)'inde kültürü negatif olmasına rağmen PZR ile *C. difficile* pozitif saptadıklarını bildirmişlerdir (28).

150 hastanın sonuçlarının değerlendirildiği bir başka çalışmada PZR için duyarlılığın %99,1, kültür yöntemi için ise %51 olduğu belirtilmiştir (29). Bir Avrupa çalışmasında, duyarlılığın RT-PZR'de % 100, ELISA yönteminde % 58,8 olduğu bildirilmiştir (30).

Anaerop kültür yapma imkanı olan laboratuvarlarda *C. difficile* izolasyonu selektif besiyerleri kullanılarak yapılmakla birlikte, uzun zaman alması ve işlemin pahalı olmasından dolayı

çoğu laboratuvar tarafından tercih edilmemektedir. Ayrıca, rutin kültür ile üreyen *C. difficile* izolatlarının toksijenik olup olmadıklarının ayrımı yapılamamaktadır. Bu nedenle özgüllüğü %90'ın üzerinde olmasına rağmen çoğu laboratuvar rutinde kültürü tercih etmemektedir (31). Çalışmamızda gelen dışkıların anaerob kültürleri yapılmadığı için yöntem karşılaştırması yapılamamıştır.

Sonuç olarak *C. difficile* hastanede yatan hastalarda antibiyotikle ilişkili ishalin en sık görülen sebebi olarak değerlendirilmektedir. PZR ile hızlı ve doğru tanı konması tedaviye erken başlanması açısından önem taşımaktadır. Xpert CD testinin en önemli avantajı hızlılık ve uygulama kolaylığıdır. Test sadece 45 dakika sürer. Ayrıca hastanede kalış süresinin azalmasının toplam maliyet ve ekonomik yükü de azaltacağı düşünülmektedir.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma Etik Kurul İzni gerektirmemektedir

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Salman E, Levent B, Karahan ZC. Toksin pozitif *C. difficile* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları ve moleküler karakterizasyonu: Türkiye'den Hipervirülan Suşların Varlığı ile İlişkili İlk Bildirim. Mikrobiyol Bul 2017; 51(3): 236-46.
2. Jamal W , Pauline EM, Rotimi VO. Comparative performance of the GeneXpert *C. difficile* PCR assay and *C. diff* Quik Chek Complete kit assay for detection of *C. difficile* antigen and toxins in symptomatic community-onset infections. Int J Infect Dis 2014; 29: 244-8
3. Hammond GA, Johnson JL. The toxigenic element of *C. difficile* strain VPI 10463. Microb Pathog. 1995;19(4): 203-13.
4. Sambol SPMM, Merrigan D, Lyerly DN Gerding, Johnson S. Toxin gene analysis of a variant strain of *C. difficile* that causes human clinical disease. Infect. Immun 2000;68(10): 5480-7
5. Kostul H, Delialioğlu N, Horasan EŞ, Emekdaş G, Öztürk C, Kuyucu N. Hastanede yatan ishalleri hastaların dışkı örneklerinde *C. difficile* toksin araştırılması ve risk faktörlerinin incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 183 - 90
6. Reller ME, Lema CA, Perl TM, Cai M, Ross TL, Speck KA, et al. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *C. difficile*. J Clin Microbiol 2007; 45(11): 3601-5



7. Kılıç A. C. *difficile* Enfeksiyonu: Epidemiyoloji, Risk Faktörleri, Patogenez, Klinik Özellikler, Tanı ve Tedavi. Mikrobiyol Bul 2013; 47(3): 556-66.
8. Fawley WN, Parnell P, Verity P, Freeman J, Wilcox MH. Molecular epidemiology of endemic *C. difficile* infection and the significance of subtypes of the United Kingdom Epidemic Strain (PCR Ribotype 1). J Clin Microbiol 2005; 43(6): 2685-96
9. Johnson S. Recurrent *C. difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. J Infect 2009; 58(6): 403-10.
10. Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan ishalleri hastalardan izole edilen *C. difficile* kökenlerinde toksin genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2011; 45(1): 1-10.
11. Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH. tcdC genotypes associated with severe TcdC: truncation in an epidemic clone and other strains of *C. difficile*, J Clin Microbiol. 2007 ;45(1):215-21.
12. Kvach EJ, Ferguson D, Riska PF, Landry ML. Comparison of BD GenOhm C diff real-time PCR assay with two-step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic *C. difficile* infection. J Clin Microbiol 2010; 48(1): 109-14.
13. Kim H, Jeong SH, Kim M, Lee Y and Lee K. Detection of *C. difficile* toxin A/B genes by multiplex real-time PCR for the diagnosis of *C. difficile* infection. J Med Microbiol 2012; 61: 274-7.
14. Wilcox MH. Overcoming barriers to effective recognition and diagnosis of *C. difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2012; 18(6): 13-20.
15. Ergen EK, Akalın H, Yılmaz E, Sınırtas M, Alver O, Heper Y, et al. Nosocomial diarrhea and *C. difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital. Med Mal Infect 2009; 39(6): 382-7.
16. Delmee M, Broeck JV, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *C. difficile* associated diarrhoea: a plea for culture. J Med Microbiol 2005; 54: 187-91.
17. Tunçcan ÖG, Ulutan F, Karakuş R. Antibiyotiğe bağlı ishal gelişen nötropenik ve nötropenik olmayan hastalarda *C. difficile* toksin sıklığı ve risk faktörlerinin analizi. Mikrobiyol Bul 2008; 42: 573-83.
18. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *C. difficile* infections. Am J Gastroenterol.2013; 108(4): 478-98.
19. Özinel MA. Hastane infeksiyonu etkeni olarak *C. difficile*. Hastane Enfeksiyonları Dergisi, 2001; 5(3): 251-4.
20. Tokimatsu I, Shigemura K, Osawa K, Kinugawa S, Kitagawa K, Nakanishi N et al. Molecular Epidemiologic Study of *C. difficile* Infections in University Hospitals: Results of a Nationwide Study in Japan. J Infect Chemother. 2018; 24(8): 641-7.
21. Granato PA, Hansen G , Herding E , Chaudhuri S , Tang S , Garg SK et al. Performance comparison of the cobas Liat and Cepheid GeneXpert systems for *C. difficile* detection. PLoS ONE 2018;13(7): 1-7.
22. Sadeghifard N, Salari M, Ghassemi M, Shirazi M, Feizabadi M, Kazemi B, et al. Prevalence of *C. difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients with nosocomial diarrhea. Iran J Public Health 2005; 34(4): 67-72.
23. Lotfian S, Douraghi M, Aliramezani A, Ghourchian S, Sarrafnejad A, Zeraati H. Detection of *C. difficile* in Fecal Specimens: a comparative evaluation of nucleic acid amplification test and toxigenic culture. Clin Lab 2016; 62(10): 1887-92.
24. Gorenek L, Dizer U, Besirbellioglu B, Eyigun C, Hacibektasoglu A, Van Thiel D. The diagnosis and treatment of *C. difficile* in antibiotic-associated diarrhea. Hepatogastroenterology 1999; 46(25): 343-8.
25. Garcia LB, Uzeda MD. Occurrence of *C. difficile* in fecal samples of children in Rio de Janeiro RJ,Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1988; 30(6): 419-23.

26. Sachu A, Dinesh K, Siyad I, Kumar A, Vasudevan A, Karim S. A prospective cross sectional study of detection of *C. difficile* toxin in patients with antibiotic associated diarrhoea. Iran J Microbiol 2018; 10(1): 1- 6.
27. Arvand M, Ruscher C, Bettge-Weller G, Goltz M, Pfeifer Y. Prevalence and risk factors for colonization by *C. difficile* and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in rehabilitation clinics in Germany. J Hosp Infect 2018; 98(1): 14-20.
28. Barbut F, Monot M, Rousseau A, Cavelot S, Simon T, Burghoffer B, et al. Rapid diagnosis of *C. difficile* infection by multiplex real-time PCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(10): 1279-85.
29. Berry N, Sewell B, Jafri S, Puli C , Vagia S, Lewis A M, et al. Real-time polymerase chain reaction correlates well with clinical diagnosis of *C. difficile* infection. J Hosp Infect 2014;87(2):109-14.
30. Jong E, Jong AS, Bartels CJ, Biggelaar C, Melchers WJ, Sturm PD. Clinical and laboratory evaluation of a real-time PCR for *C. difficile* toxin A and B genes. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(9): 2219-25.
31. Simor AE. Diagnosis, management, and prevention of *C. difficile* infection in long-term care facilities: a review. J Am Geriatr Soc 2010; 58(8): 1556-64.

# Evaluation of antinuclear antibodies in pregnant women with abortion with toxocariasis and toxoplasmosis in Iran

## İran'da toksokariyaz ve toksoplazmozlu düşük yapan gebelerde antinükleer antikorların değerlendirilmesi

Zahra SOHRABI<sup>1</sup> (ID), Vahid RAİSSİ<sup>2</sup> (ID), Gita ALİZADEH<sup>2</sup> (ID), Soudabeh ETEMADİ<sup>3,4</sup> (ID), Omid RAİESİ<sup>5</sup> (ID), Mohammad Reza BAGHERPOOR<sup>6</sup> (ID), Zahra Babaei SAMANİ<sup>7</sup> (ID), Fatemeh PARANDİN<sup>2</sup> (ID), Zeinab HASHEMİBAGHI<sup>8</sup> (ID), Hossein YOUSEFNİA<sup>4</sup> (ID), Asmaa İBRAHİM<sup>9</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** *Toxoplasma gondii*, *Toxocara* spp, and antinuclear antibodies (ANAs) have been reported as a cause of abortion. To determine the prevalence rate of *T. gondii*, *Toxocara* spp, and ANAs in aborted women, and to investigate the association between infection and the number of the sociodemographic estimated risk factors.

**Methods:** This study was carried out in aborted women referred to the Qaem hospital in Mashhad city (Razavi Khorasan Province). Serum samples were examined for the presence of Antinuclear Antibody (IgG antibodies), anti-*Toxoplasma gondii* IgG and IgM antibodies, and IgG anti-toxocariasis spp antibodies by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kit. Data like contact with animals' cats and dogs, age, and Type of cause of abortion (in most cases) were collected as risk factors for the prevalence of infection.

### ÖZET

**Amaç:** *Toxoplasma gondii*, *Toxocara* spp ve antinükleer antikorlar (ANA'lar) düşük nedeni olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmanın amacı düşük yapan kadınlarda *T. gondii*, *Toxocara* spp ve ANA prevalans oranını belirlemek ve enfeksiyon ile sosyodemografik olarak tahmin edilen risk faktörlerinin sayısı arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

**Yöntem:** Bu çalışma, Meşhed şehrinde (Razavi Horasan Eyaleti) Qaem hastanesine sevk edilen düşük yapan kadınlarda gerçekleştirildi. Serum numuneleri ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kiti ile Antinükleer Antikor (IgG antikorları), anti-*Toxoplasma gondii* IgG ve IgM antikorları ve IgG anti-toksokariyazis spp antikorlarının varlığı açısından incelendi. Kedi ve köpek gibi hayvanlarla temas, yaş ve düşük nedeni (çoğu vakada) gibi veriler enfeksiyon prevalansı için risk faktörleri olarak toplandı.

<sup>1</sup>Isfahan University of Medical Sciences, Reproductive Sciences and Sexual Health Research Center, Isfahan, Iran

<sup>2</sup>Tehran University of Medical Sciences, School of Public Health, Department of Medical Parasitology and Mycology, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Zahedan University of Medical Sciences, Resistant Tuberculosis Institute, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Zahedan, Iran

<sup>4</sup>Zahedan University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology and Mycology, Zahedan, Iran

<sup>5</sup>Ilam University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology and Mycology, Ilam, Iran

<sup>6</sup>Mashhad University of Medical Sciences, School of Medicine, Department of Parasitology and Mycology, Mashhad, Iran

<sup>7</sup>Shahrekord University, DVM student at faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord, Iran

<sup>8</sup>Islamic Azad University, Department of Sociology, Zahedan Branch, Zahedan, Iran

<sup>9</sup>University of Sadat City, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute, Sadat City Egypt



İletişim / Corresponding Author : Soudabeh ETEMADİ

Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan - Iran

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

Geliş Tarihi / Received : 15.11.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 18.04.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.69009

Sohrabi Z, Raissi V, Alizadeh G, Etemadi S, Raiesi O, Bagherpoor MR, Samani ZB, Fatemeh P, Hashemibaghi Z, Yousefnia H Ibrahim A. Evaluation of antinuclear antibodies in pregnant women with abortion with toxocariasis and toxoplasmosis in Iran. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(2): 217 - 228

**Results:** Out of 162 total samples of pregnant women were collected, 28% were positive for *T. gondii* IgG, and 2% IgM, anti-*Toxocara* spp IgG antibodies were detected in 12% and Antinuclear antibodies detected in 31% in pregnant women with abortion. Co-infection of *T. gondii* and *Toxocara* spp detected in 9%, also ANAs detected in cases with *T. gondii* in 24% and 10% with *Toxocara* spp. ANAs showed positivity with co-infection of *T. gondii* and *Toxocara* spp in 8%. This study showed a significant association between infection of each *T. gondii*, *Toxocara* spp, and ANAs with age and animal contact such as cats and dogs.

**Conclusion:** These study findings indicated that there is a relatively high prevalence of *T. gondii*, *Toxocara* spp, and ANAs in pregnant women with abortion. The coexistence of two agents or of one with ANAs increases the risk of abortion. All of them showed association with age and contact with domestic animals like cats and dogs.

**Key Words:** Antinuclear antibody, toxoplasmosis, toxocariasis, pregnant women, abortion

**Bulgular:** Toplam 162 gebeden alınan örneklerin %28'inde *T. gondii* IgG, %2'sinde IgM pozitifliği, %12'sinde anti-*Toxocara* spp IgG antikorları ve abortus yapan gebelerin % 31'inde Antinükleer antikorlar tespit edildi. Olguların %9'unda *T. gondii* ve *Toxocara* türlerinin ko-enfeksiyonu, *T. gondii* olgularında %24 ve *Toxocara* spp. olgularında %10 oranında ANA'lar tespit edildi. *T. gondii* ve *Toxocara* türlerinin ko-enfeksiyonunda ise ANA pozitifliği %8 oranında bulundu. Bu çalışma, hem *T. gondii*, hem *Toxocara* spp. enfeksiyonları ve hem de ANA'ların, olguların yaşı ve kedi, köpek gibi hayvanlarla teması arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir.

**Sonuç:** Bu çalışma bulguları, düşük yapan gebe kadınlarda *T. gondii*, *Toxocara* spp. ve ANA'ların prevalansının nispeten yüksek olduğunu göstermiştir. İki ajanın beraber veya her birinin ANA'larla birlikte bulunması düşük riskini artırır. Bunların hepsinin olguların yaşı ve kedi, köpek gibi evcil hayvanlarla temasıyla ilişkili olduğunu gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Antinükleer antikor, toxoplasmosis, toxocariasis, hamile kadınlar, abortus

## INTRODUCTION

Autoimmune disorders are most common in women 6-10 times than men (1). The number of autoantibodies reported as a cause of early pregnancy rejection in 30% of women (2). Among those antibodies, antinuclear antibodies (ANAs) are a group of autoantibodies that targeted nuclear and cytoplasmic antigens (3). The immunologic linkage between the mother and the embryo is a pivotal factor for pregnancy completing (4, 5) and supposed that variation in this immunologic parameters can cause significant complications including recurrent abortion (6). The mechanism by which ANAs lead to abortion is not known well but according to a hypothesis, ANAs cause an inflammation in the uterus which be not convenient for implantation

of the embryo(7). There is growing attention in investigating the association between autoimmune diseases and infection with parasites like *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp (8, 9). Toxoplasmosis is a common zoonotic infectious disease caused by *Toxoplasma gondii* which recognized as the third most prevalent cause of mortality from foodborne infection, and the most common protozoan infectious agent causing abortion (10-12) and main infection route is through contact with infected cats' feces (13). Globally , toxocariasis is known as one of the most prevalent zoonotic infectious disease caused by the larval stages of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*, the common roundworms of dogs and cats, respectively (14, 15). Humans can be infected by the occasional ingestion of embryonated *Toxocara* spp via contaminated soil or food (16, 17) or by the ingestion

of encapsulated larvae in the tissues of meat and/or raw or undercooked viscera of chicken, ducks, and cattle infected with *T. canis* larvae (18, 19). The prevalence of toxocariasis infection in pregnant women is infrequent, while in case of infection is possible to cause implications in reproductive health (20, 21). The present study was performed to investigate any potential association between *T. gondii*, *Toxocara* spp infection, and antinuclear antibodies by assessing the seroprevalence diagnosis and their estimated risk factors in pregnant women with abortion in Mashhad city Iran.

## MATERIAL and METHOD

### Sampling strategy

This study was performed from 26 June 2018 to 17 January 2018 in pregnant women with abortion referred to the Qaem hospital in Mashhad city (Razavi Khorasan Province).

### Immunoserology

A total of 162 pregnant women with abortion (81 cases) and Healthy pregnant women (81 case) were enrolled in this study. All stages of the experiment were conducted in the specialized immunology laboratory. About 2-4 mL of whole blood samples were taken from each participant using venipuncture. The samples were allowed to clot and centrifuged at 1000 g for 3 minutes in order to the separation of sera (Because the samples were to be analyzed for the presence of Antinuclear Antibody (ANA), the samples were placed immediately at 4 °C after centrifugation). Samples were stable for 14 days at 4 °C and for 21 days at -20 °C for ANA detection (22). In addition, the hemolysis serum samples were not tested. Sera samples were screened for anti-*Toxoplasma gondii* (IgG, IgM), anti-*Toxocara* spp (IgG) antibodies, and Antinuclear Antibody (IgG) using ELISA kit (EUROIMMUN, Germany for Toxoplasmosis, Antinuclear Antibody (ANA), and IBL, Germany for Toxocariasis). The kit has sensitivity and specificity of >98%. According to the contents of the kit and the results of the ELISA reader (ELx800,

manufactured by BioTek).

### Statistical analysis

Data analysis for this study was performed using the SPSS software version 20 (SPSS, Chicago, IL, USA). Associations between the presence of Antinuclear Antibody (ANA), Toxocariasis, and Toxoplasmosis were evaluated by Pearsons chi-square test.

The study was approved by the Zahedan University of Medical Sciences Regional Research Ethics Committee. (Date: 24.01.2021 and Number: IR.ZAUMS.REC.1399.487).

## RESULTS

### Seroprevalence of ANA

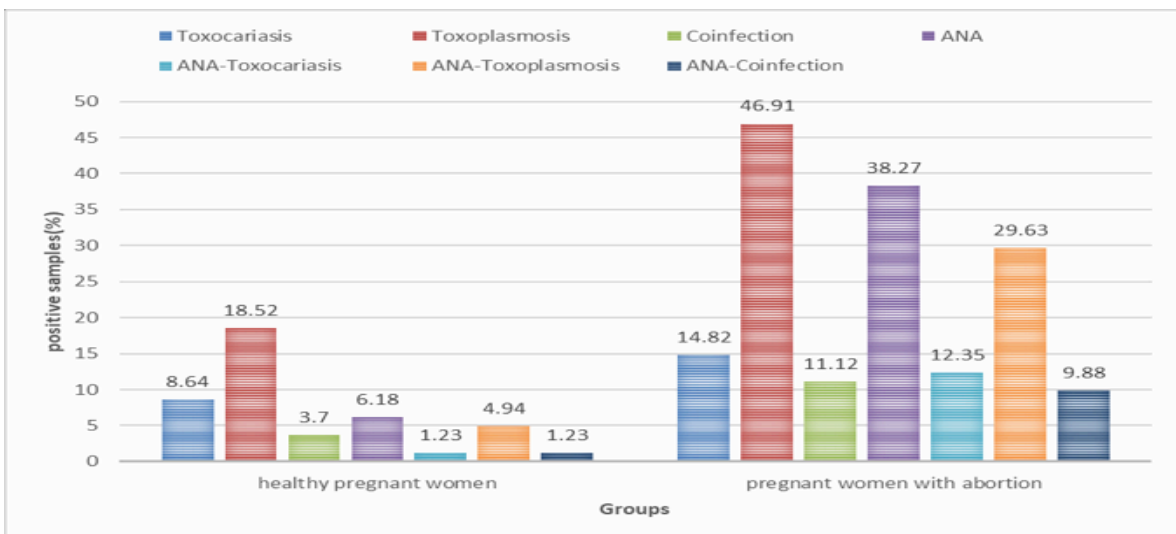
ANAs were detected in 31% of pregnant women with abortion. A positive ANA was recorded and showed a significant association with age of women ( $p=0.005$ ), a positive correlation has been detected between infection rate and age. The causes of abortion have been reported and showed a significant association with ANAs ( $p=0.042$ ). In addition to the role of contact with dogs or cats and the prevalence of infection ( $p=0.001$ ) (Table 1). The incidence rate of infection varied in pregnant women with abortion and healthy pregnant women (Figure 1). also, the association between ANAs with the number of abortions (Figure 2).

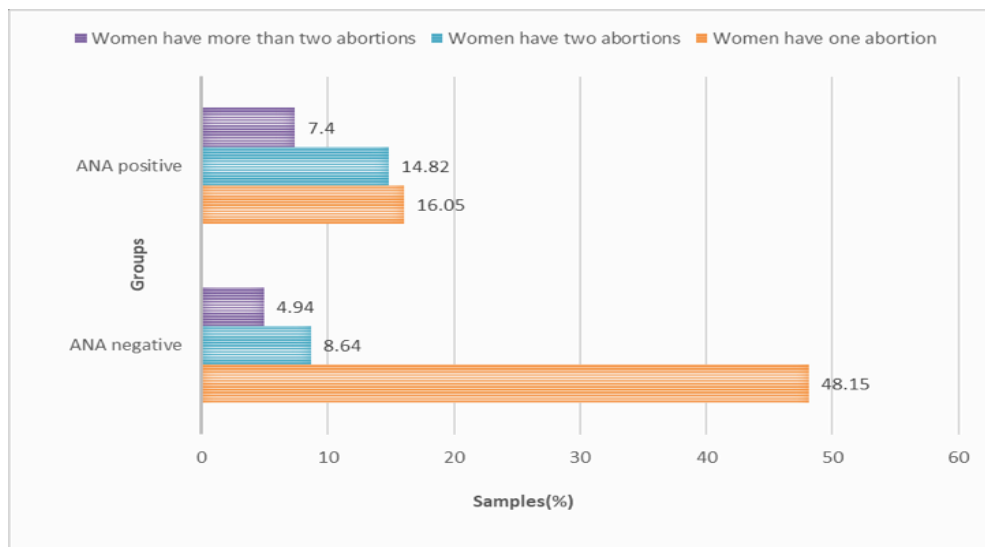
### Seroprevalence of Toxoplasmosis

Out of 81 pregnant women with abortion, 28 % showed specific IgG for *T. gondii*. With Negative IgM. The age of these women showed a significant association with the prevalence rate of infection ( $P=0.001$ ). The causes of abortion showed association with Toxoplasmosis ( $P=0.033$ ) especially endometrial cancer. Also, contact with cats was associated significantly ( $P=0.002$ ) (Table 2), while IgM detected only in 2% with IgG Negative without significant association with age, cause of abortion, and animal contact. Also, 8% of cases showed positive for both IgG and IgM with a significant association with both cause of abortion and animal contact ( $P=0.045$ , 0.03 respectively).

**Table 1.** The presence of Antinuclear Antibody (ANA) in pregnant women with abortion

Variables	Samples N (%)	Positivity N(%)	Prevalence Ratio	P-value
<b>Age</b>				<b>0.005</b>
20-29	27 (33.34%)	05(16.13%)	1	
30-39	35 (43.20%)	11(35.48%)	1.05	
40-49	09 (11.11%)	05(16.13%)	2.1	
50 or more	10 (12.35%)	10(32.26%)	4.38	
Total	81 (100%)	31(100%)		
<b>The cause of abortion</b>				<b>0.042</b>
Hypertension	15(18.52)	05(16.14)	1	
Bleeding	16(19.76)	03(9.68)	0.63	
Molar Pregnancy	13(16.05)	04(12.90)	1.1	
Ectopic Pregnancy	11(13.58)	02(6.45)	0.62	
Abnormal uterine bleeding (AUB)	06(7.40)	03(9.68)	1.84	
Uterine fibroids	03(3.70)	01(3.22)	1.2	
Uterine rupture	09(11.11)	06(19.36)	2.6	
Endometriosis	01(1.23)	01(3.22)	3.6	
Placenta Accreta	02(2.47)	02(6.45)	3.7	
cervical cancer	02(2.47)	02(6.45)	3.7	
Endometrial cancer	02(2.47)	02(6.45)	3.7	
Other cause	01(1.24)	00(0)	0	
<b>Contact with dog and cat</b>				<b>0.001</b>
Yes	37(45.68)	25(80.65)	1	
No	44(54.32)	06(19.35)	0.34	

**Figure 1.** Comparison of infection prevalence and the presence of Antinuclear Antibody (ANA) in pregnant women with abortion and healthy pregnant women



**Figure 2.** Analysis of all pregnant women with abortion for the presence or absence of Antinuclear Antibody (ANA) based on the number of abortions

**Table 2.** Prevalence of *Toxoplasmosis* (IgG positive and IgM negative) in pregnant women with abortion

Variables	Samples N (%)	Positivity N (%)	Prevalence Ratio	P-value
<b>Age</b>				<b>0.001</b>
20-29	27 (33.34)	04(14.28)	1	
30-39	35 (43.20)	08(28.56)	0.75	
40-49	09 (11.11)	06(21.43)	2.85	
50 or more	10 (12.35)	10(35.73)	4.95	
Total	81 (100)	28(100)		
<b>The cause of abortion</b>				<b>0.033</b>
Hypertension	15(18.52)	03(10.71)	1	
Bleeding	16(19.76)	04(14.30)	0.93	
Molar Pregnancy	13(16.05)	01(3.57)	0.27	
Ectopic Pregnancy	11(13.58)	03(10.71)	1.04	
Abnormal uterine bleeding (AUB)	06(7.40)	04(14.30)	2.75	
Uterine fibroids	03(3.70)	01(3.57)	1.30	
Uterine rupture	09(11.11)	07(25)	3.45	
Endometriosis	01(1.23)	01(3.57)	3.98	
cervical cancer	02(2.47)	01(3.57)	2.02	
Endometrial cancer	02(2.47)	02(7.13)	4.03	
Adnexa of uterus	01(1.24)	01(3.57)	3.97	
Other cause	02(2.47)	00(00)	0	
<b>Contact with dog and cat</b>				<b>0.002</b>
Yes	37(45.68)	25(89.29)	1	
No	44(54.32)	03(10.71)	0.2	

### Seroprevalence of *Toxocariasis*

Out of 81 pregnant women with abortion, 12 % showed specific IgG for *Toxocara* spp. The age of these women showed a significant association with the prevalence rate of infection ( $P=0.037$ ). Also, contact with cats or dogs was associated significantly ( $P=0.004$ ) (Table 3).

Seroprevalence of co-infection between

*Toxocariasis* and *Toxoplasmosis* Seropositivity of *Toxocariasis* and *Toxoplasmosis* co-infection were detected in 9% of pregnant women with abortion. (Table 4) shows there was a significant relation between co-infection with age ( $P=0.014$ ) and contact with an animal like cats or dogs shows a significant association, while the cause of abortion is not associated with co-infection.

**Table 3.** Prevalence of *Toxocariasis* infection (IgG positive) in pregnant women with abortion

Variables	Samples N (%)	Positivity N (%)	Prevalence Ratio	P-value
<b>Age</b>				<b>0.037</b>
20-29	27 (33.34)	01(8.33)	1	
30-39	35 (43.20)	05(41.65)	1.08	
40-49	09 (11.11)	03(25.01)	3	
50 or more	10 (12.35)	03(25.01)	2.7	
Total	81 (100)	12(100)		
<b>The cause of abortion</b>				<b>0.451</b>
Bleeding	16(19.76)	03(25)	1	
Molar Pregnancy	13(16.05)	01(8.33)	0.55	
Ectopic Pregnancy	11(13.58)	01(8.33)	0.67	
Abnormal uterine bleeding (AUB)	06(7.40)	02(16.68)	2.84	
Uterine rupture	09(11.11)	03(25)	3	
Placenta Accreta	02(2.47)	01(8.33)	4.09	
Adnexa of uterus	01(1.24)	01(8.33)	8.27	
Other cause	23(28.39)	00(00)	0	
<b>Contact with dog and cat</b>				<b>0.004</b>
Yes	37(45.68)	08(100)	1	
No	44(54.32)	00(00)	0	

### Seroprevalence of ANAs with *Toxoplasmosis*

Seropositivity for ANAs was detected in addition to the presence of *T. gondii* in 24% of women with abortion. (Table 5) shows there was a significant association with age, cause of abortion especially cervical cancer and Endometrial cancer, and contact with an animal like cats or dogs also shows significant relation ( $P= 0.002, 0.004,0.001$ ) respectively.

### Seroprevalence of ANAs with *Toxocariasis*

(Table 6) shows that 10% of pregnant women with abortion have seropositivity for both ANAs and *Toxocariasis*. Significant relation of infection with age and animal contact was reported ( $P=0.009, 0.002$

respectively). The cause of abortion did not show a significant association, but abortion due to Abnormal uterine bleeding (AUB) shows the highest prevalence cause.

Seroprevalence of ANAs with co-infection of (*Toxocariasis* and *Toxoplasmosis*) Seroprevalence (Table 7). It had been found that the positivity of co-infection and ANAs in 8% of pregnant women with abortion. In addition to showing the significant relation with age with a high prevalence rate in age group (40-49) and animal contact ( $P=0.003, 0.004$  respectively).



**Table 4.** Prevalence of *Toxoplasmosis* and *Toxocariasis* infection in pregnant women with abortion

Variables	Samples N (%)	Positivity N (%)	Prevalence Ratio	P-value
<b>Age</b>				<b>0.014</b>
20-29	27 (33.34)	00(00)	0	
30-39	35 (43.20)	04(44.44)	1	
40-49	09 (11.11)	02(22.22)	2.5	
50 or more	10 (12.35)	03(33.34)	4.3	
Total	81 (100)	09(100)		
<b>The cause of abortion</b>				<b>0.301</b>
Bleeding	16(19.76)	01(11.11)	1	
Ectopic Pregnancy	11(13.58)	01(11.11)	0.9	
Abnormal uterine bleeding (AUB)	06(7.40)	02(22.22)	3.9	
Uterine rupture	09(11.11)	03(33.34)	4.4	
Placenta Accreta	02(2.47)	01(11.11)	5.3	
Adnexa of uterus	01(1.24)	01(11.11)	6.6	
Other cause	36(44.44)	00(00)	0	
<b>Contact with dog and cat</b>				<b>0.003</b>
Yes	37(45.68)	09(100)	1	
No	44(54.32)	00(00)	0	

**Table 5.** The presence of Antinuclear Antibody (ANA) and *Toxoplasmosis* in pregnant women with abortion

Variables	Samples N (%)	Positivity N (%)	Prevalence Ratio	P-value
<b>Age</b>				<b>0.002</b>
20-29	27 (33.34)	06(25)	1	
30-39	35 (43.20)	03(12.50)	0.35	
40-49	09 (11.11)	05(20.83)	2.7	
50 or more	10 (12.35)	10(41.67)	6.1	
Total	81 (100)	24(100)		
<b>The cause of abortion</b>				<b>0.004</b>
Hypertension	15(18.52)	02(8.34)	1	
Bleeding	16(19.76)	02(8.34)	0.5	
Molar Pregnancy	13(16.05)	02(8.34)	0.6	
Ectopic Pregnancy	11(13.58)	02(8.34)	0.75	
Abnormal uterine bleeding (AUB)	06(7.40)	03(12.48)	2.3	
Uterine fibroids	03(3.70)	01(4.16)	1.45	
Uterine rupture	09(11.11)	06(25)	3.3	
Endometriosis	01(1.23)	01(4.16)	4.2	
Placenta Accreta	02(2.47)	01(4.16)	2.4	
cervical cancer	02(2.47)	02(8.34)	4.5	
Endometrial cancer	02(2.47)	02(8.34)	4.5	
Other cause	01(1.24)	00(00)	0	
<b>Contact with dog and cat</b>				<b>0.001</b>
Yes	37(45.68)	23(95.84)	1	
No	44(54.32)	01(4.16)	0.06	

**Table 6.** The presence of Antinuclear Antibody (ANA) and *Toxocariasis* infection in pregnant women with abortion

Variables	Samples N (%)	Positivity N (%)	Prevalence Ratio	P-value
<b>Age</b>				<b>0.009</b>
20-29	27 (33.34)	00(00)	0	
30-39	35 (43.20)	04(40)	1	
40-49	09 (11.11)	03(30)	3.8	
50 or more	10 (12.35)	03(30)	3.3	
Total	81 (100)	10 (100)		
<b>The cause of abortion</b>				<b>0.601</b>
Bleeding	16(19.76)	02(20)	1	
Molar Pregnancy	13(16.05)	01(10)	0.66	
Ectopic Pregnancy	11(13.58)	01(10)	0.8	
Abnormal uterine bleeding (AUB)	06(7.40)	02(20)	3.45	
Uterine rupture	09(11.11)	03(30)	4.3	
Placenta Accreta	02(2.47)	01(10)	4.9	
Other cause	24(29.63)	00(00)	0	
<b>Contact with dog and cat</b>				<b>0.002</b>
Yes	37(45.68)	10(100)	1	
No	44(54.32)	00(00)	0	

**Table 7.** The presence of Antinuclear Antibody (ANA) and Coinfection in pregnant women with abortion

Variables	Samples N (%)	Positivity N (%)	Prevalence Ratio	P-value
<b>Age</b>				<b>0.003</b>
20-29	27 (33.34)	00(00)	0	
30-39	35 (43.20)	02(25)	1	
40-49	09 (11.11)	03(37.50)	5.1	
50 or more	10 (12.35)	03(37.50)	4.5	
Total	81 (100)	08 (100)		
<b>The cause of abortion</b>				<b>0.317</b>
Bleeding	16(19.76)	01(12.50)	1	
Ectopic Pregnancy	11(13.58)	01(12.50)	1	
Abnormal uterine bleeding (AUB)	06(7.40)	02(25)	4.5	
Uterine rupture	09(11.11)	03(37.50)	4.95	
Placenta Accreta	02(2.47)	01(12.50)	5.8	
Other cause	37(45.68)	00(00)	0	
<b>Contact with dog and cat</b>				<b>0.004</b>
Yes	37(45.68)	08(100)	1	
No	44(54.32)	00(00)	0	

## DISCUSSION and CONCLUSION

Abortion is a public health problem, currently, the clinical and experimental research studying the reasons for abortion has been increased as a try to solve this problem (23). In this study, we investigated the seroprevalence of each antinuclear antibodies, Toxoplasmosis, and Toxocariasis among healthy pregnant women and pregnant women with the abortion of Mashhad city. Immunological responses may lead to infertility and miscarriage in a number of cases. Any disruption in the normal immunological association between mother and conceptus is well acted as the main risk factor for abortion. ANAs positivity reported as one of the autoimmune factors that causing 30% of fetal rejection cases (24). Shoenfeld et al in 2006 reported the association between autoimmune disorders in pregnant women and their history of recurrent abortion (25). Among parasitic infections, toxoplasmosis and toxocariasis are recognized as globally distributed zoonotic diseases (26). Toxoplasmosis in pregnant women has a hazardous effect it may cause abortion. A number of previous studies have reported the association between *T. gondii* infection with unexplained abortion (27, 28). In this study, we estimated the prevalence rate of IgG for *T. gondii* in 162 (81 healthy pregnant women, 81 pregnant women with abortion) in Mashhad, Iran. In agreement with several studies in Iran, the prevalence of *T. gondii* was 31-32% were reported (29-31). As shown in our results section, 28% of women were IgG positive which was less than last reports from Iran (>40%) (32, 33). Toxocariasis infection in pregnant women has a harmful effect which may reach to pregnancy loss. The overall *Toxocara* IgG prevalence among pregnant women with abortion in our study was 12%, which is lower than that of a previous study conducted in Ilam province in western Iran, IgG antibody was detected in (17.99 %) (34) and higher than the study conducted in Brazil which reported infection only in 6.4% of pregnant women with abortion (35). A number of variables have shown

their association with Antinuclear antibody (ANA) and infection of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp and such as age, domestic animal contact, and cause of abortion. Our study findings showed a significant association between age and ANAs positivity with high prevalence in the groups (50 or more) and (40-49) with (4.38, 2.1 fold respectively). In agreement with Satoh et al in 2012, ANA positivity associated with age, infection peak at age 40 to 49 years, (36) and seroprevalence of *T. gondii* IgG with age (37) was reported. Also in agreement with several studies that reported an increase in seroprevalence of *T. gondii* IgG with age (38-40). Our study findings showed a significant association between *Toxocara* IgG and age. Domestic animal contact such as cats and dogs has been recognized as the main transmission route for infection of both *T. gondii* and *Toxocara* spp (41, 42). In agreement with Lappin in 2010 IgM for *T. gondii* was detected only in 2% of pregnant women with abortion was reported (41). Our study results showed that contact with domestic animals such as cats or dogs significantly associated with seroprevalence of *T. gondii* IgG. In agreement with Cong et al in 2014, the association between toxocariasis and contact with dogs and cats was observed (42). Our study finding showed that the seroprevalence of *Toxocara* IgG was significantly associated with domestic animal contact. In addition to our study findings showed a significant association of ANAs with domestic animal contact. Abortion causes varied and a number of them showed association with variables that have been studied in the present study. Seroprevalence of *T. gondii* IgG in our study showed a statically significant association of this infection with abortion causes especially Endometrial cancer, Endometriosis, and Adnexa of uterus respectively. Also, Seroprevalence of *Toxocara* spp in this study showed association with both bleeding and uterine rupture as an abortion cause without significant association. *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp are very different parasites, one a protozoan and the other a helminth, both organisms sharing the same transmission through contaminated

soil. Cats and dogs both excrete feces in soil and humans ingest soil during work (43). According to a 2017 study, the prevalence of *T. gondii* and *Toxocara* spp had similar risk factors equal to the present study(20). ANAs positivity was detected in 24% of pregnant women with abortion with seropositive *T. gondii* IgG, a significant association with age, cause of abortion, and contact with cats have been observed. Similarly, ANAs positivity was detected in 10% of pregnant women with abortion with seropositive *Toxocara* spp, association with age, and contact with dogs and cats . In addition to the presence of ANAs in

cases with co-infection of *T. gondii* and *Toxocara* spp in 8%, relation with age and contact with the animal are statically significant.

In conclusion, the current study revealed that 31%, 28%, 12% of Antinuclear Antibodies, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara* spp respectively. These study findings indicated that there is a relatively high prevalence of *T. gondii*, *Toxocara* spp, and ANAs in pregnant women with abortion. The coexistence of two agents or of one with ANAs increases the risk of abortion. All of them showed association with age and contact with domestic animals like cats and dogs.

### ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* The study was approved by the Zahedan University of Medical Sciences Regional Research Ethics Committee. (Date: 24.01.2021 and Number: IR.ZAUMS.REC.1399.487).

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### REFERENCES

1. Shankarakumar U, Pradhan VD, Patwardhan MM, Shankarakumar A, Ghosh K. Autoantibody profile and other immunological parameters in recurrent spontaneous abortion patients. *Niger Med J* 2011; 52:3.
2. Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet* .2005;272(2):95-108.
3. Sheldon J: Laboratory testing in autoimmune rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004; 18:249-269.
4. Kjersti M, Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J: Immunology of normal pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11:279-295.
5. Yoshinaga K: Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Semin Cell Develop Biol* 2008; 19:161-169.
6. Kwak-Kim J, Yang KM, Gilman-Sachs A: Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation. *J Obstet Gynecol Res* 2009; 35:609-622.
7. Walia GK, Mukhopadhyay R, Saraswathy KN, Puri M, Chahal SMS. Immuno- Molecular Etiology of Recurrent Pregnancy Loss and the Anthropological Perspective. *Int J Hum Genet*. 2008; 8: 227-235.
8. Sagi L, Baum S, Agmon-Levin N, Sherer Y, Katz BS, Barzilai O, et al. Autoimmune bullous diseases the spectrum of infectious agent antibodies and review of the literature. *Autoimmun Rev*. 2011;10:527-35.

9. Shapira Y, Agmon-Levin N, Selmi C, Petříková J, Barzilai O, Ram M, et al. Prevalence of anti-Toxoplasma antibodies in patients with autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2012;39:112-6.
10. Eskandarian A, Jahani S, Hejazi H, Yousefi H, Raissi V. Investigation of *Toxoplasma gondii* infection in Cutaneous Leishmaniasis patients of the Isfahan province. *Int J Infect.* 2017 Jan 1;4(2).
11. Karami MF, Rafiei A, Raiesi O, Getso M, Akhlaghi E, Jalali P, Shayanfard M, Beigzadeh E, Arbat SK, Mirabedini Z, Raissi V. The Relation between Toxocariasis and Toxoplasmosis co-infection and the presence of Rheumatoid Factor (RF) in people with hydatidosis in Southwestern Iran, from 2013 to 2018. *Journal of Parasitic Diseases.* 2019 Sep 1;43(3):379-84.
12. Raissi V, Taghipour A, Navi Z, Etemadi S, Sohrabi Z, Sohrabi N, Getso M, Shamsaei S, Fasihi Karami M, Raiesi O. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp. infections among pregnant women with and without previous abortions in the west of Iran. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.* 2020 Mar;46(3):382-8.
13. Raissi V, Bayat F, Taghipour A, Raiesi O, Ibrahim A, Getso M, Hoseiny Z, Alizadeh G, Shahraki MK, Etemadi S. Seroepidemiology and risk factors of toxoplasmosis among children age ranged from 1 to 14 years referred to medical diagnostic laboratories in Southeast Iran. *Clinical Epidemiology and Global Health.* 2019 Dec 23.
14. Raissi V, Sohrabi N, Bayat F, Etemadi S, Raiesi O, Jalali P, Karami M, Abdollahi A, Hoseiny Z, Shayanfard M, Alizadeh G. Human Toxocariasis in individuals with blood disorders and cancer patients: the first seroepidemiological study in Iran. *Journal of Parasitic Diseases.*:1-8.
15. Abbaszadeh Afshar MJ, Zahabiun F, Heydarian P, Mozafar Saadati H, Mohtasebi S, Khodamoradi F, Raissi V. A Systematic Review and Meta-analysis of Toxocariasis in Iran: Is it Time to Take it Seriously?. *Acta Parasitologica.* 2020 Apr 21:1-6.
16. Raissi V., Raiesi O., Etemadi S., Firoozeh F., Getso M., Muslim Hadi A. et al. Environmental soil contamination by *Toxocara* species eggs in public places of Ilam, Iran. *Ann Agric Environ Med.* 2020;27(1):15-18. doi:10.26444/aaem/118130.
17. Raissi V, Saber V, Bahadory S, Akhlaghi E, Raiesi O, Aslani R, Shamsi L, Graili A, Ibrahim A. Comparison of the prevalence of *Toxocara* spp. eggs in public parks soils in different seasons, from 2017 to 2018, Tehran Province, Iran. *Clinical Epidemiology and Global Health.* 2019 Oct 19.
18. Choi D, Lim JH, Choi DC, Paik SW, Kim SH, Huh S. Toxocariasis, and Ingestion of Raw Cow Liver in Patients with Eosinophilia. *The Korean Journal of Parasitology* 2008; 46:139-143.
19. Raissi V, Mohebalı M, Kia EB, Foroushani AR, Sohrabi N, Rokni MB, Zibaei M. Expression of Mir-21 and Mir-103a in *Toxocara canis*: Potential for Diagnosis of Human Toxocariasis. *Iranian Journal of Parasitology.* 2020 Dec 15.
20. Santos, PC, Telmo PDL, Lehmann LM, Mattos GT, Klafke GB, Lorenzi C et al. (2017). Risk and other factors associated with toxoplasmosis and toxocariasis in pregnant women from southern Brazil. *Journal of helminthology*, 91(5), 534-538.
21. Santos PC, Lehmann LM, Lorenzi C, Hirsch C, Telmo PL, Mattos GT et al. (2015). The seropositivity of *Toxocara* spp. antibodies in pregnant women attended at the university hospital in Southern Brazil and the factors associated with infection. *PLoS one*, 10(7), e0131058.
22. Dipti TR, Azam MS, Sattar MH, Rahman S. Detection of Antinuclear Antibody in Childhood Rheumatic Diseases by Immunofluorescence Assay and Enzyme Immuno Assay. *Bangladesh Journal of Child Health.* 2011;35(2):49-52.
23. Christiansen OB, Steffenson R, Nielsen H, Varming K: Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications. *Gynecol Obstet Invest* 2008; 66:257-267.
24. Baek K-H, Lee E-J, Kim Y-S: Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends Mol Med* 2007; 13:310-317.
25. Shoenfeld Y, Carp HJ, Molina V, Blank M, Cervera R, Balasch J, et al. Autoantibodies, and prediction of reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* 2006; 56: 337-344.
26. Smith, H., Holland, C., Taylor, M., Magnaval, J.F., Schantz, P. & Maizels, R. (2009) How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitology* 25, 182-188.
27. Yasodhara P, Rama Lakshi BA, Lakshmi V, Krishna TP. Socioeconomic status and prevalence of toxoplasmosis during pregnancy. *Ind J Med Microbiol.* 2004; 22: 241-243.
28. Chen KT, Esklid A, Bresnahan M, Pedersen B, Sher A, Jenum PA. Previous maternal infection with *Toxoplasma gondii* and the risk of fetal death. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:443-49.
29. Anvari Tafti M, Ghafourzadeh M. Seroepidemiology of *Toxoplasma* infection in pregnant women in Yazd in 2012. *Toloo-e-Behdasht.* 2014;13: 116-125.

30. Ghasemloo H, Ghomashlooyan M, Hooshyar H. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women admitted at Shahid Akbar Abadi hospital, Tehran, Iran, 2010-2013. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*.2014; 1: 16-19.
31. Firouz ZE, Kaboosi H, Faghih Nasiri A, Tabatabaie SS, Golhasani-Keshtan F, Zaboli F. A comparative serological study of toxoplasmosis in pregnant women by CLIA and ELISA methods in Chalus City Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2014;16: e15115.
32. Panah AS, Assadi M, Bahman Soufiani K, Barzegar G, Gharachorlou A, Emami Zeydi A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Amol, northern Iran. *Life Science Journal*.2013; 10: 164-168.
33. Sharbatkhori M, Dadi Moghaddam Y, Pagheh AS, Mohammadi R, Hedayat Mofidi H, Shojaee S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infections in pregnant women in Gorgan city, Golestan province, Northern Iran-2012. *Iranian Journal of Parasitology*. 2014;9: 181-187.
34. Raissi V, Sohrabi Z, Getso M, Raiesi O, Hashemi Hafshejani S, Shabandoust H, Etemadi S. Risk factors and prevalence of Toxocariasis in pregnant women and diabetic patients compared to healthy adults in Ilam province. *EXCLI Journal* 2018; 17:983-988.
35. Pereira, L. C., Elefant, G. R., Nóbrega, Y. M., Vital, T., Nitz, N., Gandolfi, L., ... & Hecht, M. (2016). *Toxocara* spp. seroprevalence in pregnant women in Brasília, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(5), 641-643.
36. Satoh M, Chan EK, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD, et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum* 2012;64(7):2319-27.
37. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. Chapter 31. In: JS Remington and J Klein, eds. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant* (6th ed.). WB Saunders, Philadelphia.2006;947-1092.
38. Kolbekova P, Kourbatova E, Novotna M, Kodym P, Flegr J.. New and old risk- factors for *Toxoplasma gondii* infection: a prospective cross-sectional study among military personnel in the Czech Republic. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007;13(10), pp. 1012-1017.
39. Sroka S, Nina B, Andreas W, Jörg H, Liana A, Heliane R, et al. Prevalence and Risk Factors of Toxoplasmosis among Pregnant Women in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(3): 528-533.
40. AL-Ani RT. Study of *Toxoplasma* infection in women recurrent abortion in the First trimester of pregnancy by Indirect immunofluorescent antibody test (IFAT). *DJPS*. 2012; Vol: 8 (2).
41. Lappin MR. Update on the diagnosis and management of *Toxoplasma gondii* infection in cats. *Topics in Companion Animal Medicine*. 2010; 25:136-141.
42. Cong W, Zhang XX, Zhou N, Yu CZ, Chen J. *Toxocara* Seroprevalence among Clinically Healthy Individuals, Pregnant Women and Psychiatric Patients, and Associated Risk Factors in Shandong Province, Eastern China. *PLOS Neglected Tropical Disease* .2014;8.
43. Holland GM, Ocular toxoplasmosis: a global reassessment, part 1: epidemiology and course of the disease. *Am J Ophthalmol*.2003;136: 973-988.

# Samsun Bafra Devlet Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde endotrakeal aspirat kültüründe üreyen *Acinetobacter baumannii* suşları ve COVID-19 etkisi (2019-2020)

*Acinetobacter baumannii* strains grown in endotracheal aspirate culture in Samsun Bafra State Hospital intensive care units and the effect of COVID-19 on *Acinetobacter baumannii* strains (2019-2020)

Seda GÜDÜL HAVUZ<sup>1</sup> (ID)

## ÖZET

**Amaç:** *Acinetobacter baumannii*, hastane ortamında uzun süre yaşama yeteneğine sahip ventilasyon ile ilişkili pnömoninin önemli bir etkenidir. Bu patojene etkili olan antibiyotiklere karşı artan direnç endişe yaratmaktadır. Bu çalışmada yoğun bakım ünitelerinde endotrakeal aspirat (ETA) kültürlerinde üreyen *A. baumannii* suşlarının antibiyotik direnç profilleri ve uzun süre ülkemizde en çok vakanın görüldüğü ilimizde COVID-19 pandemisinin direnç profilleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

**Yöntem:** Çalışmamıza, Ocak 2019 ile Aralık 2020 tarihleri arasında Bafra Devlet Hastanesi yoğun bakım ünitelerinden laboratuvarımıza gönderilen ETA örneklerinden izole edilen toplam 74 adet *A. baumannii* izolatu dahil edilmiştir. Konvansiyonel yöntemler ve yarı otomatik bakteri tanımlama sistemi Vitek-2 (bioMérieux, Fransa) kullanılarak izole edilen *A. baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standartlarına uygun olarak Vitek-2 sistemi ile test edilmiştir.

## ABSTRACT

**Objective:** *Acinetobacter baumannii* is an important causative agent of ventilation-associated pneumonia capable of long-term survival in the hospital setting. Increasing resistance to antibiotics effective against this pathogen is of concern. In this study, the antibiotic resistance profiles of *A. baumannii* strains grown in endotracheal aspirate (ETA) cultures in intensive care units and the effect of the COVID-19 pandemic on the resistance profiles in our province where the highest number of cases were observed in our country for a long time were investigated.

**Methods:** Our study included 74 *A. baumannii* isolates isolated from ETA samples that was sent to our laboratory from the intensive care units of Bafra State Hospital between January 2019 and December 2020. Bacteria were identified using conventional methods and a semi automatic bacterial identification system Vitek-2 (bioMérieux, France). The antibiotic susceptibility tests of the isolated strains were studied in accordance with the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standards. Antibiotic susceptibility of *A. baumannii* strains was tested with Vitek-2 system.

<sup>1</sup>Bafra Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Samsun



İletişim / Corresponding Author : Seda GÜDÜL HAVUZ  
Yenimahalle Alanlı Cad. 3315. Sok. No: 26 55270 Samsun - Türkiye  
E-posta / E-mail : drsedahavuz@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 03.06.2021  
Kabul Tarihi / Accepted : 13.08.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.48753

Güdül Havuz S. Samsun Bafra Devlet Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde endotrakeal aspirat kültüründe üreyen *Acinetobacter baumannii* suşları ve COVID-19 etkisi (2019-2020). Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(2): 229 - 242

**Bulgular:** COVID-19 pandemisi öncesinde 18 hasta ile pandemi döneminde 56 hastanın ortalama yaş ve standart sapmaları sırasıyla  $83,0 \pm 8,3$  ve  $70,5 \pm 14,9$  ( $p < 0,001$ ) olarak saptanmıştır. Yıllara göre cinsiyetin dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p = 0,025$ ). 2019 yılında hastaların %55,6'sı kadinken, 2020 yılında %73,2'si erkek olarak saptanmıştır. İki dönemde ölüm oranları ( $p = 0,628$ ) ve solunum destek ihtiyaçları ( $p = 0,191$ ) bakımından fark görülmemiştir. Pandeminin izole edilen *A. baumannii* sayısını %311 oranında arttırdığı saptanmıştır. İki dönemde de direnç en fazla, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, siprofloksasin ve imipenem karşı görülmüştür. Her iki döneme bakıldığında, amikasin direnci 2020 yılında daha az oranda görülmüştür. Yıllara göre tigesiklin direnç oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). 2019 yılında suşların tigesiklin duyarlılığı, %88,9 iken 2020 yılında %26,8 olarak tespit edilmiştir. 2019 yılında suşların %11,1'i, 2020 yılında ise %64,3'ü tigesikline orta derece duyarlı bulunmuştur. Bu çalışmada izolatların sadece birinde (%1,4) kolistin direnci gözlenirken, beş izolatta (%6,8) ise tigesiklin direnci saptanmıştır. Bir izolat (%1,4) ceftazidim dışındaki tüm antibiyotiklere duyarlı olarak bulunmuştur. 73 *A. baumannii* izolatının çoğul antibiyotik direncine bakıldığında; çoklu ilaç direnci (ÇİD) %22,9 (n:17), aşırı ilaç direnci (AİD) %74,3 (n:55), tüm ilaçlara direnç (TİD) %1,4 (n:1) olarak bulunmuştur. Pandemi öncesi ve sonrası amikasin, meropenem ve tigesiklin dirençleri açısından istatistiksel fark bulunmakla beraber direnç paternleri arasında fark bulunmamıştır ( $p = 0,281$ ).

**Sonuç:** *A. baumannii*'ye karşı en etkin antibiyotiklerin kolistin ve tigesiklin olduğu görülmüştür. COVID-19 pandemisinin, direnç paternlerinin oranlarını değiştirmedeği saptanmıştır. Her hastanenin kendi direnç paternlerini belirlemesi, sonuçlarına göre ampirik tedavi protokollerini güncellemesi ve klinisyenlerin uygun antibiyotikleri erkenden kullanmasıyla bu enfeksiyon ile mücadelede başarının artacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, COVID-19, antibiyotik direnç paternleri, ölüm, otomatize sistem

**Results:** The mean age and standard deviations of 18 patients before the COVID-19 pandemic and 56 patients after the pandemic were found to be  $83,0 \pm 8,3$  and  $70,5 \pm 14,9$  ( $p < 0,001$ ), respectively. A statistically significant difference was found between the distributions of gender by years ( $p = 0,025$ ). While 55,6% of the patients were female in 2019, 73,2% of the patients in 2020 were male. There was no difference between the two periods in terms of death rates ( $p = 0,628$ ) and respiratory support needs ( $p = 0,191$ ). It was determined that the pandemic increased the number of isolated *A. baumannii* by 311%. For the two periods, resistance was the greatest for piperacillin/tazobactam, ceftazidime, ciprofloxacin and against imipenem. Examining the two periods, amikacin resistance was seen to a lesser extent in 2020. A statistically significant difference was found between tigesiclycline resistance rates by years ( $p < 0,001$ ). While the tigesiclycline susceptibility of strains was 88,9% in 2019, it was found to be 26,8% in 2020. 11,1% of the strains in 2019 and 64,3% in 2020 were found to be moderately susceptible. In this study, colistin resistance was observed in one (1,4%) of all isolates, while tigesiclycline resistance was detected in five isolates (6,8%). One isolate (1,4%) was susceptible to all antibiotics except ceftazidime. When the multi-antibiotic resistance of 73 *A. baumannii* isolates was examined, multidrug resistant (MDR) was 22,9% (n:17), extensive drug resistance (XDR) was 74,3% (n:55), pandrug resistance (PDR) was 1,4% (n:1). Although there was a statistical difference in amikacin, meropenem and tigesiclycline resistances before and after the pandemic, no difference was found between the resistance patterns ( $p = 0,281$ ).

**Conclusion:** It has been observed that the most effective antibiotics against *A. baumannii* are colistin and tigesiclycline. It was determined that the COVID-19 pandemic did not change the resistance pattern rates. It is thought that success in fighting this infection will increase when each hospital determines its own resistance patterns, updates empirical treatment protocols based on their results, and clinicians use appropriate antibiotics early.

**Key Words:** *Acinetobacter baumannii*, COVID-19, antibiotic resistance patterns, death, automated system



## GİRİŞ

Yoğun bakımlardaki nozokomiyal pnömonilerin ve kan dolaşımı kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedeni, *Acinetobacter baumannii*'dir (1,2). Bu mikroorganizmanın neden olduğu enfeksiyonların sayısının giderek artması ve çoklu ilaç direncine sahip olması yoğun bakımdaki hastalar için önemli bir sorun haline gelmiştir (2).

*Acinetobacter* türleri zorunlu aerop, gram negatif kokobasil görünümünde, oksidaz negatif, hareketsiz, nonfermentatif basillerdir. Sağlıklı insanların deri florasında ve hastane ortamında bulunabilen dış ortam koşullarına dayanıklı mikroorganizmalardır (3). Yoğun bakım ünitelerinde ortaya çıkan hastane enfeksiyonlarının tedavisi güç ve mortalitesi yüksektir (4, 5). Hastanede yatan ve *A. baumannii* ile enfekte olan hastalarda mortalitenin yaklaşık olarak %30 olduğu bildirilmektedir (6).

*A. baumannii*'nin neden olduğu üst solunum yolu kolonizasyonu ile gerçek pnömoniyi birbirinden ayırmak oldukça güçtür. *A. baumannii*, sağlıklı insanlarda enfeksiyona neden olmazken bariyer fonksiyonları veya florası bozulmuş, immünitesi zayıflamış kişilerde enfeksiyonlara neden olmaktadır (3, 5). *Acinetobacter*'lere bağlı ventilatör ile ilişkili pnömoni, bakteriyemi, idrar yolu enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, menenjit, peritonit gibi enfeksiyonların çok büyük bir bölümünden *A. baumannii* sorumludur (3, 7).

Viral solunum yolu enfeksiyonlarında, sıklıkla süperenfeksiyonlar ve koenfeksiyonlar görülmektedir (8). COVID-19 nedeni ile bazı hastalarda ciddi solunum problemleri yaşanmakta, hatta hastaların %5-15'inde yoğun bakım ihtiyacı ve mekanik ventilasyon desteği gerekmektedir (9, 10). Viral enfeksiyona karşı gelişen adaptif immün cevap, konağın bakteriyel enfeksiyona karşı doğuştan gelen innate immün yanıtını zayıflatmaktadır. Bu durum, COVID-19'lu hastaların akciğerlerinde virüs eredike olduğu zaman sekonder bakteriyel enfeksiyonların ortaya çıkışını açıklamaktadır (8). Mekanik ventilasyon, immünsüpresif kullanımı, karbapenem ve 3. kuşak sefalosporinler gibi önceden antibiyotik kullanma öyküsü, kronik akciğer hastalığı, malignansiler, invazif girişimler ve *Acinetobacter* ile

kolonizasyon bu enfeksiyona eğilimi arttırmaktadır (11, 12).

COVID-19 ile ilişkili ölümler, özellikle komorbiditesi olan yaşlılarda görülsa de yoğun bakımlarda entübasyon sonucu ortaya çıkan nozokomiyal pnömoniler önemli risk faktörüdür (13). *A. baumannii*, birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmakla birlikte mobil genetik unsurları sayesinde birçok antibiyotik grubuna karşı hızla direnç geliştirebilmektedir (12). Sürveyans bulguları, Avrupa'da yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *A. baumannii*'nin aminoglikozitler, florokinolonlar ve karbapenemlerden oluşan gruba karşı direncinin, %74 ile %86 arasında değiştiğini göstermiştir (14). Karbapenem dirençli *A. baumannii* (CRAB), hastane enfeksiyonlarına neden olan önemli bir halk sağlığı tehdididir (15). CRAB izolatları, polimiksinler ve tigesiklin dışında tüm antibiyotiklere dirençlidir (16). Çoklu ilaç dirençli (ÇİD) *A. baumannii* izolatlarına karşı en etkili antimikrobiyal ajan kolistin olarak bulunmuştur (17). Ancak son yıllarda kolistin ve tigesikline direnç gösteren panrezistans *A. baumannii* izolatları bildirilmektedir (16).

Sunulan bu çalışmada, iki yıllık sürede yoğun bakım ünitelerindeki hastaların ETA örneklerinden izole edilen *A. baumannii*'ye karşı antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi ve Mart 2020 yılında başlayan COVID-19 pandemisinin bu oran üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya 2019 Ocak ile 2020 Aralık ayları arasında yoğun bakım ünitelerinden laboratuvarımıza gönderilen ETA örneklerinden izole edilen toplam 74 adet *A. baumannii* suşu dahil edilmiştir. ETA örnekleri steril şartlarda bir kateter yardımı ile endotrakeal tüpün içinden serum fizyolojik verilip, aspire edilmesiyle elde edilmiştir. Aynı hastada birden fazla üreme olduysa, ilk üreme çalışmaya dahil edilmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde 48 saatten az kalan hastalar ve 48 saatten önce enfeksiyon gelişen hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

ETA örnekleri, %5 kanlı agar, eosin metilen mavisi ve çikolatamsı agara ekildikten sonra 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Mikroorganizmaların koloni

morfolojisi, gram boyanma özellikleri ve biyokimyasal testleri (oksidaz ve katalaz) değerlendirilmiştir. Kesin tür tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri için 0,5 Mcfarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlanarak, Vitec 2 Compact® (bioMerieux, Fransa) otomatize sistem ile Vitec 2 ID-AST® kartları kullanılmıştır. İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılık testleri, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standartlarına uygun olarak çalışılmıştır. Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI) ve EUCAST tarafından tigesiklin için onaylanmış minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) sınır değeri bulunmamaktadır. Bu nedenle Gıda ve İlaç Dairesi-Food and Drug Administration (FDA) tarafından *Enterobacteriaceae* için önerilen MİK sınır değeri ( $\leq 2$  µg/mL, duyarlı) dikkate alınmıştır (18). Kalite kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan antibiyotik grupları; antipsödomonal penisilin ile birlikte beta laktam inhibitörü (piperasilin/tazobaktam), sülfonamid (trimetoprim/sulfametaksazol), sefalosporin (seftazidim), antipsödomonal kinolon (siprofloksasin), aminoglikozidler (gentamisin, amikasin), karbapenemler (imipenem, meropenem), tigesiklin ve kolistindir.

İzolatlar, tüm antibiyotikler içinde, bir ile üç antibiyotik grubuna dirençli ise ÇİD, bir ya da iki antibiyotik grubu dışında tüm ilaçlara dirençli ise, “aşırı ilaç dirençli” (AİD), mevcut tüm antibiyotiklere dirençli ise “tüm ilaç dirençli” (TİD) olarak tanımlanmıştır.

Çalışma için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 27.01.2021/137

tarif ve 2021/2/14 numaralı etik onay alındı ve Helsinki Bildirgesi'ne bağlı kalındı.

#### İstatistiksel Yöntem

Veriler IBM SPSS V23 ile analiz edilmiştir. Normal dağılıma uygunluk Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Gruplara göre normal dağılan hasta yaşının karşılaştırılmasında, bağımsız iki örnek t testi kullanılmıştır. Gruplara göre kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare ve Fisher's Exact testleri kullanılmıştır. Analiz sonuçları nicel veriler için ortalama  $\pm$  standart sapma ve ortanca (minimum - maksimum) şeklinde kategorik veriler frekans (yüzde) olarak sunulmuştur. Önem düzeyi  $p < 0,050$  olarak alınmıştır.

## BULGULAR

Çalışmamızda, hastanemiz yoğun bakım servislerinde yatan hastaların ETA örneklerinin 2019 yılında 18, 2020 yılında ise 56 tanesinden *A. baumannii* izole edilmiştir. Örneklerin 49'u erkek, 25'i kadın hastalardan alınmıştır. *A. baumannii* en sık olarak 3. basamak yoğun bakımdaki hastaların örneklerinde saptanmıştır. Vakaların %24'ü 2019 yılında, %76'sı 2020 yılında tespit edilmiştir. Pandeminin izole edilen *A. baumannii* sayısını %311 oranında arttırdığı saptanmıştır. Hastalara ait yaş bilgileri tablo 1'de belirtilmiştir. Gruplara göre hastaların yaş ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuş ve COVID-19 pandemi dönemindeki hastaların daha genç olduğu görülmüştür. ( $p < 0,001$ ). Pandemi döneminde hasta ölüm oranlarında bir önceki yıla göre artış görülmemiştir ( $p = 0,628$ ).

**Tablo 1.** Gruplara göre hasta yaşının karşılaştırılması

	Ort. $\pm$ s. sapma	Ort. (min. - maks.)	Test istatistiği	p
Grup				
2019 Yılı	83,0 $\pm$ 8,3	83,0 (67,0 - 98,0)	t=4,487	<0,001
2020 Yılı	70,5 $\pm$ 14,9	72,5 (20,0 - 92,0)		
Toplam	73,5 $\pm$ 14,6	75,5 (20,0 - 98,0)		
Cinsiyet				
Erkek	70,5 $\pm$ 15,3	74,0 (20,0 - 98,0)	t=-2,579	0,012
Kadın	79,4 $\pm$ 11,1	84,0 (57,0 - 94,0)		

t: Bağımsız iki örnek t test istatistiği

İki yıllık dönemde *Acinetobacter* pozitif yoğun durumları ve solunum destek ihtiyacı ve cinsiyetlerin bakım hastalarının altta yatan hastalıkları, mevcut dağılımı tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Gruplara göre kategorik değişkenlerin karşılaştırılması

	2019 Yılı	2020 Yılı	Toplam	Test istatistiği	p
<b>Hastalıklar</b>					
COVID 19	<b>0 (0)</b>	<b>37 (66,1)</b>	37 (50)	$\chi^2 = 49,942$	<0,001
Akut solunum yetmezliği	0 (0)	2 (3,6)	2 (2,7)		
Pnömoni	1 (5,6)	5 (8,9)	6 (8,1)		
KOAH, pnömoni	<b>5 (27,8)</b>	<b>2 (3,6)</b>	7 (9,5)		
KOAH, kalp yetmezliği	1 (5,6)	2 (3,6)	3 (4,1)		
KOAH	1 (5,6)	0 (0)	1 (1,4)		
KOAH , HT	<b>2 (11,1)</b>	<b>0 (0)</b>	2 (2,7)		
Alzheimer, solunum yetmezliği	1 (5,6)	3 (5,4)	4 (5,4)		
KOAH, lösemi	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		
Akut solunum yetmezliği, SVH*	<b>3 (16,7)</b>	<b>1 (1,8)</b>	4 (5,4)		
Akut solunum yetmezliği, SVH, Ca <sup>+</sup>	1 (5,6)	0 (0)	1 (1,4)		
Solunum yetmezliği, kafa içi travma	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		
Kalp yetmezliği, solunum yetmezliği	<b>3 (16,7)</b>	<b>0 (0)</b>	3 (4,1)		
Kaburga kırığı, solunum yetmezliği	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		
Subdural kanama, solunum yetmezliği	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		
<b>Mevcut durum</b>					
Hastanede	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)	$\chi^2 = 1,739$	0,628
Ölüm	17 (94,4)	46 (82,1)	63 (85,1)		
Sevk	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		
Şifa	1 (5,6)	8 (14,3)	9 (12,2)		
<b>Solunum desteği</b>					
Almayan	1 (5,6)	0 (0)	1 (1,4)	$\chi^2 = 3,309$	0,191
Oksijen inhalasyon	1 (5,6)	5 (8,9)	6 (8,1)		
Mekanik ventilasyon	16 (88,9)	51 (91,1)	67 (90,5)		
<b>Hastalıklar grup</b>					
COVID 19	<b>0 (0)</b>	<b>37 (66,1)</b>	37 (50)	$\chi^2 = 23,786$	<0,001
Diğer hastalıklar	18 (100)	19 (33,9)	37 (50)		
<b>Cinsiyet</b>					
Erkek	8 (44,4)	41 (73,2)	49 (66,2)	$\chi^2 = 5,040$	<b>0,025</b>
Kadın	10 (55,6)	15 (26,8)	25 (33,8)		

\*SVH: Serebro vasküler hastalık + Ca: Kanser  $\chi^2$ : Ki-kare test istatistiği, F: Fisher’s Exact testi  
Bold karakterler arasında istatistiksel fark bulunmaktadır.

İki yılda da, COVID-19 dışı diğer sebeplerle görülmüştür (p=0,191). 2019 ve 2020 yıllarında A. yatan hasta sayılarında ve mekanik ventilasyon *baumannii* suşları için antibiyotik direnç oranları ihtiyaçlarında istatistiksel olarak fark olmadığı tablo 3'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.** 2019 ve 2020 yıllarına ait antibiyotik dirençleri

	2019 Yılı	2020 Yılı	Toplam	Test istatistiği	p
<b>Piperasilin-tazobaktam</b>					
Dirençli	18 (100)	55 (98,2)	73 (98,6)	---	---
Duyarlı	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		
<b>Trimetoprim-sulfametoksazol</b>					
Dirençli	16 (88,9)	53 (94,6)	69 (93,2)	---	0,590 <sup>F</sup>
Duyarlı	2 (11,1)	3 (5,4)	5 (6,8)		
<b>Ceftazidim</b>					
Dirençli	18 (100)	55 (98,2)	73 (98,6)	---	---
Intermed.	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		
<b>Gentamisin</b>					
Dirençli	17 (94,4)	52 (92,9)	69 (93,2)	---	1,000 <sup>F</sup>
Duyarlı	1 (5,6)	4 (7,1)	5 (6,8)		
<b>Amikasin</b>					
Dirençli	12 (66,7)	17 (30,4)	29 (39,2)	---	0,011 <sup>F</sup>
Duyarlı	6 (33,3)	39 (69,6)	45 (60,8)		
<b>Siprofloksasin</b>					
Dirençli	18 (100)	55 (98,2)	73 (98,6)	---	---
Duyarlı	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		
<b>Imipenem</b>					
Dirençli	18 (100)	55 (98,2)	73 (98,6)	---	---
Duyarlı	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		
<b>Meropenem</b>					
Dirençli	16 (88,9)	55 (98,2)	71 (95,9)	χ <sup>2</sup> =6,667	0,036
Duyarlı	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		
Intermed.	2 (11,1)	0 (0)	2 (2,7)		
<b>Tigesiklin</b>					
Dirençli	0 (0)	5 (8,9)	5 (6,8)	χ <sup>2</sup> =21,648	<0,001
Duyarlı	16 (88,9)	15 (26,8)	31 (41,9)		
Intermed.	2 (11,1)	36 (64,3)	38 (51,4)		
<b>Kolistin</b>					
Dirençli	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)	---	---
Duyarlı	18 (100)	55 (98,2)	73 (98,6)		

χ<sup>2</sup>: Ki-kare test istatistiği, F: Fisher's Exact testi

Her iki dönemde de direnç en fazla, piperasilin/ tazobaktam, seftazidim, siprofloksasin ve imipenem karşı görülmüştür. İki döneme bakıldığında, amikasin direnci 2020 yılında daha az oranda görülmüştür. Bu çalışmada tüm izolatlarda, kolistin direnci bir hastada (%1,4) gözlenirken, tigesiklin direnci beş hastada (%6,8) saptanmıştır. 38 hasta (%51,4) ise tigesikline orta derecede duyarlı olarak bulunmuştur.

Bir izolat (%1,4), ceftazidim dışındaki tüm antibiyotiklere duyarlı olarak bulunmuştur. *A. baumannii* suşları için antibiyotik direnç paternleri tablo 4'te gösterilmiştir.

73 *A. baumannii* izolatının çoğul antibiyotik direncine bakıldığında ÇİD %22,9 (n:17), AİD %74,3 (n:55), TİD %1,4 (n:1) olarak bulunmuştur.

2020 yılında COVID-19 ve diğer hastalıklara göre ölüm durumunun dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,073). Tablo 5'te yıl ayrımı yapmaksızın hastalık gruplarına göre ölüm durumunun dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı gösterilmiştir (p=0,327).

**Tablo 4.** *A. baumannii* suşları için antibiyotik direnç paternleri

	2019 Yılı	2020 Yılı	Toplam	Test istatistiği	p
İlaç rezistans paterni					
Duyarlı	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)	x <sup>2</sup> =3,824	0,281
ÇİD	7 (38,9)	10 (17,9)	17 (23)		
AİD	11 (61,1)	44 (78,6)	55 (74,3)		
TİD	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,4)		

ÇİD: Çoklu ilaç direnci, AİD:Aşırı ilaç direnci, TİD:Tüm ilaçlara dirençli,  
x<sup>2</sup>: Ki-kare test istatistiği, F: Fisher's Exact testi

**Tablo 5.** Hastalık gruplarına göre ölüm durumunun karşılaştırılması

Grup	Ölüm durumu	Covid 19	Diğer hastalıklar	Toplam	Test istatistiği	p
2019 Yılı	Sağ	---	1 (5,6)	1 (5,6)	---	---
	Ölüm	---	17 (94,4)	17 (94,4)		
2020 Yılı	Sağ	4 (10,8)	6 (31,6)	10 (17,9)	---	0,073 <sup>F</sup>
	Ölüm	33 (89,2)	13 (68,4)	46 (82,1)		
Toplam	Sağ	4 (10,8)	7 (18,9)	11 (14,9)	x <sup>2</sup> =0,961	0,327
	Ölüm	33 (89,2)	30 (81,1)	63 (85,1)		

x<sup>2</sup>: Ki-kare test istatistiği, F: Fisher's Exact testi

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Sunulan bu çalışmada, 2019 ve 2020 yıllarında hastanemiz yoğun bakım ünitelerinden gelen ETA kültürlerinde üreyen *A. baumannii*'nin direnç profilleri ve bu direnç profil oranları üzerinde COVID -19 pandemisinin etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. 2019 yılında 7 (%38,9), 2020 yılında 10 (%17,8) , iki yılda ise toplam 17 (%23,0) hastada ÇİD saptanmıştır. 2019, 2020 ve toplamda AİD sırasıyla, 11 (%61,1), 44 (%78,5) ve 55 (%73,3) hastada saptanmıştır. TİD ise sadece 2020'de bir (%1,8) hastada saptanmıştır.

A. *baumannii*, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından, insan sağlığı için en tehlikeli olan ve yeni antibiyotiklere acilen ihtiyaç duyulan patojenler içinde öncelikli 1 kategorisinde yer almaktadır (19). Yapılan çalışmalarda A. *baumannii*'nin en sık yoğun bakım ünitelerinde ve solunum yolu örneklerinden izole edildiği saptanmıştır. Direnç gelişiminde çeşitli faktörler etkili olmaktadır. Bunlardan başlıcaları, mikroorganizmanın hastane ortamında yaşamını sürdürebilme yeteneği, uygunsuz ve yoğun antibiyotik kullanımı, mekanik ventilasyon, trakeostomi, entübasyon, santral kateterizasyon ve üriner kateterizasyon gibi invazif girişimlerdir (20, 21).

Çalışmamızda, 2020 yılında COVID-19 ve diğer hastalıklarda ölüm durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,073). Yıl ayrımı yapılmaksızın hastalık gruplarına göre ölüm durumunun dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,327). 2020 yılında yoğun bakıma kabul edilen COVID-19 hasta sayısı fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak ölüm oranlarını arttırmamıştır. Bu sonuçlar, ölümlerin COVID-19'dan ziyade *Acinetobacter* enfeksiyonu ile ilgili olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda *Acinetobacter* enfeksiyonu sayısı pandemiden sonra %311 oranında artmış olmakla birlikte ölüm oranları aynı şekilde artmamıştır. 2019 yılında 18 hastanın 17 (%94,4)'si ölümlenirken, pandemide 56 hastanın 46 (%82,1)'si ölmüştür. Bu durum üç sebeple

açıklanabilir. Birincisi hastaların ortalama yaşlarının pandemi sonrası dönemde daha genç olması, ikincisi COVID-19'dan dolayı enfeksiyon kontrol önlemlerine sıkı sıkıya uyulması ve iki enfeksiyon hastalıkları uzmanının primer olarak yoğun bakımlardan sorumlu olması ile açıklanabilir. Üçüncü olarak, pandemi öncesi yoğun bakım ihtiyacı olan hastalar genellikle yataklık, sürekli bakıma muhtaç hastalar iken, pandemideki hastaların çoğunun polikliniklerden yoğun bakıma yatışı yapılan solunum sıkıntısı olan hastalar olması ile açıklanabilir. Çalışmamızda iki yılın toplamında COVID-19 dışı 37 hastanın 30'u (%81,1) ölümlenirken, COVID-19 pozitif 37 hastanın 33 (%89,2)'ü ölmüştür. Sharifipour ve ark. solunum yollarında *Acinetobacter* enfeksiyonu olan COVID-19 hastalarının tamamının öldüğünü bildirmişlerdir (22).

Sağmak ve arkadaşları, ETA örneklerinden izole edilen bakteriler arasında en sık A. *baumannii*'yi (%49,5) saptamışlardır. Türkiye'de, A. *baumannii* oranının yüksek olması, örneklerin ağır hastaların olduğu 3. basamak dahili ve cerrahi yoğun bakımda yatan hastalardan gelmesi, enfeksiyon ve kolonizasyon ayrımının yapılamamasına bağlanmıştır (23). Ülkemizde amikasin ve gentamisin direnci için farklı direnç oranları bildirilmektedir. Gözütok ve ark. gentamisin ve amikasin için direnç oranını sırasıyla %54 ve %59 bildirirken, Şimşek ve ark. amikasin için %55,7, gentamisin için %66,9 ve tobramisin için %47,5 olarak bildirmişlerdir (20,24). Bizim çalışmamızda gentamisin direnci 2019 ve 2020 yıllarında sırasıyla %95,4 ve %92,9, amikasin direnci %66,7 ve %30,4 olarak saptanmıştır. İki yılın toplamında gentamisin ve amikasin direncinin sırasıyla %93,2 ve %39,2 olduğu görülmüştür. Bu bulgulara göre özellikle amikasinde belirgin olmak üzere gentamisin direnç oranlarında bir önceki yıla göre azalma gözlenmiştir. Benzer durum Eroğlu ve ark. tarafından da gösterilmiştir. Araştırmacılar, gentamisin direncini 2006 ve 2011 yıllarında sırasıyla %64,3 ve % 52,6 olarak saptamışlardır (25). Zamanla aminoglikozid direncindeki bu azalmanın antibiyotiklerin sınırlı kullanımına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca

amikasin direncinin daha düşük olması, aminoglikozid modifiye edici enzimlerden gentamisine göre daha az etkilenmesi ile açıklanabilir. Ancak bu durumu doğrulamak için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır. Ciddi klinik tablolara neden olan *Acinetobacter* enfeksiyonlarında monoterapi yerine kombine antibiyotik tedavileri verilmelidir. Tedavide, imipenem aminoglikozid kombinasyonu ilk tercih edilecek antibiyotikler olmalıdır (3).

Florokinolonlar kullanıma girdikten sonra bu antibiyotiklere karşı zamanla direnç artışı ortaya çıkmıştır. *A. baumannii* suşlarının florokinolonlara %19,9-100 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir. Karşılıklı ve ark. 2004 yılında yaptıkları çalışmalarında bu patojen için norfloksasin direncini %19,9, siprofloksasin direncini %37,2 olarak saptamışlardır. Ancak yakın zamanda yapılan diğer çalışmalarda direnç oranlarının, siprofloksasin için %94,3 ve levofloksasin için %95,5 hatta %100 kadar yüksek olduğu gösterilmiştir (4,20,24,26). Sunulan bu çalışmada iki yılın toplamında siprofloksasin direnci %98,6 olarak saptanmış olup, ülkemiz direnç verileri ile uyumlu görülmektedir.

Son yıllarda karbapenemlerin ampirik tedavide sık kullanılması ile birlikte giderek artan direnç ortaya çıkmıştır (24). Karbapenemlere direnç gelişimde, metallobetalaktamazlar ve/veya D beta laktamazlar ile karbapenemlerin hidrolize olması önemli bir mekanizmadır (27). Şimşek ve Demir tarafından, imipenem ve meropenem direnci sırasıyla %95,3 ve %96,1 olarak belirtilmiştir (20). Ülkemizden yapılan diğer çalışmalarda, Sağmak ve ark. *Acinetobacter* izolatlarında karbapenem direncini %97,7 (23), Aydemir ve ark. ise, 2015-2016 yıllarında ETA kültürlerinde *Acinetobacter* izolatları için imipenem direncini %93,3 olarak saptamışlardır (28). Şirin ve ark. ise kan kültürlerinden izole edilen *A. baumannii* suşlarında karbapenem direncini %90,4 olarak bulmuşlardır (29).

Sentry antimikrobiyal sürveyans çalışmasında, Asya, Pasifik ve Latin Amerika bölgelerinden toplanan *A. baumannii* izolatlarında imipenem

duyarlılıkta önemli derecede azalma tespit edilmiştir. İmipenem duyarlılık 2006 yılında %65,8 iken 2009 yılında %40,2'ye düşmüştür. Karbapenemlere ve diğer antibiyotiklere karşı artan direnç tedavi seçeneklerini de sınırlamaktadır (30). DSÖ'nün Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) 2017 raporu için ülkemizden 67 laboratuvar veri sağlamış olup, *A. baumannii*'nin karbapenemlere %93 oranında dirençli olduğu saptanmıştır (31). Bu rapor verilerine göre ülkemizdeki karbapenem direnci diğer ülkelerden farklılık göstermektedir.

Çalışmamızda, 2019 yılında meropenem ve imipenem için direnç oranları sırasıyla %88,8 ve %100 iken, 2020 yılında ise her iki antibiyotik için direnç oranı %98,2 olarak saptanmıştır. Bu oranlar, ülkemizde yapılan çalışmalarla benzerlik göstermekte iken dünyadaki çalışmalara göre daha yüksek olarak saptanmıştır. *A. baumannii*'nin antibiyotik duyarlılığının bölgelere göre incelendiği bir çalışmada imipenem direnci dünyada en yüksek Ortadoğu'da (%91,4) en düşük Kuzey Amerika'da (%36,2) saptanmıştır (31). Çalışmamızda antibiyotik direncinin yüksek oranda saptanmasının nedeni, örneklerin yoğun bakım ünitelerinde nispeten ağır ve kronik hastalardan elde edilmiş olmasıdır. İlaçlara direnç gelişiminde; uzun süren hastane yatışları, yoğun bakım ünitelerinde invazif işlemler yapılmış olması, yoğun bakıma gelmeden önce geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması gibi faktörlerin de etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca karbapenemlere direncin bu denli yüksek olması yoğun bakımlarda ampirik tedavide sık tercih edilmelerinden kaynaklanabilir. Hastanemizdeki yüksek direnç oranı göz önüne alındığında ampirik tedavide, karbapenemlerin tek başına tercih edilmemesi gerektiği düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmada imipenem direnci ile tigesiklin direnci arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki saptanmıştır. CRAB'ın, tigesiklin ve kolistine direnç geliştirme eğiliminde olduğu bildirilmektedir (20). Bazı ÇİD *A. baumannii* izolatlarında tigesikline karşı yüksek düzeyde direnç bildirilmektedir.

Bu izolatlarda tigesikline duyarlılıktaki azalma, multidrug eflux pompa sisteminin aşırı ekspresyonu ile açıklanmaktadır (32). Ülkemizde Vitec 2 otomatize sistem kullanılarak yapılan çalışmalarda, geniş spektrumlu bir ilaç olan tigesikline karşı direnç %3-%49,3 arasında bildirilmiştir (20,24,25,33). Kullanılan yöntemlere göre direnç oranları farklı olarak bulunmaktadır. Şahin ve ark. yaptıkları çalışmada Vitec 2 otomatize sistem ile tigesiklin direncini %49,3, Şirin ve ark. ise Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile %72,4 olarak saptamışlardır (29, 33). Ayrıca Şimşek ve ark. Vitec 2 otomatize sistemini kullanarak tigesiklin direncini %21,7 olarak, broth mikrodilüsyon yöntemi ile %33 olarak saptamışlardır (20). Çalışmamızda, Vitec 2 otomatize sistem kullanılarak 2019 yılında hiçbir vakada tigesiklin için direnç gözlenmezken, 2020 yılında 5 vakada (%8,9), iki yılda toplam 5 vakada (%6,8) direnç saptanmıştır. Bu bulgular, tigesiklin direncinin ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Günümüzde *A. baumannii*'ye karşı en etkili ve direnç oranı en az olan antibiyotik kolistindir. Karbapenemlere olan direnç, yan etkilerine rağmen kolistini tedavi seçeneği haline getirmektedir (24). Sentry programı kapsamında 2006-2009 yılları arasında Avrupa'daki *A. baumannii* izolatları %99,1 oranında kolistine duyarlı olarak saptanmıştır (30). 2019 yılı Ulusal Sağlık Hizmetleri İle İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı özet raporunda; CRAB %72,6 iken, kolistin dirençli *A. baumannii* %5,07 olarak bildirilmiştir (34). Yukarıdaki yayınlarda görüldüğü gibi kolistin direnç oranı zamanla artmaktadır. Yoğun bakımlarda enfeksiyon etkeni olan *A. baumannii*'nin antibiyotik duyarlılıklarının incelendiği çok merkezli bir çalışmada karbapenem direnci %99,4, antibiyotik gradient testi ile tigesiklin direnci %1,7, mikrodilüsyon ile kolistin direnci %1,2 olarak saptanmıştır (17). Kolistin duyarlılığını saptamada E test ve Vitec 2 otomatize sistemin performansı yeterli değildir. Bu nedenle kolistine dirençli izolatların broth mikrodilüsyon yöntemi ile doğrulanması gereklidir (20). Yapılan çalışmalarda,

broth mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar ile Vitec 2 arasında çok belirgin farklar olduğu gösterilmiştir (20). Çalışmamızda 2019 yılında kolistin direnci görülmezken, 2020 yılında bir vakada (%1,8), iki yıl toplamında %1,4 oranında kolistine direnç saptanmıştır. Nisbeten düşük kolistin direncinde çalışılan yöntem, hastane mikroflorası ve coğrafi bölge etkisinin olduğu düşünülmektedir.

COVID-19 hastalarında, solunum yetmezliği nedeniyle yoğun bakımlarda entübasyon ve mekanik ventilasyon ihtiyacı olmaktadır. Yapılan bir çalışmada, yoğun bakım ünitesindeki COVID-19 pozitif 19 hastanın 17'sinde *A. baumannii* izole edilmiş olup, test edilen tüm antibiyotiklere yüksek düzeyde direnç saptanırken kolistin direnci de %52 olarak bildirilmiştir (13). COVID-19 pozitif, ÇİD vakalarının incelendiği bir çalışmada, daha önce karbapenem grubu ilaç almamış olan hastaların klinik örneklerinde CRAB üremiştir. Bu hastaların tümü aynı yoğun bakım ünitesinde bulunmuş ve ortam kültürlerinde CRAB pozitifliği saptanmıştır. Bu durum patojenin ortamlardan hastalara geçtiğini ve yayıldığını göstermektedir (35). 2019 yılında, henüz COVID-19 pandemisinin başlamadığı dönemde, *A. baumannii* suşlarında AİD %61,1 oranında saptanırken, pandemi bu oran %78,6'ya çıkmıştır. Direnç paternleri açısından bakıldığında iki yıl için istatistiksel olarak fark saptanmamış olup, COVID-19'un direnç artışına yol açmadığı görülmüştür ( $p=0,281$ ).

COVID-19 pandemisinde yoğun bakım ünitelerinde hasta sayısındaki artışa paralel olarak, nitelikli hemşire ve personel ihtiyacı da artmıştır. Mevcut yardımcı personelin COVID-19 ile enfekte olmaları bu süreci daha da zorlaştırmıştır. Bu nedenle hasta başına düşen eğitilmiş ve deneyimli personel sayısında azalma, COVID-19 pozitif yoğun bakım ihtiyacı olan hastalara uygulanan endotrekeal tüp, kateterizasyon ve diğer invaziv girişimler hastaları *A. baumannii* açısından duyarlı hale getirmiştir.

*A. baumannii*'nin antimikrobiyal ilaçlara karşı direnci her geçen gün artmaktadır. Ulusal



Nozokomiyal Enfeksiyonlar Takip Sistemi verilerine göre *A. baumannii*'nin imipenem direncinin 1986-2003 yılları arasında %0'dan %42'ye arttığı bildirilmiştir (36). Asya ülkelerinde bu patojene karşı ÇİD %82 ve AİD %51,1 oranında oldukça yüksek olarak saptanmıştır (37).

Sunulan çalışmamızda iki yıllık sürede ÇİD %23, AİD %73,3 ve TİD ise %1,8 olarak saptanmıştır. Hastanemizdeki AİD oranının yüksek olmasının, yoğun bakımlarda kolonize olan dirençli *A. baumannii* ile hastalarımızın enfekte olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonları ile mücadelede; akılcı antibiyotik kullanımı, kombinasyon terapileri, bakteriofaj tedavileri, eflüx pompa inhibitörleri, antibiyofilm ajanlar, doğal antimikrobialer ile ilgili araştırmalar tüm dünyada artmaktadır (3). Yapılan bir metaanaliz çalışmasında, ÇİD ve AİD'li *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde kolistin sulbaktam kombinasyonunun, kolistin-tigesiklin kombinasyonuna ve sadece tigesiklin tedavisine göre daha başarılı olduğu vurgulanmıştır. Aynı çalışmada bu mikroorganizmaların neden olduğu bakteriyemilerde tigesiklinin etkili olmadığını bildirilmiştir (38). Ancak çalışmamızdaki *Acinetobacter* suşlarının piperasilin/tazobaktam karşı oldukça dirençli olduğu görülmüştür. Hastanemizde tedavi başarısını arttırmak, antimikrobiyal direnç gelişimini önlemek açısından kolistin, tigesiklin veya amikasin içeren kombinasyon tedavilerinin kullanılmasının önemli olacağı düşünülmektedir.

Amikasin ve tobramisin, ÇİD *A. baumannii* izolatlarına etkili olabilen aminoglikozitlerdir. Birçok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatı amikasin ve tobramisine orta düzeyde duyarlı kalabilir (39).

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, kolistin ve tigesiklinin antibiyotik duyarlılık testi için altın standarttır. Çalışmamızda kolistin ve tigesiklin direnci otomatize sistem ile tespit edilmiş olup, her iki antibiyotik için direncin sıvı mikrodilüsyon yöntemi

ile doğrulanmamış olması bu çalışmanın kısıtlılığıdır. Hastanemizde izole edilen *A. baumannii* suşlarının antibiyogram sonuçları, hastane salgını açısından uyarıcı olmakla beraber suşlar arasındaki farklılıkları teknik olarak saptamak imkanına sahip değiliz. Moleküler yöntemlerin kullanıldığı testler ile suşlar arasındaki klonal ilişkinin ve direnç mekanizmalarının ortaya konması ile ilgili bir çalışma planlanmaktadır.

Bu mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlarda morbidite ve mortalite artmakta, kaygı verici bir şekilde global bir sorun haline gelmektedir. Bu sorun ventilatör gereksiniminin ortaya çıktığı, sekonder enfeksiyonlara eğilimin olduğu COVID-19 hastalarında daha da önemlidir. Medikal enstrümanlar üzerinde ve hastane ortamında uzun süre kalabilen ve enfeksiyöz özelliklerini kaybetmeyen *A. baumannii*'nin personellerin elleriyle kolayca yayılması mücadeleyi zorlaştırmaktadır. *A. baumannii* salgınları, izolasyon, personel eğitimi, el hijyeni, ortam kültürlerinin alınması, hastane ve ekipman dezenfeksiyonu gibi enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması ve akılcı antibiyotik kullanımı ile önlenebilir.

Etkili tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu bu enfeksiyonda direnç verilerinin izlenmesi, kullanılan antibiyotiklerin klinik ve mortalite üzerindeki etkilerinin bilinmesi hastanelerin politika geliştirilmesine ışık tutacaktır (40). Bu bakteriye karşı çoklu ilaç direnci nedeni ile tedavide güçlükler yaşansa da enfeksiyonun başlangıcında etkili tedavinin verilmesi hayatta kalmayı artıran en önemli etkindir (27).

Sonuç olarak, yoğun bakım ünitelerindeki çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* suşları için tedavi seçenekleri çok sınırlı olmakla birlikte günümüzde kolistin bu suşlara karşı duyarlılığını büyük oranda korumaktadır. Her hastane özelinde direnç paternlerinin belirlenip tedaviye erkenden başlamanın bu enfeksiyon ile mücadelede başarıyı arttıracığı düşünülmektedir.

**ETİK KURUL ONAYI**

\* Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:27.01.2021-137 ve Karar No: 2021/2/14).

**ÇIKAR ÇATIŞMASI**

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**KAYNAKLAR**

1. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. Acinetobacter baumannii: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev*, 2013;37(2):130-55.
2. Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 Summary. Access date: 20.04.2021. Available from: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
3. Emel A, Eraç B. Küresel bir tehdit: Acinetobacter baumannii enfeksiyonları, antimikrobiyal dirençte güncel durum ve alternatif tedavi yaklaşımları. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2020;77(3): 367-78.
4. Bacakoğlu F, Korkmaz Ekren P, Taşbakan MS, Başarık B, Pullukçu H, Aydemir S, ve ark. Solunumsal yoğun bakım ünitesinde çoklu antibiyotik dirençli Acinetobacter baumannii enfeksiyonu. *Mikrobiyol Bul*, 2009 Oct;43(4):575-85.
5. Piperaki E-T, Tzouveleki L, Miriagou V, Daikos G. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: in pursuit of an effective treatment. *Clin Microbiol Infect*, 2019;25(8):951-7.
6. Jung J, Park W. Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015;99(6):2533-48.
7. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 2008;21(3):538-82.
8. Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, Soltani A, Aljanabi HAA, Jeda AS, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB life*, 2020;72(10):2097-111.
9. Möhlenkamp S, Thiele H. Ventilation of COVID-19 patients in intensive care units. *Herz*, 2020;45(4):329-31.
10. Zu ZY, Jiang MD, Xu PP, Chen W, Ni QQ, Lu GM, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a perspective from China. *Radiology*, 2020;296(2):E15-E25.
11. Russotto V, Cortegiani A, Graziano G, Saporito L, Raineri SM, Mammina C, et al. Bloodstream infections in intensive care unit patients: distribution and antibiotic resistance of bacteria. *Infect Drug Resist*, 2015;8:287-96.
12. Garnacho-Montero J, Timsit J-F. Managing Acinetobacter baumannii infections. *Curr Opin Infect Dis*, 2019;32(1):69-76.
13. Sharifipour E, Shams S, Esmkhani M, Khodadadi J, Fotouhi-Ardakani R, Koohpaei A, et al. Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. *BMC Infect Dis*, 2020;20(1):1-7.

14. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. European Centre for Disease Prevention and Control 2013; Access date: 20.04.2021[Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>.
15. Carbapenem-Resistant Acinetobacter. Access date: 20.04.2021. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/acetobacter-508.pdf>.
16. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of Acinetobacter infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev*, 2017;30(1):409-47.
17. Boral B, Unaldi Ö, Ergin A, Durmaz R, Eser ÖK. A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections in intensive care units with clinical and environmental features. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2019; 18(1):1-9 <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0319-8>.
18. Zarkotou O, Pournaras S, Altouvas G, Pitiriga V, Tziraki M, Mamali V, et al. Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods for expanded-spectrum cephalosporin and carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *J Clin Microbiol*, 2012;50(11):3747-50.
19. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 2018;18(3):318-27.
20. Şimşek M, Demir C. Determination of Colistin and Tigecycline Resistance Profile of Acinetobacter Baumannii Strains from Different Clinical Samples in a Territory Hospital in Turkey. *J Health Sci Med Res*, 2020;38(2):81-91.
21. Çalışkan A, Kırışçı Ö. Bir devlet hastanesinde 2013-2018 döneminde Acinetobacter enfeksiyonlarında antibiyotik duyarlılığı ve çoğul antibiyotik direnci. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2020;77(4): 487-92.
22. Sharifipour E, Shams S, Esmkhani M, Khodadadi J, Fotouhi-Ardakani R, Koohpaei A, et al. Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. *BMC Infect Dis*, 2020; 20: 646. Published online 2020 Sep 1.
23. Sağmak-Tartar A, Özer AB, Ulu R, Akbulut A. Endotrakeal aspirat örneklerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları: Bir yıllık retrospektif analiz. *Klimik Derg*, 2018;31(1):56-60.
24. Gozutok F, Sariguzel F, Celik I, Berk E, Aydın B, Guzel D. Investigation of antimicrobial resistance rates of Acinetobacter baumannii strains from nosocomial infections. *Ankem Derg*, 2013;27(1):7-12.
25. Eroğlu C, Ünal N, Karadağ A, Yılmaz H, Acuner İÇ, Günaydın M. Acinetobacter species isolated from various clinical specimens between 2006-2011 years and their susceptibilities against antibiotics. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2016;73(1):25-32.
26. Karşlıgil T, Balci I, Zer Y. Antibacterial sensitivity of Acinetobacter strains isolated from nosocomial infections. *J Int Med Res*, 2004;32(4):436-43.
27. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 2006;12(9):826-36.
28. Aydemir Ö, Demiray T, Köroğlu M, Aydemir Y, Karabay O, Altındaş M. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların endotrakeal aspirat örneklerinden izole edilen bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2016;1(4):1-8.
29. Şirin MC, Ağuş N, Yılmaz N, Bayram A, Yılmaz Hancı S, Şamlıoğlu P, et al. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2017;74(4):269-78.
30. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*, 2011;66(9):2070-4.
31. Lob SH, Hoban DJ, Sahm DF, Badal RE. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of Acinetobacter baumannii. *Int J Antimicrob Agents*, 2016;47(4):317-23.
32. Eliopoulos GM, Maragakis LL, Perl TM. Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*, 2008;46(8):1254-63.

33. Şahin AR, Doğruer D, Nazik S, Aktemur A, Öksüz H, Murat A, et al. Hastane kökenli patojenlerde artan antimikrobiyal direnç sorunu: *Acinetobacter baumannii*. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi, 2019;4(2):156-69.
34. Hekimoğlu C. BE, Meşe E. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Özet Raporu 2019. Erişim tarihi: 20.04.2021. Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/342282560>.
35. Gottesman T, Fedorowsky R, Yerushalmi R, Lellouche J, Nutman A. An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a COVID-19 dedicated hospital. *J Infect Prev*, 2021 Mar; 3(1): 100113. Published online 2021 Jan 9.
36. McDonald LC. Trends in antimicrobial resistance in health care-associated pathogens and effect on treatment. *Clin. Infect. Dis*, 2006;42(Supplement\_2):S65-S71.
37. Chung DR, Song J-H, Kim SH, Thamlikitkul V, Huang S-G, Wang H, et al. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011;184(12):1409-17.
38. Kengkla K, Kongpakwattana K, Saokaew S, Apisanthanarak A, Chaiyakunapruk N. Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and network meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, 2018;73(1):22-32.
39. Yadav R, Landersdorfer CB, Nation RL, Boyce JD, Bulitta JB. Novel approach to optimize synergistic carbapenem-aminoglycoside combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015;59(4):2286-98.
40. Kofteridis DP, Andrianaki AM, Maraki S, Mathioudaki A, Plataki M, Alexopoulou C, et al. Treatment pattern, prognostic factors, and outcome in patients with infection due to pan-drug-resistant gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020 May;39(5):965-70.
41. Alhaddad MS, AlBarjas AK, Alhammar LE, Al Rashed AS, Badger-Emeka LI. Molecular characterization and antibiotic susceptibility pattern of *Acinetobacter baumannii* isolated in intensive care unit patients in Al-Hassa, Kingdom of Saudi Arabia. *International Int J Appl Basic Med Res*, Jan-Mar 2018;8(1):19-23.

# Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in rat blood cells: preventive effects of ferulic acid

## Rat kan hücrelerinde dimetoat'ın neden olduğu oksidatif stres ve DNA hasarı: ferulik asit'in koruyucu rolü

Hatice BAŞ<sup>1</sup> (ID), Fatma Gökçe APAYDIN<sup>2</sup> (ID), Suna KALENDER<sup>3</sup> (ID), Gülizar AYDOĞDU<sup>4</sup> (ID), Çağlar ADIGÜZEL<sup>2</sup> (ID), Hakkı TAŞTAN<sup>2</sup> (ID), Yusuf KALENDER<sup>2</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** Chemicals called as insecticides are frequently used in agricultural control and cause toxic effects on non-target organisms, especially mammals. Exposure to insecticides may induce hematotoxicity. This research is appertaining to the possible property of ferulic acid, utilized as nutritional supplement, to mitigate oxidative stress process caused via dimethoate.

**Methods:** Male Wistar rats were divided into six groups, randomly (six animal each). Animals were treated orally via gavage with ferulic acid (30 mg/kg body weight, everyday for 28 days) prior to treatment of low or high doses of dimethoate (3 mg/kg body weight, everyday for 28 days 1/100 LD50 and 30 mg/kg body weight, everyday for 4 weeks 1/10 LD50, respectively).

**Results:** Exposing rats to dimethoate for 4 weeks contributed oxidative stress process with a rise in malondialdehyde levels of rats' erythrocytes. Also, treatment of dimethoate induced alterations in antioxidant defence system of erythrocytes

### ÖZET

**Amaç:** İnektisitler olarak adlandırılan kimyasallar, zirai mücadelede sıklıkla kullanılmakta ve başta memeliler olmak üzere hedef olmayan canlılarda toksik etkiye neden olmaktadır. İnektisitlere maruz kalmak kan dokusunda meydana gelen toksisiteyi indükleyebilir. Bu araştırmanın amacı, dimetoat'ın neden olduğu oksidatif stres sürecini azaltmak için besin takviyesi olarak kullanılan ferulik asidin olası koruyucu özelliğini ortaya koymaktır.

**Yöntem:** Erkek Wistar sıçanlar rastgele (her bir grupta altı hayvan olacak şekilde) olmak üzere altı gruba ayrıldı. Hayvanlar gavaj vasıtasıyla, düşük veya yüksek dozlarda dimetoat (sırasıyla; 3 mg/kg vücut ağırlığı 1/100 LD50, 28 gün boyunca her gün ve 30 mg/kg vücut ağırlığı 1/10 LD50, 4 hafta boyunca her gün) uygulamasından önce, ferulik asit (30 mg/kg vücut ağırlığı, 28 gün boyunca her gün) ile ağız yoluyla muamele edildi.

**Bulgular:** Sıçanların 4 hafta dimetoat'a maruz bırakılması, eritrosit malondialdehit seviyesinde oluşan artış ile gözlemlenen oksidatif stres sürecine katkıda bulunmuştur. Ayrıca dimetoat uygulaması, eritrositlerde

<sup>1</sup>Yozgat Bozok University, Faculty of Science and Letters, Department of Biology, Yozgat

<sup>2</sup>Gazi University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara

<sup>3</sup>Gazi University, Faculty of Education, Department of Mathematics and Science Education, Ankara

<sup>4</sup>Ordu University, Faculty of Science and Letters, Department of Molecular Biology and Genetics, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Hatice BAŞ

Yozgat Bozok Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Yozgat - Türkiye

E-posta / E-mail : htc.haticebas@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 08.11.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 13.04.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.09734

Baş H, Apaydın FG, Kalender S, Aydoğdu G, Adıgüzel Ç, Taştan H, Kalender Y. Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in rat blood cells: preventive effects of ferulic acid. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2022; 79(2): 243 - 254

as monitored by the increase in the activities of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase and superoxide dismutase. Additionally, dimethoate caused DNA damage, too. Pretreatment with ferulic acid remediated the detriment caused via dimethoate, as ascertained by detention of lipid peroxidation, improvement of glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, superoxide dismutase and catalase activities and also DNA damage.

**Conclusion:** Dimethoate, an insecticide, has caused serious toxic effects on blood tissue of rats. Therefore, the conscious use of dimethoate should be ensured, its use should be minimized and development of different methods should be encouraged that replaced these chemicals in agricultural control. The present findings indicate that ferulic acid may ameliorate dimethoate-caused oxidative stress process and DNA damage by altering antioxidant defense system and decreasing lipid peroxidation in blood.

**Key Words:** Dimethoate, ferulic acid, DNA damage, oxidative stress, pesticide, antioksidan, lipid peroxidation

glutasyon peroksidaz, glutasyon-S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki artışla kendini gösteren antioksidan savunma sisteminde meydana gelen değişiklikleri indüklemiştir. Ek olarak dimetoat DNA hasarına da neden olmuştur. Ferulik asit ile yapılan ön muamele, lipid peroksidasyonunun azalması, glutasyon peroksidaz, glutasyon-S-transferaz, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin ve ayrıca DNA hasarının düzenlenmesi ile dimetoatın neden olduğu zararın boyutunu azaltmıştır.

**Sonuç:** Bir insektisit olan dimetoat ratlarda kan dokusu üzerinde ciddi toksik etkilere neden olmuştur. Bu nedenle, dimetoatın bilinçli olarak kullanılması sağlanmalı, kullanımı asgari seviyeye indirilmeli ve zirai mücadelede bu kimyasalların yerini alabilecek yöntemlerin geliştirilmesi teşvik edilmelidir. Mevcut bulgular, ferulik asidin dimetoat kaynaklı oksidatif stres sürecini ve DNA hasarını antioksidan savunma sistemini düzenleyerek ve kandaki lipid peroksidasyonunu azaltarak düzeltebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Dimetoat, ferulik asit, DNA hasarı, oksidatif stres, pestisit, antioksidan, lipit peroksidasyonu

## INTRODUCTION

Pesticides especially organophosphate (OP) compounds have been among the most widely ubiquitously and heavily used pesticides worldwide for over half a century. Regrettably, like other xenobiotics, OP compounds have adverse effects on people. Their extensive use is a main concern of public health in the World (1). Even so, given its ease of application, low cost, and effects against insects, its use is predicted to increase around the World by 2022 (2). The harmful impressions of OP insecticides

cause severe different pathologies such as chronic renal diseases, testes atrophy, benign and malignant neoplasms of the endocrine organs, parathyroid hyperplasia, disorders in the liver and lymphatic system (3).

Dimethoate (DM) or O, O-dimethyl-S (N-methyl-carbomethyl)phosphorodithioate, an OP insecticide, is used in agriculture to protect crops against aphids and leaf miners (3). Besides, extensive use of DM can pose lots of negative impressions on the health of organisms thanks to its persistence in water, crops and soil (4). Annual DM production in the European Union

is estimated to be 6000-8000 tons (5) and DM values up to 39.9 mg/L have been determined in surface waters close to the Mediterranean Sea coast (6). The main risk groups for DM exposure are the general population (by household insecticide application or drinking water), farm owners, pesticide producers and workers (4, 7). Also, DM residue is found in foods such as cow's milk (8).

The generation of free radicals is expected to cause toxicity. For this reason, antioxidant supplementation may be used as an alternative method against pesticide toxicity (3). Thus, its relevance as a natural antioxidant has risen, such as its use as a method to protect oxidative stress in the pathophysiology of different health problems (9). Within many classes of antioxidant compounds, phenolics naturally found in nutrients have been given attention in recent studies (10). Ferulic acid (FA) or 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid is an important natural potent phyto-chemical that can be obtained from rice, wheat, apple, barley, orange, coffee, etc. It has an extensive range of biological activities like anti-inflammatory activity (11). FA has been established to be a powerful antioxidant, reported to end the chain reaction of free radicals and reduce the risk of heart problems such as coronary heart diseases. Also, FA has preventive effects in hepatic toxicity caused by drugs (12).

In this regard, studies on FA added to the diet is promising mainly because of its free radical scavenging efficiency, specifying that it could procured as a substantial antioxidant source in the diet. Since pesticides are frequently used in agriculture, non-target organisms are exposed to these chemicals even if they do not want to. Therefore, it is important to detect antioxidants that reduce or eliminate the effect of pesticides. There are few studies on the effectiveness of ferulic acid against pesticides. This research aimed to examine the preventive role of dietary FA adding on DM causing hematotoxicity in Wistar rats, as it has not been investigated so far. We hypothesize that FA may reduce DM hematotoxicity.

## MATERIAL and METHOD

### ANIMALS AND CHEMICALS

The procedure (G.U.ET-17.004) which we applied to the rats (200-250 g) in this research was approved by Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee. 36 male Wistar rats were provided from the Laboratory Animals Raising and Experimental Research Center, Gazi University, Ankara, Turkey. Water ad libitum and standard laboratory chow at 25±2 °C were applied to the rats. The investigation process of the research was carried out in accordance with international guidelines for care and use of laboratory animals. DM (≥99% purity), FA and other chemicals were obtained from Sigma Aldrich and dissolved in distilled water.

### GROUPS AND APPLICATIONS

Rats were divided into 6 groups (6 animals in each group).

1. group: Control (1.0 ml/kg bw distilled water treated)
2. group: FA (30 mg/ kg bw daily) treated group
3. group: Low dose DM (3 mg/kg bw daily 1/100 LD50) treated group (13)
4. group: High dose DM (30 mg/kg bw daily 1/10 LD50) treated group
5. group: Low dose DM + FA treated group
6. group: High dose DM + FA treated group

DM and FA were given to rats daily by gavage during the experimental period (28 days).

### OBTAINING OF ERYTHROCYTES FOR MEASURING OXIDATIVE STRESS PARAMETERS

At the end of the experimental period, blood samples of animals were taken into tubes containing heparin. Erythrocyte cells and plasma were separated via centrifugation (1600 rpm for 5 min) and then the erythrocytes were treated with %0.9 isotonic saline solution for washing. After this stage, phosphate buffer (pH 7.4) was added to erythrocytes for attaining 50% cell suspension. Erythrocyte cells were destroyed with

the help of osmotic pressure, they were centrifuged and supernatants were isolated, and data on the activities of antioxidant enzymes and MDA were assessed via Shimadzu UV-1700, Japan. Hemoglobin concentration (Hb) was measured using the method of Drabkin (14).

#### ASSAYS OF ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY

##### Assay of catalase (CAT) activity

A mixture containing 2 ml erythrocyte dilution and 1ml Phosphate Buffered Saline at pH 7.00 (50 mM) was prepared. Then it was incubated for 3 min (25 °C) and the reaction was started by adding 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM). The distribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was monitored directly with the Shimadzu UV-1700 spectrophotometer by the absorbance decreasing at 240 nm (25 °C) (15). The obtained data were represented as U/mgHb for erythrocytes.

##### Assay of glutathione peroxidase (GPx) activity

We measured the GPx activity using a substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) predicate in the procedure described in Paglia and Valentine's study (16). The reactions were observed indirectly as the NADPH oxidation rate for 3 minutes at 240 nm. The enzymatic activity of the samples were calculated as U of mg Hb.

##### Assay of glutathione-S-transferase (GST) activity

We assayed the GST activity via measuring Glutathione (GSH) and the 1-chloro 2, 4-dinitrobenzene (CDNB) conjugate generation (17). Enhancing absorbance was searched for 3 minutes at 340 nm. We expressed the GST activity as U of the CDNB - GSH conjugate formed/mg Hb.

##### Assay of superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity in fractions of cell cytoplasm was analysed by Marklund and Marklund's procedure (18). The procedure determined in Marklund and Marklund's method is based on measuring the pyrogallol illumination and autooxidation for 3 minutes at 440 nm. One unit activity of SOD was assessed as the amount of protein that induced detention of 50% pyrogallol autooxidation. The activity of enzyme was

defined as U/mg Hb.

#### ASSAY OF MALONDIALDEHYDE (MDA) LEVELS

MDA data of erythrocytes, which are the major final product of lipid peroxidation (LPO) in membranes of cells, were investigated. For this assay, thiobarbituric acid was put in blood cells and the mixture was incubated for 60 min (95 °C). Thiobarbituric acid reacts with MDA and the generation of coloured complex was sighted. MDA levels were analysed at 532 nm according to a procedure described previously (19). Data were expressed as nmol/mg Hb.

#### DETERMINING OF DNA DAMAGE

Blood samples (1,5 ml) taken from the control and experimental groups were taken to eppendorf tubes. After that, all the blood samples in eppendorf were added from ammonium sulfate solution prepared at 8 per thousand and all samples were centrifuged until the leukocytes collapsed clearly to the bottom of the eppendorf tube with a 15-min interval at 8000 rpm (doi:10.1101/pdb.rec079152 Cold Spring Harb Protoc 2015). Then Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) study was carried out for DNA damage and repair of leukocytes belonging to all the knitting of the experimental group (Roche, cat no: 11544 675 001).

#### STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis of the obtained values was made with the help of SPSS program (Statistical Package for the Social Sciences), version 20.0 for Windows. One-way analysis of variance (anova) and Tukey tests were used to determine the differences of groups regarding oxidative stress parameters.  $p < 0.05$  was considered statistically significant and the data were represented as the mean $\pm$ SD (standard deviation). Statistical significance was assessed by the two-tailed Student's t-test with SPSS version 20.0 to determine DNA damage results.

The study was approved by the Gazi University Experimental Animal Local Ethics' Committee (Date: 03.01.2017 and Number: E.785).

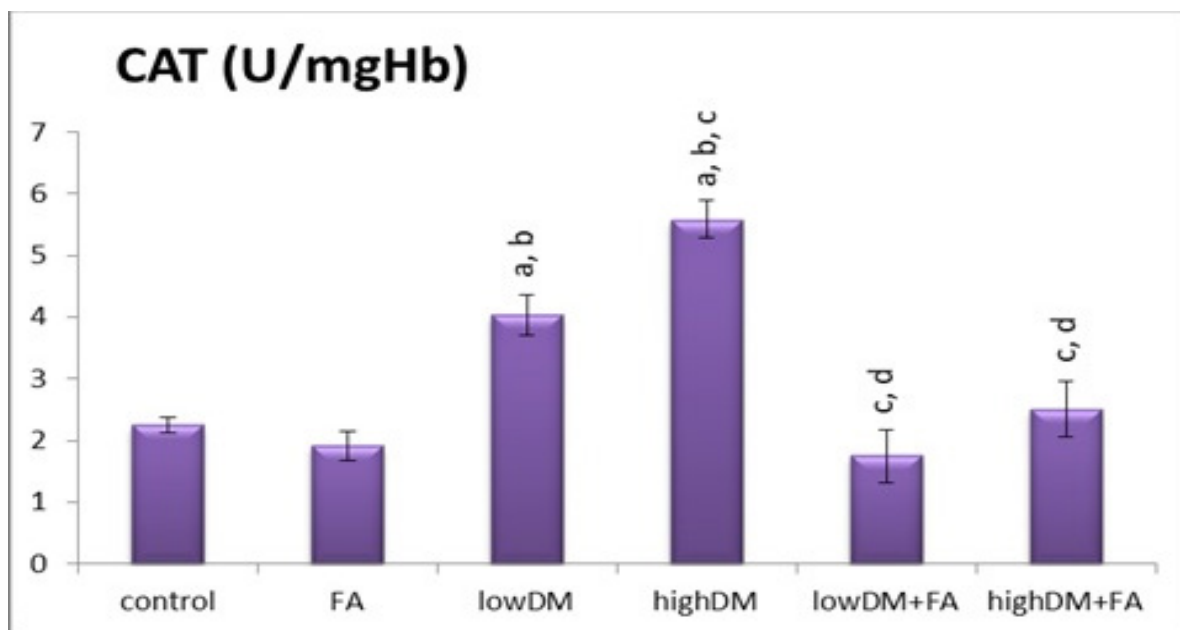


## RESULTS

### Catalase activity in erythrocytes

Erythrocytes of animals treated with FA did not show significant changes compared to control (Fig. 1)

( $p > 0.05$ ). Treatment with DM caused an increase in the erythrocyte CAT activity compared to the control group. FA treated rats administered with DM showed a decrease in erythrocyte CAT activity compared to DM administered groups without FA ( $p < 0.05$ ).



**Figure 1.** Effect of dimethoate (DM) treatment on catalase activity (U/mgHb) in experimental rats after subacute exposure of 28 days. Data of groups (6 rats in each group) are predicated as mean±SD. P values <0.05 were regarded significant.

<sup>a</sup>comparison of control group with other groups.

<sup>b</sup>comparison of Ferulic acid (FA) treated group with other groups.

<sup>c</sup>comparison of low dose DM treated group with other groups.

<sup>d</sup>comparison of high dose DM treated group with other groups

### Glutathione peroxidase activity in erythrocytes

Erythrocyte GPx activity of FA treated rats was not significantly different from control values (Fig. 2) ( $p > 0.05$ ). Treatment with DM (high dose only) caused an increase in the enzyme activity of erythrocytes compared to control. FA treated rats administered with high dose DM showed a decrease in erythrocyte GPx activity compared to the high dose DM administered group ( $p < 0.05$ ).

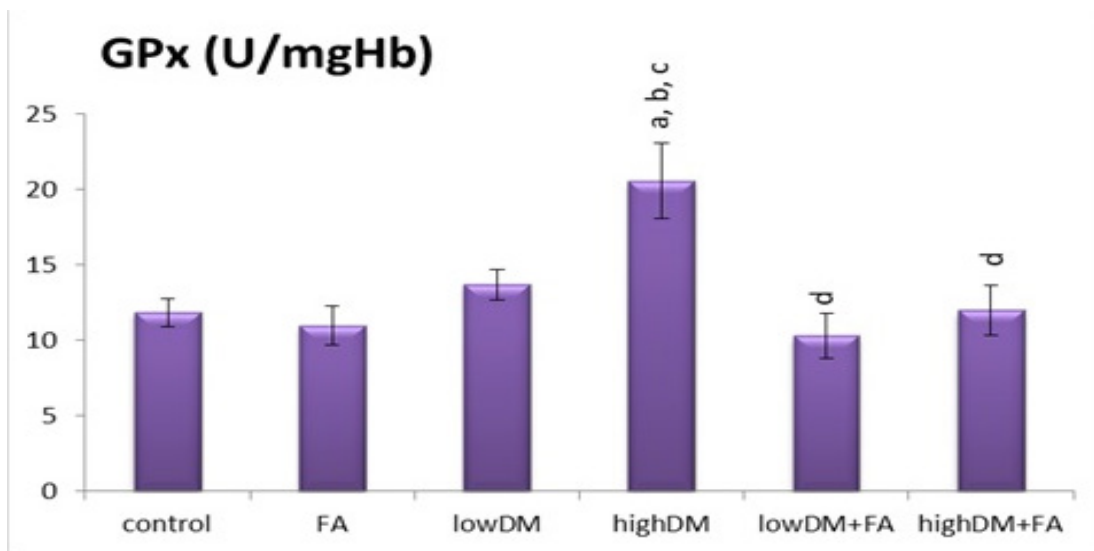
### Glutathione-S-transferase activity in erythrocytes

GST activities of erythrocyte of FA treated rats showed no changes compared to control (Fig. 3) ( $p > 0.05$ ). Treatment with DM caused a significant

increase in erythrocyte GST activity compared with the control group. FA treated rats administered with DM showed amelioration in GST activity compared to DM treated groups ( $p < 0.05$ ).

### Superoxide dismutase activity in erythrocytes

SOD activity in FA administered rats was not significantly different from control (Fig. 4) ( $p > 0.05$ ). Treatment with DM caused an increase in SOD activity in erythrocytes compared to the control group. FA treated rats administered with DM showed a significant decrease in erythrocyte SOD activity compared to DM treated groups ( $p < 0.05$ ).



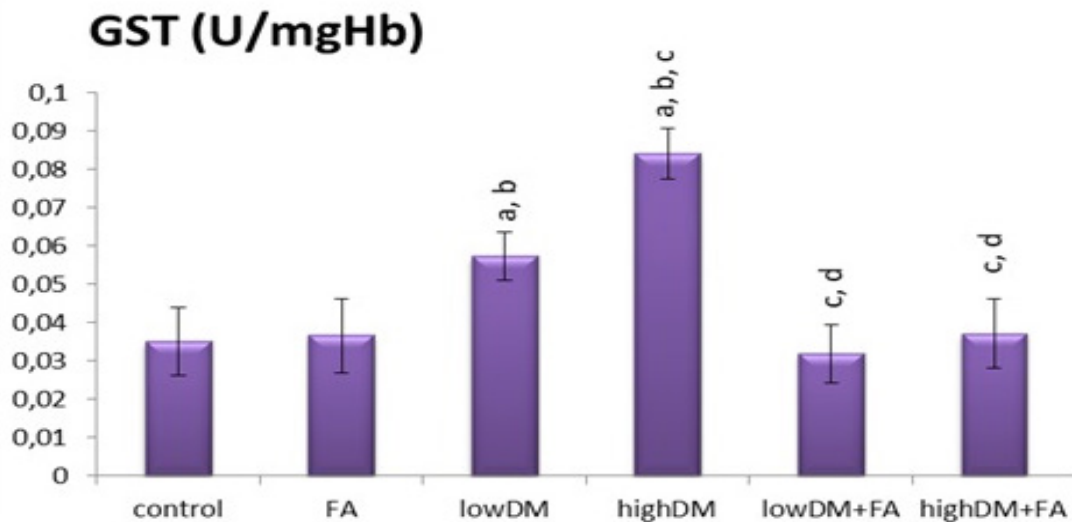
**Figure 2.** Effect of dimethoate (DM) treatment on glutathione peroxidase activity (U/mgHb) in experimental rats after subacute exposure of 28 days. Data of groups (6 rats in each group) are predicated as mean±SD. P values <0.05 were regarded significant.

<sup>a</sup>comparison of control group with other groups.

<sup>b</sup>comparison of Ferulic acid (FA) treated group with other groups.

<sup>c</sup>comparison of low dose DM treated group with other groups.

<sup>d</sup>comparison of high dose DM treated group with other groups



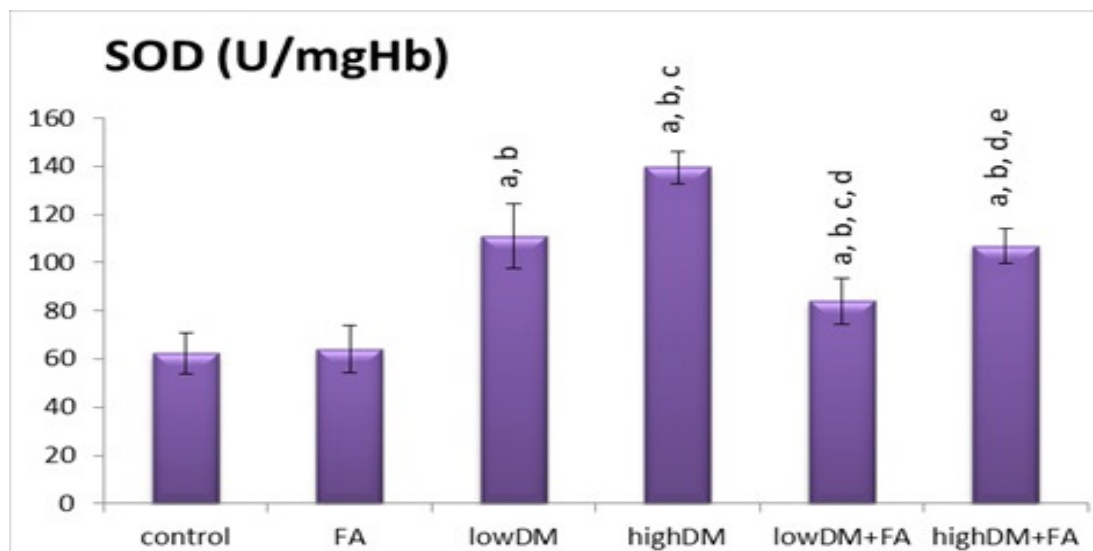
**Figure 3.** Effect of dimethoate (DM) treatment on glutathione-S-transferase activity (U/mgHb) in experimental rats after subacute exposure of 28 days. Data of groups (6 rats in each group) are predicated as mean±SD. P values <0.05 were regarded significant.

<sup>a</sup>comparison of control group with other groups.

<sup>b</sup>comparison of Ferulic acid (FA) treated group with other groups.

<sup>c</sup>comparison of low dose DM treated group with other groups.

<sup>d</sup>comparison of high dose DM treated group with other groups



**Figure 4.** Effect of dimethoate (DM) treatment on superoxide dismutase activity (U/mgHb) in experimental rats after subacute exposure of 28 days. Data of groups (6 rats in each group) are predicated as mean±SD. P values <0.05 were regarded significant.

<sup>a</sup>comparison of control group with other groups.

<sup>b</sup>comparison of Ferulic acid (FA) treated group with other groups.

<sup>c</sup>comparison of low dose DM treated group with other groups.

<sup>d</sup>comparison of high dose DM treated group with other groups.

<sup>e</sup>comparison of low dose DM+ FA treated group with other groups

### Lipid peroxidation in erythrocytes

Erythrocytes of FA treated rats showed no difference compared to control (Fig. 5) ( $p > 0.05$ ). Treatment with DM (both low and high doses) caused increased MDA levels in erythrocytes compared to the control group. FA treated rats administered with DM showed a significant decrease in erythrocyte LPO compared to rats administered DM without FA treatment ( $p < 0.05$ ).

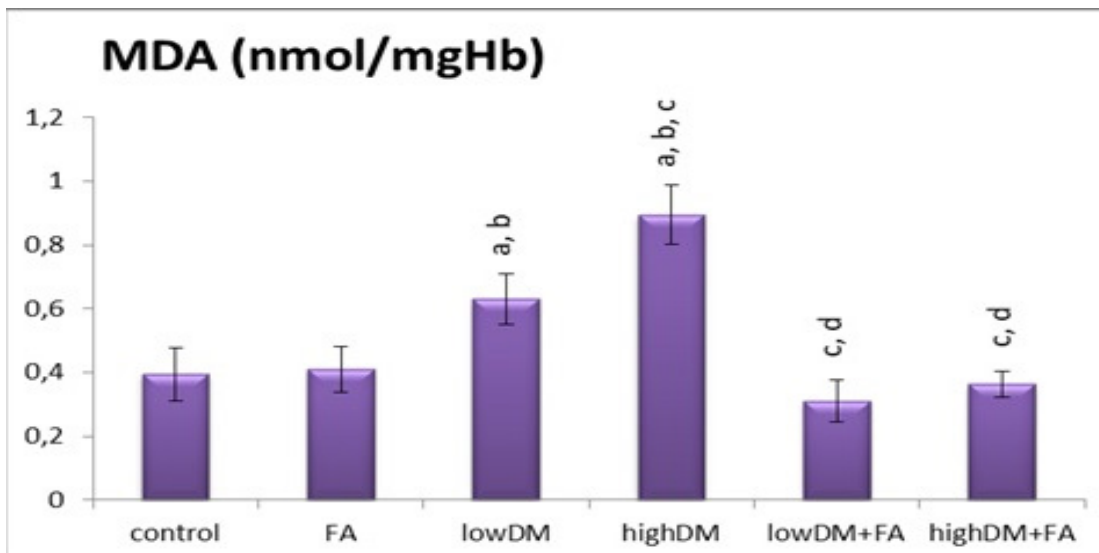
### DNA damage results

In this study, DNA damage levels of control and FA treated rats were very close to each other. Similar results were seen among rats treated with low dose DM and high dose DM, as well as between FA combined with low dose DM and high dose DM groups. According to the control and FA groups, DNA damage level significantly increased in the low dose DM and

high dose DM treated groups. However, a significant decrease in DNA damage was observed in the groups treated with FA combined with low dose DM and high dose DM (Fig. 6).

### DISCUSSION and CONCLUSION

These days people are increasingly exposed to chemical compounds such as OP pesticides. These chemicals have caused the generation of excessive amounts of free radicals that are responsible for various different alterations in cells of organisms. Recent examinations have shown the important effects of natural antioxidants found in nutritions to protect the damage induced by toxic chemicals (20). Thus, in this research, we investigated the potential effects of FA against DM toxicity.



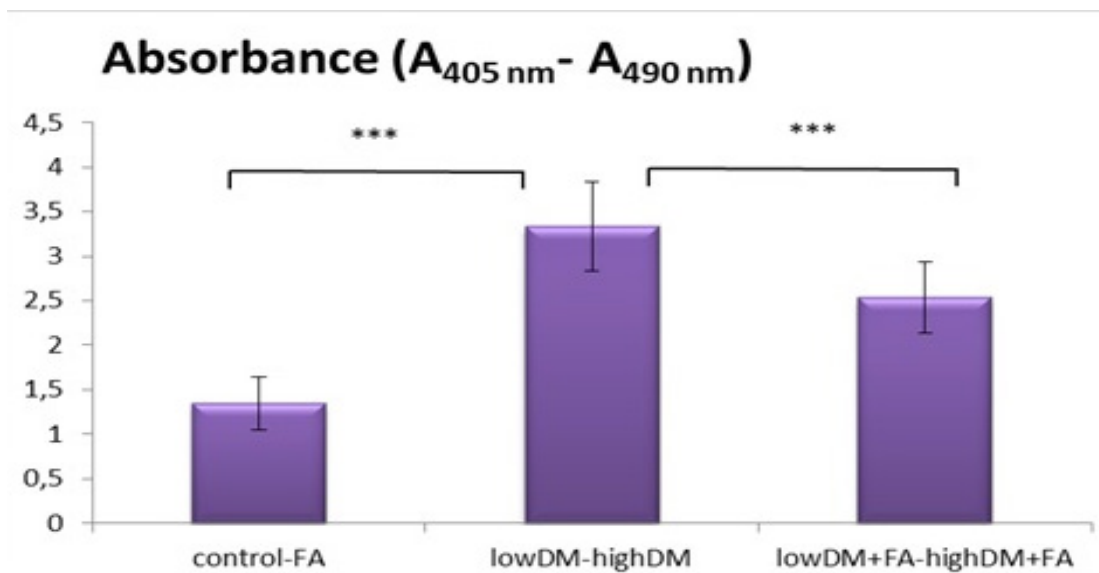
**Figure 5.** Effect of dimethoate (DM) treatment on malondialdehyde level (nmol/mgHb) in experimental rats after subacute exposure of 28 days. Data of groups (6 rats in each group) are predicated as mean $\pm$ SD. P values <0.05 were regarded significant.

<sup>a</sup>comparison of control group with other groups.

<sup>b</sup>comparison of Ferulic acid (FA) treated group with other groups.

<sup>c</sup>comparison of low dose DM treated group with other groups.

<sup>d</sup>comparison of high dose DM treated group with other groups



**Figure 6.** Effect of dimethoate (DM) treatment on DNA damage in experimental rats after subacute exposure of 28 days. Data are shown as means  $\pm$  SD.

Statistical significance in two-tailed Student's t-test indicated by \*P  $\leq$  0.05, \*\*P  $\leq$  0.005, and \*\*\*P  $\leq$  0.0005

DM, the OP compound chosen for this research, induced human toxicity and has been widely used in many countries for the control of a wide variety of crop insects and indoor houseflies. It changes physiological parameters in subchronic and acute applications (21). The excessive use of DM induces toxic effects on human health and causes environmental pollution. The mechanisms of DM intoxication are inhibiting the acetylcholinesterase activity and provoking oxidative stress through free radical formation and induction of LPO. DM exposure results in harmful effects on many organ systems in human and other mammals (22). In a previous study, dichlorvos, an OP pesticide, caused dose-response damages in rat erythrocytes (23). In another study, researchers investigated the effects of three OP pesticides, chlorpyrifos, malathion and diazinon in human erythrocytes. They observed the increase in LPO levels (24). DM intoxication induces oxidative stress resulting in LPO and free radical formation, which causes cellular injury (3). These effects may be related to the cytotoxic and genotoxic potential of DM in rat bone marrow and peripheral blood cells (25).

The mission of LPO markers and antioxidant enzymes have been ascertained in the pesticide pathogenesis in many studies (26, 27). For this reason, in this work, we examined the MDA contents as LPO marker and antioxidant enzyme activities. In this study, it was observed DM caused an increase in MDA levels both low and high doses. But high dose DM treatment caused more increment in MDA content. There are various studies showing that insecticides lead to an increase in MDA values (28, 29). Previous studies on insecticides indicated that MDA levels may increase because of detrimental impressions of OP insecticides on poly-unsaturated fatty acids (PUFA) found in cellular membranes (27, 28).

GST, SOD, CAT, and GPx are the antioxidant enzymes play important roles in the process of scavenging free radicals, especially reactive oxygen species (ROS), which potentiate lots of damage at the cellular level (30, 31). In previous studies, the enzymatic activities

of these enzymes have been investigated to search oxidative stress (28, 32). Differences in enzymatic activities may be due to the formation of ROS (27, 33). In a former study, chlorpyrifos, malathion and diazinon induced changes in total antioxidant power in human erythrocytes (24). It is well known that DM changes some metabolic enzyme activities (21). DM intoxication has been shown to alter the antioxidant defense system in the liver of female adult rats (3). In this study, DM caused an increase in antioxidant enzyme activities both low and high doses except GPx activity. For GPx, low dose DM did not effect the activity. High dose DM treatment caused more increment in GST, CAT and SOD activities. The rise in the enzymatic activities of GST, SOD, CAT, and GPx in erythrocytes of DM administrated animals compared to control blood cells appears to be a response to the improved oxidative stress process (22).

DNA is known to be targeted by various chemicals whose activity results in genotoxic effects (34). Pesticides can cause DNA damage, too. In a previous study, it was showed that DM caused DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. The authors examined whether there is a relationship between lipid peroxidation, SOD, GPx, CAT activities and genotoxicity in vivo (35). They observed that DM caused oxidative stress and DNA damage, which are compatible with our results in blood cells of rats. As a result of this study, DNA damage was significantly increased in DM treated groups compared to the control group. However, a significant reduction in DNA damage was observed in the group treated with FA. These data can be evaluated depending on our experimental results as follows; exposure of rats to DM resulted in extensive acute further tissue inflammation including blood and blood injury reflected by the increased number of neutrophils and macrophages levels and DNA damage with cytoplasmic histone-associated DNA fragments (mono-and oligonucleosomes) after induced cell death in blood tissue. Thus, in DM treated groups, DNA fragmentation due to DM causing DNA damage was measured by ELISA method and the comparison of the

protective group was obtained. The high DNA damage observed in rat leucocytes after *in vivo* DM treatment shows parallelism with related investigations. In a previous study, it was determined that chlorpyrifos, an OP pesticide caused DNA damage in Mouse retina cells (28). Furthermore, Nazam et al. reported that DM induces DNA damage and mitochondrial dysfunction triggering apoptosis in rat bone-marrow and peripheral blood cells (25). In another study, it is reported that organophosphate compounds such as DM cause DNA damage by changing oxidative stress markers (34).

Actually, numerous studies indicated that the antioxidant activities of cells are ameliorated by the presence of antioxidant compounds in diet (3). Phenolic compounds have been proposed as natural antioxidant agents that protect cells against unwanted effects associated with oxidative stress. It has been proposed that they reduce ROS concentration directly (36). So, more attention has been paid to the preventive role of naturally occurring antioxidants against toxicity caused by chemicals, especially when ROS formations are involved (21). FA is known to scavenge both reactive nitrogen species and ROS (37). Because of its scavenge ROS activity, and enhancing the cell response, FA has very strong antioxidant properties due to its ROS activity and enhancing cell response (38, 39). In this study, FA protected changes in CAT, GPx, GST activities and MDA levels completely against low and high dose treatments of DM. These parameters were not different from the control group in lowDM+FA and highDM+FA groups, statistically. However, we did not see these complete preventive effects on SOD activity. For SOD, FA caused a decrease

in activity but lowDM+FA and highDM+FA groups were statistically different from the control group. It has an antioxidant role referring to phenolic hydroxyl group in its structure. Studies have demonstrated that FA could hinder MDA formation from cell membranes, hinder lysis of erythrocytes induced by MDA and hydroxyl radical (HO. free radical) and so, inhibit LPO caused by  $H_2O_2$  and  $O_2$ . Moreover, previous studies also indicated that the antioxidant effect of FA may be due to the capture of free radicals directly through the structural phenolic hydroxyl group.(10). Kohno et al. investigated the retinal protective effect of FA in a sodium iodate-induced model of retinal degeneration in mice and found that oral administration of FA attenuated the morphological and functional features of retinal degeneration (40). Mahmoud et al. indicated that FA prevents oxidative stress, inflammation, and liver injury via upregulation of Nrf2/HO-1 signaling in methotrexate-induced rats (12). As a result of this study, a significant reduction in DNA damage was observed in the groups treated with FA combined with low dose DM and high dose DM. In other words, FA has a protective effect against DM induced DNA damage.

The effects observed in the present research indicated that DM has toxic oxidant impacts on blood cells. This information may be based upon the probability of such a pesticide producing ROS and a state of oxidative stress and improving cell injury. FA, a naturally occurring antioxidant, could be beneficial in reducing the harmful effects of DM, maintaining the normal function of blood cells and actively inhibiting oxidative injury, suggesting its mission in ROS elimination, which is responsible for LPO process.

### ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* The study was approved by the Gazi University Experimental Animal Local Ethics' Committee (Date: 03.01.2017 and Number: E.785).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Burke RD, Todd SW, Lumsden E, Mullins RJ, Mamczarz J, Fawcett WP, et al. Developmental neurotoxicity of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos: from clinical findings to preclinical models and potential mechanisms. *J Neurochem*, 2017; 142(2): 162-77.
2. Grand View Research. Chlorpyrifos market analysis, market size, application analysis, regional outlook, competitive strategies, and forecasts, 2015 to 2022. 2014; [date of accession 12 March 2019]. <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/chlorpyrifos-market>.
3. Amara IB, Soudani N, Troudi A, Bouaziz H, Boudawara T, Zeghal N. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2011; 74: 811-9.
4. IPCS/WHO. Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals. *Environmental Health Criteria* 180, Geneva, Switzerland. 1996.
5. UNEP (United Nations Environment Programme). Assessment of the state of pollution of Mediterranean Sea by organophosphorous compounds. MAP Technical Reports Series no. 58. 1991.
6. Hernandez F, Serrano R, Beltran J. Monitoring of pesticide residues in surface waters from the Comunidad Valenciana. Research agreement between Consulleria de Agricultura Pesca (Generalitat Valenciana) and the Universitat Jaume I. Internal Report. 1993.
7. IPCS/WHO. Classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-01, Geneva, Switzerland. 2001.
8. Srivastava MK, Raizada RB. Developmental effect of technical dimethoate in rats: maternal and fetal toxicity evaluation. *Indian J. Exp Biol*, 1996; 34: 329-33.
9. Shireen KF, Pace RD, Mahboob M, Khan AT. Effects of dietary vitamin E, C and soybean oil supplementation on antioxidant enzyme activities in liver and muscles of rats. *Food Chem Toxicol*, 2008; 46: 3290-4.
10. Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield DA. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *J Nutr Biochem*, 2002; 13: 273-81.
11. Chowdhury S, Ghosh S, Rashid K, Sil PC. Deciphering the role of ferulic acid against streptozotocin-induced cellular stress in the cardiac tissue of diabetic rats. *Food Chem Toxicol*, 2016; 97: 187-98.
12. Mahmoud AM, Hussein OE, Hozayen WG, Bin-Jumah M, Abd El-Twab SM. Ferulic acid prevents oxidative stress, inflammation, and liver injury via upregulation of NFR2/HO1 signaling in methotrexate-induced rats. *Env Sci Poll Res*, 2020; 27: 7910-21.
13. Sharma Y, Bashira S, Irshad M, Datta Gupta S, Dogra TD. Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. *Toxicol*, 2005; 206: 49-57.
14. Drabkin DI. Spectrophotometric studies. XIV, the crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. *J Biol Chem*, 1946; 164: 703-23.
15. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 1984; 105: 121-6.
16. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967; 70: 158-69.
17. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 1974; 249: 7130-9.
18. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 1974; 47: 469-74.

19. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979; 95: 351-8.
20. Saafi EB, Louedi M, Elfeki A, Zakhama A, Najjar MF, Hammami M, et al. Protective effect of date palm fruit extract (*Phoenix dactylifera* L.) on dimethoate induced-oxidative stress in rat liver. *Exp Toxicol Pathol*, 2011; 63: 433-41.
21. Amara IB, Soudani N, Hakim A, Troudi A, Zeghal KM, Boudawara T, et al. Selenium and vitamin E, natural antioxidants, protect rat cerebral cortex against dimethoate-induced neurotoxicity. *Pestic Biochem Physiol*, 2011; 101: 165-74.
22. Eken A. Dimethoate organophosphate insecticide toxicity and the role of oxidative stress. In: Patel VB, Preedy VR, eds. *Toxicology Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Academic Press, 2021: 59-68.
23. Antonijevic E, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Curcic M, Miladinovic DC, et al. Dose-response modeling of reactivating potency of oximes K027 and K203 against a direct acetylcholinesterase inhibitor in rat erythrocytes. *Food Chem Toxicol*, 2018; 121: 224-30.
24. Fakhri-Bafghi MS, Ghasemi-Niri SF, Mostafalou S, Navaei-Nigjeh M, Baeeri M, Mohammadirad A, et al. Protective effect of selenium-based medicines on toxicity of three common organophosphorus compounds in human erythrocytes in vitro. *Cell J*, 2016; 17(4): 740-7.
25. Nazam N, Lone MI, Hamid A, Qadah T, Banjar A, Alam Q, et al. Dimethoate induces DNA damage and mitochondrial dysfunction triggering apoptosis in rat bone-marrow and peripheral blood cells. *Toxics*, 2020; 8: e80.
26. Baş H, Kalender Y. Chlorpyrifos induced cardiotoxicity in rats and the protective role of quercetin and catechin. *Gazi J Sci*, 2011; 24: 387-95.
27. Apaydın FG, Pandır D, Kalender S, Baş H, Kalender Y. Hematoprotective effect of vitamins C and E against subchronic toxicity of bendiocarb: biochemical evidences. *Food Biochem*, 2018; 42: e12659.
28. Matsushita T, Fujita Y, Omori K, Huang Y, Matsui Y, Shirasaki N. Effect of chlorination on anti-acetylcholinesterase activity of organophosphorus insecticide solutions and contributions of the parent insecticides and their oxons to the activity. *Chemosphere*, 2020; 261: e127743.
29. Apaydın FG, Baş H, Kalender S, Kalender Y. Bendiocarb induced histopathological and biochemical alterations in rat liver and preventive role of vitamins C and E. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017; 49: 148-55.
30. Uzun FG, Demir F, Kalender S, Bas H, Kalender Y. Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifos-induced lung toxicity in male rats. *Food Chem Toxicol*, 2010; 45: 1714-20.
31. Apaydın FG, Baş H, Kalender S, Kalender Y. Subacute effects of low dose lead nitrate and mercury chloride exposure on kidney of rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016; 41: 219-24.
32. Uzunhisarcikli M, Kalender Y. Protective effects of vitamins C and E against hepatotoxicity induced by methyl parathion in rats. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2011; 74: 2112-8.
33. Baş H, Kalender Y, Pandır D, Kalender S. Effects of lead nitrate and sodium selenite on DNA damage and oxidative stress in diabetic and non-diabetic rat erythrocytes and leucocytes. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015; 39: 1019-26.
34. Afzali S, Karami M, Kheyripour N, Ranjbar A. Investigating the effect of fresh frozen plasma and albumin on DNA damage and oxidative stress biomarkers in poisoning cases by organophosphates. *Drug Res*, 2021; 10: 10-6.
35. Dogan D, Can C, Kocyigit A, Dikilitas M, Taskin A, Bilinc H. Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*, 2011; 84: 39-46.
36. Barraza-Garza G, Perez-Leon JA, Castillo-Michel H, de la Rosa LA, Martinez-Martinez A, Cotte M, et al. Antioxidant effect of phenolic compounds (PC) at different concentrations in IEC-6 cells: A spectroscopic analysis. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020; 227: e117570.
37. Trombino S, Cassano S, Ferrarelli T, Barone E, Picci N, Mancuso C. Trans-ferulic acid-based solid lipidnanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. *Coll Surf B Biointerfaces*, 2013; 109: 273-9.
38. Calabrese V, Calafato S, Puleo E, Cornelius C, Sapienza M, Morganti P, et al. Redox regulation of cellular stress response by ferulic acid ethyl ester in human dermal fibroblasts: role of vitagenes. *Clin Dermatol*, 2008; 26 (4): 358-63.
39. Barone E, Calabrese V, Mancuso C. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. *Biogerontol*, 2009; 10(2): 97-108.
40. Kohno M, Musashi K, Ikeda HO, Horibe T, Matsumoto A, Kawakami K. Oral administration of ferulic acid or ethyl ferulate attenuates retinal damage in sodium iodate-induced retinal degeneration mice. *Sci Rep*, 2020; 10: e8688.



## Enflamatuvar belirteç olarak HCRP ve Sistatin C'nin obezitede böbrek fonksiyonları izleminde kullanılması

### Use of HCRP and Cystatin C as inflammation markers in the follow-up of kidney functions in obesity

Serpil ÇEÇEN<sup>1</sup> (ID), Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK<sup>2</sup> (ID), Can ILGIN<sup>3</sup> (ID)

#### ÖZET

**Amaç:** Obezitede böbrek fonksiyonlarının takibinde glomerüler filtrasyon hızı (GFR)'nin belirlenmesi önemlidir. GFR belirlenmesinde kreatinin ve sistatin C kullanılmaktadır. Sistatin C yağ dokusu artışıyla orantılı olarak artmakta olup bu çalışmada amacımız obez bireylerde GFR hesaplanırken sistatin C kullanımının uygunluğunu araştırmaktır.

**Yöntem:** Çalışmaya obezite şikayeti ile başvuran kadın hastalar dahil edildi (n=113). Bireylerin düz bir zeminde çıplak ayakla ve sırtları duvara gelecek şekilde dururken boy uzunlukları ölçüldü. Daha sonra biyoimpedans cihazında tüm vücut analizi yapılarak toplam vücut ağırlığı, beden kütle indeksi (BMI), yağ yüzdesi, yağ ağırlığı ve yağsız ağırlıkları tespit edildi. Hastaların biyokimyasal verilerine geriye yönelik olarak ulaşılarak değerlendirme yapıldı. Sistatin C, kreatinin değerleri ölçülmüş olan hastaların CKD-EPI-GFR (Chronic Kidney Disease- Epidemiology Collaboration equation-glomerular filtration rate), GFR-epi-cr (kreatinin-GFR), GFR-epi-cysc (sistatin C-GFR) ve GFR-epi-cr-cysc (kombine-GFR) değerleri hesaplandı.

#### ABSTRACT

**Objective:** Determination of glomerular filtration rate is essential for kidney functions in obesity. Creatinine and cystatin C are used to determine glomerular filtration rate. Cystatin-c increases with the increase of adipose tissue. The study investigates the use of cystatin C in calculating the glomerular filtration rate in obese individuals.

**Methods:** One hundred thirteen obese women were used in the study. The height of the patients was measured barefoot on a flat surface. A whole-body analysis was performed by bioimpedance device (Tanita-BC418), and body weight, body mass index (BMI), fat percentage, fat mass, fat-free mass were detected. Biochemical data were evaluated retrospectively. CKD-EPI-GFR (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation glomerular filtration rate), GFR-epi-cr (creatinine-GFR), GFR-epi-cysc (cystatin C-GFR) and GFR-epi-cr-cysc (combined-GFR) values were calculated from the measured cystatin-c and creatinine values.

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Spor Fizyolojisi Bölümü, İstanbul

<sup>2</sup>Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, İstanbul

<sup>3</sup>Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD, İstanbul



İletişim / Corresponding Author : Serpil ÇEÇEN

Fevzi Çakmak Mah. Mimar Sinan Cad. No: 41 Üst Kaynarca / Pendik - İstanbul - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 29.04.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 29.05.2021

**Bulgular:** GFR-epi-cr değerinin yaş ve BMI ile azaldığını, boy uzunluğu ile arttığını, GFR-epi-cysc değerinin yaş, BMI, yağ yüzdesi, yağ ağırlığı ile azaldığını, boy uzunluğu ile anlamlı olarak arttığını, GFR-epi-cr-cysc değerinin yaş, BMI, yağ yüzdesi, yağ ağırlığı ile azaldığını tespit ettik. GFR-epi-cr, GFR-epi-cysc, GFR-epi-cr-cysc değerlerinin HCRP (High-C-reactif protein) ile azaldığını tespit ettik. Kreatinin değerinin yaş ile arttığını, GFR-epi-cr, GFR-epi-cysc, GFR-epi-cr-cysc ile azaldığını tesbit ettik. Cystatin C değerlerinin yaş, vücut ağırlığı, BMI, yağ yüzdesi, yağ ağırlığı ile arttığını, GFR-epi-cr, GFR-epi-cysc, GFR-epi-cr-cysc ile azaldığını tesbit ettik.

**Sonuç:** Sistatin C böbrek glomerüllerinden rahatlıkla geçebilen bir madde olup GFR hesaplamasında kullanılırken, obez bireylerde yağ dokusuyla artışı ile orantılı olarak sistatin C'nin arttığını ve GFR-epi-cysc ve GFR-epi-cr-cysc azaldığını tesbit ettik. Aynı zamanda yağ yüzdesi ve yağ dokusu artışı ile daha belirgin olmak üzere HCRP'nin arttığını tesbit ettik. Bu sonuçlar obez bireylerde yağ dokusu artışı ile belirginleşen enflamasyonun böbrek fonksiyonlarını etkilediğini düşündürmesi açısından önemlidir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler, obez bireylerde GFR hesaplama ve böbrek fonksiyonlarını takipte kullanılan parametrelerin kullanımı konusunda farkındalık oluşturması açısından önemli görünmektedir. Çalışmamız göstermiştir ki, sistatin C'nin obez bireylerde GFR hesaplama ve böbrek fonksiyonlarını takipte kullanımı yanlış sonuçlar verebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Obezite, sistatin C, glomerüler filtrasyon hızı, enflamasyon, HCRP

**Results:** We found that GFR-epi-cr decreased with age and BMI, increased with height, GFR-epi-cysc decreased with age, BMI, fat percentage, fat mass, increased significantly with height, GFR-epi-cr-cysc decreased with age, BMI, fat percentage, fat mass. GFR-epi-cr, GFR-epi-cysc, GFR-epi-cr-cysc decreased with HCRP (High-C-reactif protein). Creatinine increased with age and decreased with GFR-epi-cr, GFR-epi-cysc, GFR-epi-cr-cysc. Cystatin-c increased with age, body weight, BMI, fat percentage, fat mass, and decreased GFR-epi-cr, GFR-epi-cysc, GFR-epi-cr-cysc.

**Conclusion:** Cystatin C can pass through kidney glomeruli easily and used in GFR calculation. We found that while cystatin-c increases with increased adipose tissue in obese individuals, GFR-epi-cysc ve GFR-epi-cr-cysc decreased. As well, HCRP increased with the fat percentage and fat mass. These results are essential in terms of inflammation, which is evident with the increase in adipose tissue, affects kidney functions in obese individuals. Our study is essential in raising awareness about GFR calculation and parameters used in the follow-up of kidney functions in obese individuals. Our study shows that to use of cystatin C may give wrong results to calculate GFR and follow up of kidney functions in obese individuals.

**Key Words:** Obesity, cystatin C, glomerular filtration rate, inflammation, HCRP

## GİRİŞ

Obezite vücutta yağ dokusunun artması ile karakterize, düşük dereceli enflamasyonun eşlik ettiği kronik, kompleks bir hastalık olarak tarif edilmektedir (1). Dünya genelinde artarak devam

ettiği için halk sağlığını tehdit eden bir salgın olarak da tanımlanmaktadır (2).

Obezitenin tip II diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, kas-iskelet sistemi hastalıkları gibi birçok kronik hastalığa neden olduğu bilinmekle birlikte (3), böbrek fonksiyonlarını da etkilediği, Beden kitle

indeksi (BMI) artışının son dönem böbrek yetmezliği için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (4). BMI'nin yanı sıra bel çevresi, bel-kalça oranı, bel çevresi-boy oranında artışın da kronik böbrek hastalıkları için risk faktörü olduğu gösterilmiştir (5).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda obezite değerlendirilirken kilo, BMI, bel çevresi, bel-kalça gibi antropometrik ölçüm parametreleri kullanılırken, son yıllarda yapılan çalışmalar obezitenin kalori deposu olarak bilinen yağ dokusu artışından kaynaklandığını ve yağ dokusunun da immünolojik fonksiyonları olan bir organ olduğunu göstermektedir (6,7). Obezitede adipoz dokuda gelişen hipertrofi ve lokal hipoksinin adipozitlerde fonksiyon bozukluğuna neden olarak enflamatuvar süreci başlattığı, biyolojik olarak aktif birçok sitokinlerin salgılamasına ve düşük dereceli kronik enflamasyona neden olduğu bilinmektedir (1). Obezite nedeni enflamasyonun insülin rezistansı, tip II diyabet ve vasküler hastalık riskini artırdığı bilinmektedir (8).

Obezitede gelişen enflamasyon, insülin rezistansı, diyabet ve hipertansiyon gibi faktörlerin böbrek fonksiyonlarını da olumsuz etkilediği bilinmektedir (9). Bu nedenle böbrek fonksiyonlarının takibi obezitede önem kazanmaktadır. Böbrek fonksiyonlarının takibinde kullanılan Glomerüler filtrasyon hızı (GFR) hesaplanırken kreatinin ve sistatin C değerlerinden faydalanılmaktadır. Kreatinin böbreklerde metabolize olmayıp glomerüllerden serbestçe geçebildiğinden GFR hesaplamasında kullanılan bir biyobelirteç olmakla birlikte, kas dokusu ağırlığı, yaş ve cinsiyete göre üretim hızı değiştiğinden GFR hesaplamasında kullanımına dikkat etmek gerekmektedir (10). Sistatin C ise bir sistein proteaz inhibitörüdür ve vücuttaki tüm çekirdekli hücreler tarafından üretilebilmekte ve böbrek glomerüllerinden tamamen geçerek proksimal tübülde metabolize edilmektedir (11). Bu nedenle GFR hesaplanırken kreatinine göre daha güvenilir bir biomarker olduğu düşünülmektedir. Sistatin C nin kas dokusu ağırlığı ve cinsiyet farklılığından etkilenmemesi de bir diğer avantaj olarak görülmektedir (10). Sistatin C vücutta birçok dokuda, vücut sıvılarında bulunmakta

olup, immunmodulasyonla ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (12). Sistatin-C'nin ayrıca inflamasyonla ilişkili olduğu da gösterilmiştir (13). Son yıllarda obezitede yapılan çalışmalarda sistatin C seviyesinin BMI, bel çevresi ve vücut ağırlığı artışına bağlı olarak arttığı gösterilirken (14), sistatin C mRNA seviyesinin obez bireylerdeki adipoz dokuda daha yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir (15).

Obezitede yağ dokusu artışının enflamasyonla ilişkili olduğu, sistatin C nin yağ dokusu artışı ile orantılı olarak arttığı bilinmekte olup, bu çalışmada amacımız obez bireylerde GFR hesaplanırken sistatin C kullanımını araştırmaktır. Ayrıca GFR değerlerinin obezitede arttığı bilinen enflamatuvar belirteçlerle olan ilişkisini de araştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Spor Fizyolojisi polikliniğine obezite şikayeti ile başvuran kadın hastalar dahil edildi (n= 113). Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik kurulundan onay alındıktan sonra çalışmaya başlandı (Tarih:05.04.2019 ve No: 09.2019.369). Başvuran bireylerin öncelikle düz bir zeminde çıplak ayakla ve sırtları duvara gelecek şekilde dururken boy uzunlukları ölçüldü. Daha sonra biyoimpedans cihazında (Tip-BC-418-MAIII, Tanita Body Composition Analyzer; Tanita, Tokyo, Japan) tüm vücut analizi yapılarak toplam vücut ağırlığı, BMI, yağ yüzdesi, yağ ağırlığı ve yağsız ağırlıkları tespit edildi. Nefropati öyküsü olan ve GFR-cr <60ml/min/1.73m<sup>2</sup> tespit edilenler, kortikosteroid kullanan, tiroid hastalığı ve diabet öyküsü olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmaya dahil edilen hastaların biyokimyasal verilerine geriye yönelik olarak ulaşılarak değerlendirme yapıldı. Sistatin C, kreatinin değerleri ölçülmüş olan hastaların CKD-EPI-GFR (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation glomerular filtration rate) , GFR-epi-cr (kreatinin-GFR), GFR-epi-cysc (sistatin C -GFR) ve GFR-epi-cr-cys (kombine-GFR) değerleri hesaplandı.

## İstatistiksel analiz

Sürekli değişkenlerin normal dağılım varsayımları Kolmogorov Smirnov, Skewness Kurtosis, normal quantil plot ve histogram testleri ile analiz edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenler ortanca, çeyrekler arası dağılım aralığı, minimum ve maksimum değerleri ile rapor edilmiştir. Sürekli değişkenler arasında korelasyonlar Spearman testi ile analiz edilip, rho ve p değerleri rapor edilmiştir. P değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlıdır. Analizlerde Stata 15.1 yazılımı kullanılmıştır.

## BULGULAR

Antropometrik ölçümler ve biyokimyasal bulgulara ait değerler tablo 1 de görülmektedir. GFR-epi-cr ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü negatif korelasyon ( $r = -0.782$ ,  $p < 0.001$ ), boy uzunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon ( $r = 0.334$ ,  $p < 0.001$ ), BMI arasında istatistiksel olarak anlamlı önemsiz negatif korelasyon ( $r = -0.209$ ,  $p = 0.026$ ) olduğunu, toplam vücut ağırlığı, yağ yüzdesi, yağ ağırlığı ve kas ağırlığı ile GFR-epi-cr arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını tespit ettik (Tablo 2).

**Tablo 1.** Antropometrik ölçümler ve biyokimyasal bulgulara ait verilerin ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri.

n=113	Mean	SS	min	max
Age	42	17	18	69
Height	161	9	144	179
Weight	86.8	20.2	58.5	153.6
BMI	33.9	8.1	25.2	57.8
Fat%	40.9	7.6	18.5	54.2
Fat mass	35.9	13.7	16.2	79.3
Fat free mass	51	8	38.4	74.4
HCRP	3.32	4.44	0.39	10.1
Procalcitonin	0.03	0.02	0.02	0.21
Plateletcrit	0.2	0.1	0.1	0.4
SII	466.5	300	108	1294
TG index	8.42	0.79	7.33	10.23
TG/HDL	1.92	1.56	0.76	8.22
TKol/HDL	4.01	1.29	2.22	7.57
LDL/HDL	2.5	0.95	1.03	5.61
Gfr-epi-cr	114	20	33	150
Gfr-epi -cysc	105	26	31	136
Gfr-epi-cr-cysc	109	26	31	150

BMI: Vücut kitle indeksi, HCRP: High-C-reactive protein, SII: Systemic immuneinflammatory index, TG index: Trigliserid indeksi, TG/HDL= Trigliserid/High density lipoprotein, TKol/HDL= total kolesterol/ High density lipoprotein, LDL/HDL=Low density lipoprotein/ High density lipoprotein.

GFR-epi-cysc ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü negatif korelasyon ( $r = -0.693$ ,  $p < 0.001$ ), BMI arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf negatif korelasyon ( $r = -0.374$ ,  $p < 0.001$ ), yağ yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı orta negatif korelasyon ( $r = -0.364$ ,  $p < 0.001$ ), yağ ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı orta negatif korelasyon ( $r = -0.254$ ,  $p < 0.001$ ), boy uzunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı orta pozitif korelasyon ( $r = 0.381$ ,  $p < 0.001$ ) olduğunu, toplam vücut ağırlığı ve kas ağırlığı ile GFR-epi-cysc arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını tespit ettik (Tablo 2).

GFR-epi-cr-cysc ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü negatif korelasyon ( $r = -0.710$ ,  $p < 0.001$ ), BMI arasında istatistiksel olarak anlamlı orta negatif korelasyon ( $r = -0.311$ ,  $p < 0.001$ ), yağ yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf negatif korelasyon ( $r = -0.291$ ,  $p = 0.002$ ), yağ ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı önemsiz negatif korelasyon ( $r = -0.191$ ,  $p = 0.042$ ) olduğunu, toplam vücut ağırlığı ve kas ağırlığı ile GFR-epi-cr-cysc arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını tespit ettik (Tablo 2). İnflamasyon

markerlarının GFR ye olan etkisini incelediğimizde, GFR-epi-cr ile HCRP arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf negatif korelasyon ( $r = -0.223$ ,  $p = 0.017$ ), TG indexi arasında istatistiksel olarak anlamlı önemsiz negatif korelasyon ( $r = -0.199$ ,  $p = 0.035$ ) olduğunu, procalcitonin, plateletcrit, SII (systemic inflammatory index=platelet x neutrophil /lymphocyte), TG/HDL, TKol/HDL, LDL/HDL ile GFR-epi-cr arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını tespit ettik (Tablo 3).

GFR-epi-cysc ile HCRP arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf negatif korelasyon ( $r = -0.274$ ,  $p = 0.004$ ) olduğunu, TG indexi, procalcitonin, plateletcrit, SII, TG/HDL, TKol/HDL, LDL/HDL ile GFR-epi-cysc arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını tespit ettik (Tablo 3).

GFR-epi-cr-cysc ile HCRP arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf negatif korelasyon ( $r = -0.265$ ,  $p = 0.005$ ) olduğunu, TG indexi, procalcitonin, plateletcrit, SII, TG/HDL, TKol/HDL, LDL/HDL ile GFR-epi-cr-cysc arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını tespit ettik (Tablo 3).

**Tablo 2.** GFR değerlerinin antropometrik ölçümlerle olan ilişkisi.

		Gfr-epi-cr	Gfr-epi -cysc	Gfr-epi-cr-cysc
Age	r	-0.782	-0.693	-0.710
	p	<0.001	<0.001	<0.001
Height	r	0.334	0.381	0.335
	p	<0.001	<0.001	<0.001
Weight	r	-0.008	-0.156	-0.112
	p	0.931	0.0992	0.2377
BMI(Body mass index)	r	-0.209	-0.374	-0.311
	p	0.026	<0.001	<0.001
Fat %	r	-0.171	-0.364	-0.291
	p	0.0692	<0.001	<0.001
Fat Mass	r	-0.080	-0.254	-0.191
	p	0.399	<0.001	0.042
Fat free mass	r	0.117	0.050	0.047
	p	0.2394	0.5924	0.6187

Tablo 3. GFR inflamasyon markerleri ile ilişkisi.

		Gfr-epi-cr	Gfr-epi -cysc	Gfr-epi-cr-cysc
HCRP	r	-0.223	-0.274	-0.265
	p	<b>0.017</b>	<b>0.004</b>	<b>0.005</b>
Procalcitonin	r	-0.151	-0.178	-0.17
	p	0.144	0.086	0.099
Plateletcrit	r	0.050	-0.101	-0.032
	p	0.594	0.286	0.739
SII	r	0.108	0.093	0.102
	p	0.259	0.330	0.284
TG index	r	-0.199	-0.144	-0.151
	p	<b>0.035</b>	0.127	0.109
TG/HDL	r	-0.103	-0.055	-0.070
	p	0.276	0.565	0.456
TKol/HDL	r	-0.137	-0.018	-0.063
	p	0.150	0.846	0.506
LDL/HDL	r	-0.086	0.035	-0.013
	p	0.365	0.712	0.886

HCRP: High-C-reactive protein, SII: Systemic immuneinflammatory index, TG index: Trigliserid indeksi, TG/HDL= Trigliserid/High density lipoprotein, TKol/HDL= total kolesterol/ High density lipoprotein, LDL/HDL=Low density lipoprotein/ High density lipoprotein

Kreatinin ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon ( $r=0.222$ ,  $p=0.018$ ), GFR-epi-cr arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü negatif korelasyon ( $r= -0.701$ ,  $p<0.001$ ), GFR-epi-cysc arasında istatistiksel olarak anlamlı orta negatif korelasyon ( $r= -0.463$ ,  $p<0.001$ ), GFR-epi-cr-cysc arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü negatif korelasyon ( $r= -0.660$ ,  $p<0.001$ ) olduğunu tespit ettik (Tablo 4).

Sistatin C ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı orta pozitif korelasyon ( $r= 0.478$ ,  $p<0.001$ ), vücut ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı önemsiz pozitif korelasyon ( $r= 0.188$ ,  $p=0.046$ ), BMI arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif

korelasyon ( $r=0.336$ ,  $p<0.001$ ), yağ yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon ( $r=0.334$ ,  $p<0.001$ ), yağ ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon ( $r=0.249$ ,  $p= 0.008$ ) olduğunu, kas ağırlığı sistatin C arasında ise istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olmadığını tespit ettik (Tablo 4).

Sistatin C ile GFR-epi-cr arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü negatif korelasyon ( $r= -0.621$ ,  $p<0.001$ ), GFR-epi-cysc arasında istatistiksel olarak anlamlı çok güçlü negatif korelasyon ( $r= -0.947$ ,  $p<0.001$ ), GFR-epi-cr-cysc arasında istatistiksel olarak anlamlı çok güçlü negatif korelasyon ( $r=- 0.885$ ,  $p<0.001$ ) olduğunu tespit ettik (Tablo 4).

**Tablo 4.** Kreatinin ve sistatin C'nin antropometrik ölçümler ve GFR değerleri olan ilişkisi

		Kreatinin	Sistatin-c
Age	r	0.222	0.478
	p	<b>0.018</b>	<b>&lt;0.001</b>
Weight	r	0.032	0.188
	p	0.732	<b>0.046</b>
BMI(Body mass index)	r	0.066	0.336
	p	0.485	<b>&lt;0.001</b>
Fat %	r	0.021	0.334
	p	0.824	<b>&lt;0.001</b>
Fat Mass	r	0.028	0.249
	p	0.764	<b>0.008</b>
Fat free mass	r	0.074	0.024
	p	0.434	0.802
GFR-epi-cr	r	-0.701	-0.621
	p	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
GFR-epi -cysc	r	-0.463	-0.947
	p	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
GFR-epi-cr-cysc	r	-0.660	-0.885
	p	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

HCRP ile kilo arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon ( $r= 0.244$ ,  $p= 0.009$ ), BMI arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon ( $r= 0.351$ ,  $p= p<0.001$ ), yağ yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon ( $r=0.375$ ,  $p<0.001$ ), yağ ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon ( $r=0.312$ ,  $p<0.001$ ) olduğunu, kas ağırlığı ile HCRP arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını tespit ettik (Tablo 5).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda obez bireylerde yağ dokusu artışı ile sistatin C seviyesinin arttığını, GFR-epi-cysc ve GFR-epi-cr-cysc değerlerinin azaldığını tespit ettik.

Ayrıca inflamatuvar markerlardan HCRP'nin yağ dokusu artışı ile daha belirgin olarak arttığını, HCRP artışı ile orantılı olarak glomeruler filtrasyon hızı değerlerinde azalma olduğunu saptadık. Çalışmamız göstermiştir ki, sistatin C'nin obez bireylerde GFR hesaplama ve böbrek fonksiyonlarını takipte kullanımı yanlış sonuçlar verebilir.

### Obezitenin böbrek fonksiyonları ile ilişkisi:

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda obezitenin böbrek hastalıkları için risk faktörü olduğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarda genellikle vücut ağırlığı, BMI, bel çevresi gibi obezite parametrelerindeki artışın böbrek fonksiyonlarını azalttığı gösterilmiş ve obezitenin böbrek fonksiyonlarını etkileyen bağımsız risk faktörü olduğunu düşünülmüştür (16).

Tablo 5. İnflamasyon markerlarının antropometrik ölçümlerle olan ilişkisi.

		Weight	BMI	Fat%	Fat mass	Fat Free Mass
HCRP	r	0.244	0.351	0.375	0.312	0.068
	p	<b>0.009</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.47
Procalcitonin	r	-0.095	0.022	-0.007	-0.059	-0.140
	p	0.470	0.810	0.940	0.530	0.130
Plateletcrit	r	0.098	0.186	0.190	0.133	0.005
	p	0.300	<b>0.040</b>	<b>0.040</b>	0.160	0.950
SII	r	0.099	0.120	0.070	0.093	0.064
	p	0.290	0.200	0.460	0.320	0.500
TG index	r	-0.067	0.030	-0.013	-0.051	-0.063
	p	0.480	0.750	0.890	0.590	0.500
TG/HDL	r	0.015	0.061	0.025	0.010	0.026
	p	0.870	0.520	0.790	0.910	0.780
TKol/HDL	r	0.038	0.029	0.035	0.026	0.065
	p	0.680	0.760	0.710	0.780	0.490
LDL/HDL	r	0.021	-0.003	0.024	0.015	0.043
	p	0.820	0.970	0.800	0.870	0.650

HCRP: High-C-reactive protein, SII: Systemic immuneinflammatory index, TG index: Trigliserid indeksi, TG/HDL= Trigliserid/High density lipoprotein, TKol/HDL= total kolesterol/ High density lipoprotein, LDL/HDL=Low density lipoprotein/ High density lipoprotein

Vücut ağırlığı artışının böbrek yetmezliği için risk faktörü olduğu ve kilo kaybının böbrek hastalığının ilerlemesini engelleyebileceği gösterilmiştir (17). Bizim çalışmamızda da vücut ağırlığı ve BMI ile GFR değerlerinde azalmaları tespit etmemiz bu literatür bilgilerini destekler nitelikte olup obezitede kilo artışının böbrek fonksiyonlarını etkilediğini göstermektedir.

Obezitede böbrek fonksiyonlardaki bozulmanın patogenezi tam anlayışlamamış olmakla birlikte, anlamaya yönelik yapılan çalışmalarda, obeziteye sekonder olarak gelişen diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi gibi değişikliklerin böbrek fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir (18). Obez bireylerin böbreklerinde fokal segmental

glomeruloskleroz, glomerulomegali gibi histopatolojik değişikliklerin diyabet ve hipertansiyondan bağımsız olarak gelişerek böbreğin filtrasyon işlevinin azaldığı gösterilmiştir (19). Vücut ağırlığı artışının nefronlar üzerine extra bir yük getirdiği ve kronik böbrek hasarına neden olduğu düşünülmüştür (20). Amara ve ark.'nın yüksek yağlı diyet ve overiektomi yaparak obezite oluşturdukları ratlarda yapılan çalışmada kilo artışı, abdominal yağ dokusu ve kan basıncı artışının böbreklerde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (21). Obez bireylerde sık rastlanan proteinüri bulgusunun glomerüllerin proteinleri sızdırması sonucu ortaya çıktığı gösterilmiş ve bundan dolayı obezitenin kronik böbrek hastalıkları için risk faktörü olduğu



savunulmuştur (19).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kronik böbrek hastalıklarının patogenezinde inflamasyonun etkisi gösterilmeye başlanmıştır (22). Ratlarda yapılan bir çalışmada diyabete bağlı gelişen nefropatide TNF alfa, IL-1, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin renal hasar ve üriner albümin atılımının artmasına neden olduğu ve antienflamatuvar etkinliği bilinen pentoksifilin tedavisi ile idrar sitokin atılımında azalma tespit edilmiş olup, diyabete bağlı gelişen nefropatide antienflamatuvar özelliği bilinen ajanların kullanılabilceği gösterilmiştir (23). Martos-Rus ve ark.'nın yaptıkları çalışmada obezitede adipoz dokudaki artışın üremi patogenezinin sorumlu olan enflamasyonu artırdığı gösterilmiştir (24). Yüksek yağ ve karbonhidrat içeren diyetle obezite oluşturulan fare çalışmasında renal dokuda enflamasyona ait histopatolojik değişikliklerinin olduğu gösterilmiştir (25). Sucedaram ve ark. tarafından obezite oluşturulmuş ratlarda yapılan bir diğer çalışmada karaciğer ve böbreklerde makrofaj infiltrasyonunun gösterilmesi obeziteye bağlı gelişen enflamasyonun bu organların fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiş olup, obezite-enflamasyon ilişkisini desteklemektedir. (26). Ye ve ark.'nın farelerde curcumin ile yaptıkları çalışmada curcuminin antienflamatuvar etkisinden dolayı obezitede kronik enflamasyona bağlı geliştiği düşünülen nefropatiyi geriletmediği görülmüştür (27). Bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçları destekler nitelikte çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar obezitedeki enflamasyon artışının böbrek fonksiyonlarını etkilediğini düşündürmesi açısından önemlidir. Her ne kadar çalışmamızda mikroskobik olarak böbrek değişikliklerini gösterememiş olsak da GFR değerlerindeki azalmaların tespiti ve bu azalmaların HCRP ile ilişkisi enflamasyonun böbrek fonksiyonlarını etkilediğini düşündürmektedir. Çalışmamızda ayrıca yağ yüzdesi ve yağ ağırlığı ile GFR değerinin azaldığının tespiti, obezitede böbrek fonksiyonlarının yağ dokusu artışından etkilendiğini göstermektedir. Bu artışın enflamasyonu artırabileceğini düşünerek, HCRP

düzeylerinin yağ dokusu ile orantılı olarak arttığını göstermemiz, HCRP artışıyla GFR'deki azalmaları tespit etmemiz, obezitede yağ dokusu artışına bağlı vücutta gelişen enflamasyonun böbrek fonksiyonlarını etkilediğini düşündürmektedir.

#### **Obes bireylerde böbrek fonksiyonlarını takipte sistatin C kullanımı:**

Çalışmamızda ayrıca sistatin C seviyesinin yağ dokusu artışı ile arttığını tespit ettik. Sistatin C'nin yağ dokusu ile ilişkisi olduğu, adipoz dokudan salgılandığı daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiş durumdadır (15). Ancak obes bireylerde böbrek fonksiyonlarının takibi açısından sistatin C'nin kullanımı konusunda literatür bilgisinin oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. HIV pozitif aşırı kilolu olan bireylerde yapılan çalışmada, sistatin C'nin GFR'yi etkilemediği gösterilmiş, ancak bu çalışmadaki bireylerin yağ dokusu yüzdesi ve ağırlığının düşük olmasının sistatin C düzeyini etkilemediği düşünülerek daha yüksek obezitesi olan bireylerde çalışmak gerekliliği sonucuna varılmıştır (28).

Bu çalışmamızda sistatin C'nin yağ dokusu ile orantılı olarak artması ve GFR-epi-cysc değerlerinin yağ dokusu ile orantılı olarak azaldığının tespiti, obes bireylerde GFR hesaplanırken sistatin C kullanımı ile ilgili olarak soru işaretleri oluşturmaktadır. Sistatin C kas dokusundan etkilenmediği için kas kaybının eşlik ettiği kronik hastalıklarda kreatinine göre daha güvenilir olduğu düşünülerek böbrek fonksiyon takibinde kullanılabilceği savunulmuştur (29). BMI  $\geq 35$  kg / m<sup>2</sup> olan obezitesi olan kronik böbrek hastalarında GFR-epi-cr-cysc değerinin GFR-epi-cr temelli formülden daha üstün olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada bel çevresi ve BMI ölçümlerinin adipoz doku ve sistatin C ilişkisi ile doğru sonuçlar vermediği, vücut kompozisyonunu gösterecek farklı ölçümlerin gerektiği sonucuna varılmıştır (30). Bir diğer çalışmada diyabeti olan obes bireylerde sistatin C seviyesinin BMI artışı ile orantılı olarak arttığı gösterilmiş, obezitede yağ dokusu artışına bağlı olarak sistatin C'nin arttığı ve kardiyovasküler riskleri artırdığı sonucuna varılmıştır (31). Bizim

çalışmamızda sistatin C'nin yağ dokusu ile arttığını, GFR-epi-cysc ve GFR-epi-cr-cysc değerlerinin yağ dokusu arttıkça belirgin olarak azaldığını tespit etmemiz sadece bel çevresi ve BMI ölçümleri ile sistatin C arasındaki ilişkiyi incelemenin yetersiz olduğu literatür bilgisini desteklemektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda böbrek fonksiyonlarını hesaplamada kullanılan vücut yüzey alanı, kilo ve boy parametrelerinin obez bireylerde kullanılması konusunda tam bir fikir birliğinin olmadığı görülmektedir. Lopez -Martinez ve ark.'nın yaptıkları çalışmada GFR hesaplamasında kreatinin ve sistatin C kullanılarak, boy, kilo ve vücut yüzey alanına göre hesaplanan formüllerin aşırı kilolu ve obez hastalarda renal fonksiyonları doğru yansıtmadığını, klinik uygulamada bu formülleri kullanırken dikkatli olmak gerektiğini savunmuşlardır (32). Bir diğer çalışmada obezitesi olan kronik böbrek hastalarında ideal vücut ağırlığı kullanılarak vücut yüzey alanıyla GFR hesaplamasının, gerçek vücut ağırlığı kullanılarak vücut yüzey alanıyla GFR hesaplamasına göre daha az güvenilir olduğunu, çünkü kilo artarken hem kas ağırlığı ve hem de yağ dokusu artışı olduğunu düşünerek, ideal vücut ağırlığı

kullanımının yeterli olmayacağını düşünmüşlerdir (33). Bizim çalışmamızda da GFR-epi-cysc ve GFR-epi-cr-cysc değerlerinde boy ve BMI artışı ile belirgin azalmanın olmasının yanı sıra, yağ yüzdesi ve yağ ağırlığı artışıyla da azalmanın tespit edilmesi obez bireylerde GFR değerlerinin kullanımında dikkat etmek gerektiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, obezitenin inflamasyon ile ilişkisinin gösterilmesinin ardından obezitede artan yağ dokusu daha da dikkatleri üzerine çekmeye başlamıştır. Sistatin C böbrek glomerullerinden rahatlıkla geçebilen bir madde olup GFR hesaplamasında kullanılırken, obez bireylerde kullanılması ne kadar güvenilirdir düşüncesiyle yaptığımız çalışmamızda yağ dokusuyla artışı ile orantılı olarak sistatin C'nin arttığını ve GFR-epi-cysc ve GFR-epi-cr-cysc azaldığını tespit ettik. Yağ yüzdesi ve yağ dokusu artışı ile daha belirgin olmak üzere HCRP nin arttığını da tespit ettik. Bu sonuçlar obez bireylerde yağ dokusu artışı ile belirginleşen enflamasyonun böbrek fonksiyonlarını etkilediğini düşündürmesi açısından önemlidir. Bu göstermektedir ki, sistatin C'nin obez bireylerde GFR hesaplama ve böbrek fonksiyonlarını takipte kullanımı yanlış sonuçlar verebilir.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:05.04.2109 ve Karar No: 09.2019.369).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Engin A. The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:221-45.
2. Bonauto DK, Lu D, Fan ZJ. Obesity prevalence by occupation in Washington State, Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Prev Chronic Dis.* 2014;11:130219.
3. Kim HS, Lee J, Cho YK, Park JY, Lee WJ, Kim YJ, et al. Differential Effect of Metabolic Health and Obesity on Incident Heart Failure: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:625083.
4. Hsu CY, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Ann Intern Med.* 2006; 144:21-8.
5. Moreira AD, Velasquez-Melendez G, Ladeira RM, da Silva Junior GB, Fonseca MJ, Barreto SM. Association between Adiposity Indexes and Kidney Disease: Findings from the Longitudinal Study of Adult Health (Elsa-Brazil). *J Am Coll Nutr.* 2021;1-7.
6. Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts.* 2017;10(3):207-15.
7. Stolarczyk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr Opin Pharmacol.* 2017;37:35-40.
8. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(11):2792-800.
9. Kittikulnam P, Tiskajornsiri K, Katavetin P, Chaiwatanarat T, Eiam-Ong S, Praditpornsilpa K. The failure of glomerular filtration rate estimating equations among obese population. *PLoS One.* 2020;15(11):1-13.
10. McMahon GM, Waikar SS. Biomarkers in nephrology: Core curriculum 2013. *Am J Kidney Dis.* 2013;62(1):165-78.
11. Donahue RP, Stranges S, Rejman K, Rafalson LB, Dmochowski J, Trevisan M. Elevated cystatin C concentration and progression to pre-diabetes: the Western New York study. *Diabetes Care.* 2007;30(7):1724-9.
12. Gren ST, Janciauskiene S, Sandeep S, Jonigk D, Kvist PH, Gerwien JG, et al. The protease inhibitor cystatin C down-regulates the release of IL-beta and TNF-alpha in lipopolysaccharide activated monocytes. *J Leukoc Biol.* 2016;100(4):811-22.
13. Smith ER. Cystatin C - More than a filtration marker? *Atherosclerosis* 2013;230:173-5.
14. Muntner P, Winstan J, Uribarri J, Mann D, Fox CS. Overweight and obesity and elevated serum cystatin C levels in US adults. *Am J Med.* 2008;121(4):341348.
15. Naour N, Fellahi S, Renucci JF, Poitou C, Rouault C, Basdevant A, et al. Potential contribution of adipose tissue to elevated serum cystatin C in human obesity, *Obesity (Silver Spring).* 2009;17: 2121-6.
16. Iseki K, Ikemiya Y, Kinjo K, Inoue T, Iseki C, Takishita S. Body mass index and the risk of development of end-stage renal disease in a screened cohort. *Kidney Int.* 2004; 65:1870-76.
17. Nguyen S, Hsu C. Excess weight as a risk factor for kidney failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007;16(2):71-6.
18. 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.
19. Ejerblad E, Fored CM, Lindblad P, Fryzek J, McLaughlin JK, Nyren O. Obesity and risk for chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1695-702.
20. Nenov VD, Taal MW, Sakharova OV, Brenner BM. Multi-hit nature of chronic renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9:85-97.

21. Amaral LSB, Silva JA, Trindade TM, Ribas WBD, Macedo CL, Coimbra TM, et al. Renal changes in the early stages of diet-induced obesity in ovariectomized rats. *Physiol Res*. 2014;63(6):723-32.
22. Shabaka A, Cases-Corona C, Fernandez-Juarez G. Therapeutic Insights in Chronic Kidney Disease Progression. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:645187.
23. Navarro JF, Milena FJ, Mora C, Leon C, Garcia J. Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration. *Am J Nephrol* 2006; 26: 562-70.
24. Martos-Rus C, Katz-Greenberg G, Lin Z, Serrano E, Whitaker-Menezes D, Domingo-Vidal M, et al. Macrophage and adipocyte interaction as a source of inflammation in kidney disease. *Sci Rep*. 2021;11(1):1-14.
25. De Castro IC, Pequito DCT, Borghetti G, Yamaguchi AA, de Brito GAP, Yamazaki RK, et al. Obesity-like metabolic effects of high-carbohydrate or high-fat diets consumption in metabolic and renal functions. *Arch Physiol Biochem*. 2021:1-11.
26. Sucedaram Y, Johns EJ, Husain R, Abdul Sattar M, H Abdulla M, Nelli G. Exposure to High-Fat Style Diet Induced Renal and Liver Structural Changes, Lipid Accumulation and Inflammation in Intact and Ovariectomized Female Rats. *J Inflamm Res*. 2021;14: 689-710.
27. Ye L, Hu X, Hu X, Yin S, Chen J, He H, et al. Curcumin analogue C66 attenuates obesity-induced renal injury by inhibiting chronic inflammation. *Biomed Pharmacother*. 2021;137:111418.
28. Çağlayık DY, Arıkan H, Çeçen S. HIV ile enfekte obez bireylerde Sistatin-C. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2019;76(4): 461-68.
29. Hojs R, Bevc S, Ekart R, Gorenjak M, Puklavec L. Serum cystatin C as an endogenous marker of renal function in patients with mild to moderate impairment of kidney function. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:1855-62.
30. Lemoine S, Panaye M, Pelletier C, Bon C, Juillard L, Dubourg L, et al. Cystatin C-Creatinine Based Glomerular Filtration Rate Equation in Obese Chronic Kidney Disease Patients: Impact of Deindexation and Gender. *Am J Nephrol*. 2016;44(1):63-70.
31. Jhatta C, Girdhar J, Gupta S, Verma I. To Compare the Level of Cystatin C in Type 2 Diabetes Mellitus with Obesity. *Indian J Endocrinol Metab*. 2020 Jul-Aug;24(4):312-18.
32. López-Martínez M, Luis-Lima S, Morales E, Navarro-Díaz M, Negrín-Mena N, Folgueras T, et al. The estimation of GFR and the adjustment for BSA in overweight and obesity: a dreadful combination of two errors. *Int J Obes (Lond)*. 2020;44(5):1129-40.
33. Lemoine S, Guebre-Egziabher F, Sens F, Nguyen-Tu MS, Juillard L, Dubourg L, et al. Accuracy of GFR estimation in Obese Patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9:720-7.

## Sub-Kronik stresin neden olduğu depresyon ve anksiyete bozukluklarında tDAS'ın etkileri

### The effects of tDCS on depression and anxiety disorders induced by Sub-Chronic stress

Güven AKÇAY<sup>1</sup> (ID), Narin DERİN<sup>2</sup> (ID)

#### ÖZET

**Amaç:** Stres duygu, düşünce ve davranışları etkileyerek kişide depresyon, anksiyete gibi nöropsikiyatrik hastalıklara sebep olmaktadır. Bu çalışmada sub-kronik stres sonrası oluşan depresyon ve anksiyete bozukluklarına tDAS'ın terapötik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** 290-310 g ağırlığındaki 40 adet erkek Wistar sıçanlar kontrol, tDAS, stres ve stres+tDAS olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Stres modeli olarak 7 gün boyunca günde 2 saat hareketsizlik stresi uygulanmıştır. tDAS ve stres+tDAS grubundaki sıçanlara stres maruziyetinin 5. gününden itibaren 3 gün boyunca 1 mA anodal tDAS uyarımı yapılmıştır. Deneyin 7. gününde sıçanların anksiyete ve depresyon davranışları açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi ile değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Kontrol ve tDAS grupları arasında lokomotor aktivite, yükseltilmiş artı labirent testi verilerinde anlamlı değişim bulunmamıştır. Kontrol grubuna göre stres grubu sıçanların lokomotor aktivite düzeylerinde anlamlı azalma görülürken ( $p<0.001$ ), yükseltilmiş artı labirent testinde anksiyete göstergesi olan verilerde ise anlamlı artış saptanmıştır ( $p<0.001$ ). Kontrol grubuna

#### ABSTRACT

**Objective:** Stress causes neuropsychiatric diseases such as depression and anxiety in the person by affecting emotions, opinions and behaviors. In this study, the aim was to investigate the therapeutic effects of tDCS on depression and anxiety disorders that occur after sub-chronic stress.

**Methods:** 40 male Wistar rats weighing 290-310 g were divided into four groups as control, tDCS, stress and stress+tDCS. Restraint stress was applied for 7 days (2 h/day) as a stress model. Rats in the tDCS and stress+tDCS groups were performed the stimulation of 1 mA anodal tDCS for three consecutive days from the 5th day of stress exposure. On the 7th day of the experiment, the anxiety and depression behaviors of the rats were evaluated with the open field test and the elevated plus maze test.

**Results:** No significant changes were found in the locomotor activity, elevated plus maze test data between control and tDCS groups. In the stress group rats compared to the control group, there was a significant decrease in the locomotor activity levels ( $p <0.001$ ), while a significant increase was observed in the data

<sup>1</sup>Hittit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik AD., Çorum  
<sup>2</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik AD., Antalya



İletişim / Corresponding Author : Güven AKÇAY

İkbalkent Kampüsü Ulukavak Mah. Çiftlik Çayırı Cad. No: 45 19040 Çorum - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 22.01.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 19.08.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.06641

Akçay G, Derin N. Sub-Kronik stresin neden olduğu depresyon ve anksiyete bozukluklarında tDAS'ın etkileri. Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(2): 267 - 278

göre stres+tDAS grubunda, tDAS uygulamasını takiben anksiyete göstergesi olan verilerde ise anlamlı azalış görülmüş ( $p<0.05$ ) ancak lokomotor aktivite sonuçlarında anlamlı farka rastlanmamıştır.

**Sonuç:** Sonuç olarak verilerimiz, tDAS uyarımının sub-kronik stres kaynaklı anksiyete ve depresyon eğilimini azaltıcı etkilerinin olabileceğini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Stres, depresyon, anksiyete, tDAS, hareketsizlik stresi, sıçan

indicator of anxiety ( $p<0.001$ ). In the stress + tDCS group compared to the control group, there was a significant decrease in the data indicator of anxiety following tDCS application ( $p <0.05$ ), but no significant difference was found in the results of locomotor activity.

**Conclusion:** In conclusion, our data showed that tDCS stimulation may have an effect on sub-chronic stress-induced anxiety and depression behaviors.

**Key Words:** Stress, depression, anxiety, tDCS, restraint stress, rat

## GİRİŞ

Stres yanıtı, fiziksel ve/veya psikolojik uyarılar ile canlıda homeostazisin bozulması sonucu ortaya çıkan “çevresel değişimlere karşı vücudun spesifik olmayan cevabı” olarak tanımlanmaktadır (1, 2). Stresli bir hayat kişinin duygu, düşünce ve davranışlarını etkileyerek kişide depresyon, anksiyete gibi nöropsikiyatrik hastalıkların oluşmasına sebep olan en temel etkenlerden biridir (3). Stres ile karşılaşılması sonucu otonomik, metabolik, nöroendokrin ve immünolojik yanıtların aktive olduğu bilinmektedir (4). Stres canlılar için gerekli olmakla birlikte tekrarlanması ve uzun süre devam etmesi durumunda kişilerin beyinde ve diğer organlarında olumsuz değişikliklere yol açarak depresyon, anksiyete gibi nöropsikiyatrik bozukluklar ve kardiyovasküler hastalıklar da dahil birçok patolojik süreci tetiklediği bilinmektedir (5, 6). Bu tip durumların kişilerin beyin fonksiyonları üzerinde kalıcı zararlı etkilere sebep olduğu rapor edilmiştir (7, 8). Depresyon, dünyada 264 milyondan fazla kişiyi etkileyen yaygın bir zihinsel bozukluktur. Depresyon, stres cevabına karşı verilen fizyolojik değişiktir (9). Depresyonlu kişilerde uyku ve iştah bozukluğu, yorgunluk ve dikkat eksikliği gibi

durumlar yaygındır (10, 11). Özellikle uzun süre ve şiddetli yoğunlukta depresyon yaşayan kişilerde ciddi bir sağlık sorunu haline gelerek kişinin acı çekmesine ve yaşamını olumsuz etkilemesine neden olabilmektedir (11). Depresyon kişilerde intihara neden olabilmekte ve her yıl 800.000’e yakın kişi depresyondan dolayı intihar etmektedir. Depresyon sonrası ortaya çıkan çaresizlik duygusu genellikle anksiyetik durumlar ile beraber gözlenmektedir. Depresyon ile birlikte anksiyetenin görüldüğü kişilerde gelecek korkusu, uyarılma ve dikkatte artış, kalp hızı ve kan basıncı artışı ile durumun seyri daha da kötü bir hal almaktadır (7, 8). Stres ve anksiyete kişinin günlük yaşam kalitesini önemli ölçüde bozan ve halk sağlığına çok yüksek ekonomik maliyeti olan önemli psikiyatrik durumlardır. Anksiyete, normal yaşamda canlının hayatta kalabilmesi ve tehlikelere karşı uyum sağlamasında önemli bir mekanizma iken, devamlı ve aşırı olması durumunda sebepsiz korkulara yol açarak nöropsikiyatrik bozukluklara neden olmaktadır (12).

Transkraniyal Doğru Akım Stimülasyonu (tDAS), klinikte depresyon, akut ve kronik ağrı, demans, inme sonrası rehabilitasyon, madde bağımlılığı ile bazı nörolojik ve psikiyatrik durumlarda tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılan, nöromodülasyon

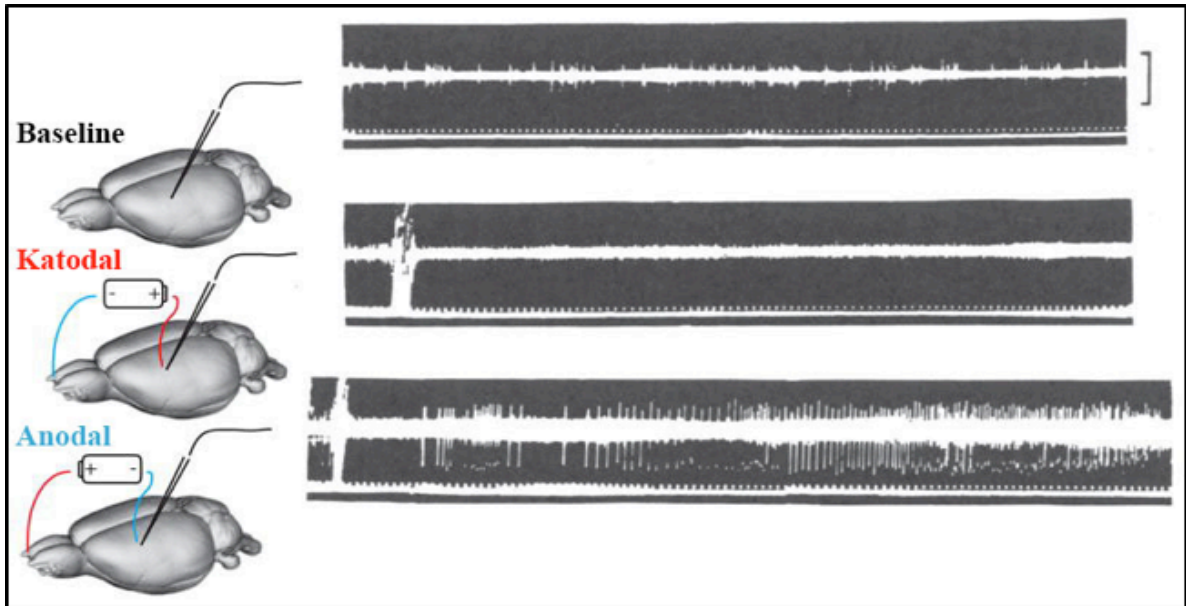
tekniklerinden biridir (13). tDAS, genellikle alın bölgesinden iki elektrot aracılığı ile beynin, düşük yoğunlukta doğru akım ile uyarılması prensibi ile çalışmaktadır. Doğru akımın uyardığı beyin dış kabuğunda beynin bazı elektriksel aktivitelerinin canlanması ve bazı aktivitelerinin ise bastırılması hedeflenmektedir (13). tDAS'ın etki mekanizması nöronlarda aksiyon potansiyeli oluşturmaksızın membran potansiyelinde depolarizasyon veya hiperpolarizasyon etki oluşturarak gerçekleşmektedir (14, 15). Uygulanan doğru akımın süresi, polaritesi ve akımın yönü nöronlarda oluşan değişikliğin derecesini belirlemektedir (16). Uyarılabilirliği akım şiddeti ve uyarı tipi (anodal veya katodal) belirlemektedir (17).

Transkraniyal doğru akım stimülasyonunun anodal ve katodal tDAS olmak üzere iki tipi vardır: Anodal uyarı eksitasyona yol açarak piramidal hücrelerin somasında depolarizasyon etki gösterirken, katodal uyarı inhibisyona neden olarak hiperpolarizasyon etki oluşturmaktadır (15-17) (Şekil 1). Yapılan çalışmalarda tDAS uyarısının etkinliğinin, uyarının süresine ve yerine bağlı olarak 90 dakikaya kadar sürdüğü ve

tekrarlayan uyarılardan sonra da uzun süre sürdüğü gösterilmiştir (18, 19).

tDAS'ın beyinde bilişsel fonksiyonları artırdığı bilinmektedir (13). Uyarı süresi ve sayısına bağlı olarak etkinliğinin değiştiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (19, 20). tDAS ile ilgili yapılan çalışmalarda, tDAS'ın ilaca yardımcı bir tedavi olarak etkili olduğu gösterilmiştir (21-23). tDAS kısa süreli ve ağrısız bir tedavi olmakla birlikte, ilaç etkileşimi olmaması ve vücuda zarar vermemesi ile ön plana çıkmaktadır (17). tDAS, yaşlı, organ yetmezliği olan ve hamile gibi ilaç toleransı olmayan hastalar için ilaçsız tedavi yöntemleri arasında kullanılan en avantajlı yöntemdir (23). İnme sonrası rehabilitasyon, depresyon ve ağrı tedavisinde ilaca yardımcı bir tedavi olarak uygulandığında tek başına ilaç tedavisinden alınacak sonucu kuvvetlendirmektedir (21).

Bu çalışma ile sub-kronik stres sonrası oluşan depresyon ve anksiyete bozukluklarına tDAS'ın terapötik etkilerinin açık alan ve yükseltmiş artı labirent testleri ile incelenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 1. Anodal ve katodal tDAS uyarım sonrası beyin aktivitesini gösteren kayıt örnekleri (18)

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Deneysel Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı (18.01.2020/Karar No 4) ile Akdeniz Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen sıçanlar kullanılmıştır.

### Deneysel Grupları ve Protoköli

290-310 gr ağırlığındaki 40 adet erkek Wistar albino sıçan 4 gruba ayrılarak deneyler yapılmıştır.

**Kontrol grubu:** Sıçanlara herhangi bir işlem yapılmamıştır.

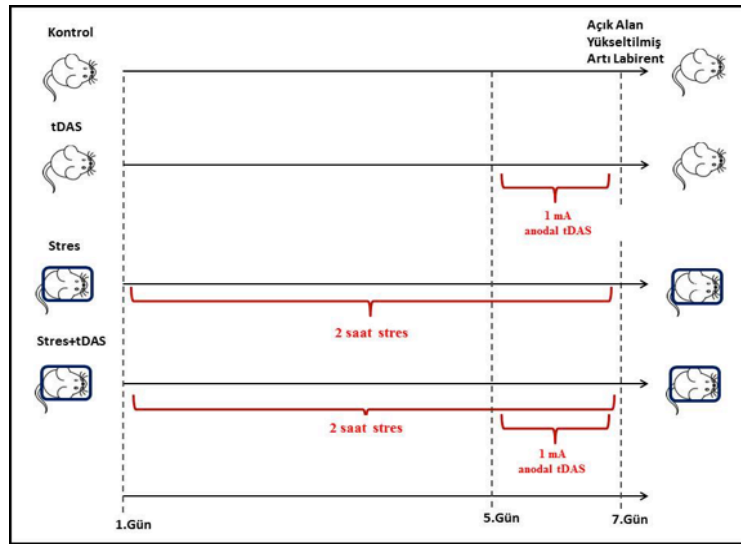
**tDAS grubu:** Sıçanlara stres uygulanmaksızın 5. günden itibaren 3 gün boyunca 1 mA anodal tDAS uygulaması yapılmıştır.

**Stres grubu:** Sıçanlara 7 gün boyunca hareketsizlik stresi uygulanmıştır.

**Stres+tDAS grubu:** Sıçanlara 7 gün boyunca hareketsizlik stresi uygulanmış, deneyin 5. gününden itibaren de 3 gün boyunca stres ile birlikte 1 mA anodal tDAS uygulaması yapılmıştır.

### Deneysel Protoköli

Deneysel boyunca hayvanlar her kafeste 5 hayvan olacak şekilde 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusunda tutulmuşlardır. Deneysel boyunca sıçanlar kısıtlamaksızın (ad libitum) ticari yem ve su ile beslenmiştir. Deneysel 1. gününden başlayarak 7 gün boyunca sub-kronik stres uygulanmıştır. Deneysel 7. gününde sabah açık alan testi ve öğleden sonra da yükseltilmiş artı labirent testi deneyleri yapılmıştır. Deneysel süreci ile ilgili takvim Şekil 2'de sunulmuştur.



Şekil 2. Deneysel süreci ile ilgili 7 günlük takvim

### Sub-kronik stres modeli

Sub-kronik stres modeli için Sandrini ve ark.'nın metodu kullanılmıştır (24). Hareketsizlik stresi, hayvanların ebatlarına göre büyüklüğü ayarlanabilen, pleksiglastan yapılmış ön tarafında havalandırma delikleri olan, 7x7x12 cm boyutlarındaki aparatta yapılmıştır. Deneklerin burunları aparatın ön

bölümündeki hava deliklerine gelecek şekilde yerleştirildikten sonra, kuyrukları dışarıda kalacak biçimde sıçanın boyutlarına göre sürgüyle ayarlanmıştır (Şekil 3). Sub-kronik stres günün farklı saatlerinde olacak şekilde, 7 gün boyunca günde 2 saat uygulanmıştır (Şekil 2) (24-27).





Şekil 3. Sıçanların hareketsizlik stresinin uygulandığı apparattaki görüntüleri

#### tDAS Uygulaması

tDAS uygulaması için, Biyofizik Anabilim Dalında bulunan ve zamansal çözünürlüğü 1 dk olan Animal DCS Stimulator (model 2100) cihazı kullanılmıştır. Çalışmamızda tDAS ve stres+tDAS gruplarında yer alan sıçanlara deneyin 5. gününden itibaren 3 gün

boyunca günde 30 dak. 1 mA anodal tDAS uygulaması yapılmıştır. tDAS uyarımı stres grubuna sub-kronik stres uygulamasından sonra uygulanmıştır. tDAS uygulaması sırasında yüzeysel disk elektrot kullanılmış, maksimum akım şiddeti  $\pm 1000 \mu\text{A}$ , akım çözünürlüğü 0.01mA olarak ayarlanmıştır (Şekil 4.).

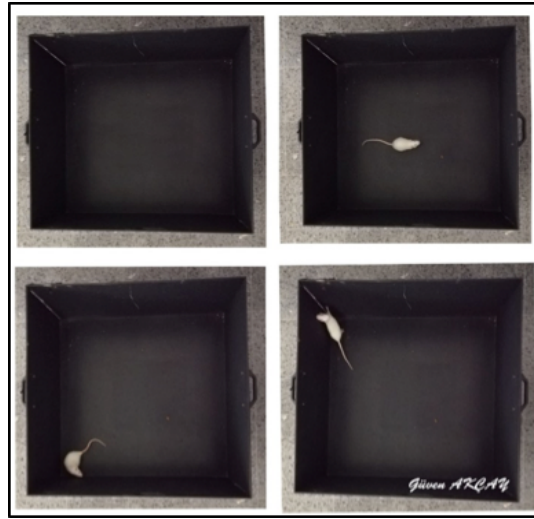


Şekil 4. tDAS uygulama görüntüleri

### Açık Alan Testi

Açık alan testi, lokomotor aktivite, anksiyete ve depresyon benzeri bazı davranışları değerlendirmede kullanılan bir testtir. Açık alan deneyleri 80x80x40 cm ebatlarında düzeneğe yapılmıştır (Şekil 5). Alan, 20 cm<sup>2</sup> büyüklüğünde 12'si çevresel bölgeyi ve kalan 4'ü arenanın merkezi bölgesini oluşturan birbirine eşit 16 küçük kareye bölünmüş, denekler düzeneğin merkezine bırakılarak 5 dakika boyunca hareketleri kaydedilmiştir. Her bir sıçan düzeneğe alınmadan

önce, açık alan düzeneği % 70 etanol ile temizlenerek koku ile ilgili ipuçları yok edilmiştir. Her sıçan için alınan toplam yol (cm), ortalama hız (cm/s), girilen kare sayısı ve dış/iç kadranda geçirilen süre yüzde oranları analiz edilmiştir (28). Locomotor aktive parametreleri olarak alınan toplam yol (cm), ortalama hız (cm/s) ve girilen kare sayısı, depresyon parametresi olarak da dış/iç kadranda geçirilen süre yüzde oranları kullanılmıştır.



Şekil 5. Açık alan testinde sıçanların düzenekteki görüntüleri

### Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yükseltilmiş artı labirent testi, kemirgenlerin keşif ve kaygı tarzı davranışlarını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Sıçanlarda yükseltilmiş artı labirent testi için, 50x10 cm ebatlarında iki açık ve iki kapalı koldan oluşan artı şeklinde düzeneğe kullanılmıştır. Yükseltilmiş artı labirent düzeneği her bir sıçan düzeneğe konulmadan önce %70 etanol ile temizlenmiş ve kurutulmuştur. Her bir sıçan, kafası açık kola bakacak şekilde labirentin ortasına yerleştirilmiş ve keşif faaliyeti 5 dakika boyunca izlenmiştir. Açık ve kapalı kollarda geçirilen süre ve giriş sayıları değerlendirilmiştir. Açık kollarda (açık kollarda geçirilen süre/tüm kollarda geçirilen süre x 100) ve kapalı kollarda (kapalı kollarda geçirilen

süre/tüm kollarda geçirilen süre x 100) geçirilen süre yüzde olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, açık ve kapalı kol girişlerinin yüzdeleri (açık kollarda/tüm kollarda veya kapalı kollarda/(tüm kollarda) x 100) değerlendirilmiştir. Hayvanın dört pençesinin tamamının labirentin bir kolunda bulunması giriş olarak tanımlandı (28).

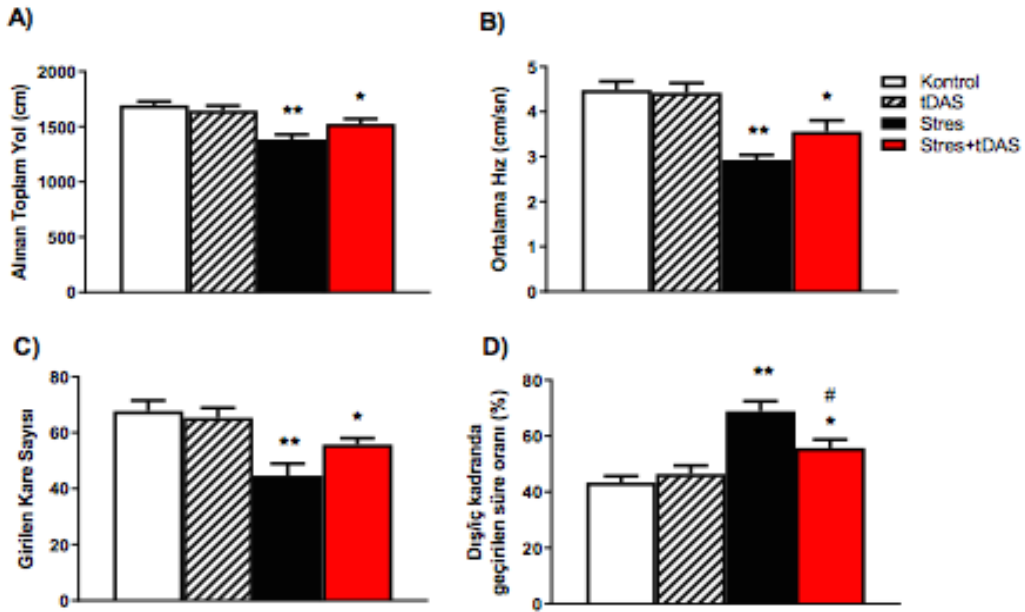
### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz SPSS 20.0 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama±standart hata (SEM) olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık p <0.05 olarak kabul edilmiştir. Açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testi verileri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve posthoc test olarak Tukey testi kullanılmıştır.

## BULGULAR

Açık alan testi verileri incelendiğinde stres ve stres+tDAS gruplarında alınan toplam yol, ortalama hız ve girilen kare sayısının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (Şekil 6A, 6B, 6C). Stres grubuna kıyasla stres+tDAS grubunun lokomotor aktivite verilerinde artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak

anlamlı olmadığı saptanmıştır. Anksiyete parametresi olan dış/iç kadranda geçirilen süre oranında stres ve stres+tDAS grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış tespit edilmiştir (Şekil 6D). Stres grubuna göre stres+tDAS grubunun dış/iç kadranda geçirilen süre oranında istatistiksel olarak anlamlı olarak azalma görülmüştür. Sıçanların açık alan düzeneğinde kat ettikleri yolun görseli Şekil 7'de sunulmuştur.



Şekil 6. Deney gruplarının açık alan testi bulguları.

A) Alınan toplam yol (cm), B) Ortalama hız (cm/sn), C) Girilen kare sayısı, D) Dış/iç kadranda geçirilen süre oranı (%).

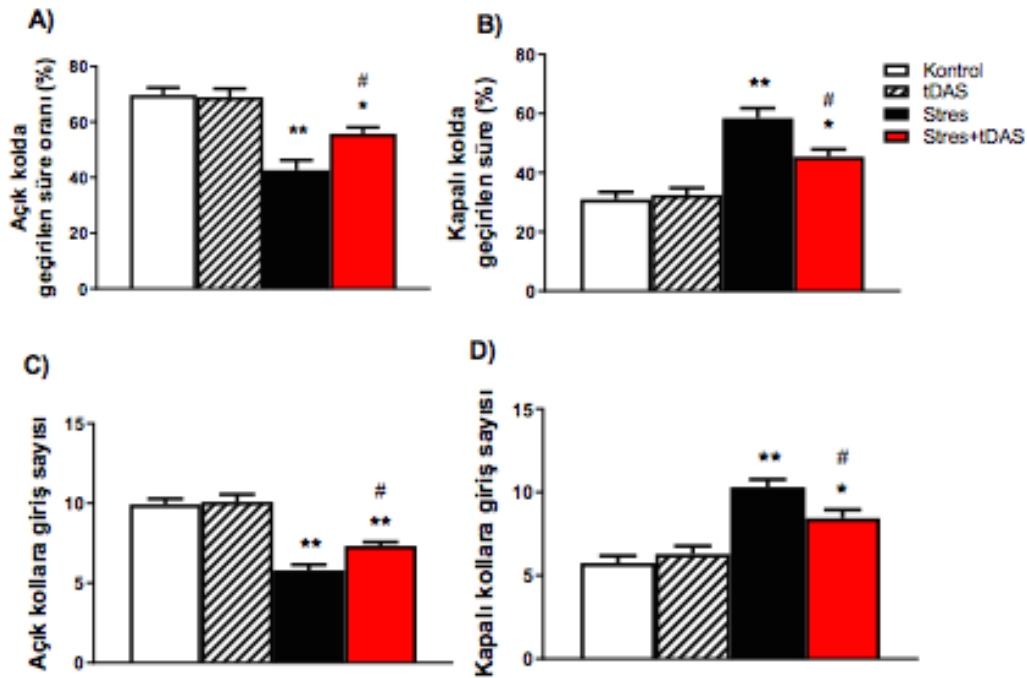
\*  $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.001$ , Kontrol grubuna göre farkı göstermektedir. #  $p < 0.05$ , Stres grubuna göre farkı göstermektedir.



Şekil 7. Deney gruplarının açık alan düzeneğinde kat ettikleri yolun çizgilerle sunumu

Yükseltilmiş artı labirent testinde, kontrol grubuna göre stres ve stres+tDAS gruplarının açık kolda geçirilen süre oranı ve açık kollara giriş sayılarında anlamlı olarak azalma görülürken, kapalı kolda geçirilen süre oranı ve kapalı kollara giriş sayılarında ise artma görülmüştür (Şekil 8A, 8B, 8C, 8D). Stres+tDAS grubundaki sıçanların açık

kolda geçirdikleri süre oranı ve açık kollara giriş sayılarının stres grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı tespit edilirken, kapalı kolda geçirdikleri süre oranı ve kapalı kollara giriş sayılarının stres grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (Şekil 8A, 8B, 8C, 8D).



Şekil 8. Grupların yükseltilmiş artı labirent testi verileri.

A) Açık kolda geçirilen süre oranı(%), B) Kapalı kolda geçirilen süre oranı (%), C) Açık kollara giriş sayısı, D) Kapalı kollara giriş sayısı  
\* p<0.05 ve \*\*p<0.001, Kontrol grubuna göre farkı göstermektedir. # p<0.05, Stres grubuna göre farkı göstermektedir

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Fiziksel ve psikososyal çevresel stres faktörleri hem merkezi sinir sistemi bozukluklarının hem de kardiyovasküler hastalıkların başlamasına ve ilerlemesine neden olmaktadır (24). İnsanlar yaşamı boyunca birçok stres etkenine doğrudan ya da dolaylı olarak maruz kalmaktadır. Stresin tekrar etmesi ve uzun sürmesi kişilerin duygu, düşünce

ve davranışlarını etkileyerek depresyon, anksiyete gibi nöropsikiyatrik hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır (3). Anksiyete ve depresyon, dünya çapında en yaygın ruhsal bozukluklardan biridir. tDAS, dikkate değer noninvazif beyin stimülasyon tekniklerinden biridir ve anksiyete tedavisinde yeni bir seçenek olması beklenmektedir (28). Klinikte yapılan çalışmalarda, dorsolateral prefrontal kortekse tDAS uygulamasının obsesif kompulsif bozukluk, travma

sonrası stres bozukluğu ve anksiyete bozukluğu olan hastaların semptomlarında azalmalara neden olduğu rapor edilmiştir (29-34). Mehrsafar ve ark. 12 erkek okçu üzerinde yaptığı çalışmada dorsolateral prefrontal korteks üzerine 20 dak. 2 mA anodal tDAS uygulamasının, okçuların kendilerini daha enerjik hissetmelerinde artışa neden olduğunu ve gerginlik, yorgunluk gibi anksiyetik duyguların ise azalttığını göstermişlerdir (35). Bogdanov ve Schwabe insanlar üzerinde yaptığı çalışmada, 1.075 mA anodal tDAS uygulamasının akut stresin neden olduğu çalışan hafıza bozukluklarını önlemede potansiyel yeni bir metod olabileceğini rapor etmişlerdir (36). Sub-kronik stres sonrası tDAS'ın anksiyete ve depresyon davranışları üzerine etkileri hala tam olarak bilinmemektedir. tDAS'ın etki mekanizmalarının tam olarak anlaşılması için davranışsal ve moleküler mekanizmaları araştıran prelinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan dolayı çalışmamızda tDAS'ın anksiyete ve depresyona olan etkileri davranışsal olarak araştırılmıştır. Adachi ve ark. sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada 8 gün 20 dak. 0.5 mA anodal tDAS'ın kronik stresin neden olduğu hiperlajzi ve allodini gibi ağrı sistemi üzerindeki olumsuz etkileri tersine çevirebildiğini ve bu etkinin 24 saat boyunca devam ettiğini göstermişlerdir (37). Brunoni ve ark. majör depresif bozukluğa sahip 120 hasta üzerinde yaptıkları randomize kontrollü çalışmada, sadece sertralin (50 mg/gün) adlı antidepressan ilaç tedavisi ve sertralin (50 mg/gün) tedavisi ile birlikte tDAS uygulamasının etkisini karşılaştırmışlar, tDAS ve sertralinin birlikte uygulanmasının depresif semptomları daha hızlı ve etkili bir şekilde hafiflettiğini göstermişlerdir (21). Fang ve Wang yaptıkları çalışmada, 30 dakika zorunlu yüzme akut stres maruziyeti sonrası sıçanlara 0.4 mA 7 gün anodal tDAS uygulaması yapmışlardır (28). Bu araştırmacılar tDAS uyarımının açık alan testinde lokomotor aktiviteyi etkilemeden merkezde harcanan zamanı artırdığını, yükseltilmiş artı labirent testinde açık kola giriş sayısını ve açık kolda harcanan zamanı yükselttiğini göstermişlerdir. Bizim bulgularımız

Fang ve Wang'ın sonuçları ile örtüşmekte olup, çalışmamızda, anodal tDAS uygulamasının açık alan testinde lokomotor aktive parametrelerini istatistiksel olarak değiştirmeden depresyon parametresi olan dış/iç kadranda geçirilen süre oranını anlamlı derecede azalttığı, yükseltilmiş artı labirent testinde de tDAS uygulamasının stres sonrası artan anksiyete parametrelerini tersine çevirdiği tespit edilmiştir (28). Çalışmamızda, 7 gün uygulanan hareketsizlik stresinin yalnızca son 3 gününde uygulanan tDAS'ın anksiyete ve depresyon göstergeleri üzerinde azaltıcı etkilerinin olduğu, bu etkinliğin tDAS'ın akım şiddetinin artırılması ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Nitekim, çalışmamızda Fang ve Wang tarafından kullanılan 0.4 mA yerine 1 mA tDAS kullanılmış olup, tDAS uygulaması ile ilişkili terapötik etkinlikte tDAS'ın uygulama süresi ve akım şiddetinin önemli olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda depresyon tedavisinde N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistlerinin antidepressan ilaçlardan daha kısa zamanda etki göstererek faydalı olduğu bildirilmiştir (38, 39). Bu nedenle, anksiyete ve depresyon davranışlarına tDAS uygulamasının terapötik etkisinin, depresyon hastalığının patofizyolojisinde rol oynadığı bilinen glutamaterjik sistem ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (38). NMDA reseptör antagonistlerinin daha kısa süre etki göstermesinin nedeni henüz bilinmemesine rağmen sinaptik aralıktaki glutamat seviyelerindeki değişimlerin neden olduğu düşünülmektedir.

Bu sonuçlar, tDAS'ın muhtemelen sub-kronik stres kaynaklı anksiyete benzeri nöropsikiyatrik davranış bozukluklarına karşı tedavi edici etkisi olabileceğini göstermektedir. Gelecekte yapılacak çalışmalar ile kronik hareketsizlik stresinin neden olduğu duygu durum ve anksiyete bozukluklarına tDAS'ın etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamak için davranış deneyleri yanı sıra özellikle glutamat ve glutamin düzeylerinin araştırılmasının da büyük katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

**ETİK KURUL ONAYI**

\* Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 18.01.2020 ve Karar No: 4).

**ÇIKAR ÇATIŞMASI**

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**KAYNAKLAR**

1. Aguilera G, Rabadan-Diehl C, Nikodemova M. Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides*. 2001;22(5):769-74.
2. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:259-84.
3. Gronli J. Chronic mild stress-an animal model of depression [Doctoral Thesis]: University of Bergen; 2006.
4. Aysu Ş. Sıçanlarda kronik stresin empatiye etkilerinin araştırılması [Uzmanlık Tezi]: İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi 2020.
5. Smith SM, Vale WW. Autophagy deficiency contributes to diabetes progression. *Nature Reviews Endocrinology*. 2012;8(2):68.
6. Levine AB, Levine LM, Levine TB. Posttraumatic stress disorder and cardiometabolic disease. *Cardiology*. 2014;127(1):1-19.
7. Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res*. 2005;156(1):105-14.
8. Lee B, Sur B, Kwon S, Yeom M, Shim I, Lee H, et al. Chronic administration of catechin decreases depression and anxiety-like behaviors in a rat model using chronic corticosterone injections. *Biomol Ther (Seoul)*. 2013;21(4):313-22.
9. Thakare VN, Dhakane VD, Patel BM. Potential antidepressant-like activity of silymarin in the acute restraint stress in mice: Modulation of corticosterone and oxidative stress response in cerebral cortex and hippocampus. *Pharmacol Rep*. 2016;68(5):1020-7.
10. Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2010;13(10):1161-9.
11. WHO. Depression 19.01.2021 [<https://www.who.int/health-topics/depression>].

12. Cryan JF, Sweeney FF. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011;164(4):1129-61.
13. Stagg CJ, Antal A, Nitsche MA. Physiology of Transcranial Direct Current Stimulation. *J ECT.* 2018;34(3):144-52.
14. Akçay G, Bahadır A. The Therapeutic Effects of Non-Invasive Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) in Experimental Models of Stroke. In: Chernopolski PM, Shapekova NL, Ak B, eds. *Research Advancements In Health Sciences.* 1 ed. St. Kliment Ohridski University Press, 2021:28-49.
15. Wagner T, Fregni F, Fecteau S, Grodzinsky A, Zahn M, Pascual-Leone A. Transcranial direct current stimulation: a computer-based human model study. *Neuroimage.* 2007;35(3):1113-24.
16. Medeiros LF, de Souza IC, Vidor LP, de Souza A, Deitos A, Volz MS, et al. Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: a review. *Front Psychiatry.* 2012;3:110.
17. Stagg CJ, Nitsche MA. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *Neuroscientist.* 2011;17(1):37-53.
18. Reinhart RM, Cosman JD, Fukuda K, Woodman GF. Using transcranial direct-current stimulation (tDCS) to understand cognitive processing. *Atten Percept Psychophys.* 2017;79(1):3-23.
19. Galvez V, Alonzo A, Martin D, Loo CK. Transcranial direct current stimulation treatment protocols: should stimulus intensity be constant or incremental over multiple sessions? *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;16(1):13-21.
20. Alonzo A, Brassil J, Taylor JL, Martin D, Loo CK. Daily transcranial direct current stimulation (tDCS) leads to greater increases in cortical excitability than second daily transcranial direct current stimulation. *Brain Stimulation.* 2012;5(3):208-13.
21. Brunoni AR, Valiengo L, Baccaro A, Zanao TA, de Oliveira JF, Goulart A, et al. The sertraline vs. electrical current therapy for treating depression clinical study: results from a factorial, randomized, controlled trial. *JAMA Psychiatry.* 2013;70(4):383-91.
22. Behzad Rigi K, Behrooz D, Masoud N, Nour Mohammad B, Abed M, Mousa Chakeri H. Combination Therapy and Opioids: Effectiveness of Transcranial Direct-Current Stimulation (tDCS) and Emotion Regulation Training in Reducing Current Drug Craving. *Maedica (Bucur).* 2020;15(1):53-60.
23. Palm U, Hasan A, Strube W, Padberg F. tDCS for the treatment of depression: a comprehensive review. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2016;266(8):681-94.
24. Öğüt E, Akçay G, Yıldırım F B, Derin N. Sirinjik Asidin Anksiyolitik Benzeri Etkileri: Davranış Çalışması. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi.* 2022. <https://doi.org/10.26650/IUITFD.1071463>.
25. Yuen EY, Liu W, Karatsoreos IN, Feng J, McEwen BS, Yan Z. Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(33):14075-9.
26. Kumar A, Garg R, Prakash AK. Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) treatment on restraint stress-induced behavioral and biochemical alteration in mice. *BMC Complement Altern Med.* 2010;10:18.
27. Yu H, Wang DD, Wang Y, Liu T, Lee FS, Chen ZY. Variant brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism alters vulnerability to stress and response to antidepressants. *J Neurosci.* 2012;32(12):4092-101.
28. Fang G, Wang Y. Transcranial direct current stimulation (tDCS) produce anti-anxiety response in acute stress exposure rats via activation of amygdala CB1R. *Behav Brain Res.* 2020;400:113050.
29. D'Urso G, Mantovani A, Patti S, Toscano E, de Bartolomeis A. Transcranial Direct Current Stimulation in Obsessive-Compulsive Disorder, Posttraumatic Stress Disorder, and Anxiety Disorders. *J ECT.* 2018;34(3):172-81.
30. Palm U, Leitner B, Kirsch B, Behler N, Kumpf U, Wulf L, et al. Prefrontal tDCS and sertraline in obsessive compulsive disorder: a case report and review of the literature. *Neurocase.* 2017;23(2):173-7.

31. Handrack M, Voderholzer U, Schwartz C, Hasan A, Padberg F, Palm U. Prefrontal direct current stimulation in hoarding disorder: A case report. *Brain Stimul.* 2018;11(3):634-5.
32. Mondino M, Bennabi D, Poulet E, Galvao F, Brunelin J, Haffen E. Can transcranial direct current stimulation (tDCS) alleviate symptoms and improve cognition in psychiatric disorders? *World J Biol Psychiatry.* 2014;15(4):261-75.
33. Bation R, Poulet E, Haesebaert F, Saoud M, Brunelin J. Transcranial direct current stimulation in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder: An open-label pilot study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016;65:153-7.
34. Narayanaswamy JC, Jose D, Chhabra H, Agarwal SM, Shrinivasa B, Hegde A, et al. Successful Application of Add-on Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) for Treatment of SSRI Resistant OCD. *Brain Stimul.* 2015;8(3):655-7.
35. Mehrafar AH, Rosa MAS, Zadeh AM, Gazerani P. A feasibility study of application and potential effects of a single session transcranial direct current stimulation (tDCS) on competitive anxiety, mood state, salivary levels of cortisol and alpha amylase in elite athletes under a real-world competition. *Physiol Behav.* 2020;227:113173.
36. Bogdanov M, Schwabe L. Transcranial Stimulation of the Dorsolateral Prefrontal Cortex Prevents Stress-Induced Working Memory Deficits. *J Neurosci.* 2016;36(4):1429-37.
37. Spezia Adachi LN, Caumo W, Laste G, Fernandes Medeiros L, Ripoll Rozisky J, de Souza A, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res.* 2012;1489:17-26.
38. Strzelecki D, Tabaszewska A, Barszcz Z, Jozefowicz O, Kropiwnicki P, Rabe-Jablonska J. A 10-week memantine treatment in bipolar depression: a case report. Focus on depressive symptomatology, cognitive parameters and quality of life. *Psychiatry Investig.* 2013;10(4):421-4.
39. Mathews DC, Henter ID, Zarate CA. Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. *Drugs.* 2012;72(10):1313-33.



# Determination of doxorubicin amount conjugated to mPEG-b-PCL copolymer via pH sensitive hydrazone bond

## pH duyarlı hidrazon bağıyla mPEG-b-PCL kopolimerine konjuge edilen doksorubisin miktarının belirlenmesi

Gülhan IŞIK<sup>1</sup> (ID), Ayşen TEZCANER<sup>2</sup> (ID), Nesrin HASIRCI<sup>3</sup> (ID), Aysel KIZILTAY<sup>4</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to find the efficient medium to bind an anticancer drug, Doxorubicin (DOX), to a synthesized polymer, methoxy poly(ethylene glycol)-block-polycaprolactone (mPEG-b-PCL) via pH sensitive hydrazone bonds and to determine the amount of conjugated drug.

**Methods:** DOX conjugation was carried out in two different media [dimethyl sulfoxide (DMSO) and methanol-trifluoroacetic acid (MeOH-TFA)]. The amount of conjugated drug was determined with two different methods. One method was applied the dissolution of the conjugate in chloroform: methanol (Ch: MeOH, 1: 1 v/v) solution without considering pH responsiveness, and the other method was after breaking pH sensitive hydrazone bonds in acidic medium [using three different media as 0.1 M hydrochloric acid (HCl), concentrated HCl (12 M HCl) and concentrated sulfuric acid (18.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)].

**Results:** The highest conjugation efficiency was obtained when the conjugation was achieved in MeOH-TFA solution, and for the polymer-drug conjugates after the treatment with concentrated sulfuric acid.

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, antikanser bir ilaç olan Doksorubisin (DOX) sentezlenen metoksi poli(etilen glikol)-blok-polikaprolakton (mPEG-b-PCL) polimerine pH-duyarlı hidrazon bağları aracılığıyla bağlanabileceği etkin ortamı bulmak ve konjuge edilmiş ilaç miktarını belirlemektir.

**Yöntem:** DOX konjugasyon işlemi iki farklı ortamda [dimetil sülfoksit (DMSO) ve metanol trifloroasetik asit (MeOH-TFA)] gerçekleştirilmiştir. Konjuge ilaç miktarı iki farklı yöntemle belirlenmiştir. Bir metot, pH duyarlılığını göz ardı ederek konjuge yapının kloroform:metanol (Ch:MeOH, 1:1 v/v) çözeltisi içerisinde çözünmesi sonrasında, diğer metot pH'ya duyarlı hidrazon bağlarının asidik ortamda [0.1 M hidroklorik asit (HCl), derişik HCl (12 M HCl) ve derişik sülfürik asit (18.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) olarak üç farklı ortamda] kırılması sonrasında uygulanmıştır.

**Bulgular:** En yüksek konjugasyon verimliliği MeOH-TFA çözeltisi içerisinde konjugasyon sağlandığında ve polimer-ilaç konjugatları konsantre sülfürik asit ile muamele edildikten sonra elde edilmiştir.

<sup>1</sup>Middle East Technical University, Graduate Department of Biotechnology, Ankara

<sup>2</sup>Middle East Technical University, Department of Engineering Sciences, Ankara

<sup>3</sup>Near East University, Tissue Engineering And Biomaterials Research Center, Lefkosa, TRNC

<sup>4</sup>Middle East Technical University, Central Laboratory, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Aysel KIZILTAY

Üniversiteler Mh., Dumlupınar Blv. No: 1, Çankaya 06800 Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : kiziltay@metu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 16.08.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 04.01.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.04317

Işık G, Tezcaner A, Hasirci N, Kiziltay A. Determination of doxorubicin amount conjugated to mPEG-b-PCL copolymer via pH sensitive hydrazone bond.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(2): 279 - 292

**Conclusion:** It was concluded that, MeOH-TFA method was a good method for conjugation of DOX to mPEG-b-PCL copolymer, and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18.3 M) method was better than any other present in literature for determination of the amount of DOX linked to the polymer via hydrazone conjugation.

**Key Words:** Doxorubicin, hydrazine bond, mPEG-b-PCL, trinitrobenzene sulfonic acid, drug conjugation

**Sonuç:** MeOH-TFA yönteminin DOX'un mPEG-b-PCL kopolimerine konjugasyonu için iyi bir yöntem olduğu ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18.3 M) yönteminin hidrazon konjugasyonu yoluyla polimere bağlı DOX miktarının belirlenmesi için literatürde mevcut diğer yöntemlerden daha iyi olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Doksorubisin, hidrazon bağı, mPEG-b-PCL, trinitrobenzen sülfonik asit, ilaç konjugasyonu

## INTRODUCTION

Conjugation of drugs to biocompatible polymers responsive to the tumor microenvironment improves their therapeutical activities (1-4). Cancer cells favor glycolysis rather than oxidative phosphorylation in order to supply the required ATP with a fast-metabolic pathway. This reaction results in hypoxia in and around the tumor, and pH value decreases to 6.5-7.2, 5.0-6.5, and 4.5-5.0 for the tumor microenvironment, endosomes and lysosomes, respectively (5). Therefore, drugs which are conjugated to polymers with pH sensitive linkages as hydrazone, disulfide, azo, acetal, ortho ester, vinyl ether, amine, imine, can be targeted to tumor and be effective in that region (6). Hydrazone conjugation of cancer drugs to the polymers is an attractive technique since it can easily break in acidic media (7). Doxorubicin (DOX), which is an effective cancer drug, can be either entrap into nanoparticles (8) or conjugate to polymers to be targeted to tumour area (9,10). Faster release at pH 5.0 than the release at pH 7.4 was reported for the system having conjugated DOX to N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) copolymers via hydrazone bonds (9). Similarly, when DOX was conjugated to a pentablock copolymer via

hydrazone bonds, the release was reported as 89% at pH 5.0 while it was about 29% at pH 7.4 after 7 days of incubation (10).

Polyethylene glycol (PEG) and polycaprolactone (PCL) are biocompatible polymers and widely used in the production of drug delivery systems and tissue engineering scaffolds (11). However, PCL is highly hydrophobic, its degradation is too slow for drug delivery applications, and it can be recognized by immune system rapidly (12). On the other hand, PEG is hydrophilic and can escape from the immune system. Scientists prepared or used copolymers or tri-block-polymers of PEG and PCL and prepared either nanoparticles or micelles as drug delivery vehicles and evaluated *in vitro* and *in vivo* properties (13). Gong et al studied affinity of PEG-PCL-PEG micelles (14). Hu et al prepared micelles and polymersomes from PCL-PEG-PCL polymers to be used as drug carriers (15). Cytotoxic properties of Doxorubicin loaded PEG-PCL micelles prepared with functionalized PEGs were evaluated by Chen et al. and promising results were reported (16). An accurate determination of drug conjugation is important since higher dose given to a patient may create some unwanted symptoms like cardiomyopathy.

In this study, methoxy poly(ethylene glycol)-b-

polycaprolactone block copolymer (mPEG-b-PCL) was synthesized to form micelles due to hydrophobic-hydrophilic properties of the copolymer. The mPEG-b-PCL copolymer was functionalized with hydrazone bonds by using hydrazine hydrate, and then a chemotherapeutic drug, DOX, was conjugated by using two different media, either dimethyl sulfoxide (DMSO), or methanol-trifluoroacetic acid (MeOH-TFA). The conjugated drug content of the copolymer was determined in two methods by measuring UV-visible absorbances of the solutions: 1) after dissolving the drug-polymer conjugate in chloroform:methanol (Ch:MeOH, 1:1 v/v) solution without considering pH responsiveness of the chemical bond, 2) breaking the pH sensitive bonds in three different acidic media (as hydrochloric acid (0.1 M HCl), concentrated hydrochloric acid (12 M HCl) and concentrated sulfuric acid (18.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)). Ch:MeOH was chosen for the dissolution of the polymer-drug conjugates since chloroform and methanol are solvents for mPEG-b-PCL copolymer and DOX, respectively. Therefore, Ch:MeOH solution was used to compare its effectiveness with the data obtained via breaking the conjugation bonds in acidic media. Results demonstrated that, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method is more effective to break the hydrazone bonds than using 0.1 M or 12 M HCl as given in this study and also compared to the techniques given in the literature. To the best of our knowledge, this is the first study showing the efficiency of conjugation of DOX to mPEG-b-PCL copolymer in MeOH-TFA media and determination of the conjugated amount by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method.

## MATERIAL and METHOD

### Materials

Adriamycin (trade name of DOX) was purchased from Deva Holding (Turkey) as lyophilized powder of 10 mg of Doxorubicin hydrochloride in injection vials.  $\epsilon$ -Caprolactone ( $\epsilon$ -CL) was purchased from Acros Organics (USA). Methoxy poly(ethylene glycol) (mPEG) (Mn=5000 Da), tin(II) 2-ethylhexanoate,

succinic anhydride, dimethylaminopyridine, dicyclohexylcarbodiimide, N-hydroxysuccinimide (NHS), hydrazine hydrate, trinitrobenzene sulfonic acid (TNBSA) (5%), sodium bicarbonate, glycine and DMSO were obtained from Sigma-Aldrich (Germany). Dichloromethane, ethanol, tetrahydrofuran, diethyl ether, chloroform, methanol, TFA, 35% HCl concentrated sulfuric acid were purchased from Merck (Germany).

### Methods

#### Synthesis of mPEG-b-PCL Copolymers

mPEG-b-PCL copolymer was synthesized by ring opening polymerization of PCL according to the method previously carried out by our group (17). Shortly, predetermined amount of  $\epsilon$ -caprolactone was added to a 3-necked flask containing mPEG (Mn = 5000 Da) and tin(II) 2-ethylhexanoate (0.1% of  $\epsilon$ -caprolactone in molar amount). The flask filled with argon gas was sealed, and the reaction was carried out in an oil bath at 120°C for 6 hours. The product obtained was dissolved in dichloromethane, precipitated in cold ethanol and then dried under vacuum at 40°C.

#### Synthesis of mPEG-b-PCL-COOH

mPEG-b-PCL, succinic anhydride and dimethylaminopyridine were dissolved (1:2:0.5 molar ratio) in tetrahydrofuran (50 mL) in a three-neck flask and reacted under N<sub>2</sub> atmosphere for 24 hours at 30°C (10). The product (mPEG-b-PCL-COOH) was precipitated in cold diethyl ether, dried under vacuum and examined by 1H-NMR (by Bruker Avance 400 DPX (USA) working at 400 MHz and using deuterated chloroform) and Fourier Transform Infrared (FT-IR) (by Perkin Elmer Spectrum 65, Perkin Elmer Inc., USA) analyses.

#### Synthesis of mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub>

mPEG-b-PCL-COOH, dicyclohexylcarbodiimide and NHS were dissolved (1:1:1 molar ratio) in tetrahydrofuran (50 mL) and reacted under N<sub>2</sub> atmosphere for 24 hours at 30°C (10). Hydrazine hydrate was then added to this mixture and the

reaction was continued for 12 hours. The product (mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub>) was filtered, precipitated in cold diethyl ether, and the precipitate was dried under vacuum. FT-IR spectrum was recorded (by Perkin Elmer Spectrum 65, Perkin Elmer Inc., USA).

For colorimetric detection of primary amine groups attached to the copolymer, TNBSA method was used. For this purpose, different concentrations of glycine solutions (4 - 20 µg/mL) were prepared in sodium bicarbonate buffer (0.1 M, pH 8.5) to construct a calibration curve. Then, 5% TNBSA was diluted 500-fold with 0.1 M sodium bicarbonate buffer. Then, 1 part of TNBSA solution was mixed with 2 part of glycine solutions having different concentrations (4 - 20 µg/mL; or  $0.53 \times 10^{-7}$  -  $27 \times 10^{-7}$  mol amine/mL). The solutions were incubated at 37°C for 2 hours and absorbances were measured at 335 nm using a plate reader (SpectraMax iD3, Molecular Devices, USA). Meanwhile, 1 mg/mL mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> was suspended in 0.1 M sodium bicarbonate buffer and 1 part of TNBSA was mixed with 2 parts of mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> suspension. The absorbance of the solution was measured at 335 nm and the amount of primary amine was determined using the calibration curve.

#### Conjugation of DOX to mPEG-b-PLC-CO-NH-NH<sub>2</sub>

For conjugation of DOX to hydrazone group, two different methods were used as given below:

**DMSO method:** mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> copolymer and DOX were dissolved (1:1 molar ratio) in DMSO (50 mL) and kept in dark, for 72 hours, under N<sub>2</sub> gas, at 30°C for reaction (9). The product was purified by dialysis (MWCO 3500, Spectrum Laboratories, USA) against deionized water at room temperature for 3 days by changing the water in every 6 hours. DOX conjugated mPEG-b-PLC-CO-NH-NH<sub>2</sub> was obtained after lyophilization. The yield of the synthesis was determined with the equation below;

$$\text{Eq. 1: The yield (\%)} = \frac{\text{Total amount of DOX conjugated polymer}}{\text{The sum of DOX and the polymer used for the synthesis}} \times 100$$

**MeOH-TFA method:** mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> copolymer and DOX were dissolved (1:1 molar ratio) in methanol (15 mL), a drop of TFA was added, left overnight at 60°C (18). After the removal of methanol under vacuum, the residue was suspended in water and dialyzed (MWCO 3500, Spectrum Laboratories, USA) against deionized water at room temperature for 3 days by changing the water in every 6 hours. DOX conjugated mPEG-b-PLC-CO-NH-NH<sub>2</sub> was obtained after lyophilization. The yield of the synthesis was determined with using Eq. 1.

#### Determination of Conjugated DOX Content of the Copolymer

DOX conjugation to the copolymer was characterized with using <sup>1</sup>H-NMR [by Bruker Avance 400 DPX (USA) working at 400 MHz and using deuterated DMSO].

DOX conjugation efficiency was determined by using the following two methods:

**1. Dissolution of the drug-polymer conjugate (Ch:MeOH (1:1) Method):** DOX (10 mg) was dissolved in chloroform:methanol (1:1, v/v) and a calibration curve was constructed (1 - 70 µg DOX / mL) by measuring absorbances at 440 nm with UV-visible spectrophotometer. 10 mg of pristine mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> copolymer (as blank solution) and/or 10 mg of DOX conjugated copolymer were dissolved in 1 mL of Ch:MeOH (1:1, v/v). DOX content of the DOX-copolymer conjugate was calculated by using the following equation;

$$\text{Eq. 2: Conjugated drug content (\mu\text{g}/\text{mg polymer})} = \frac{(\text{Abs of DOX conj poly} - \text{Abs poly}) / X}{10}$$

where; Abs of DOX conj poly = Absorbance of DOX conjugated copolymer,

Abs poly = Absorbance of pristine copolymer.

X = The slope of the calibration curve is 0.014 for Ch:MeOH

10 = Dilution factor (the samples were diluted 10 times before the measurements).

Conjugation efficiencies of the copolymer was calculated with the equation below;

$$\text{Eq. 3: Conjugation efficiency} = \frac{\text{Total conjugated DOX to the polymer}}{\text{DOX content used for the synthesis}} \times 100$$

**2. Breaking the pH sensitive bond in acidic media:** Three different media [HCl (0.1 M), concentrated HCl (12 M) and concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18.3 M)] were used to determine the conjugated DOX content. HCl (0.1 M) was used to compare the results with literature (10). For each, the wavelength having maximum absorbance values was determined, and the calibration curves were prepared accordingly. Pristine copolymer (10 mg) having no drug was also dissolved or dispersed in the mentioned media and used as blank solution (in order to eliminate any effect caused by the polymer). DOX-polymer conjugates (10 mg) were dissolved in the solutions and conjugated drug content of the copolymer was determined spectroscopically by using the following equation;

$$\text{Eq. 4: Conjugated drug content (}\mu\text{g/mg polymer)} = \frac{(\text{Abs of DOX conj poly} - \text{Abs poly}) / X}{10}$$

where; Abs of DOX conj poly = Absorbance of DOX conjugated copolymer,

Abs poly = Absorbance of pristine copolymer.

X = The slope of the calibration curves, which are 0.0211, 0.02 and 0.0415 for HCl (0.1 M), HCl (12 M) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectively.

10 = Dilution factor (the samples were diluted 10 times before the measurements).

Conjugation efficiencies of the copolymer was calculated with using Eq. 3.

The procedures of each method are given below.

**a) HCl (0.1 M and 12 M) method:** DOX (10 mg) was dissolved in 0.1 M HCl or 12 M HCl separately. First, wavelength values where the maximum absorption was observed ( $\lambda$ -max) were determined as 480 nm for 0.1 M HCl and at 504 nm for 12 M HCl media. Then calibration curves were constructed

(using concentrations as 1 - 50  $\mu$ g DOX/mL for 0.1 M HCl and 1-55  $\mu$ g DOX/mL for 12 M HCl) by measuring absorbances at with UV-visible spectrophotometer at determined  $\lambda$ -max (10). Similarly, 10 mg DOX conjugated copolymer was suspended in 5 mL of 0.1 M HCl or in 12 M HCl, separately and probe sonication with 10% amplitude for 5 min was applied. The suspensions were kept at 37°C for 48 hours, copolymers were separated by centrifugation (14000 rpm for 10 min), and the absorbances of the supernatant at 480 nm for 0.1 M HCl and at 504 nm for 12 M HCl were measured by UV-visible spectrophotometer. As blank solution, 10 mg pristine copolymer prepared in the same way in 0.1 M HCl or 12 M HCl was used. The amount of the DOX in the supernatant was calculated from the formula given above.

**b) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18.3 M) method:** DOX was dissolved in concentrated (18.3 M) sulfuric acid. A calibration curve was constructed with different concentrations of the DOX (1 - 40  $\mu$ g/mL) by measuring absorbances at 543 nm with a UV-visible spectrophotometer. 1 mg of DOX conjugated mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> was dissolved in 1 mL of concentrated sulfuric acid. The same amount of pristine copolymer dissolved in 1 mL of concentrated sulfuric acid was used as blank solution and the conjugated DOX content was calculated from the formula given above.

### Statistical Analysis

All data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test.

## RESULTS

### Characterization of mPEG-b-PCL Copolymers

The number average molecular weight (Mn) of the mPEG-b-PCL copolymer synthesized was determined as 16 kDa using <sup>1</sup>H NMR data. This is exactly the same as the value determined by gel permeation chromatography (GPC) for the same polymer synthesized previously (17).

### Characterization of Functionalized mPEG-b-PCL Copolymers

mPEG-b-PCL copolymer was functionalized with succinic anhydride to obtain carboxyl ended mPEG-b-PCL-COOH copolymer so that hydrazine hydrate can bind to the copolymer via peptide bond. Then further functionalization was achieved with hydrazine hydrate to obtain mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> (Figure 1).

<sup>1</sup>H NMR spectrum of mPEG-b-PCL-COOH copolymer was obtained (Figure 2). The peak at 2.64 shows the -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- group from succinic anhydride (10). The peaks at 1.36-1.43 ppm (multiplet), 1.56-1.70 ppm (multiplet), 2.31 ppm (triplet), 4.06 ppm (triplet) and 4.23 ppm (triplet) belong to the methylene protons of PCL block in the copolymer. The peak at 3.65 ppm (triplet) was assigned to the methylene protons of mPEG block in the copolymer (16).

FT-IR spectra of mPEG-b-PCL, mPEG-b-PCL-COOH and mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> polymers are given in Figure 3. The absorbance peaks observed at 3443 cm<sup>-1</sup> belong to the stretching vibrations of -NH<sub>2</sub> bonds (10); peaks at 2866 cm<sup>-1</sup> and 2945 cm<sup>-1</sup> are belong to C-H stretching vibrations. The absorbance peaks at 1722 cm<sup>-1</sup> was evaluated as C=O stretching vibrations of PCL unit, and the peak at 1103 cm<sup>-1</sup> was ascribed to C-O stretching vibrations of mPEG unit in the copolymer (16).

Hydrazide functionalization in the mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> copolymer was determined by colorimetric primary amine detection assay. The hydrazide amount in mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> polymer was calculated as 45.6 mol% (100 mol polymer contains 45.6 mol of -NH<sub>2</sub> group defined as hydrazide group) from the calibration curve (Figure 1).

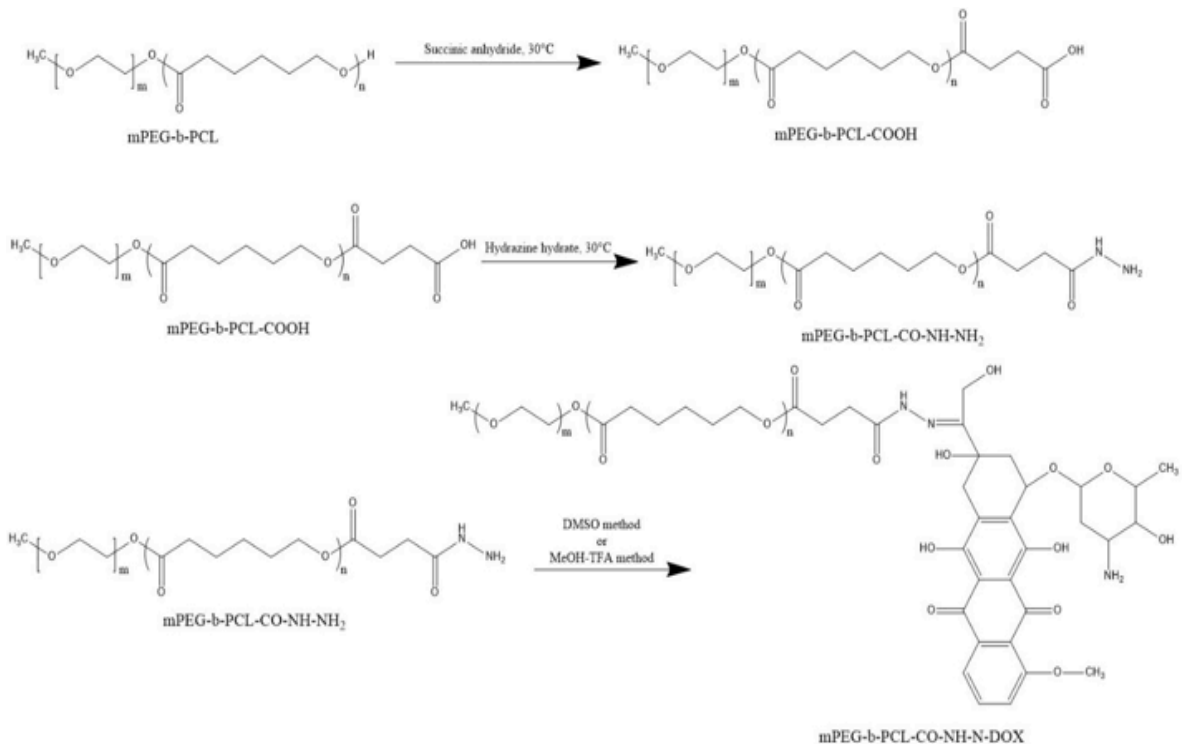


Figure 1. Reaction scheme for hydrazide functionalization of mPEG-b-PCL copolymer and conjugation of DOX

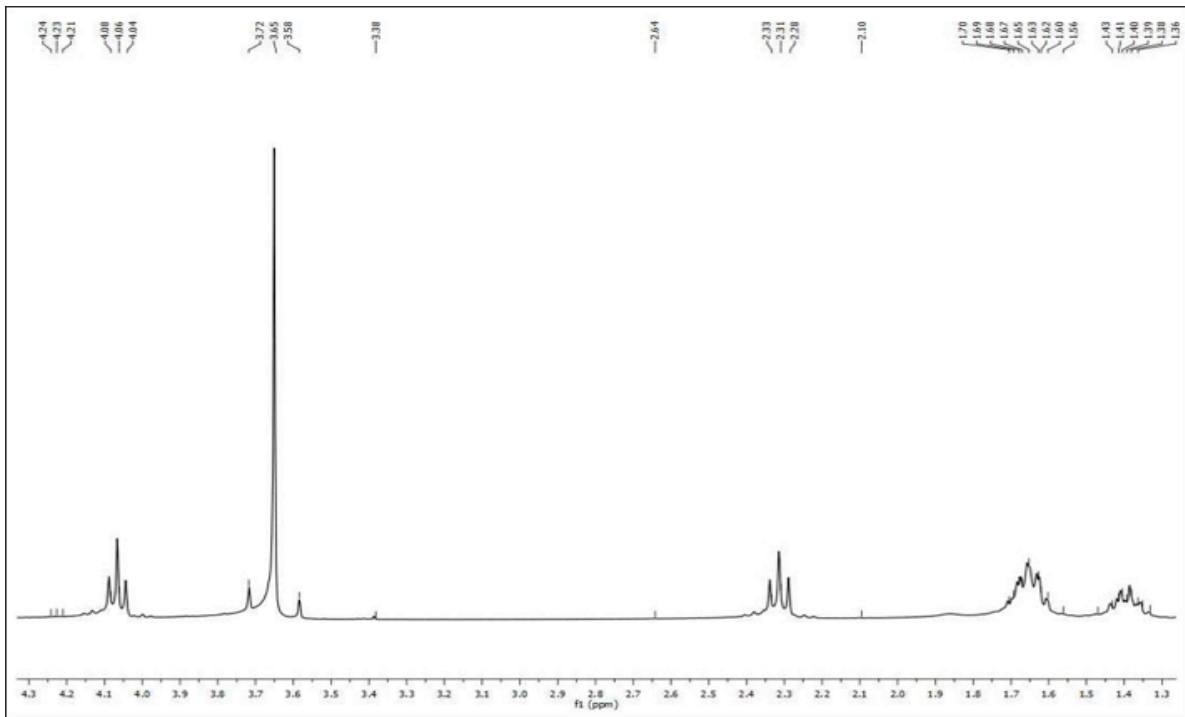


Figure 2.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of mPEG-b-PCL-COOH in  $\text{CDCl}_3$

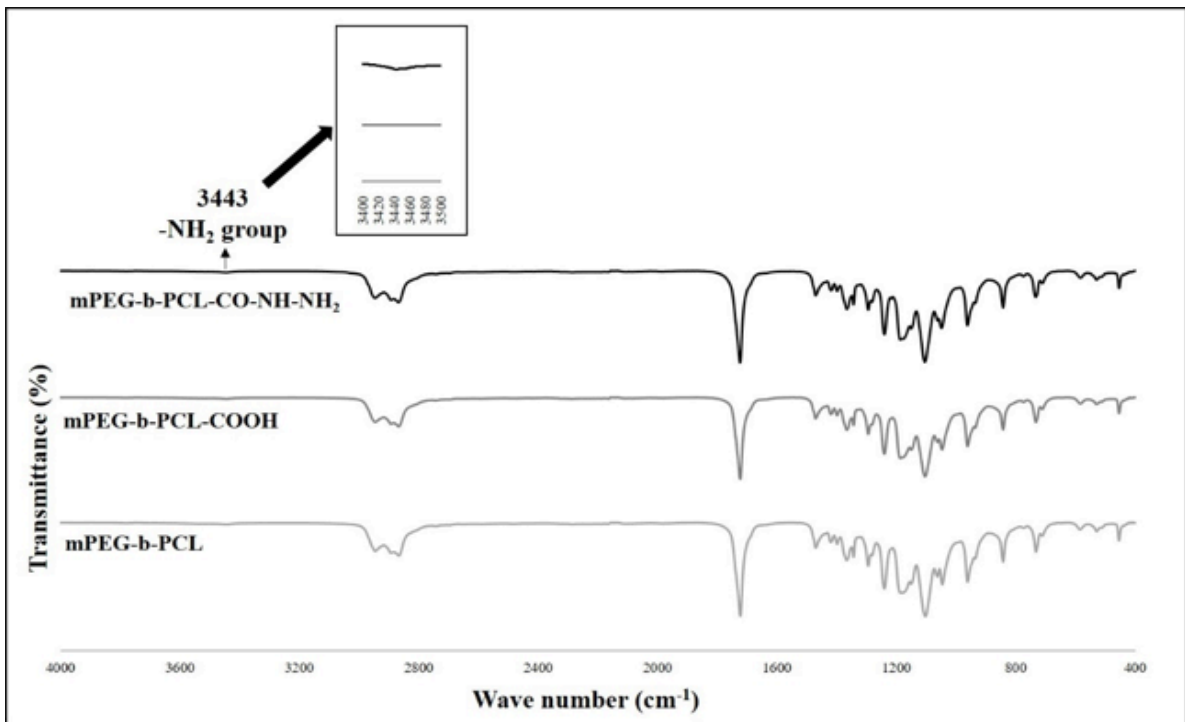
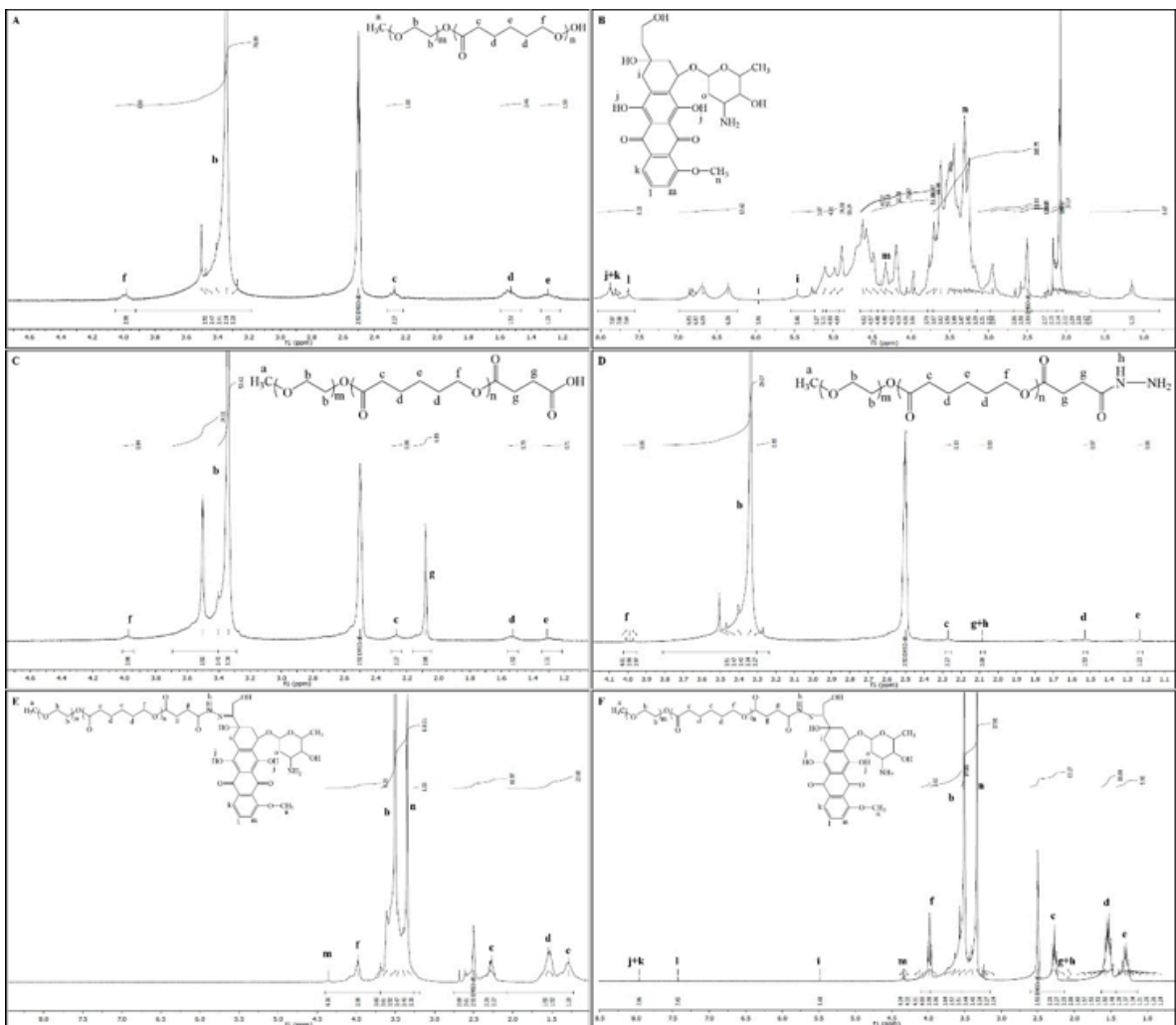


Figure 3. FT-IR spectra of mPEG-b-PCL, mPEG-b-PCL-COOH, mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub>.

### Determination of Conjugated DOX Content of the Copolymer

DOX conjugation was verified using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy (Figure 4) and results showed that hydrazide functionalization of mPEG-b-PCL copolymer was achieved successfully (19-22).  $^1\text{H}$  NMR results also showed that MeOH-TFA method (Figure 4F) was more efficient than DMSO method since the yield for DOX conjugated polymer synthesis was higher

in MeOH-TFA method (%92.1) than DMSO method (%78.9 (Figure 4E and 4F)). In  $^1\text{H}$  NMR spectrum of DOX conjugated copolymer which was prepared with DMSO method, some impurities which can come from the DOX we used were observed. The DOX we used contains methyl paraben and lactose monohydrate as excipients. Some peaks in the NMR spectra could not be detected due to these impurities.



**Figure 4.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of A) mPEG-b-PCL in  $\text{CDCl}_3$ , B) DOX in  $\text{CDCl}_3$ , C) mPEG-b-PCL-COOH in  $\text{CDCl}_3$ , D) mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> in  $\text{CDCl}_3$ , E) mPEG-b-PCL-CO-NH-N-DOX with DMSO method in  $\text{DMSO-d}_6$ , and F) mPEG-b-PCL-CO-NH-N-DOX with MeOH-TFA method in  $\text{DMSO-d}_6$ .



DOX was conjugated to mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub> copolymer either in DMSO or in MeOH-TFA solutions, and the DOX contents of the DOX-copolymer conjugate were measured spectroscopically with two different methods: 1. dissolution of the polymer-drug conjugates in Ch:MeOH (1:1) and 2. breaking the pH sensitive bonds between the polymer and the drug using three different acidic media [HCl (0.1 M), HCl (12 M) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18.3 M)]. The results demonstrated that, MeOH-TFA was better than the DMSO, since the amount of DOX conjugation was found to be higher in this media. Meanwhile, when two methods were compared, the results obtained for Ch:MeOH (1:1) and HCl (0.1 M) in DMSO media did not show any significant difference (Table 1 and Table 2). On the other hand, when the medium was changed to MeOH:TFA, a significant difference between Ch:MeOH (1:1) and HCl (0.1 M) was observed. Therefore, using acidic media to determine the conjugation content

and conjugation efficiency resulted in higher amount conjugated. In the second method, acidity of the media was changed to compare the conjugation efficiencies and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18.3 M) method resulted in higher DOX amount than the ones obtained for HCl (0.1 M) and HCl (12 M) methods (Table 1 and Table 2).

In Ch:MeOH (1:1, v/v) method, the conjugated DOX contents of the copolymer using DMSO and MeOH-TFA media were found as 1.91 ± 0.01 and 4.15 ± 0.03 µg DOX/mg polymer, respectively, and these values were lower than the other methods. In case of HCl (0.1 M) method, the conjugated DOX contents were found as 2.08 µg ± 0.05 and 6.45 ± 0.10 µg DOX/mg polymer, for the samples prepared by DMSO and MeOH-TFA methods, respectively. In HCl (0.1 M) and HCl (12 M) methods, the polymer obtained after centrifugation was still pink in color (Figure 7) which shows the presence of DOX which still stays in conjugated form in the polymer.

**Table 1.** DOX conjugation content on copolymer synthesized.

Conjugation Media*	Conjugation contents (µg DOX/mg polymer)*			
	Ch:MeOH (1:1) Method	HCl (0.1 M) Method	HCl (12 M) Method	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (18.3 M) Method
DMSO, at 30 °C	1.91 ± 0.01	2.08 ± 0.05	3.24 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.93 ± 0.12 <sup>a</sup>
MeOH-TFA, at 60 °C	4.15 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.45 ± 0.10 <sup>b</sup>	7.99 ± 0.05 <sup>b</sup>	12.87 ± 0.07 <sup>b</sup>

\* n=3,

<sup>a</sup>shows the significant differences between conjugation content of DMSO media,

<sup>b</sup> shows the significant differences between conjugation content methods of MeOH-TFA media.

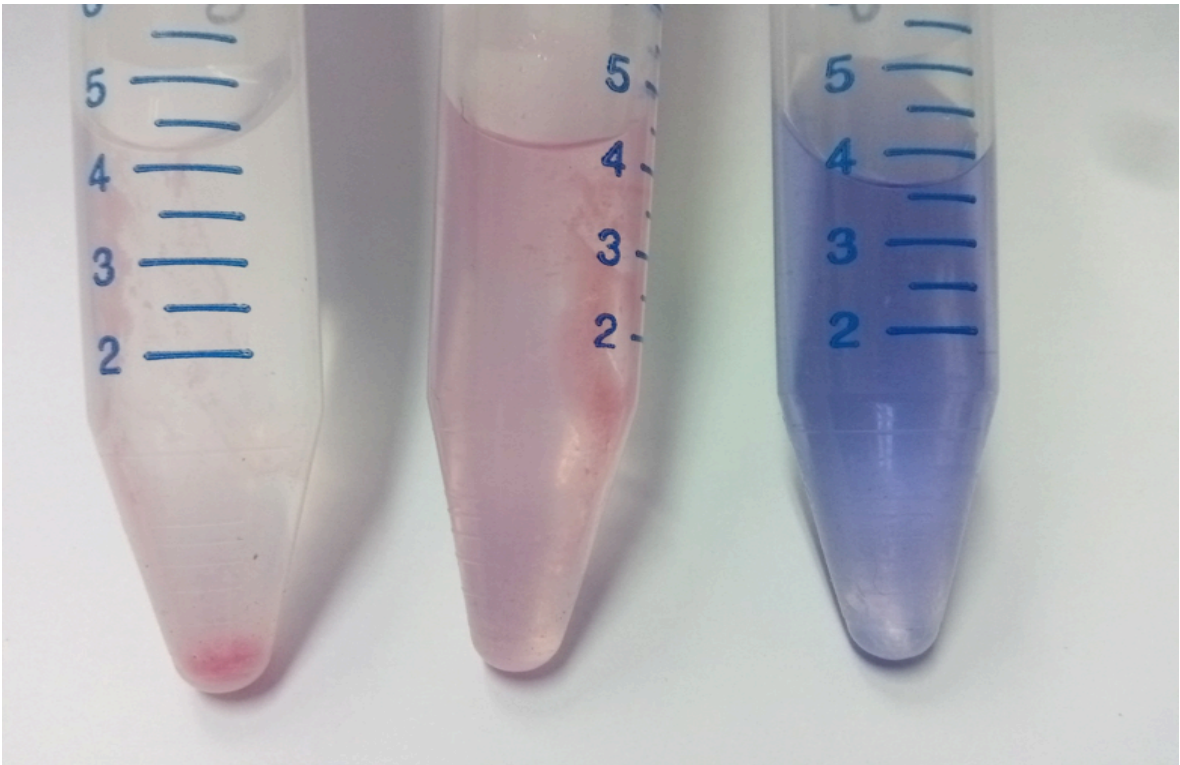
**Table 2.** DOX conjugation efficiencies.

Conjugation Media*	Conjugation efficiencies found with different methods (%)*			
	Ch:MeOH (1:1)	HCl (0.1 M)	HCl (12 M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (18.3 M)
DMSO, at 30 °C	4.59 ± 0.03	5.00 ± 0.13	7.77 ± 0.33 <sup>a</sup>	9.44 ± 0.29 <sup>a</sup>
MeOH-TFA, at 60 °C	11.61 ± 0.09 <sup>b</sup>	18.05 ± 0.27 <sup>b</sup>	22.36 ± 0.14 <sup>b</sup>	36.04 ± 0.20 <sup>b</sup>

\* n=3,

<sup>a</sup> shows the significant differences between conjugation content of DMSO media,

<sup>b</sup> shows the significant differences between conjugation content methods of MeOH-TFA media.



**Figure 7.** Image of DOX conjugated polymers in, a) 0.1 M HCl, b) 12 M HCl, and c) 18.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. DOX conjugated polymers that are not dissolved in 0.1 N HCl and 12 M HCl are shown with arrows. Polymer dissolved completely in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## DISCUSSION and CONCLUSION

The solvent choice is an important role in determination of drug conjugation efficiency since hydrazone bond is cleaved at acidic pH. In the current study, we compared two different methods to find the most efficient medium to determine the conjugated drug content: 1. dissolution of the drug-polymer conjugates, and 2. breaking the pH sensitive bond in acidic media. For this purpose, DOX conjugation efficiencies were obtained with two different methods, the polymer-drug conjugates were subjected to Ch:MeOH (1:1) for the first method and to 0.1 M HCl, 12 M HCl and 18.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> separately

to break linkages between the polymer and the drug. 0.1 M HCl was used as a control to compare the results with the literature. The higher bond cleavage efficiency was obtained with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> since the molarity of sulphuric acid was higher than that of HCl.

The hydrazide yield can vary depending on polymer and the crosslinker used. For example, Etrych et al. (9,23) used N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) copolymers and hydrazide amount was determined as 8.2 mol% and 5.6 mol% in their polymer in two different studies while del Rosario et al. (24) used amphiphilic macromolecule and quantified the hydrazide amount as 63%.

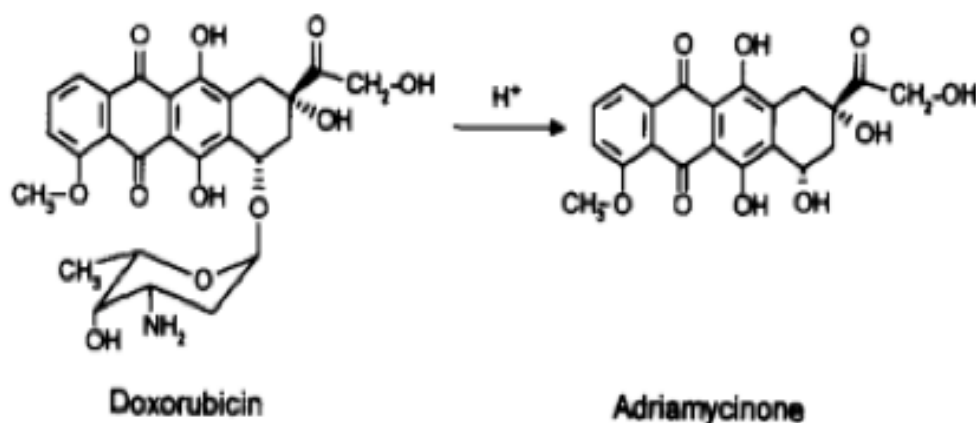


Figure 5. Acid hydrolysis of doxorubicin (25).

DOX.HCl has a characteristic absorbance peak at 480 nm. However, the maximum absorbance wavelength ( $\lambda_{max}$ ) was observed at 504 nm when the calibration curve was prepared using concentrated acid (12 M HCl). It is possible that DOX might have different conformational forms depending on the acidity of the medium, or some by-products of DOX might be formed in very high acidic medium, which might cause peak shifting (480 nm to 504 nm) in the absorption of DOX in UV-visible radiation. Dox conjugation content and conjugation efficiency were measured highest in  $H_2SO_4$ . It is highly possible that DOX can degrade in  $H_2SO_4$  but calibration curve of free DOX in  $H_2SO_4$  shows that  $R^2$  is 0.9936 which means that even if the DOX is degraded in  $H_2SO_4$  we can still measure it. Thus, we assumed that degradation products of DOX gave max absorption at 543 nm. It is known that DOX is not stable in solutions with a pH less than 3; DOX breaks up into a red-colored, water insoluble aglycone (adriamycinone) (Figure 5) and a water soluble, reducing amino sugar (daunosamine) (25). For example, treatment of DOX with mild acids (e.g. 1 N HCl) selectively cleaves the glycosidic bond between the aglycone and the sugar group components. Thus, quantification of conjugated

DOX after mild acid hydrolysis is based on released adriamycinone component (26).

According to the statistical analysis, for DMSO method, there was no significant difference between Ch:MeOH (1:1, v/v) method and HCl (0.1 M) method, while 12 M HCl and  $H_2SO_4$  (18.3 M) methods were significantly different from the others. The statistical analysis was also showed that  $H_2SO_4$  (18.3 M) method was also significantly different from 12 M HCl method. The statistical analysis also showed that, for MeOH-TFA method, all conjugated drug contents obtained with the four methods were significantly different from each other. These statistical results proved that, MeOH-TFA method is preferable for DOX conjugation to the copolymer and concentrated sulfuric acid is in determination of the conjugated drug content.

In literature, there are studies using UV-spectrophotometer (at 488 nm) for determination of conjugated DOX content to hydrazide groups. Etrych et al. (9,23) used N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide polymer to conjugate DOX via hydrazone bond, and reported 12 wt%, and 9 wt% conjugation contents in two different studies. The reported values are lower than the ones we found in our study. That might be because of the use of different polymers.

In conclusion; in this study, a functional copolymer having hydrazine end groups (mPEG-b-PCL-CO-NH-NH<sub>2</sub>) was synthesized, and DOX was linked via acid sensitive hydrazone conjugation with application of two different media mentioned as DMSO or MeOH-TFA methods. Conjugated drug contents of the copolymer were determined as 1.91 to 12.87 µg DOX/mg polymer and was found to be higher for MeOH-TFA compared to DMSO method.

Two different methods were applied to determine the amount of DOX: 1. dissolution the polymer-drug conjugates in MeOH and 2. breaking the pH sensitive

bonds in acidic media. Conjugated DOX contents of the copolymer were found to be higher when H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18.3 M) method was applied. This method was applied the first time in this study and found to be more effective than the ones present in the literature and achieved in this study such as Ch:MeOH (1:1, 1/1), HCl (0.1 M) and HCl (12 M) methods. The results suggest that acidic strength of the solution plays an important role in the determination of conjugated drug contents bound via hydrazone linkages, and the use of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> is suggested as a new and efficient method for this purpose.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge BIOMATEN Center of Excellence in Biomaterials and Tissue Engineering and Central Laboratory of Middle East Technical University.

## FUNDING

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Middle East Technical University [DKT-310-2018-3580].

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\*This study does not require Ethics Committee Approval.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Pasut G, Scaramuzza S, Schiavon O, Mendichi R, Veronese FM. PEG-epirubicin conjugates with high drug loading. *J Bioact Compat Polym*, 2005; 20 (3): 213-30. doi:10.1177/0883911505053377.
2. Bagherifam S, Skjeldal FM, Griffiths G, Mælandsmo GM, Engebråten O, Nyström B, et al. pH-responsive nano carriers for doxorubicin delivery. *Pharm Res*, 2015; 32: 1249-63. doi: 10.1007/s11095-014-1530-0.
3. Kavand A, Anton N, Vandamme T, Serra CA, Seng DC. Synthesis and functionalization of hyperbranched polymers for targeted drug delivery. *J Control Release*. 2020; 321: 285-311. doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.019.
4. Malikmammadov E, Hasirci N. Dual- and Multistimuli-Responsive Polymers for Biomedical Applications. In: Aguilar MR, Román JS, eds. *Smart Polym their Appl*. Second Edi. Woodhead Elsevier Ltd, 2019; 255-78. doi.org/10.1016/B978-0-08-102416-4.00008-9.
5. Li Y, Yang HY, Thambi T, Park JH, Lee DS. Charge-convertible polymers for improved tumor targeting and enhanced therapy. *Biomaterials*, 2019; 217: 119299. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119299.
6. Chang M, Zhang F, Wei. Smart linkers in polymer-drug conjugates for tumor-targeted delivery. *J Drug Target*, 2016; 24: 475-91. doi: 10.3109/1061186X.2015.1108324.
7. Faal MM, Jafari A, Mirhadi E, Askarizadeh E, Golichenari B, Hadizadeh F, et al. Endogenous stimuli-responsive linkers in nanoliposomal systems for cancer drug targeting. *Int J Pharm*, 2019; 572: 118716. doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118716.
8. Sahin A, Eke G, Buyuksungur A, Hasirci N, Hasirci V. Nuclear targeting peptide-modified, DOX-loaded, PHBV nanoparticles enhance drug efficacy by targeting to Saos-2 cell nuclear membranes, *J Biomater Sci, Polym Ed*, 2018, 29, 507-19. doi.org/10.1080/09205063.2018.1423812.
9. Etrych T, Subr V, Laga R, Rihova B, Ulbrich K. Polymer conjugates of doxorubicin bound through an amide and hydrazone bond: Impact of the carrier structure onto synergistic action in the treatment of solid tumours. *Eur J Pharm Sci*, 2014; 58: 1-12. doi: 10.1016/j.ejps.2014.02.016.
10. Lale SV, Kumar A, Naz F, Bharti AC, Koul V. Multifunctional ATRP based pH responsive polymeric nanoparticles for improved doxorubicin chemotherapy in breast cancer by proton sponge effect/endo-lysosomal escape. *Polym Chem*, 2015; 6: 2115-132. doi.org/10.1039/c4py01698j.
11. Xiong W, Peng L, Chen H, Li Q. Surface modification of MPEG-b-PCL-based nanoparticles via oxidative self-polymerization of dopamine for malignant melanoma therapy. *Int J Nanomedicine*. 2015;10: 2985-96. doi: 10.2147/IJN.S79605.
12. Mariani E, Lisignoli G, Borzì RM, Pulsatelli L. Biomaterials: Foreign bodies or tuners for the immune response? *Int J Mol Sci*, 2019; 20: 636. doi: 10.3390/ijms20030636.
13. Öz UC, Bozkır A. Polimerik veziküller ve biyolojik uygulamaları. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2018; 75(4): 443-58. doi:10.5505/TurkHijyen.2018.87369.
14. Gong CY, Wang YJ, Wang XH, Wei XW, Wu Q, Wang B, et al. Biodegradable self-assembled PEG-PCL-PEG micelles for hydrophobic drug delivery, part 2: In vitro and in vivo toxicity evaluation. *J Nanoparticle Res*, 2011; 13: 721-31. doi:10.1007/s11051-010-0071-7.
15. Hu C, Chen Z, Wu S, Han Y, Wang H, Sun H, et al. Micelle or polymersome formation by PCL-PEG-PCL copolymers as drug delivery systems. *Chinese Chem Lett*, 2017; 28: 1905-9. doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.07.020.
16. Chen Y, Zhang YX, Wu ZF, Peng XY, Su T, Cao J, et al. Biodegradable poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) polymeric micelles with different tailored topological amphiphilicities for doxorubicin (DOX) drug delivery. *RSC Adv*, 2016; 6: 58160-72. doi.org/10.1039/C6RA06040D.

17. Isik G, Hasirci N, Tezcaner A, Kiziltay A. Multifunctional periodontal membrane for treatment and regeneration purposes. *J Bioact Compat Polym*, 2020; 35: 117-38. doi.org/10.1177/0883911520911659.
18. Wang F, Wang YC, Dou S, Xiong MH, Sun TM, Wang J. Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. *ACS Nano*, 2011; 5: 3679-92. doi.org/10.1021/nn200007z.
19. Ye WL, Zhao YP, Li HQ, Na R, Li F, Mei Q, et al. Doxorubicin-poly (ethylene glycol)-alendronate self-assembled micelles for targeted therapy of bone metastatic cancer. *Sci Rep*, 2015; 5: 14614. doi: 10.1038/srep14614 .
20. Guo X, Shi C, Wang J, Di S, Zhou S. pH-triggered intracellular release from actively targeting polymer micelles. *Biomaterials*, 2013; 34: 4544-54. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.071.
21. Gatti S, Agostini A, Palmiero UC, Colombo C, Peviani M, Biffi A, et al. Hydrazone linked doxorubicin-PLA prodrug nanoparticles with high drug loading. *Nanotechnology*, 2018; 29: 305602. doi: 10.1088/1361-6528/aac0d3.
22. Song H, Wang R, Xiao H, Cai H, Zhang W, Xie Z, et al. A cross-linked polymeric micellar delivery system for cisplatin(IV) complex. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013; 83: 63-75. doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.09.004.
23. Etrych T, Jelínková M, Rihova B, Ulbrich K. New HEMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties. *J Control Release*, 2001; 73: 89-102. doi: 10.1016/s0168-3659(01)00281-4.
24. del Rosario LS, Demirdirek B, Harmon A, Orban D, Uhrich KE. Micellar nanocarriers assembled from doxorubicin-conjugated amphiphilic macromolecules (DOX-AM). *Macromol Biosci*, 2010; 10: 415-23. doi: 10.1002/mabi.200900335.
25. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 31703, Doxorubicin. Retrieved May 24, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin>
26. Configliacchi E, Razzano G, Rizzo V, Vigevani A. HPLC methods for the determination of bound and free doxorubicin, and of bound and free galactosamine, in methacrylamide polymer-drug conjugates. *J Pharm Biomed Anal*, 1996; 15: 123-29. doi: 10.1016/0731-7085(96)01825-0.

# The antiproliferative and cytotoxic effects of curcumin on human cervical cancer Hep2C cell line

## Kurkuminin insan servikal kanseri Hep2C hücre hattı üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkileri

Filiz SUSUZ ALANYALI<sup>1</sup> (ID), Mehmet ALKAN<sup>2</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** In this study, antiproliferative and cytotoxic effects of different concentrations of curcumin on cervical cancer Hep2C cells were investigated with microscopic methods and MTT assay.

**Methods:** Hep2C (human carcinoma cancer cell line, ATCC:CCL-23) cells were cultured. For cytotoxicity evaluation Hep2C cells exposed to curcumin at different concentrations of 30 µg/ml, 15 µg/ml, 7.5 µg/ml, 3.7 µg/ml, 1.9 µg/ml, 0.9 µg/ml, 0.45 µg/ml for 24 hours. These Hep2C cells are evaluated with MTT assay. The IC<sub>50</sub> value of the agent for 24 h of exposure was detected. The graph of the absorbance data obtained by the Spectramax I3 device. Viability values of Hep2C cells calculated from the absorbances obtained from MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay are gained. The preparations were observed based on changes in nuclei and structures using an inverted microscope (Leica Microsystems). Nontreated cells were used as negative control and for positive control Hep2C cells were exposed to ammonium molybdate (1mg/ml) for the above given incubation period.

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, kurkuminin servikal kanser hücresi Hep2C üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkisi mikroskopik yöntemlerle ve MTT testi aracılığı ile araştırılmıştır.

**Yöntem:** Hücre kültüründe çoğaltılan Hep2C (insan karsinoma kanser hücre hattı, ATCC:CCL-23) hücreleri, farklı kurkumin konsantrasyonlarına; 30 µg/ml, 15 µg/ml, 7,5 µg/ml, 3,7 µg/ml, 1,9 µg/ml, 0,9 µg/ml, 0,45 µg/ml, 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Bu hücreler MTT protokolü uygulanarak test edilmiştir. 24 saatlik maruz bırakılmadan sonra Spectramax I3 cihazıyla absorbans değerlerine dayalı grafik ve IC<sub>50</sub> değeri elde edilmiştir. MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür) testine dayalı olarak Hep2C hücrelerinin canlılık oranları tespit edilmiştir. Bu hücrelerdeki çekirdek ve yapısal değişiklikler inverted mikroskopla gözlemlenmiştir (Leica Microsystems). İşlem görmemiş hücreler negatif kontrol olarak kullanılmış ve pozitif kontrol için Hep2C hücreleri, yukarıda verilen inkübasyon süresi boyunca amonyum molibdata (1 mg/ml) maruz bırakılmıştır.

<sup>1</sup>Eskişehir Technical University, Faculty of Science, Department of Biology, Eskişehir  
<sup>2</sup>Turkish Medicines and Medical Devices Agency, Turkish Ministry of Health, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Filiz SUSUZ ALANYALI

Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 26470, Eskişehir - Türkiye  
E-posta / E-mail : fsusuz@eskisehir.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 18.11.2021  
Kabul Tarihi / Accepted : 10.05.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.47154

Susuz Alanyalı F, Alkan M. The antiproliferative and cytotoxic effects of curcumin on human cervical cancer Hep2C cell line. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(2): 293 - 300

**Results:** High doses of curcumin (30 µg/ml, 15 µg/ml, 7.5 µg/ml) showed high antiproliferative and cytotoxic effects on Hep2C cells. The antiproliferative and cytotoxic effects were not observed on cervical cancer Hep2C cells treated with lower concentrations of curcumin.

**Conclusion:** Curcumin has been shown that it is non-toxic, can be used as a highly antioxidant and anti-inflammatory agent and has multifaced therapeutic-pharmacological effects. However, researches on the antiproliferative, anti-cancer effects of curcumin in cervical cancer cells is not sufficient. The present study evaluates the antiproliferative and cytotoxic effects of curcumin on human cervical cancer Hep2C cells as the first time. The results of our study support these effects of curcumin on Hep2C cells in a concentration-dependent manner.

**Key Words:** Cancer, curcumin, MTT assay, cytotoxic effect, cell culture

**Bulgular:** Yüksek dozlarda kurkumin (30 µg/ml, 15 µg/ml, 7,5 µg/ml) Hep2C hücrelerinde yüksek oranda antiproliferatif ve sitotoksik etki göstermiştir. Daha düşük konsantrasyonda kurkumin uygulanan Hep2C servikal kanser hücre hattında antiproliferatif ve sitotoksik etki gözlenmemiştir.

**Sonuç:** Kurkuminin toksik olmadığı, yüksek oranda antioksidan ve antiinflamatuvar ajan olarak kullanılabileceği ve çok yönlü terapötik- farmakolojik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak kurkuminin servikal kanser dokusundaki antiproliferatif, anti kanser etkileri konusundaki araştırmalar yeterli düzeyde değildir. Bu çalışmada kurkuminin ilk kez, servikal kanser hücresi Hep2C üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkisi mikroskopik yöntemlerle ve MTT testi aracılığı ile araştırılmıştır. Çalışmamızın sonuçları ile Hep2C hücrelerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkilerin konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği ortaya konulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, kurkumin, MTT testi, sitotoksik etki, hücre kültürü

## INTRODUCTION

Cancer is a group of diseases caused by the accumulation of successive genetic and epigenetic alterations resulting in apoptosis resistance, uncontrolled cell proliferation, induced metastasis, angiogenesis, and dysfunction of the immune system (1, 2). Cancers arise by an evolutionary process as somatic cells mutate and escape the restraints that normally rein in their untoward expansion. Consequently, multiple mechanisms have arisen to forestall uncontrolled cell division. Some of these are devices within the cell, such as those that limit cell-cycle progression, whereas others are social signals

that prompt a cell to remain within its supportive microenvironment (3).

Several strategies have been developed in recent years to combat cancer evasion, which includes surgery, chemotherapy, hormonal therapy and radiation therapy. The type of treatment to be used depends on the location, type, and progression of cancer as well as on the patient's health (4). Recent studies suggest the use of a few "adjuvants" in combination with chemotherapy to reduce the adverse effects and drug resistance and to increase the effective targeting of cancerous cells. Natural compounds, that are obtained from plants, are capable of garnering considerable attention from the



scientific community, primarily due to their ability to check and prevent the onset and progress of cancer (5).

Amongst the wide range of the medical herbs Curcumin is a yellow spice derived from the rhizomes of *Curcuma longa* commonly known as turmeric. It is a short-stemmed perennial that grows to about 100 cm in height (4). Curcumin belongs to a chemical class of polyphenols with a chemical formula of  $C_{21}H_{20}O_6$  and a molecular weight of 368.38 (6). Curcumin has been used as a traditional medicine to treat a spectrum of diseases like rheumatism, body ache, skin diseases, intestinal worms, diarrhea, intermittent fevers, hepatic disorders, biliousness, inflammations, constipation, leukoderma, amenorrhea, arthritis, colitis and hepatitis (3, 7-9).

Many recent studies conducted by major research groups around world suggest the use of curcumin as a chemopreventive adjuvant molecule to maximize and the desired effects and minimize side effects of chemotherapeutic drugs. These studies have been shown that curcumin inhibits tumor growth by inhibiting cell cycle progression or by inducing apoptosis; by inhibiting angiogenesis, the expression of antiapoptotic proteins, multiple cell survival signaling pathways and their cross-communication; and by modulating immune responses (3, 10, 11). Several studies were conducted to explore the anti-cancer properties of curcumin and it was shown that curcumin modulates multiple cell signaling pathways which include cell proliferation, cell survival, apoptosis or cell death, as well as controls tumor suppressor pathway death receptor pathway, mitochondrial pathways, and protein kinase pathway, thereby affecting tumor cell growth (3, 10-12). Curcumin induces the initiation of both p53-dependent and p53-independent G2/M phase cell cycle arrest, thereby restricting cell proliferation and tumor progression. Therefore, curcumin is used either alone or in combination in targeting various types of cancers such as multiple myelomas, pancreatic, lung, breast, oral, prostate, and colorectal cancers, and

head neck squamous cell carcinoma (4, 10-15).

In this study, antiproliferative and cytotoxic effects of different concentrations of commercial *Curcuma longa* extract (Neptun, Turkey) on cervical cancer Hep2C cell line were investigated with microscopic methods and MTT assay.

## MATERIAL and METHOD

### Materials

*Curcuma longa* extract commercial product purchased from Neptun, Turkey. Penicillin-streptomycin, dimethyl sulfoxide (DMSO), and MTT were obtained from Sigma-Aldrich (USA). Hep2C were used.

### Cell culture

Hep2C cells were cultured in MEM (Minimum Essential Medium) (Gibco, USA) containing 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Gemini Byproducts, Calabasas, CA), 2 mM L-glutamine and 1% penicillin and streptomycin. Cells were maintained in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. For continuity of the proliferated cells, the medium in the culture flasks was replaced with fresh MEM every third day. Confluent cells on the bottom of the culture flasks were washed with phosphate buffered saline (PBS) and harvested by treatment with trypsin solution (0.25% trypsin, 1 mM EDTA) for 3 min at 37 °C. For neutralizing the effect of trypsin, 2 mL of fresh culture medium was added before the mixture was centrifuged at 1200 rpm at room temperature. The pellets were resuspended with fresh MEM and reseeded in sterile culture flasks in a laminar flow cabinet. Subcultures were then incubated at 37 °C.

Nontreated cells were used as negative control and for positive control Hep2C cells were exposed to ammonium molybdate (1mg/ml) for the above given incubation period.

### Cytotoxicity test (MTT assay)

For cytotoxicity evaluation, curcumin was dissolved in DMSO (14mM). Further dilutions were made with fresh MEM. Hep2C cells were harvested by

trypsinization and were plated at  $10^5$  cell/mL/ well into 96-well plates and were exposed to curcumin at concentrations of 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 3.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24 h. After incubation at 37 °C in a 5%  $\text{CO}_2$  humidified incubator, 20  $\mu\text{L}$ /well of MTT solution (5 mg/mL in distilled water) was added and the plates were incubated for 3 h at 37 °C. The medium in each well was removed and changed with 100  $\mu\text{L}$  of isopropanol. After mixing at room temperature, the plates were read with Spectramax I3 at 570 nm wavelength ( $n = 3$ ). The graph of the absorbance data obtained by the PLA 2.0 application of Spectramax I3 device are presented in results. Each experimental and control group was repeated in triplicate. The percentage of viability was calculated by the following formula:

$$\text{Cell proliferation (\%)} = [\text{OD sample}] \times 100 / [\text{OD control}],$$

where OD is optical density.

#### Evaluation via inverted microscopy

Hep2C cells were plated onto sterilized coverslips in a petri dish and exposed to the different concentrations of curcumin, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 3.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.45  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24 h at 37 °C. After 24 h, the cells were washed in PBS. The preparations were

observed based on changes in nuclei and structures using a inverted microscope (Leica Microsystems).

#### Statistical analysis

Statistical analyzes were performed by one-way analysis of variance for multiple comparisons of the GraphPad Prism 6.0. Significances of  $p < 0.05$  level were taken in consideration.

## RESULTS

#### Cytotoxicity of curcumin on Hep2C cells

Hep2C cells were exposed to curcumin at concentrations of 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 3.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24 h. According to the cytotoxicity test results, curcumin inhibited cell viability in a concentration-dependent manner. At the concentrations of 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 3.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , the viability of Hep2C cells was decreased at statistically significant level ( $p < 0.05$ ). The  $\text{IC}_{50}$  value of the agent for 24 h of exposure was detected as 4.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Cell viability percentage decreased as the applied concentration increased. The sharpest decrease was detected at the highest concentration (Figure 1). Viability values of Hep2C cells calculated from the absorbances obtained from MTT assay are presented in Table 1.

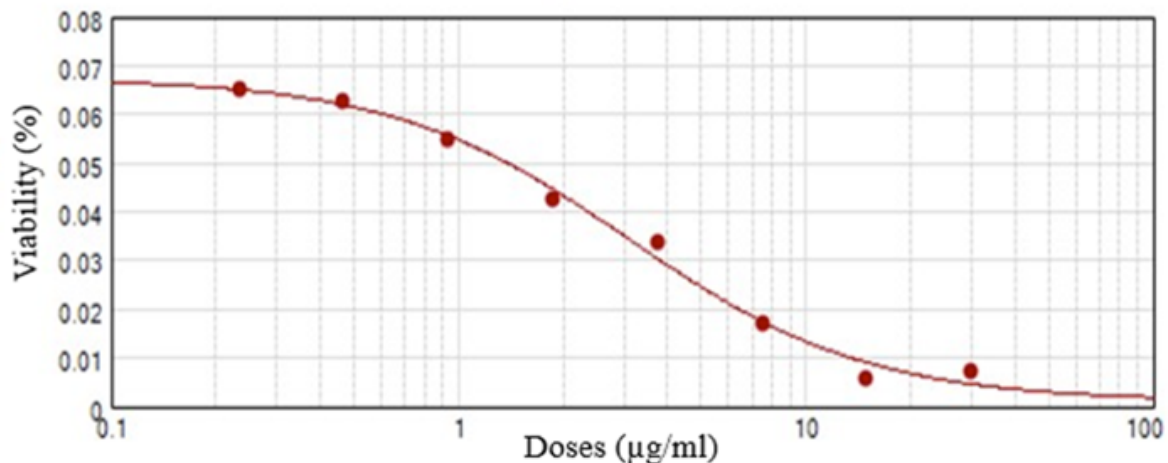


Figure 1. Antiproliferative activity of Curcumin on Hep2C cells for 24 hours.

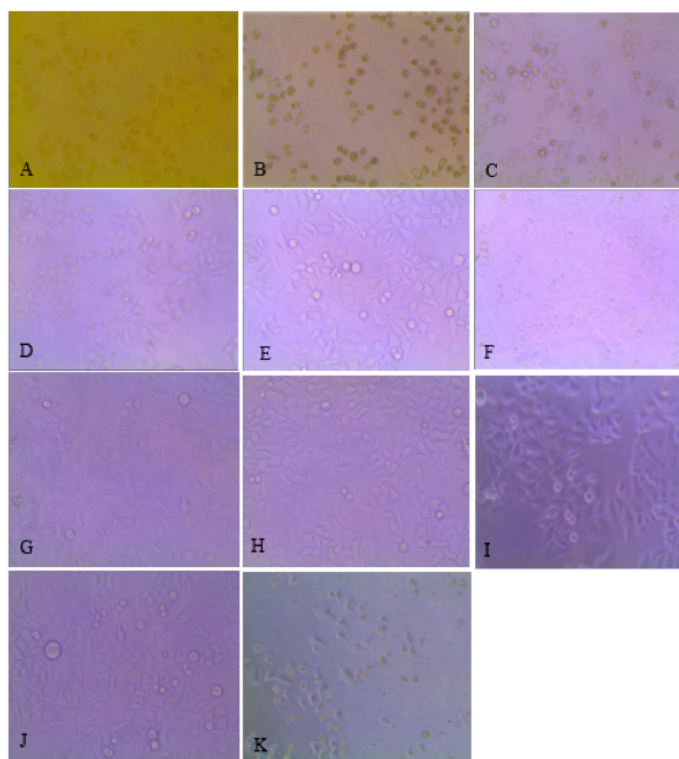
**Table 1.** Viability values of Hep2C cells calculated from the absorbances obtained from MTT assay

Applied Curcumin Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hep2C $\text{IC}_{50}$ Values
30	11.74
15	10.25
7.5	46.25
3.75	75.69
1.9	104.07
0.9	106.94
0.45	111.35

### Effects of curcumin on Hep2C cell morphology using inverted microscopy

The morphological changes on Hep2C cells caused by 24 h of exposure to curcumin at concentrations of 30  $\mu\text{g/ml}$ , 15  $\mu\text{g/ml}$ , 7.5  $\mu\text{g/ml}$ , 3.7  $\mu\text{g/ml}$ , 1.9  $\mu\text{g/ml}$ , 0.9  $\mu\text{g/ml}$ , 0.45  $\mu\text{g}$ , 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , 0.12  $\mu\text{g/ml}$  are shown

in Figures 2(A-I). Condensations of the nuclei and chromatin were the most significant morphological changes. Change in cell shape to circular was observed by inverted microscopy. In addition, a decrease in cell volume was recorded, whereas control cells remained unchanged (Figures 2J).



**Figure 2.** Microscope images showing the morphological changes of Hep2C cells exposed to curcumin at different concentrations (40X) for 24 hours.

(A) 30  $\mu\text{g/ml}$ ; (B) 15  $\mu\text{g/ml}$ ; (C) 7.5  $\mu\text{g/ml}$ ; (D) 3.7  $\mu\text{g/ml}$ ; (E) 1.9  $\mu\text{g/ml}$ ; (F) 0.9  $\mu\text{g/ml}$ ; (G) 0.45  $\mu\text{g/ml}$ ; (H) 0.25  $\mu\text{g/ml}$ ; (I) 0.12  $\mu\text{g/ml}$ ; (J) Negative control; (K) 1 mg/ml ammonium molybdate (positive control)

## DISCUSSION and CONCLUSION

Recent studies suggest the use of few “adjuvants” in combination with chemotherapy to reduce the adverse effects and drug resistance and to increase the effective targeting of cancerous cells. Natural compounds, that are obtained from plants, are capable of garnering considerable attention from the scientific community, primarily due to their ability to check and prevent the onset and progress of cancer (5). Many recent studies conducted by major research groups around world suggest the use of curcumin as a chemopreventive adjuvant molecule to maximize the desired effects and minimize side effects of chemotherapeutic drugs (3, 10, 11).

The present study evaluates the antiproliferative and cytotoxic effects of curcumin on human cervical cancer Hep2C cells. The results of our study support the above effects of curcumin on Hep2C cells in a concentration-dependent manner. The statistically significant decrease of viability of test cells was determined in the highest four concentrations. As shown in the Table 1, the viability of the cells exposed to different curcumin concentrations for 24 h decreased remarkably in a dose-dependent manner. A significant decrease was recorded at the  $IC_{50}$  value (4.1  $\mu\text{g/ml}$ ) of curcumin for 24 h. At the level of the highest three concentrations, 30  $\mu\text{g/ml}$ , 15  $\mu\text{g/ml}$ , and 7.5  $\mu\text{g/ml}$ , cell morphology deterioration and the

dispersion of the cytoplasmic structure are clearly determined microscopically (Figure 2 A-C). Normal cell morphology is observed to be preserved at lower curcumin concentrations of 3.7  $\mu\text{g/ml}$ , 1.9  $\mu\text{g/ml}$ , 0.9  $\mu\text{g/ml}$ , 0.45  $\mu\text{g/ml}$ , 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , 0.12  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 2 D-I).

According to these data, it was determined that curcumin has an antiproliferative and cytotoxic effects on cervical cancer. Considering other studies investigating the anti-cancer activity of curcumin; Curcumin has been shown to reduce proliferation in the human leiomyosarcoma cells, human prostate and breast cancer cells (16-19).

In this study, the data obtained from the cervical cancer Hep2C cells, an anticancer herbal drug that can be produced from curcumin, it needs to be administered at high concentrations for curcumin to be effective in cancer therapy. According to the cervical cancer cells data in which curcumin is applied at lower concentration, it is seen that proliferation is not inhibited. In the light of these data, it has been shown “that curcumin has antiproliferative and cytotoxic effects. It is important for the production of a herbal anti-cancer drug candidate to study.

In conclusion, we recommend curcumin to be studied further as a potential agent for cancer treatment. Further in-depth investigations are required for other in vivo effects and elucidation of the mechanism of action.

## ETHICS COMITTEE APPROVAL

\* This study does not require Ethics Committee Approval.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1): 57-70.
2. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001;7(3): 683-94.
3. Gaurisankar S, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Div*, 2008;3:14.
4. Das T, Gaurisankar S, Saha B, Das K. Multifocal signal modulation therapy of cancer: ancient weapon, modern targets. *Mol Cell Biochem*, 2010; 336(1-2): 85-95.
5. Panda AK, Chakraborty D, Sarkar I, Khan T, Gaurisankar S. New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *J Exp Pharmacol*, 2017; 9:31-45.
6. Giordano A, Tommonaro G. Curcumin and Cancer. *Nutrients*, 2019; 11: 2376.
7. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol*, 2007; 595:1-75.
8. Saha S, Adhikary A, Bhattacharyya P, Das T, Sa G. Death by design: where curcumin sensitizes drug-resistant tumours. *Anticancer Res*, 2012; 32(7): 2567-84.
9. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009; 41(1): 40-59.
10. Choudhuri T, Pal S, Das T, Sa G. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J Biol Chem*, 2005; 280(20): 20059-68.
11. Bhattacharyya S, Mandal D, Sen GS, Suman P, Shuvomoy B, Lahiry L, et al. Tumor-induced oxidative stress perturbs nuclear factor-kappaB activity-augmenting tumor necrosis factor-alpha-mediated T-cell death: protection by curcumin. *Cancer Res*, 2007 ;67(1): 362-70.
12. Sharma RA, AJ Gescher, WP Steward. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*, 2005; 41:1955-68.

13. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumor suppression. *Nature*, 2004; 432: 307-15.
14. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: a review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2011; 10: 12.
15. Bose S, Panda AB, Mukherjee S, Sa G. Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system. *Cell Div*, 2015; 10(69): 1-13.
16. Bachmeier B, Nerlich AG, Iancu CM, Cilli M, Schleicher E, Vene R, et al. The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice. *Cell Physiol Biochem*, 2007; 19(1-4): 137-52.
17. Wong TF, Takeda T, Li B. Curcumin disrupts uterine leiomyosarcoma cells through AKT-mTOR pathway inhibition. *Gynecol Oncol*, 2011; 122(1): 141-8.
18. Sun XD, Liu XE, Huang DS. Curcumin induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells by inhibition of EGFR expression. *Mol Med Rep*, 2012; 6(6): 1267-70.
19. Killian PH, Kronski E, Michalik KM. Curcumin inhibits prostate cancer metastasis in vivo by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and 2. *Carcinogenesis* 2012; 33(12): 2507-19.

## Detection of *Salmonella enteritidis* in a immunocompetent patient with myocarditis

### Miyokardit tanılı immünokompetan hastada *Salmonella enteritidis* saptanması

Fatih Emin ÖZTÜRK<sup>1</sup> (ID), Yasin YILDIZ<sup>1</sup> (ID), Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK<sup>2</sup> (ID)

#### ABSTRACT

*Salmonella* is a gram-negative, motile, non-spore-forming, facultative anaerobic bacterium belonging to the *Enterobacteriaceae* family. There are several subtypes that can cause disease in humans and animals. Infection can be caused by food, such as eggs, poultry, contaminated waters, and can also be monitored after contact with animals. In humans, it may present with different clinics ranging from asymptomatic carriage to enteric fever. Factors such as the age of the host, immunosuppressive status and additional comorbidities may be effective in the course of the disease. Extraintestinal complications can be observed during the course of enteric fever clinic. Among these complications, clinical conditions such as endocarditis, visceral abscess, osteomyelitis can be considered. In this case, we presented the myocarditis clinic in a patient who presented with vomiting, chest pain and diarrhea, and *Salmonella* was found in the stool.

**Key Words:** Myocarditis, *Salmonella*, diarrhea

#### ÖZET

*Salmonella*, gram negatif, hareketli, sporsuz, fakültatif anaerobik, *Enterobacteriaceae* ailesine ait bir bakteri türüdür. İnsanlarda ve hayvanlarda hastalık yapabilen çeşitli alt tipleri mevcuttur. Bulaşma yumurta, kümes hayvanları, kontamine sular gibi gıda kaynaklı olabileceği gibi hayvanlarla temas sonrasında da izlenebilmektedir. İnsanlarda asemptomatik taşıyıcılıktan enterik ateşe kadar farklı kliniklerle ortaya çıkabilir. Hastalığın seyrinde konağın yaşı, immunsupresif durumu ve ek komorbiditeleri gibi faktörler etkili olabilmektedir. Enterik ateş kliniği seyri sırasında extraintestinal komplikasyonlar izlenebilmektedir. Bu komplikasyonlar arasında endokardit, visceral abse, osteomyelit gibi klinik durumlar sayılabilmektedir. Biz de bu vakamızda kusma, göğüs ağrısı ve diyare kliniği ile gelen gaitada *Salmonella* saptanan hastada miyokardit kliniğini sunduk.

**Anahtar Kelimeler:** Miyokardit, *Salmonella*, diyare

<sup>1</sup>Marmara University Pendik Training and Research Hospital Department of Internal Medicine, İstanbul

<sup>2</sup>Marmara University Pendik Training and Research Hospital Department of Infectious Disease and Clinical Microbiology, İstanbul



İletişim / Corresponding Author : Fatih Emin ÖZTÜRK

Fevzi Çakmak mah. Muhsin Yazıcıoğlu cad. Pendik / İstanbul - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 24.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 30.01.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.38159

Öztürk FE, Yıldız Y, Yağcı Çağlayık D. Detection of *Salmonella enteritidis* in a immunocompetent patient with myocarditis.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2021; 79(2): 301 - 306

## INTRODUCTION

Myocarditis is a clinical condition in which inflammation is seen in the cardiac muscular tissue and infectious and non-infectious agents are involved in the etiology. Among the non-infectious causes, factors such as cardiac toxins, chemotherapeutic drugs, systemic diseases and radiotherapy are counted (1). Among the infectious factors, viral, bacterial, fungal and protozoal agents can be counted (1).

Among the bacterial agents, *Salmonella* is a very rare factor especially in western societies where sanitation techniques are developed (2). Usually foodborne contamination. Poultry and eggs are among the foods often blamed. While non-typhoidal *salmonella* infection is usually self-limited in immunocompetent individuals, complications such as osteomyelitis and endocarditis can be observed in immunosuppressed individuals (3). In this case report, we aimed to present the clinic of *salmonella*-associated myocarditis, which started with diarrhea, nausea, vomiting, chest pain in an immunocompetent 49-year-old male patient with no known disease.

## CASE

A 49-year-old male patient with no known disease was admitted to the emergency department with nausea, vomiting, fever and diarrhea lasting ten times a day for four days. At the emergency service evaluation, the patient was oriented and cooperated. His general condition was evaluated as poor. The respiratory rate was recorded as 32/minute. No pathology was observed in the cardiovascular system examination of the patient whose bilateral respiratory sounds were decreased. Abdominal examination revealed no defense and rebound. Bowel sounds increased in all four quadrants. His skin was evaluated as dehydrated. In laboratory tests, wbc:11400 mm<sup>3</sup>, Hemoglobin:19.3 g/dl, Hct:56.8, platelet:189 000 /ul, bun:67 mg/dl kre:5.61 mg /dl ast:87 u/l alt:21 u/l na:123 mEq/l ph:7.27 hco<sub>3</sub>:9.2 pco<sub>2</sub>:21

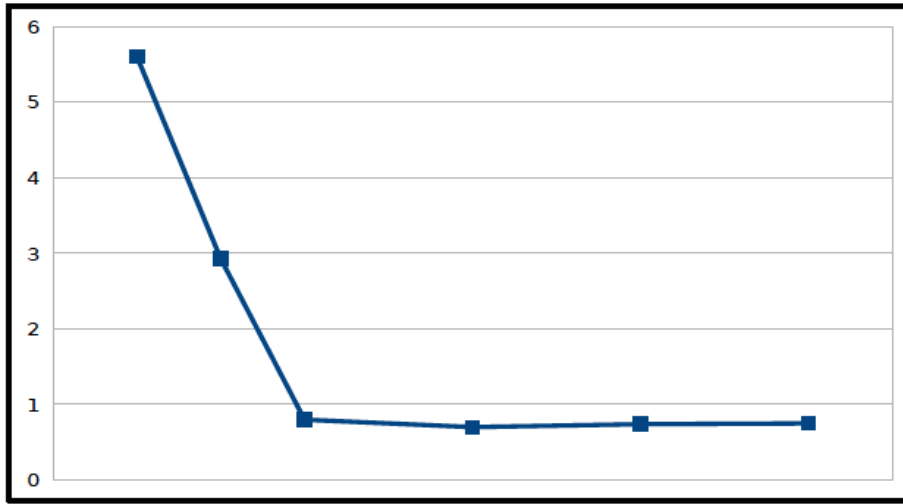
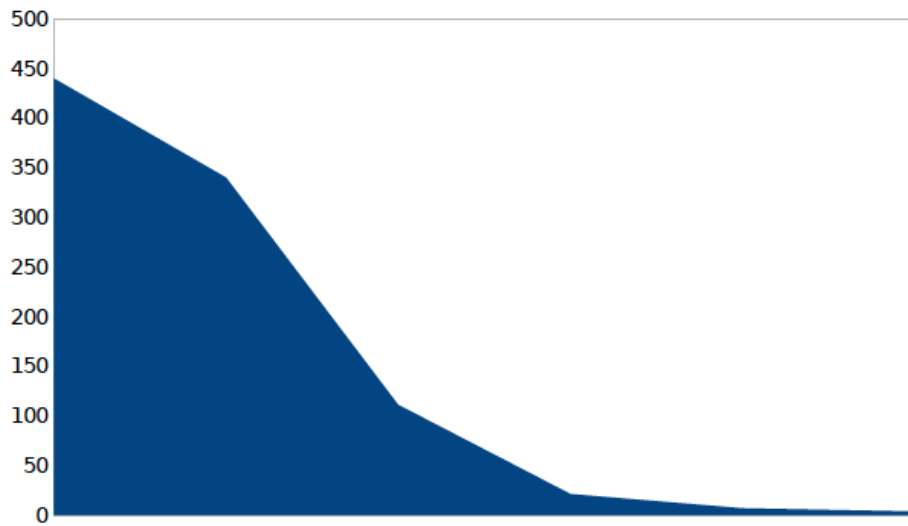
lactate:5.3, procalcitonin:100, crp:440 mg/l, ck mb:9 ng /ml, troponin:927. The creatinine value of the patient, which was measured three years ago, was found to be 1.13 mg/dl. Considering the available laboratory and clinical data, the patient was evaluated as prerenal acute renal failure and hypovolemic hyponatremia. Hydration was started intravenously. Peripheral blood culture and stool culture were sent from the patient who had acute phase increase and had diarrhea. Enteric panel in stool was sent from the patient who was learned to have consumed raw eggs before the onset of the complaints. Covid 19 PCR test taken. The patient with increased cardiac enzyme was evaluated with ECG. Coronary angiography was performed with the pre-diagnosis of myocardial infarction upon detection of ST elevation in the inferior leads. Coronary arteries were evaluated as normal. Service follow-up of the patient was continued after angiography. The sent Covid PCR sample was negative. Covid 19 mRNA vaccine was not administered. *Salmonella* spp was detected in the enteric panel, which was examined with BioFire Film array (Biomerieux) in the stool sample of the patient. No reproduction was reported in blood culture. Current ECG changes and bradycardia observed in clinical follow-ups were evaluated as *Salmonella*-associated myocarditis. Ciprofloxacin antibiotic therapy was started. IV hydration continued. Decrease in the number of defecations was observed with hydration and antibiotic therapy. Acute phase reactants decreased. On the tenth day of treatment, this was observed as BUN:14 mg/dl creatinine: 0.84 mg/dl. The control ECG also showed that the ST elevations decreased. The patient, whose complaints were resolved, was discharged with oral antibiotic therapy. It was learned from the antibiogram that the growing *Salmonella* bacteria were sensitive to the empirically initiated quinolone. It was also susceptible to ampicillin and trimethoprim/sulfomethoxazole.

“Informed Consent Form” has been taken from the patient.



**Table 1.** Changes in laboratory parameters after hydration and antibiotic therapy

Changes in laboratory parameters with treatment						
	21.10.2020	22.10.2020	23.10.2020	25.10.2020	27.10.2020	29.10.2020
BUN/kreatin	67/5,61	58/2,93	16/0,8	9/0,7	10/0,74	14/0,75
CRP	400	340	111	21	6,62	3,59
Prokalsitonin	100	75,8	21	1,82	0,46	0,24
Ck-mb	9	7,6	5,4	-	-	-
Trop-t	927	414	210	77	43	24

**Figure 1.** Creatinin follow-up with i.v hydration**Figure 2.** CRP follow-up with antibiotic treatment

## DISCUSSION and CONCLUSION

Myocarditis is a clinical condition in which inflammation is seen in the myocardial tissue with infectious and non-infectious factors in its etiology. Absence of pathognomonic clinical presentation, mimicking other myocardial-related diseases, and non-specific biopsy findings are among the compelling factors in diagnosis (4). Endomyocardial biopsy is shown as the gold standard for diagnosis. Dallas criteria are used in tissue diagnosis. The presence of sampling errors in the biopsy, the presence of complications that may occur in the biopsy, and the low sensitivity and specificity of histological findings make the application of tissue diagnosis difficult. In clinical practice, the diagnosis is often made clinically. The lack of diagnostic criteria with high sensitivity and specificity makes it difficult to estimate the true prevalence of myocarditis (5).

There are toxic, immune-mediated, radiotherapy-related and infectious causes in the etiology of myocarditis. Among the infectious agents, viral agents are often considered as causative agents. *Coxsackievirus A* and *Coxsackievirus B*, *Parvovirus*, *influenza*, HHV6, EBV, VZV, CMV can be counted among the leading viral factors. In addition to viral factors, bacterial, fungal, parasitic agents are also considered to be among the infectious pathogens that can be causative agents (6).

Among bacterial pathogens, *Chlamydia*, *Legionella*, *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium tuberculosis* are frequently counted (6). *Salmonella*-associated myocarditis is considered very rare among infectious pathogens (7). There are case-level reports in western society where sanitation techniques are advanced. Transmission is usually observed after consumption of poultry and raw eggs. In the case we presented, raw egg consumption was present before the complaints (8). The patient had a habit of consuming raw eggs, which had been for many years. The consumption history of eggs, both packaged and sold in the open

in rural areas, was known. According to European survey data, in 2019, the quinolone resistance of the *Salmonella enteritidis* bacterium isolated from humans was found to be 0.3% in Germany, 0% in Malta, and 49% in Italy, which may also be an indicator for antibiotic use rates in poultry and fattening animals. Quinolone resistance has been found to be 1% in studies conducted in different provinces in our country for infections due to *Salmonella* bacteria, and it still seems to be a good option for empirical treatment (9,10).

The main complaints in the reported cases are fever, diarrhea, nausea, vomiting and chest pain. In cases with accompanying myocarditis, increase in troponin and ck mb accompanies. The most common ECG finding in the clinic of myocarditis has been reported as ST segment elevation. *Salmonella enteritidis* is the most commonly isolated nontyphoidal pathogen (8). In the case we presented, the elevation of the ST segment on the ECG, the growth of *Salmonella enterica* D1 in the stool, the increase in cardiac markers and normal coronary angiography made us think of the diagnosis of *salmonella*-associated myocarditis. Apart from invasive methods, cardiac MRI can be used as a non-invasive method in the diagnosis of myocarditis (11). However, it is not always a method that can be achieved in clinical practice.

BioFire Film array (Biomerieux) is a method that can detect bacterial, viral and parasitic agents. *Campylobacter* spp, *C. difficile*, *V. cholerae*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Astrovirus*, *Norovirus*, *Rotavirus* are some of them. While the sensitivity of biofilm array was 100% in detecting the *Salmonella* agent in feces, the specificity was evaluated as 99.6% (11).

Myocarditis is a challenging diagnosis for the clinician due to factors such as nonspecific clinical findings and laboratory results, and controversial descriptive criteria. It is very difficult to estimate the true incidence as tissue diagnosis is not possible in every case (12).

*Salmonella* is an uncommon pathogen, especially in western societies where sanitation techniques are advanced. Myocarditis is among the rarely reported extraintestinal manifestations. It is possible to show the pathogen in stool and blood cultures. While it

can be brought to mind in clinical diagnosis and satisfactory results can be obtained with appropriate antibiotic therapy, it can be mortal in patients with delayed diagnosis.

### INFORMED CONSENT FORM

“Informed Consent Form” has been taken from the patient.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### KAYNAKLAR

1. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: Current trends in diagnosis and treatment. *Circulation*, 2006;113(6):876-90, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.584532.
2. Sundbom P, Suutari AM, Abdulhadi K, Broda W, Csegedi M. Salmonella enteritidis causing myocarditis in a previously healthy 22-year-old male. *Oxd Med Case Reports*, 2018;2018(12): 447-51. doi: 10.1093/omcr/omy106.
3. Pegues DA, Ohl ME, Miller SI. Nontyphoidal Salmonellosis. *Trop Infect Dis*, 2006; 1: 241-54. doi: 10.1016/B978-0-443-06668-9.50023-5.
4. Caforio ALP, Marcolongo R, Basso C, Iliceto S. Clinical presentation and diagnosis of myocarditis. *Heart*, 2015;101(16):1332-44, doi: 10.1136/heartjnl-2014-306363.

5. Caforio ALP, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*, 2013; 34(33):2636-48, doi: 10.1093/eurheartj/eh210.
6. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yılmaz A, et al. Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol*, 2012;59(9):779-92, doi: 10.1016/j.jacc.2011.09.074.
7. Markaki L, Spernovasilis N, Lempidakis D, Kokorakis E, Gialamas I, Petousis S, et al. Non-typhoidal salmonella myocarditis in an immunocompetent young adult with diarrhea. *Pan Afr Med J*, 2019;34:1-6, doi:10.11604/pamj.2019.34.117.19506.
8. Villablanca P, Mohananey D, Meier G, Yap JE, Chouksey S, Abegunde AT, Salmonella Berta myocarditis: Case report and systematic review of non-typhoid Salmonella myocarditis. *World J Cardiol*, 2015; 7(12):(931), doi: 10.4330/wjc.v7.i12.931.
9. Gündoğdu A, Kılıç H, Ulu-Kılıç A, Parkan ÖM, Türe Z. Kayseri Bölgesinde Soyutlanan Salmonella Serovarlarının Dağılımı ve Antimikrobiyal Duyarlılıkları. *Klimik Derg*, 2017; 30(1):22-26, doi: 10.5152/kd.2017.04.
10. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/salmonellosis-annual-epidemiological-report-2017> (Date of access; 11.05.2021).
11. Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, 2015;53(3):915-25, doi: 10.1128/JCM.02674-14.
12. Caforio ALP, Malipiero G, Marcolongo R, Illiceto S. Myocarditis: A Clinical Overview. *Curr Cardiol Rep*, 2017;19(7), doi: 10.1007/s11886-017-0870-x.

## Köpek ısırığı sonrası gelişen *Pasteurella multocida*'ya bağlı yumuşak doku enfeksiyonu olgusu

A soft tissue infection case due to *Pasteurella multocida* that developed after a dog bite

Ferhan KORKMAZ<sup>1</sup> (ID), Gülen GÜLOĞLU ÇAMAŞ<sup>2</sup> (ID), Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI<sup>3</sup> (ID)

### ÖZET

*Pasteurella multocida* (PM), sıklıkla kedi ve köpek gibi evcil hayvanların orofaringeal sekresyonlarından izole edilen gram negatif bir kokobasilidir. Kedi ısırığı ve tırmağı gibi olası kaynaklardan alınan tipik izolatlar için indol pozitif ve MacConkey agarda üremeyen, oksidaz pozitif gram negatif basil görülmesi genellikle *Pasteurella multocida*'nın tanımlanması için yeterlidir. Hem hayvan ısırıkları hem de tırmalamaları tipik olarak yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olur ve bu enfeksiyonlar uygun tıbbi tedavi ile iyileşme eğilimindedir. Fakat osteomyelit, pnömoni, endokardit, sepsis ve menenjit gibi ciddi klinik durumlar da görülebilmektedir. Bu makalede 61 yaşında diyabetes mellitus tanısı olan kadın hastanın, sol bacağından köpek tarafından ısırılması sonucu gelişen *Pasteurella multocida*'ya bağlı yumuşak doku enfeksiyonu olgusu literatür eşliğinde sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Pasteurella multocida*, köpek ısırığı, yumuşak doku enfeksiyonu

### ABSTRACT

*Pasteurella multocida* (PM) is a gram negative coccobacillus which is frequently isolated from oropharyngeal secretions of domestic animals such as cats and dogs. For typical isolates from probable sources such as cat bite or scratch, the presence of indole-positive and oxidase-positive, gram-negative bacilli, non-growing on MacConkey agar, is usually sufficient for identification of *Pasteurella multocida*. Both animal bites and scratches typically cause soft tissue infections which tend to have favorable outcomes with appropriate medical treatment, however, they may also cause serious clinical conditions such as osteomyelitis, pneumonia, endocarditis, sepsis and meningitis. In this article, a case of soft tissue infection due to *Pasteurella multocida* in a 61 year-old diabetic female who had a history of dog bite on her left leg, was presented in the light of the literature.

**Key Words:** *Pasteurella multocida*, dog bite, soft tissue infection

<sup>1</sup>Rize Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Rize  
<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Halk Sağlığı AD., Aydın  
<sup>3</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD., Samsun



İletişim / Corresponding Author : Ferhan KORKMAZ  
Eminettin Mahallesi Rize Valiliği Karşısı 53020 Rize - Türkiye  
E-posta / E-mail : ferhankorkmaz15@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 24.08.2021  
Kabul Tarihi / Accepted : 24.02.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.67790

Korkmaz F, Güloğlu Çamaş G, Tanrıverdi Çaycı Y. Köpek ısırığı sonrası gelişen *Pasteurella multocida*'ya bağlı yumuşak doku enfeksiyonu olgusu. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 79(2): 307 - 312

## GİRİŞ

*Pasteurella multocida* klinik örneklerde en sık görülen *Pasteurella* türüdür ve hayvanlardan izole edilmiştir. Sağlıklı evcil kedilerin (%70-90), köpeklerin (%40-66) ağız florasında bulunur. Nadiren hayvan maruziyeti sık olan sağlıklı insanların nazofarenksinde bulunabilir. *P. multocida* oksidaz, katalaz, indol pozitif; üreaz negatif Gram negatif kokobasildir. Çikolatamsı ve koyun kanlı agarda iyi ürer, CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saatlik inkübasyon sonrası düzgün, hemoliz oluşturmeyen gri koloniler oluştururlar. Solunum yolunda elde edilen izolatlar mukoid olabilir. Eosin Methylen-Blue (EMB) ve MacConkey agar gibi seçici/ayırt edici besiyerinde üremez. Kedi ısırığı veya tırmığı gibi olası kaynaklardan alınan tipik izolatlar için indol pozitif ve MacConkey agarda üremeyen, oksidaz pozitif, Gram negatif basil görülmesi genellikle *P. multocida*'nın tanımlanması için yeterlidir (1).

Bu olguda köpek ısırığı sonrasında gelişen yumuşak doku enfeksiyonlarında *P. multocida*'nın etken olabileceği, daha ciddi komplikasyonların gelişmemesi için uygun antibiyotik tedaviye hemen başlanması gerektiğine dikkat çekmek amaçlanmıştır.

## OLGU

Beş gün önce köpek tarafından ısırılan 61 yaşındaki kadın hasta sol tibia ön yüzde; kızarıklık, şişlik ve ateş yüksekliği yakınmasıyla acil servise başvurdu. Tetanoz ve kuduz profilaksisi yapılan hasta enfeksiyon hastalıkları polikliniğine yönlendirildi. Özgeçmişinde diabetes mellitus tanısı olan hastanın fizik muayenesinde sol tibia ön alt 1/3'de 2x3 cm'lik bölgede abrazyon, akıntı, tibia ön ve arka yüze yayılan kızarıklık, ısı artışı, şişlik saptandı, krepitasyon gözlenmedi. Ayak bileği hareketlerinde herhangi bir kısıtlılık ve nörovasküler bulgu saptanmadı. Laboratuvar incelemesinde lökosit 11.300/mm<sup>3</sup> (nötrofil %61.5), hemoglobin 12.9 g/dL, trombosit 185.000 /mm<sup>3</sup>, C-reakif protein 172.5 mg/L, kan glukozu 427 mg/ dL olarak saptandı. Hasta hastaneye yatırıldı ve intravenöz piperasilin-tazobaktam (3x4.5gr) ile tedavisine başlandı. Direkt grafide; cilt defekti düzeyinde yumuşak dokuda gaz görünümü saptanması üzerine nekrotizan fasiit açısından ortopediye konsülte edildi, ortopedi tarafınca nekrotizan fasiit düşünülmedi, pansuman ve antibiyotik tedavisi ile takip önerildi.



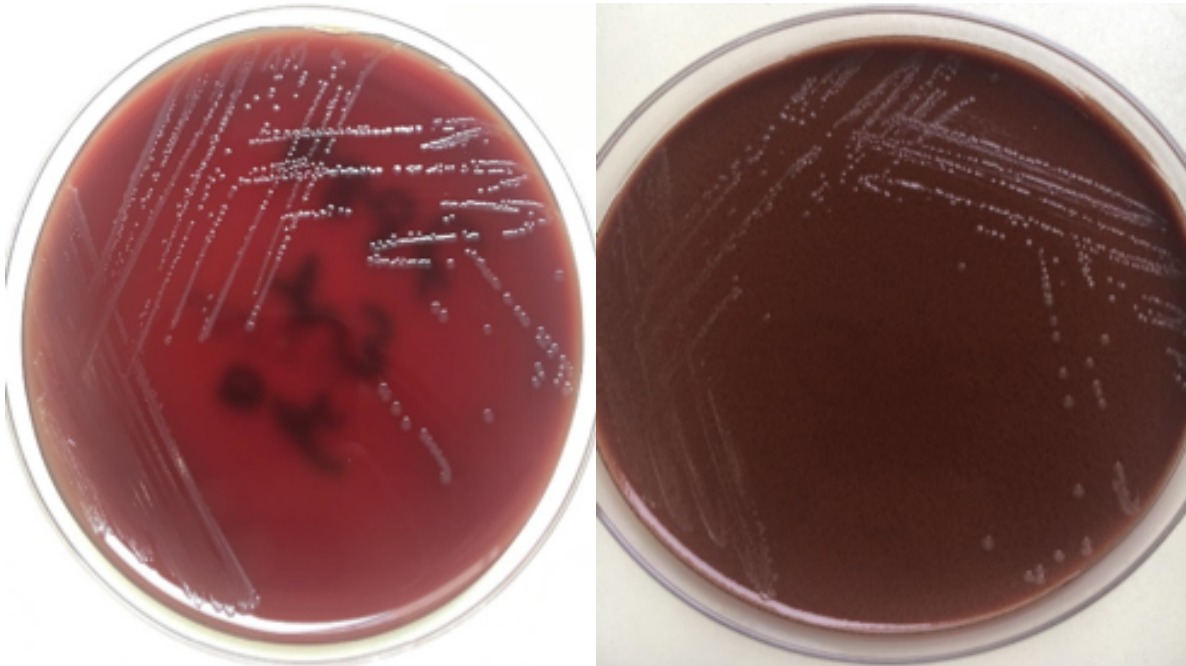
Şekil 1. Sol tibiadaki lezyonların görüntüsü

Yara kültürü örneği alınarak laboratuvara gönderildi. Yara kültür örneği % 5 koyun kanlı agar, Eosin Methylen Blue (EMB) agar ve çukolatamsı agara ekilerek 18-24 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kanlı ve çikolatamsı agarda üreme saptanırken EMB agarda üreme görülmedi. Kanlı agarda grimsi, hemoliz yapmayan S koloniler görüldü. Gram boyamada Gram negatif (-) kokobasiller görüldü. Oksidaz, katalaz ve indol testleri pozitif iken, metil red ve üreaz negatif olarak saptandı. Bakteri tanımlanması otomatize Vitek2 Kompakt (bioMérieux, Fransa) ile yapıldı ve % 50 oranında *Pasteurella multocida* olarak tanımlandı. İzolat Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi ve Vitek MS (bioMérieux, Fransa) cihazı ile *P. multocida* olarak tanımlandı. Antibiyotik duyarlılığı Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile

çalışıldı ve penisilin, siprofloksasin, levofloksasin, amoksisilin-klavulanik asit, sefotaksim ve trimethoprim-sulfametoksazole duyarlı olarak saptandı.

Takibinde kontrol C-reaktif protein 14 mg/L'e kadar geriledi. Yara yerindeki kızarıklık, ısı artışı ve şişlik tamamen geriledi. Ateşi ve aktif yakınması olmayan, klinik ve laboratuvar parametreleri gerileyen hasta parenteral tedavinin 8. gününde oral amoksisilin-klavulanat tedavisine geçilerek enfeksiyon poliklinik kontrolü ve pansuman önerileriyle taburcu edildi.

Bu olgu sunumu için Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi'nden 27.05.2021 tarihinde E-40465587-050.01.04-127 sayılı etik kurul onayı ve 21.05.2021 tarihinde hastadan Bilgilendirilmiş Onam Formu alınmıştır.



Şekil 2. *Pasteurella multocida*'nın kanlı ve çikolata agardaki koloni görüntüleri

## TARTIŞMA

*P. multocida* enfeksiyonlarının çoğu yara enfeksiyonlarıdır. Kedi, köpek ısırıkları ve kedi tırmalaması ile ilişkilidir. Bu enfeksiyonlar hızla gelişen ağrı, eritem, şişme, selülit ve yara yerinde seröanjinöz ve pürülan drenaj ile karakterizedir (2). Yara; derin, güçlü ve alttaki dokular için travmatikse sıklıkla ciddi komplikasyonlar (septik artrit, osteomyelit) gelişebilir. *P. multocida* hayvan ısırığı olmayan veya hayvan teması olmayan yaralarda da saptanabilir. Bunun dışında açık ve kısmen iyileşmiş yaraların kedi ve köpek tarafından yalanması sonucu da oluşabilir (3). Dekübit ülserleri, perioküler apseler ve cerrahi sonrası abdominal veya ortopedik yaralardan izole edilmiştir (4, 5). İmmün yetmezliği, malignensi ve karaciğer hastalığı olanlarda lokalize yara enfeksiyonlarından bakteriyemi gelişebilir ve hematogen yolla pnömoni, menenjit ve diğer komplikasyonlar ortaya çıkabilir (6).

Milani-Nejat ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada; diyabeti ve myelodisplastik sendromu olan nötropenik, evde kedi besleyen 73 yaşında kadın hasta ön kolda döküntülerle hastaneye başvurmuştur. Alınan kan kültürü ve yara kültüründe *P. multocida* üremesi saptanmıştır. Hastaya vankomisin, sefepim, metranidazol başlanmış, nekrotizan fasiit gelişince tedaviye klindamisin eklenerek hasta yatışının 18. gününde klinik ve laboratuvar parametreleri gerileyince taburcu edilmiştir. Minnesota Hastanesinde 2014 yılında yatan 5 hastada *P. multocida* enfeksiyonu saptanmış olup bu hastaların dördünde sepsis gelişirken üç hasta kaybedilmiştir. Hastaların hepsinde de komorbid sebepler (siroz, diyabet, steroid vb.) bulunduğu belirtilmiştir (8). Kimura ve ark 2019'da yaptıkları bir çalışmada; 29 yaşında evde kedi besleyen fakat herhangi bir çizik veya ısırığı olmayan, serviks kanseri olan bir kadının uterusunda apse gelişmiş olup *P. multocida* vajinal kültürde üremiştir. Bu vaka ile *P. multocida*'nın hayvanla ilişkili bir patojen olarak bilinmesine rağmen, insanlarda görünür ısırıklar veya çizikler olmadan

intrapelvik apseye neden olabileceği vurgulanmıştır (9). Lodhi ve ark 2020'de epidural steroid enjeksiyonu ve tekrarlayan kedi ısırıkları öyküsü olan 66 yaşındaki bir erkek hastada epidural apsedan *P. multocida* izole etmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile; ateş, titreme ve şiddetli sırt spazmları şikayetiyle başvuran hastada *P. multocida*'nın sağlıklı bir bireyde hastalık sürecinin başka herhangi bir belirti veya semptomu olmadan spinal epidural apseye neden olabileceğini belirtmişlerdir (10). Türkiye'de Ceyhan ve ark. 2010'da yaptıkları bir çalışmada; koroner arter hastalığı, konjestif kalp yetmezliği ve hipertansiyon öyküsü olan, evinde kedi besleyen 76 yaşında kadın hasta bacağına tahta düşmesinden sonra bacağında kızarıklık, şişlik şikayetiyle hastaneye başvurmuştur. Nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonu tanısı konan hastaya ampisilin-sulbaktam başlanmıştır. Yara kültüründe *P. multocida* üreyen hasta antibiyotik tedavisiyle kutanöz lezyonları gerilemesine rağmen yatışının 15. gününde dekompanse kalp yetmezliği nedeniyle kaybedilmiştir (11).

Ayas ve ark. 2021'de yaptıkları çalışmada dört gün önce köpek tarafından ısırılan, özgeçmişinde atriyal fibrilasyon, konjestif kalp yetmezliği ve hipertansiyon öyküsü olan 79 yaşında erkek hasta, hemoptizi, nefes darlığı, ishal ve göğüs ağrısı şikayetiyle acil servise başvurmuştur. C-reaktif protein 101,3 mg/L, prokalsitonin 19 ng/mL olup akciğer röntgeninde sağ orta lobta infiltrasyon görülmüştür. COVID-19 testi negatif çıkan hastaya seftriakson ve azitromisin başlanmıştır. Kan kültürlerinde penisiline duyarlı *P. multocida* üremiştir. Klinik ve laboratuvar parametreleri gerileyen hastada 10 günlük tedaviyi tamamlamak için amoksisilin tedavisine geçilerek taburcu edilmiştir (12). Jan ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada (2021) ; 53 yaşında kadın hasta ateş ve solunum sıkıntısı nedeniyle acil servise başvurmuştur. Özgeçmişinde bilinen bir hastalığı olmayan hastanın sokak kedileriyle yakın temas öyküsü mevcuttur. Epiglottit tanısı konan hastada alınan kan kültürlerinde *P. multocida* üremiştir. Seftriakson ve metronidazol ile ampirik tedavi başlanmış olup daha sonra



amoksisilin klavulanik aside geçilerek hasta taburcu edilmiştir. Çalışmada *Pasteurella*'ya bağlı epiglottit vakalarının çok nadir görüldüğü, hayvanlara maruziyet dışında hiçbir klinik özelliğin *P. multocida* enfeksiyon şüphesini artırmadığını bu sebeple klinik öykünün çok önemli olduğunu vurgulamışlardır (13). Jha ve ark. yaptıkları bir çalışmada (2021) 7 haftalık infantta evcil hayvan tarafından ısırılma, sıyrık veya yalama öyküsü olmadan *P. multocida*'ya bağlı septik şok vakasına dikkat çekmişlerdir. Bu vaka ile hayvanlarla herhangi bir invaziv temas veya sıyrık olmaksızın *Pasteurella* enfeksiyonları ile yaşamı tehdit eden durumların ortaya çıkabileceğini vurgulamışlardır (14). Okumura ve ark. yaptıkları bir çalışmada (2021) 49 yaşında, evcil kedisi olan alkolik sirozlu hasta, iki gün boyunca her 30 dakikada bir sık ishal ve ateş şikayetiyle hastaneye başvurmuştur. Hastaya septik şok tanısı konup piperasilin tazobaktam başlanmıştır. Hastanın durumunun kötüleşmesi üzerine tedaviye meropenem ve vankomisin eklenmiş olup hasta üçüncü gün kaybedilmiştir. Alınan kan kültüründe *P. multocida* üremiştir. Sirozla birlikte diyare varlığının bakteriyemi gelişme ihtimalini artırdığı, evde hayvan besleyen hastalarda *P. multocida*'nın etken olabileceği düşünülerek mortaliteyi azaltmak

için ampirik tedavinin hızlı ve uygun bir şekilde düzenlenmesi gerektiğine dikkat çekilmiştir (15).

Bizim hastamızda nekrotizan fasiit ve diğer ciddi komplikasyonlar oluşmadan uygun antibiyotik tedavisi ile yumuşak doku enfeksiyonu tamamen geriledi. *P. multocida* enfeksiyonları ölümcül komplikasyonlara yol açabileceğinden evde hayvan besleyen hastalarda deride kızarıklık, şişlik oluştuğunda *P. multocida*'nın etken olabileceği düşünülerek uygun antibiyotik tedavisi başlanmalıdır. Uygun antibiyotikler arasında penisilin, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler, kinolonlar, tetrasiklinler, kloramfenikol ve trimetoprim sülfametoksazol bulunur (16, 17). Yara yerinden kültür alınarak, bakteri izolasyonundan sonra mutlaka antibiyogram yapılmalıdır. Bazı *Pasteurella* suşları penisiline dirençli olabileceğinden ve B-laktamaz eksprese edebileceğinden, yeterli kapsamı sağlamak için duyarlılık testi gereklidir (18).

Ülkemizde çok nadir *P. multocida* olguları görülmektedir. Köpek ısırığı sonrasında gelişen yumuşak doku enfeksiyonlarında *P. multocida*'nın etken olabileceği akılda tutulmalı; osteomyelit, bakteriyemi, pnömoni, menenjit gibi daha ciddi komplikasyonların gelişmemesi için uygun ampirik tedaviye hemen başlanmalıdır.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 27.05.2021 ve Karar No: E-40465587-050.01.04-127).

## BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

\* Bu çalışma için hastadan Bilgilendirilmiş Onam Formu alınmıştır (Tarih: 21.05.2021).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Miscellaneous Fastidious Gram Negative Bacilli pp:509, 2017; 7thed, United States of America.
2. Westling K, Bygdeman S, Engkvist O, Jorup-Rönström C. *Pasteurella multocida* infection following cat bites in humans. J Infect, 2000; 40(1):97-8.
3. Chang K, Siu LK, Chen YH, Lu PL, Chen TC, Hsieh HS at al. Fatal *Pasteurella multocida* septicemia and necrotizing fasciitis related with wound licked by a domestic dog. Scand J Infect Dis, 2007; 39(2):167-70.
4. Cook PP. Persistent postoperative wound infection with *Pasteurella multocida*:case report and literature review. Infection, 1995; 23(4):252.
5. Hutcheson KA, Magbalon M. Periocular abscess and cellulitis from *Pasteurella multocida* in a healthy child. Am J Ophthalmol, 1999; 128(4):514-5.
6. Raffi F, Barner J, Baron D, Dugeon HB, Nicolas F, Courtieu AL. *Pasteurella multocida* bacteremia:report of 13 cases over 12 years and review of the literature. Scand J Infect Dis, 1987; 19:385-93.
7. Milani-Nejad N, Tyler K, Grieco CA, Kaffenberger BH. *Pasteurella multocida* ecthyma complicated by necrotizing fasciitis. Dermatol Online J, 2017; 23(4):5.
8. Talley P, Snippes-Vagnone P, Smith K. Invasive *Pasteurella multocida* Infections - Report of Five Cases at a Minnesota Hospital 2014. Zoonoses Public Health, 2016; 63(6):431-5.
9. Kimura K, Hagiya H, Yamamoto N, Yoshida H, Akeda Y, Nishi I, Tomono K. *Pasteurella multocida* multiple intrapelvic abscesses in a young woman with uterine cervical cancer. J Infect Chemother, 2019; 25(3):197-9.
10. Lodhi FAK, Shogren SL, Haque N, Ishaq M, Rehman A. Spinal epidural abscess due to *Pasteurella multocida* infection. IDCases, 2020; 11;21:e00801.
11. Ceyhan A. M, Kaya O, Başoğlu N, Tıǧlı A, Yıldırım M. *Pasteurella multocida*'nın neden olduğu nadir görülen nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonu olgusu. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 2010; 30(1):439-42.
12. Ayas MF, Youssef D, Johnson L. A rare case of bacteremic community-acquired pneumonia due to *Pasteurella multocida* presenting with hemoptysis. Cureus, 2021; 13(3):e14232.
13. Jan L, Boute P, Mouawad F. *Pasteurella multocida* acut eepiglottitis European Annals of Otorhinolaryngology. Headand Neck Diseases, 2021; 138(2): 100-2.
14. Jha P, Kalyoussef S. Fulminant septic shock with *Pasteurella multocida* in a young infant: no bite, scratch, or lick! Vector Borne Zoonotic Dis, 2021; 21(1):59-62.
15. Okumura H, Nishiguchi S. *Pasteurella multocida* infection presented with frequent diarrhea in the cirrhotic patient. Cureus, 2021; 13(9): e18183.
16. Gabi A, Wolfer R, Shattahi E. Abdominal necrotizing fasciitis due to *Pasteurella multocida* infection. W V Med J, 2014; 110(6):32-5.
17. Kimura R, Hayashi Y, Takeuchi T, Shimizu M, Iwata M, Tanahashi M. *Pasteurella multocida* septicemia caused by close contact with a domestic cat: case report and literature review. J Infect Chemother, 2004; 10(4):250-2.
18. Jorgensen J.H, Hindler J.F. New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Clin Infect Dis, 2007; 44(2):280-6.

## Oral kaviteye yerleşen parazitler

### Parasites of the oral cavity

Başak KARASU<sup>1</sup> (ID), Özcan ÖZKAN<sup>2</sup> (ID), Ayşegül TAYLAN ÖZKAN<sup>3</sup> (ID)

#### ÖZET

Paraziter hastalıkların genelde az gelişmiş ülkelerde görüldüğü bilinmektedir. Son zamanlarda gelişmiş ülkelerde rapor edilen oral paraziter enfeksiyonların prevalansı artmıştır. Ağız boşluğu birçok mikroorganizma için yerleşim yeridir. Bu mikroorganizmalar, kötü ağız hijyeni, periodontal hastalık ve immün sistemi baskılanmış olan hastalarda daha yaygın olarak görülmektedir. Bu derlemede, paraziter hastalıklarla ilgili oral lezyonlar, bunların ağızda görülen hastalıkların patofizyolojisindeki rolleri, tanı ve tedavi seçenekleri hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Paraziter hastalıklar, ağız boşluğu, protozoon, arthropod, helmint

#### ABSTRACT

Parasitic diseases were known to be problematic mostly in developing countries. Recently the prevalence of oral parasitic infections being reported more frequently in developed countries. Oral cavity is the typical residence for particular organisms. These microorganisms are found more commonly in patients with poor oral hygiene, periodontal disease, and immune suppression. The aim of this review was to provide the data about oral lesions related to parasitic diseases and their roles in pathophysiology of oral diseases. It also discusses current approaches to diagnosis and treatment options of parasitic infections.

**Key Words:** Parasitic diseases, oral cavity, protozoa, arthropod, helminth

<sup>1</sup>Çankırı Karatekin Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Çankırı

<sup>2</sup>Çankırı Karatekin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Çankırı

<sup>3</sup>TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Ankara



İletişim / Corresponding Author : Başak KARASU

Aksu Mah. Hürriyet Cad. No: 14 18200 Çankırı - Türkiye

E-posta / E-mail : b\_karasu@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 28.12.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 24.05.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.71473

Karasu B, Özkan Ö, Taylan Özkan A. Oral kaviteye yerleşen parazitler.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2021; 79(2): 313 - 320

## GİRİŞ

Hayatta kalmak için omurgalı veya eklem bacaklı konaklara bağımlı olan parazitlerin neden olduğu parazitler hastalıklar dünya çapında yaygın bir şekilde görülmektedir. Gelişmemiş ülkelerde daha çok karşılaşılan bu hastalıkların, günümüzde sanayileşmiş ülkelerde de sıklıkla rapor edildiği bilinmektedir. Parazitler sıklıkla ağır enfeksiyonlara ve bazen de konağın ölümüne neden olmaktadır (1).

İnsanda hastalık yapan birçok parazit için ağız bir giriş kapısıdır. Bu nedenle parazitlerin birçoğunun özellikle ağız içinde görüleceği düşünülse de *Entamoeba gingivalis* (*E. gingivalis*) ve *Trichomonas tenax* (*T. tenax*) gibi fırsatçı patojenlere dönüşebilen saprofitler (2,3) veya ara sıra invaziv olabilen ancak nadiren klinik olarak görülen serbest yaşayan amipler dışında, parazitler ağız boşluğuna yerleşmeyi başaramamışlardır (4). Son yıllarda parazitlerin diş eti hastalıkları üzerine olan etkilerinin gösterilmesi, immün yetmezlik sendromu görülen bireylerde parazitler enfeksiyonlarının artması ve sistemik açıdan sağlıklı insanlarda da bu enfeksiyonların varlığına dair kanıtların fazlaşmasının bir sonucu olarak oral kaviteyi etkileyen parazitlerin teşhisi ve eliminasyonu medikal ve epidemiyolojik açıdan önemlidir.

Ağız içinde protozoonlar, artropodlar ve helmintler enfeksiyonlara neden olan parazitlerdir (5).

## PROTOZOONLAR

### *T. tenax* ve *E. gingivalis*

Protozoonlar, ökaryotik tek hücreli hayvanlardan oluşan çeşitli parazitleri kapsayan bir gruptur. Parazitik türler tüm omurgalıları ve bazı omurgasızları enfekte eder. Hareketlidirler ve kirpikliler, kamçılılar, yaylılar ve yalancı ayaklılar gibi hareket mekanizmalarına göre gruplandırılırlar. Konak içinde çoğalırlar (5). Enfeksiyonun türüne bağlı olarak, parazitler enfeksiyöz ajanlar; lokal enfeksiyonları indükleyenler ve oral kavitede dolaylı etkilerle sistemik enfeksiyonları indükleyenler olarak iki kategoriye ayrılabilir.

İnsanda, protozoonlardan *E. gingivalis* ve *T. tenax*'ın oral kaviteye yerleştiği bilinmektedir. *E.*

*gingivalis* insanda dental plakta tanımlanan ilk amip olarak gösterilmektedir. Kist formu yoktur. Morfolojisi ve hareketi *Entamoeba histolytica*'ya benzer. Genellikle dişler ve diş etleri arasındaki iltihabi ceplerle tonsiller kriptlerde bulunmaktadır.

Parazitlerin en sık gözlenen bulaş yolu oral temastır. Ağız boşluğunda yaşayan tek kamçılı protozoon *T. tenax* insan vücudunda yerleşen üç *Trichomonas* türünden biridir. Kist formu yoktur ve ilk olarak diş taşında tespit edilmiştir. *T. tenax*, ağız boşluğundaki bakteriler, ölmüş hücreler ve besin artıkları ile beslenir. Periodontal ceplerde varlığına rastlanmıştır (6-10).

*T. tenax* ve *E. gingivalis*, genellikle zararsız kommensallerdir. Bir anaerobik olan *T. tenax*'ın, diş etini ve alveoler kemiği etkileyen, çok faktörlü inflamatuvar bir hastalık olan periodontitiste etkili olduğundan şüphelenilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanarak yapılmış bir çalışmada, *T. tenax*'ın periodontal hastalık görülen Down sendromlu kişilerde, sağlıklı bireylere göre daha yaygın olduğu tespit edilmiştir (11). Ağız boşluğunda, diğer parazitlere göre daha sıklıkla karşılaşılan *E. gingivalis*, *T. tenax*'a göre daha az bulunur. *E. gingivalis*'in, bağışıklığı zayıflamış hastalarda genellikle nekrotik bir diş eti enfeksiyonu sonucu progresif periodontal hastalığa neden olduğuna dair bulgular vardır (4). Yapılan bir çalışmada bu parazitlerin human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ile ilişkili olduğu ve başka parazitlerin de bulunmaması nedeniyle HIV-1'e özel bir durum olduğu savunulmuştur (12). *E. gingivalis*'in maksillada kemik yıkımı üzerine etkisi olduğu ve parazitin bulunuşunun periodontal bir hastalığa işaret ettiği belirtilmiştir (13).

### *Leishmania*-Leişmanyaz

*Leishmania* cinsine ait protozoonların neden olduğu iç organları, deriyi ve nadiren mukozayı etkileyen bir hastalıktır. Zorunlu hücre içi parazitlerdir. Vektör kum sineği ile bulaşılırlar (14). Klinik bulgularına göre enfeksiyon; kütanöz, mukozal ve visseral olmak üzere üç grupta sınıflandırılır. Mukozal leişmanyaz, nazal

mukozada başlar ve daha sonra orofarenks ve larinks tutabilir (15).

Tropikal hastalıklardan birisi olarak kabul edilen leişmanyaz, Dünya Sağlık Örgütü tarafından en önemli hastalıklar listesine eklenmiş, visseral formunun sıklıkla HIV/AIDS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (16).

Lezyonlar, hastalığın visseral ya da mukozal formunun ağız bulgusu olarak ortaya çıkabilir. Abbas ve ark. şişmiş, kanamalı ve ödemli diş eti, kırmızı ve fissürlü yanak, uvula ve damak lezyonları görülen bir hastadan alınan lezyonların yaymalarında amastigotlar görüldüğünü ve hastaya visseral ve mukozal leişmanyaz teşhisi konduğunu bildirmişlerdir. Hasta, sodyum stiboglukonat (Pentostam, Wellcome Laboratories, İngiltere) reçete edilerek tedavi edilmiştir (17).

Michiels ve ark. AIDS'li bir hastada oral leişmanyaz rapor etmişlerdir. Sağ tonsilde ve yumuşak damakta ülser, çapı 3 cm polipoid kitle bulunan hastaya yapılan biyopside, *Leishmania donovani* ile uyumlu Leishman-Donovan cisimcikleri bulgusu ile teşhis koymuşlar ve eşlik eden kaposi sarkomu görüldüğünü belirtmişlerdir. (18).

Leişmanyaz, endemik bölgelerdeki ağız enfeksiyonlarının ayırıcı tanısında göz önünde bulundurulması gereken bir ağız hastalığı olarak tanımlanmıştır (19).

#### ARTOPODLAR (EKLEMBACAKLILAR)

Eklembacaklılar, yaşam döngüleri boyunca çeşitli patojenlerin vektörlüğünü yapabilir, parazitik organizmalara konak olabilir veya insanlarda doğrudan doku hasarına ve hastalığa neden olabilirler. Bu tür enfeksiyonların en çok tropikal bölgelerde görüldüğü rapor edilmişse de Amerika Birleşik Devletleri ve diğer ılıman iklimleri de sıklıkla etkilediği bildirilmiştir (5).

#### Miyaz

Miyaz, diptera larvalarının omurgalı hayvan ve insan dokularına veya vücut boşluklarına girip, canlı veya ölü dokular ile beslenmeleri sonucu oluşan enfeksiyon için kullanılan genel bir terimdir. Yerleşim yerlerine göre kutanöz, nazofaringeal,

gastrointestinal ve aural olarak sınıflandırılabilir (7).

Dental miyaz olarak da bilinen ve nadir görülen oral miyaz ve gingival miyaz, oral kavitedeki dokuların larvalar ile enfestasyonudur (19,20). Ağızda diş çekim yarasının bulunması, şiddetli gingivit veya periodontit predispozan faktörlerdendir. Bireylerde ağız kokusu ve çoğu durumda özellikle uyurken ağız solunumu öyküsü bulunur. Hastaların uyurken sinek larvaları ile enfeste olduğu düşünülmektedir (21).

Birçok hasta ağrı, diş etinde şişme, kanama semptomları ve ilgili bölgede kaşınıtı şikayetleriyle başvurur. Ağız içi muayenede görülen şişmiş, eritemli, kanamalı dokular aktif larvaların varlığının göstergesidir. Çoğu durumda, larvalar diş etinin içine ve altına girerek bir delik oluşturur. Tedavi, larvaların uzaklaştırılması ve dokuların irrigasyonu ile sağlanır.

Felices ve Ogbureke larvaların uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak için eter solüsyonu kullanılmasını önermektedir (22). Antibiyotikler reçete edilebilir ve predispozan durumun ortadan kaldırılması için takip tedavisi gerekmektedir (21,23). Özellikle gelişmekte olan ülkelere artan yurt dışı seyahatleriyle birlikte oral miyaz vakalarının yanı sıra diğer tropikal enfeksiyonların görülme insidansının da artabileceği bildirilmiştir (23).

#### HELMİNTLER

##### Tenyaz ve Sistiserkoz

Tenyaz, çiğ veya yeterince pişirilmemiş et tüketimi ile helmintlerin canlı larvalarının sindirimi sonucu bağırsaklarda oluşan bir enfeksiyondur. Sığırdada bulunan *Taenia saginata* ve domuzda görülen *Taenia solium*'un erişkin formları neden olmaktadır. Sistiserkoz ise helmintlerin larva formlarının neden olduğu paraziter bir hastalıktır ve yumurtaların sindirimi sonucunda oluşmaktadır (24,25). Oral kavitede nadir görülürken, subkutanöz dokularda, merkezi sinir sisteminde, göz ve iskelet kaslarında yaygın olarak tutulum yapmaktadır (26).

Mallett *T. saginata* teşhisi konan bir hastada, kırmızı, ödematöz, ağrı ve gingival kanamanın eşlik ettiği hiperplastik mukozit rapor etmiştir (27).

Sistiserklerin en sık karşılaştığı bölgeler dil, dudaklar ve yanak mukozasıdır. Tanı konulan yaş, ortalama 22 olmak üzere 3 ile 70 arasında değişmektedir (28). Lezyonlar, sağlam mukozanın altında uzanan, sert, hassas olmayan nodüller olarak ortaya çıkar. Tanı, eksize edilen kistlerin mikroskopik incelenmesi ile doğrulanır. Tipik olarak, ince, yoğun, lifli bir bağ dokusu kapsülü bir larva formu içeren kistik boşluğu çevreler (29).

Sistiserkoz yaygın olarak Afrika, Hindistan, Latin Amerika, Doğu Avrupa ve Güney Amerika'da görülmektedir. Göç ve seyahat arttıkça, Amerika Birleşik Devletleri, Birleşik Krallık ve İskandinav ülkelerindeki sistiserkoz raporları artmıştır. Oral sistiserkoz vaka raporlarında da benzer bir artış beklenebilir (5).

#### Ekinokokkoz (Kistik Hidatik)

Kistik ekinokokkoz, *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*)'un larval formlarının neden olduğu, insan, koyun, keçi ve sığır gibi çiftlik hayvanlarında görülen zoonotik bir enfeksiyondur. *E. granulosus*'un esas konağı olan köpeklerin dışkı ile atılan yumurtalar enfeksiyonun asıl kaynağıdır. İnce bağırsakta bulunan yumurtalar bağırsak duvarını geçip dolaşıma girerek vücutta taşınır. Larvalar dokularda hidatik kistlere dönüşür ve daha sonra boyut artmaya devam eder. *E. granulosus*'un yaşam döngüsü esas olarak koyun ve sığır gibi çiftlik hayvanları ile köpekler arasındadır ancak insanlar da ara konak olarak döngüde yer alır. Kistler uniloküler veya multiloküler olabilir (9, 15). İnsanda dilde, mandibulada, bukkal mukozada ve infratemporal fossada tespit edildiğine dair çalışmalar yayınlanmıştır (31,32).

Klinik olarak iyi sınırlı, yumuşak veya sert, elastik, fluktan, ağrısız şişlikler olarak gözlenmişlerdir. Dili etkileyen kistlerin boyut olarak büyüdükçe yutma, konuşma ve çiğnemede zorluklara neden olduğu bildirilmiştir. Saptanan bu hidatik kistlerin tamamı cerrahi olarak çıkarılıp mikroskopik olarak teşhis edilmiştir (5, 33, 34).

#### Nematodlar

Nematodlar genellikle toprakta ve sulu ortamlarda yaşarlar. Çoğu parazitik nematod, belirli bir konakçıya biyolojik bağımlılık geliştirmiştir. Nematodların neden olduğu insan enfeksiyonları, bir milyardan fazla insanı enfekte eden ve insanlarda en yaygın olanlardır. Çocuklar bu parazitlere özellikle duyarlıdır ve hastalığa yakalanan çocuklarda morbidite yüksektir (15). Oral kavitede görülen nematod enfeksiyonları çok nadirdir. Literatürde bildirilen vakalar *Trichinella*, *Gongylonema* ve *Ascaris* cinslerini içermektedir (5).

#### Trişineloz

Trişineloz, bağırsakta yaşayan *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*)'in neden olduğu, trişinoz olarak da isimlendirilen zoonoz paraziter bir hastalıktır. İnsanlara genellikle çiğ ya da az pişmiş et tüketimi yoluyla bulaşır (35).

Zegarelli ve ark., 40 yaşındaki bir kadında dişsiz maksillaya bitişik, mukobukkal katlantıdan çıkarılan bilateral yumuşak doku tümörlerinin biyopsilerinde kapsüllenmiş *T. spiralis* kalıntılarının bulunduğunu bildirmişlerdir (35).

Curphey, sağ posterior alveolar sırtta tekrarlayan şişlikler görülen 48 yaşındaki dişsiz bir erkek hastada, sklerotik kemikle çevrili radyografik görünüm tespit etmişlerdir. Yapılan biyopside *T. spiralis* olarak teşhis edilen hiyalin sarmal bantları bulunmuştur (36).

Hansen ve Allard 8 yaşındaki bir erkek ve 44 yaşındaki bir kadının bukkal mukoza biyopsilerinde *T. spiralis* olduğunu bulgulamışlardır (37).

Miloro ve Kinney 44 yaşındaki bir erkekte, osteoartrit ve şiddetli dejeneratif eklem tedavisi için bilateral total temporomandibular eklem replasmanlarının ardından çizgili kastaki *T. spiralis*'i göstermişlerdir. Bu parazit ile hastanın eklem rahatsızlığı arasındaki ilişkinin belirlenemediğini ve ağız dokularında *T. spiralis*'in varlığının, larvaların hematojen yayılmasının bir sonucu olabileceğini bildirmişlerdir (38).

Moskow, periodontal hastalığın histopatolojisini incelediği mandibula kesitinde kapsüllü *T. spiralis* tespit etmiştir. Kistlerin milohiyoid kasta yerleştiklerini göstermiştir (39).

Skuamöz hücreli karsinom tedavisi gören hastaların biyopsi örneklerinde *T. spiralis* saptanması üzerine bu helmintin karsinogeneze neden olabileceği konusu gündeme getirilmiştir. Karsinom lezyonlarının dil ve ağız tabanını tuttuğu tespit edilmiş trişinoz ile oral skuamöz hücreli karsinom arasında bir ilişki olabileceği vurgulanmıştır (40).

### Gongylonema

*Gongylonema pulchrum* evcil çiftlik hayvanlarının sindirim sisteminde bulunur ancak insanda da oral dokularda görülmüştür (41-43).

Stiles ve Baker, 18 yaşındaki bir kadının alt dudağında (41), Waite ve Gorrie, 30 yaşındaki bir erkeğin damağında görüldüğünü bildirmişlerdir (42). Burrill ve ark. bir kadın hastada sağ mandibulada bukkal sulkusta hareket eden erişkin formunun bulunduğunu rapor etmiştir (43).

### Ascaris

İnce bağırsağın üst kısmında yaşayan *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*), 30 cm'den fazla büyüyebildiği için genellikle dev bağırsak kurdu olarak adlandırılmaktadır (5). Hiatt, 5 yaşındaki bir çocuğun submental bölgesindeki asemptomatik şişlikte *A. lumbricoides* bulunduğunu bildirmiş ve tiroglossal kanalın bu parazit için giriş yolu olabileceğini belirtmiştir (44).

### TEŞHİS

Ağız boşluğundaki parazitlerin teşhisi genellikle doku kazıntılarının veya biyopsi örneklerinin direkt mikroskopisi tekniğiyle veya özel ortamda kültüründen sonra yapılır. Serolojik tekniklerden tedavisonuçlarının izlenmesinde faydalanılmaktadır. Giemsa Romanovsky yöntemi kullanılarak boyama, teknik olarak basittir, hızlıdır ve tüm karakteristik

hücre organellerinin görüntülenmesini sağlar (45).

Ancak parazitler her zaman morfolojik olarak tanımlanamazlar. Yüksek özgüllükleri ve duyarlılıkları nedeniyle, moleküler araçların yakın gelecekte ana teşhis aracı haline geleceği düşünülmektedir. PCR olarak bilinen moleküler testler de tanıda kullanılmaktadır (46). Bu yöntem, polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonuna benzer, ancak aranan parazitten spesifik bir sekansın bilinmesi bakımından farklıdır. PCR yönteminin özgüllüğünün genellikle %100'e yakın olduğu rapor edilmiştir (46).

Leişmanyaz teşhisinde biyopsi, ince iğne aspirasyonu, giemsa boyama tekniğinden faydalanılır (4).

### TEDAVİ

*Trichomonas* ve *Entamoeba*'nın neden olduğu protozoal enfeksiyonların tedavisinde metronidazol kullanılmaktadır. Oral enfeksiyonlar için bir hafta boyunca günde üç kez 400 mg önerilmektedir. Çocuklara vücut ağırlıklarına bağlı olarak daha düşük bir doz reçete edilir. Özellikle amebiyaz görülen hastalarda daha yüksek dozlar ve daha uzun tedavi süresi gerekli olabilir. Eşlik eden herhangi bir immün yetmezlik sendromu ve ekstraoral enfeksiyon varlığında daha etkin tedavi gerekir. Bu parazitlerin hiçbirine karşı mevcut veya geliştirilmekte olan aşı yoktur (4).

Pentavalent antimonialler leişmanyaz tedavisinde ilk seçenektir. Kutanöz leişmanyaz'a karşı kullanılan en yaygın ilaçlar, parenteral uygulanan sodyum stiboglukonat (Pentostam) ve megluminantimoniat (Glucantime)'tir. Amfoterisin B deoksikolat ve antifungal özelliklere sahip makrolid polien olan Fungizon da tedavi seçeneklerindedir. Lipozomaş amfoterisin B'nin en yüksek tedavi etkinliği olan ilaç olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, özellikle refrakter bölgelerde sıklıkla kullanılmaktadır (47).

## SONUÇ

Vücudun diğer bölgelerine oranla oral kaviteyi etkileyen parazitlerin nispeten az sayıda olduğu bilinmekle beraber, son zamanlarda artan sayıda literatür, oral protozoonların bilinenden daha yaygın görüldüğünü savunmaktadır. Gelişen tanı teknikleriyle, özellikle *T. tenax*'a diş hekimliği uygulamalarında daha sıkça rastlandığı bildirilmiştir. *E. gingivalis*'in bağışıklığı baskılanmış hastalarda daha şiddetli, ilerleyici periodontal hastalığa neden olduğunu gösteren belirteçler vardır. Sistemik parazitler enfeksiyonları arasında, sadece *Leishmania* ağız boşluğunu etkileyen klinik semptomlar oluşturabilir.

Ağız ve burunda granülomatöz büyüme ile dolaylı olarak etkisini gösterir. Tanıda direkt mikroskopi, boyanmış preparatlar, hücre kültürleri ve moleküler araçlar ön plandadır. Son literatürler ışığında serolojik ve moleküler yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir. Lokal etki eden *Trichomonas* ve *Entamoeba* enfeksiyonlarının etkili tedavisinde metronidazol kullanılırken, leişmanyaza ilk seçenek olarak beş değerli antimon bileşikler uygulanır. Ancak maliyetli olmasına karşın hastanede yatış gerektirmemesi nedeniyle lipozomal amfoterasin de seçenekler arasındadır. Oral parazitler konusunda diş hekimleri ve kulak burun boğaz uzmanlarının farkındalığının artırılması önerilir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Monteil, R. Parasitic diseases, in World Workshop on Oral Medicine, Ann Arbor: School of Dentistry, 1993; University of Michigan.
2. Chomicz L, Piekarczyk J, Starościk B, Fiedor P, Piekarczyk B, Wojtowicz AJ, et al. Host--protozoans--bacteria-fungi interrelations in the mouths of patients with systemic illnesses. *Wiadomosci parazytologiczne*, 2001; 47(4): 559-63.
3. Prieto-Prieto J, Calvo A. Microbiological basis of oral infections and sensitivity to antibiotics. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004;9 Suppl:15-8; 11-4.
4. Bergquist R. Parasitic infections affecting the oral cavity. *Periodontol* 2000. 2009; 49:96-105. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00294.x.
5. Stanford TW, Rivera-Hidalgo F. Oral mucosal lesions caused by infective microorganisms. II. Fungi and parasites. *Periodontol* 2000. 1999;21:125-44. doi: 10.1111/j.1600-0757.1999.tb00172.x.
6. Garcia LS, Diagnostic medical parasitology. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*, 2001: p. 274-305.
7. Saygı G, 1998. *Temel Tıbbi Parazitoloji*, Baskı Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas.
8. Kucknoor AS, Mundodi V, Alderete J. Genetic identity and differential gene expression between *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas tenax*. *BMC Microbiol*. 2009; 9:58. doi: 10.1186/1471-2180-9-58.



9. Chejfec G. *Markell & Voge's Medical Parasitology*. 1999.
10. Bisson C, Lec PH, Blique M, Thilly N, Machouart M. Presence of trichomonads in subgingival biofilm of patients with periodontitis: preliminary results. *Parasitol Res*. 2018; 117(12):3767-74. doi: 10.1007/s00436-018-6077-2.
11. Mehr AK, Zarandi A, Anush K. Prevalence of oral *Trichomonas tenax* in periodontal lesions of Down Syndrome in Tabriz, Iran. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(7):ZC88-90. doi: 10.7860/JCDR/2015/14725.6238.
12. Lucht E, Evengård B, Skott J, Pehrson P, Nord CE. *Entamoeba gingivalis* in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with periodontal disease. *Clin Infect Dis*. 1998;27(3):471-3. doi: 10.1086/514709.
13. Bonner M. Medical implication of oral amoebiasis. In 5th European Congress on Tropical Medicine and International Health. 2007.
14. Demir S. Survival strategies of *Leishmania* in hosts. *Türkiye Parazitoloj Derg*. 2019;43(2):83-88. doi: 10.4274/tpd.galenos.2019.6365.
15. Despommier DD, Gwadz RW, Hotez PJ. *Parasitic diseases*. 2012: Springer Science & Business Media.
16. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe*. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97 Suppl 1:3-15. doi: 10.1179/000349803225002499.
17. Abbas K, el Toum IA, el Hassan AM. Oral leishmaniasis associated with kala-azar. A case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;73(5):583-4. doi: 10.1016/0030-4220(92)90103-w.
18. Michiels JF, Monteil RA, Hofman P, Perrin C, Fuzibet JG, Lefichoux Y, Loubière R. Oral leishmaniasis and Kaposi's sarcoma in an AIDS patient. *J Oral Pathol Med*. 1994;23(1):45-6. doi: 10.1111/j.1600-0714.1994.tb00253.x.
19. Sánchez Torres J, Licéaga Escalera C, Lifshitz Oswiecki J. Miasis bucal. Reporte de un caso clínico [Oral myiasis. Report of a clinical case]. *ADM*. 1974; 31(4):33-6.
20. Droma EB, Wilamowski A, Schnur H, Yarom N, Scheuer E, Schwartz E. Oral myiasis: a case report and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103(1):92-6. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.10.075.
21. Bozzo L, Lima IA, de Almeida OP, Scully C. Oral myiasis caused by Sarcophagidae in an extraction wound. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;74(6):733-5. doi: 10.1016/0030-4220(92)90399-b.
22. Felices RR, Ogbureke KU. Oral myiasis: report of case and review of management. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54(2):219-20. doi: 10.1016/s0278-2391(96)90452-8.
23. Zeltser R, Lustmann J. Oral myiasis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1989;18(2):288-9. doi: 10.1016/s0901-5027(89)80150-x.
24. Altıntaş K. Genel parazitoloji. Ed: Altıntaş K, Tıbbi Parazitoloji. MN Medical & Nobel Tıp kitapevleri, İstanbul; 2002.
25. de Almeida OP, Scully C. Oral lesions in the systemic mycoses. *Curr Opin Dent*. 1991;1(4):423-8.
26. Wortman PD. Subcutaneous cysticercosis. *J Am Acad Dermatol*. 1991;25(2 Pt 2):409-14. doi: 10.1016/0190-9622(91)70217-p.
27. Mallett SP. Stomatitis, with taenia saginata. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1957;10(12):1277-80. doi: 10.1016/s0030-4220(57)80026-7.
28. Romero de Leon E, Aguirre A. Oral cysticercosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;79(5):572-7. doi: 10.1016/s1079-2104(05)80098-8.
29. Timoşca G, Gavriliţă L. Cysticercosis of the maxillofacial region. A clinicopathologic study of five cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1974;37(3):390-400. doi: 10.1016/0030-4220(74)90112-1.
30. da Costa JG. Quistos parasitários da boca [Parasitic cysts of the mouth]. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac*. 1965;6(3):99-106. Portuguese.

31. Gracanic S. An unusual case of echinococcus cyst of the tongue. *J Laryngol Otol.* 1963; 77:624-6. doi: 10.1017/s0022215100061089.
32. Shuker S. Hydatid cyst in the maxillofacial region. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994;52(10):1086-9. doi: 10.1016/0278-2391(94)90185-6.
33. Gracanic S. An unusual case of Echinococcus cyst of the tongue. *J Laryngol Otol.* 1963;77:624-6. doi: 10.1017/s0022215100061089.
34. Perl P, Perl T, Goldberg B. Abbreviated case report: hydatid cyst in the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972; 33(4), 579-81. doi: 10.1016/0030-4220(72)90370-2.
35. Zegarelli EV, Kutscher AH, Osipow J. Trichinosis found during examination of oral inflammatory tumor: report of case. *J Oral Surg.* 1965;23(7):655-6.
36. Curphey JE. Trichiniasis of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971;31(1):19-24. doi: 10.1016/0030-4220(71)90028-4.
37. Hansen LS, Allard RH. Encysted parasitic larvae in the mouth. *J Am Dent Assoc.* 1984;108(4):632-6. doi: 10.14219/jada.archive.1984.0379.
38. Miloro M, Kinney LA. Trichinosis of the lateral pterygoid muscle. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78(3):276-7. doi: 10.1016/0030-4220(94)90053-1.
39. Moskow BS. Trichinosis in oral musculature: report of case. *J Am Dent Assoc.* 1973;86(3):663-6. doi: 10.14219/jada.archive.1973.0107.
40. Agwu E, Ihongbe JC, Pazos V, Tirwomwe JF. Zero prevalence of parasites associated with oral lesions of HIV infected and AIDS patients in South Western Uganda. *Afr Health Sci.* 2009;9(4):258-63.
41. Stiles CW, Baker CE. A fifth case of *Gongylonema hominis* in man in The United States. *JAMA.* 1928;91(24):1891-2. doi:10.1001/jama.1928.92700240001013.
42. Waite CH, Gorrie R. A *Gongylonema Infestation* in Man. *JAMA.* 1935;105(1):23-24. doi:10.1001/jama.1935.92760270001008.
43. Burrill DY, Kotcher E, Childers JK. Nematode infestation of the buccal submucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1957; 10(6): 612-3.
44. Hiatt WR. Submandibular swelling of unusual etiology. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969;28(4):610-2. doi: 10.1016/0030-4220(69)90271-0.
45. Vráblic J, Vodrázka J, Tomová S, Staník R, Catár G. Morfológia a diagnostika ústnych prvokov *Trichomonas tenax* a *Entamoeba gingivalis* zafarbených podľa Giemsa-Romanovského [Morphology and diagnosis of the oral protozoans *Trichomonas tenax* and *Entamoeba gingivalis* using the Giemsa-Romanovsky stain]. *Bratisl Lek Listy.* 1998;99(11):567-72. Slovak.
46. Mahmoud MS, Rahman GA. Pulmonary trichomoniasis: improved diagnosis by using polymerase chain reaction targeting *Trichomonas tenax* 18S rRNA gene in sputum specimens. *J Egypt Soc Parasitol.* 2004;34(1):197-211.
47. Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem.* 2007;14(10):1153-69. doi: 10.2174/092986707780362862.

# Türkiye’de kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbı alanında kalite göstergelerinin geliştirilmesi

## Development of quality indicators in the field of blood banking and transfusion medicine in Turkey

Ayşe SAKİOĞLU<sup>1</sup> (ID), Sibel ELDEMİR<sup>2</sup> (ID), İsmail Yaşar AVCI<sup>3</sup> (ID)

### ÖZET

Dünya Sağlık Örgütü’nün “Güvenli kan benimle başlar” sloganı ile başlattığı çalışmalar sonucu, kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbında kalite anlayışı daha belirgin hissedilmeye başlanmıştır. Ülkemizde ise “Güvenli kan temin projesi” ile transfüzyon tıbbında kalite çalışmaları hız kazanmıştır. Kan hizmet birimleri için kalite “yaptığını yaz, yazdığını yap” anlayışının ötesine geçerek, güvenli kan temini sürecinin bir parçası haline gelmiştir. Kalite yönetim sistemi anlayışının, varlığını daha yoğun hissettirmesi, kan hizmet birimleri için, kalite yönetim sisteminin olumlu katkılarının somut göstergelerle ifade edilmesi ihtiyacını oluşturmuştur. Oluşturulacak kalite göstergeleri ile transfüzyon tıbbındaki süreçlerin izlenmesi, hedeflenen somut kanıtlar olabilir. Kan hizmet birimlerinin performanslarının değerlendirilmesi ve kıyaslanabilmesi için de kalite göstergeleri önemlidir. Ulusal ve uluslararası düzeyde, transfüzyon tıbbında kalite göstergeleri oluşturulmasına yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda, özellikle transfüzyon merkezleri için kalite göstergelerine çok az değinilmiştir. Ulusal düzeyde de transfüzyon merkezlerine yönelik standardize edilmiş kalite göstergeleri bulunmamaktadır. Yazımızda,

### ABSTRACT

As a result of the work initiated by the World Health Organization with the slogan “Safe blood begins with me”, the understanding of quality in blood banking and transfusion medicine has begun to be felt more clearly. In our country, quality studies in transfusion medicine gained momentum with the “Safe blood supply project”. For blood service units, quality has gone beyond the understanding of “write what you do, do what you write” and become a part of the safe blood supply process. The fact that the understanding of the quality management system made its presence felt more intensely created the need for blood service units to express the positive contributions of the quality management system with concrete indicators. Monitoring the processes in transfusion medicine with the quality indicators to be established can be the targeted concrete evidence. Quality indicators are also important for evaluating and comparing the performances of blood service units. There are various studies on establishing quality indicators in transfusion medicine at national and international level. However, quality indicators for transfusion centers were barely mentioned in these studies. There are no standardized quality indicators for transfusion centers at the national level. In our article,

<sup>1</sup>Türk Kızılay İç Anadolu Bölge Kan Merkezi, Kayseri

<sup>2</sup>Türk Kızılay Kan Hizmetleri Genel Müdürlüğü Kalite ve Stratejik Yönetim Direktörlüğü, Ankara

<sup>3</sup>Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı AD, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Ayşe SAKİOĞLU

İç Anadolu Bölge Kan Merkezi Müdürlüğü, Talas Yolu 38070 Melikgazi, Kayseri - Türkiye

E-posta / E-mail : ayse.sakioğlu@kizilay.org.tr

Geliş Tarihi / Received : 18.08.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 09.02.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.62444

Sakioğlu A, Eldemir S, Avcı İY. Türkiye’de kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbı alanında kalite göstergelerinin geliştirilmesi. Turk Hij Den Biol Derg, 2021; 79(2): 321 - 332

Türkiye kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbında kalite göstergelerinde hissedilen eksiklikleri değerlendirdik. Uluslararası ve ulusal çalışmalardan yararlanarak örnek kalite göstergeleri geliştirdik. İlerleyen süreçte daha kapsamlı çalışmalar yapılarak, yetkili otorite tarafından onaylanmış, standardize edilmiş kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbı kalite göstergelerinin oluşturulacağı kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Kalite, gösterge, kan bankacılığı, transfüzyon tıbbı

we evaluated the deficiencies in quality indicators in blood banking and transfusion medicine in Turkey. We have developed exemplary quality indicators by making use of international and national studies. We believe that in the future, more comprehensive studies will be carried out and standardized blood banking and transfusion medicine quality indicators approved by the competent authority will be established.

**Key Words:** Quality, indicator, blood banking, transfusion medicine

## GİRİŞ

Ülkemizde 2003 yılında ortaya konan Sağlıkta Dönüşüm Programı içinde yer alan “Nitelikli ve Etkili Sağlık Hizmetleri İçin Kalite ve Akreditasyon” bileşeni ile ivme kazanan kalite anlayışı; sağlık alanında standartların belirlendiği, uygulandığı ve değerlendirildiği bir sistem oluşumu yanında sağlıkta akreditasyon alt yapısının da oluşumunu sağlamıştır (1). Güvenli Kan Sloganı ile Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün 2000 yılında başlattığı çalışmanın ülkemizdeki yansıması olan, 2005 yılı “Güvenli Kan Temin Projesi” ile ülkemizde başlatılan güvenli kan temini hedefi, kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbı içerisinde de kalite kavramının oluşumu ve gelişimine hız katarken, kan hizmet birimleri açısından kalite “yaptığını yaz, yazdığını yap” anlayışının ötesine geçerek güvenli kan temini sürecinin bir parçası haline gelmiştir (2- 4).

Kalite yönetim sistemi anlayışının kan bankacılığındaki varlığını yoğun hissettirmesi zaman içerisinde paydaşlar tarafından kalite yönetim

sisteminin olumlu katkılarının somut göstergelerle ifade edilmesi ihtiyacını oluşturmuştur. Bu bağlamda kalite göstergeleri ihtiyaç duyulan somut kanıtları sağlamakla kalmayıp, elde edilen verilerle iyileştirme çalışmalarına yol gösteren kalite yönetim sistemi araçları olmuştur. Ulusal ve uluslararası boyutta kalite göstergelerini oluşturmak için çeşitli kuruluşlar tarafından çalışmalar organize edilmiş; Sağlık Hizmetleri Araştırma ve Kalite Ajansı (AHRQ), Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) ve Amerikan Patologlar Koleji (CAP) gibi seçkin kuruluşlar tarafından dikkate değer katkılar sağlanmıştır (5). Ne yazık ki bu çabalar içerisinde, transfüzyon merkezi için kalite göstergelerine çok seyrek bir şekilde değinilmiştir (5). Avrupa’da kan bankacılığı uygulamalarında standardın yakalanabilmesi amacıyla, iyi uygulamaların tanımlanması ve yaygınlaştırılması görevi Avrupa Konseyi’nin Avrupa İlaç ve Sağlık Hizmetleri Kalite Müdürlüğü (EDQM) tarafından yürütülmektedir. Uluslararası Kan Transfüzyon Derneği (ISBT), Kalite Yönetim Çalışma Grubu tarafından bu ihtiyacı karşılama

amaçlı çalışmalar temel alınarak EDQM tarafından “Kan ve Kan Bileşenlerinin Optimal Kullanımının Değerlendirilmesi ve İzlenmesine dair Kalite Göstergeleri Projesi” başlatılmıştır. Proje Transfüzyon Tıbbı kalite göstergelerinin uyarlanmasında tek platform olmayı hedefleyen çalışma neticesinde anket yöntemi ile tüm Avrupa Birliği ülkelerinden kalitenin izlenmesi süreçlerine yönelik bilgi toplanmıştır. Derlenen bilgilerin değerlendirilmesine istinaden Avrupa Kan Transfüzyonu Komitesi ve Avrupa Komisyonu tarafından 2005/ 62/ EC sayılı Direktife Uygun Olması Ön Görülen Kan Kuruluşuna İlişkin İyi Uygulama Kılavuzu oluşturulmuştur (6). ISBT Kalite Yönetimi Çalışma Grubu tarafından yapılan çalışmalar ile transfüzyon tıbbına ilişkin kalite göstergeleri geliştirilmiştir (7). Küresel bağlamda başlatılan bu çalışmalar henüz ülke düzeyinde yeterli seviyede ele alınmamıştır. Kalite yönetim sisteminin ana unsurları olan çeşitli faaliyetler gerçekleştirilirken WHO hedefleri, uluslararası gelişmeler, ülke sağlık sisteminin yapısı, ihtiyaç ve öncelikleri temel alınmaktadır (8). Sağlıkta kalitenin geliştirilmesi ve değerlendirilmesine yönelik 27 Haziran 2015 tarihinde çıkarılan “Sağlıkta Kalitenin Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesine Dair Yönetmelik” ile sağlık kurum ve kuruluşlarında kaliteli hizmet sunumunun sağlanması, hasta güvenliği, çalışan güvenliği, hasta memnuniyeti ve çalışan memnuniyetini esas alan sağlıkta kalite standartları ile bu standartların uygulanmasına ilişkin usul ve esaslar düzenlenmiştir (9, 10). Ülkemizde, kan tedarik sistemine yönelik ilgili mevcut düzenlemeler ise Avrupa Birliği Ortak Pozisyonu “Tüketicinin ve Sağlığının Korunması” başlıklı 28. faslın kapanış kriterlerin de de yer alan 2002/ 98/ EC sayılı ana direktif kapsamında yapılmıştır. Güvenli kan ve kan bileşeni tedariki ve izlenebilirliği başta olmak üzere, teknik alt yapı, personel ve uygulamalara yönelik düzenlemelerin güncellenmesi ve varsa aksayan yönlerin tespiti amacıyla 27 Şubat 2012 ve 26 Şubat 2014 tarihleri arasında Avrupa Birliği destekli “Kan Tedarik Sisteminin Güçlendirilmesi Teknik Destek Projesi” yürütülmüştür. Ülkemizde kan

ve kan bileşenleri tedarikinden sorumlu kuruluş olan Türk Kızılay da söz konusu projenin eş yararlanıcısı olmuştur. Proje kapsamında kan ve kan bileşenlerinin izlenebilirliği, hizmet ve ürün standartları, kalite güvencesi, idari ve teknik personele yönelik kapasite geliştirme faaliyetleri ve klinik hekimlerine yönelik kanın uygun klinik kullanımı eğitimi dâhil pek çok alanda eğitimler düzenlenmiştir (11). Bu proje kapsamında Kan Hizmet Birimleri için Kalite Yönetim Sistemi Rehberi oluşturulmuştur. Rehberde kalite, “bir ürünün ifade edilen veya beklenen ihtiyaçları karşılama kabiliyetini oluşturan özelliklerin toplamıdır.” şeklinde belirtilerek, kan hizmet birimlerinden kaliteye yönelik beklentiler de ilgili rehber de tanımlanmıştır (11).

Etkili bir kalite yönetim sistemi için, kan bağış ve transfüzyon sürecinin bütün basamaklarının, risk temelli düşünülerek planlanan kalite izlemleri ile takip edilmesi ve uygun değerlendirmeler ile sürekli iyileşmenin sağlanması gerekmektedir. Transfüzyon tıbbında sağlıklı bireyden bağış ile ürünün alınması, karmaşık bağışçı seçimi, rutin test algoritması, bileşenin hazırlanma, dağıtım ve klinik kullanımında gerçekleştirilen kritik süreçlerin kabul kriterlerinin Kan Hizmet Birimleri için Ulusal Standartlar Rehberi Bileşen Monograflarında tanımlanmış spesifikasyonlara dayandırılması gerekmektedir (6). Kalite risk yönetimi çerçevesinde ürün çeşitliliği göz önüne alındığında ürün ve hizmetlerin kalitesi ve güvenliği sağlanırken kaynakların rasyonel yönetiminin güvence altına alınabilmesi için kalite izlemenin önemi ve zorluğu daha iyi anlaşılmaktadır. Kaliteyi ölçerek mevcut kalite düzeyini değerlendirmek, amaç olarak uygun ve optimal bir kalite yönetim sistemine sahip olmayı amaçlarken beraberinde ürün ve hizmet kalitesindeki artışı, olumsuz durumların ve israfın azalmasını, tasarruf ve kaynakların akıllıca dağıtımını, bütün bunların sonucunda da müşteri memnuniyetini beraberinde getirecektir (12).

Kalitenin izlenmesi de, ancak elde edilen verilerin doğru analizleri ile mümkün olacaktır. Veri toplama; kalite kontrol süreci ve kalite göstergelerinin birlikte

değerlendirilmesi ile sağlanabilir. Kalite kontrol süreci ile kan bileşenlerinin uygunluğu takip edilirken, kalite göstergeleri ile kalite yönetim sürecinin tüm basamaklarının doğru işleyişi değerlendirilebilir (12). Kan Hizmet Birimleri için Ulusal Standartlar Rehberi ile kan hizmet birimlerinde kalite kontrol sürecinin, kontrol edilecek parametreler, test sıklığı ve karşılanması gereken gereksinimler gibi kriterlerin oluşturulduğu görülmektedir (13). Ancak ürün odaklı yapılan kalite kontrol süreci dışında, transfüzyonun tüm basamaklarına yönelik kalite göstergelerinin oluşturulması gerekmektedir. Tüm sürece yönelik kalite göstergelerinin oluşturulması ve değerlendirilmesi, ulusal ve uluslararası işleyiş ve veri paylaşımları açısından da değerlidir.

Uluslararası çalışmalar incelendiğinde; İspanyol Yoğun ve Kritik Bakım Tıbbi ve Koroner Üniteler Derneği (SEMICYUC) tarafından kritik hastalar için kalite göstergeleri, yayımlandığı tarih itibarıyla ABD Sağlık Araştırma ve Kalite Ajansı' nın Ulusal Kalite Ölçüleri Kıyaslama Listesi' ne dahil edilmiştir. Transfüzyon tıbbına dair göstergeler Kan Ürünleri başlığı altında tanımlanmaktadır (14). Geçen süre zarfında yapılan analizlerde transfüzyon reaksiyonları ile çok seyrek karşılaşılmasından dolayı ilgili performans göstergeleri Ulusal Kalite Ölçüleri Kıyaslama Listesinden çıkarılmıştır (15).

ISBT Kalite Yönetim ve Çalışma Gurubunun Kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbi kalite göstergeleri ile ilgili çalışmaları bulunmaktadır ve bu çalışmalarda kalite göstergeleri yedi ana başlık (bağışçı seçimi ve danışmanlığı, kan toplama, kan bileşeni hazırlama, kan bileşeni depolama ve dağıtım, bağışçı ve ürün testleri, kalite yönetimi, klinik servis) ve alt kısımları şeklinde oluşturulmuştur (7). Bu göstergelerden klinik servis ana başlığı altında transfüzyon merkezlerine ait kalite göstergeleri standardize edilmeye çalışılmıştır.

Ülkemiz düzeyinde baktığımızda, kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbi kalite anlayışına yönelik ciddi gelişmeler olmuştur. Ancak özellikle transfüzyon merkezi düzeyinde kalite göstergeleri yönünden bir eksiklik hissedilmektedir.

Ülkemizde kan hizmet birimleri; bünyesinde barındırdığı Kan Bağış Merkezleri (KBM) aracılığıyla, sağlıklı bireyden kan bağışının kabulü, bileşenlerine ayırıştırıp rutin zorunlu testleri sonrası hastanelere transferini sağlayan Bölge Kan Merkezleri (BKM) ile kanın klinik kullanımı amaçlı transfüzyon öncesi uygunluk testlerinin yapılarak kliniklere transferinden sorumlu Transfüzyon Merkezleri (TM)'nden oluşmaktadır (16).

Kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbında, paydaş iki ana alanda oluşturulmuş kalite göstergelerine baktığımızda, BKM'de, kan bağışçısı güvenliği, hasta güvenliği, sistem güvenliği ve çalışan güvenliği göstergeleri şeklinde dört ana başlık ve alt kısımları olarak oluşturulmuş sistematik kalite göstergeleri ve bu göstergeler kapsamında oluşturulan düzenli veri toplama ve iyileştirme çalışmaları bulunmaktadır (17). TM bazında baktığımızda ise sistematik, standardize edilmiş bir kalite gösterge sisteminin eksikliği hissedilmektedir. Sağlık Bakanlığı Sağlıkta Kalite Standartları- Hastane 2020 ile, hastanelerde transfüzyon hizmetleri için ayrıntılı standartlar oluşturulmasına rağmen Sağlık Bakanlığı Sağlıkta Kalite Standartları Gösterge Yönetimi Rehberinde transfüzyon hizmetleri için yer alan tek gösterge "imha edilen kan ve kan bileşeni oranı" olarak yer almaktadır (8, 18). Transfüzyon merkezlerinin sadece imha sayı verilerinin takibi konusunda zorunlu tutulmasının sebebi rehberde tek bir kalite göstergesinin yer alması olabilir. Ancak transfüzyon sürecinin önemi düşünüldüğünde, bu tek veri çok yetersiz kalmaktadır. Ulusal ve uluslararası bilgi paylaşımları da göz önüne alındığında da bu alanda da bir standardizasyonun sağlanması gerekmektedir.

Ulusal düzeyde hissedilen bu eksiklik nedeni, makalemizde tüm kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbi sürecini içeren örnek kalite göstergeleri geliştirdik. Bu göstergelerin güvenli kan temini açısından anlam ve önemine değindik.

Kalite göstergelerini iki alana yönelik geliştirdik. Bu iki alanda, bileşen temini ve transfüzyon süreçlerini ayrı başlıklar altında inceleysek de aslında iki süreç

çok ince çizgi ile birbirinden ayrılan, ortak paydaları olan, birbirinin devamı şeklindeki süreçlerdir. Bu nedenle de iletişimin, bilgi aktarımının, bu alanlar arasında çok kuvvetli olarak oluşturulması, kalite göstergelerinin doğru analizi için ayrı bir önem arz edecektir.

Kalite göstergeleri belirlenirken BKM'ler, fonksiyonel birimlerine göre değerlendirilmiştir (13). TM'de bu süreç üç ana başlık altında toplanmıştır: TM ile BKM iletişiminin olduğu kan bileşenlerinin temin edildiği süreç, TM'nin kendi iç işleyişinden oluşan süreç ve TM ile klinik birimlerin iletişimi ile oluşan süreç (19). Bu süreçlere ek olarak hemovijilans, çalışan güvenliği ve kalite yönetimi TM için de ayrı başlık altında değerlendirilmiştir. Kalite göstergeleri bu süreçlerde belirlenen kritik noktalara göre oluşturulmuştur.

### Bileşen Temin Süreci

#### • Bağışçı Seçimi / Kan Bağış Toplama

- Planlanan kan bağışı hedefi gerçekleştirme oranı
- İlk defa kan bağışı yapan bağışçı oranı
- Düzenli kan bağışçısı oranı
- Ekip kan bağış oranı
- Sabit birim kan bağış oranı
- Uygunsuz / eksik kan bağışına esas form doldurulması oranı
- Kesin ret oranı / Geçici şartlı ret oranı
- Kesin ret / Geçici şartlı ret iptal oranı
- Yetersiz hacim kan bağış oranı

Kan bileşeni stoklarının doğru yönetilebilmesi ve yetersiz olma ihtimali olan dönemlerin önceden değerlendirilebilmesi için kan bağış hedeflerinin önceden planlanarak bu hedeflerin ne kadar gerçekleştirilebildiği analiz edilmelidir (20). Bağışçı seçiminde sürecin devamlılığı için ilk bağışçı kazanımları önem arz eder, ancak bir yandan da güvenlik ve materyal planlama açısından da düzenli bağışçı oranının yükseltilmesi önemlidir. Kan bağış alanı olarak, ekip usulü kan alımındaki ekonomik yük düşünüldüğünde, sabit alanlarda kan bağışını

artırma çalışmalarının planlanabilmesi için ekip ve sabit alan bağış oranlarının takip edilmesi gerekmektedir (21, 22). Kan bağışçısı sorgulama formu, onam formu gibi kan bağışına esas formların eksiksiz doldurulması kan güvenliği ve oluşabilecek hukuki süreçler açısından önemlidir. Eksik yada hatalı doldurulmuş form oranlarının takip edilerek, iyileştirici faaliyetler planlanmalıdır. Bağışçı kesin ret ve geçici ret kayıtlarının takibi ile kaybedilen bağışçı sayısı, ret iptalleri ile de geri kazanılan bağışçı sayısı hakkında elde edilecek veriler, kan bağış hedef planlamaları için önemlidir. Damar problemi veya reaksiyon gibi nedenlerle kan bağış sürecinin tamamlanamadığı durumlarda torbada yetersiz hacimde kan bulunmaktadır ve bu kan ürünleri kullanılmamaktadır. Yetersiz hacimde kan bağış oranlarının bilinmesi ekipman, zaman israfı açısından bir ön değerlendirme yapılabilmesini sağlayacaktır. Bu oranların azaltılması için alınabilecek tedbirler ve çalışmalar için de yönlendirici kriterlerdir.

#### • Alınan Tam Kan ve Tüplerin Nakli, Testler

- Uygunsuz tam kan ve numune tüpü transfer oranı
- Test laboratuvarında reddedilen numune sayısı
- Test laboratuvarında tekrar istenen numune sayısı
- / Tekrarlanan test sayısı
- Zamanında verilmeyen laboratuvar test sonucu
- Dış kalite değerlendirme çalışmaları uygunsuzluk oranı

DSÖ'nün yayımladığı ve AB direktiflerinin doğrudan atıfta bulunduğu İyi Üretim Uygulamaları (GMP) Rehberinin laboratuvar standartları, WHO Salgın Hastalıklar Laboratuvar Standartları Rehberinin 53. Standard Maddesinden esinlenerek hazırlanmış olup ilgi madde ISO 15189 standardına atıfta bulunmaktadır. ISO 15189 Standardının temel amacı medikal laboratuvarların akredite edilerek test sonuçlarının hasta, kan bağışçısı ve sağlık personeli nezdinde güvence altına alınmasını sağlamaktır.

Direktifle uyumlu olarak hazırlanan ulusal standartlar doğrultusunda, hasta güvenliği açısından

gerekli olan güvenilir kan bileşeninin sağlanabilmesi için, toplanan tam kanların ve ilgili kanların test tüplerinin uygun şartlarda, sürede transferi önemlidir (13). Tüplerin ilgili laboratuvarlara gönderim süresi ile test sonuçlarının geri bildiriminin uygun süre içerisinde yapılmasının göstergeler ile takibi, ilgili kanların kullanım süreleri içerisinde hastanelere transferi açısından önemli ve takip edilmesi gereken verilerdir.

Laboratuvarlar da reddedilen uygunsuz numune, tekrarlanan numune istemleri ve test tekrarları da, göstergeler ile takip edilerek hatalara yönelik iyileştirme çalışmaları planlanmalıdır.

Numune kabulünden test sonuçlarının rapor edilmesine kadar tüm laboratuvar analitik süreçlerin, dış kalite programlarıyla, uluslararası ölçekte değerlendirilmesi ile sürecin etkinliğinin güvence altına alınması sağlanmalıdır (16).

#### • Kanın Bileşenlerine Ayrıştırılması

İmha olan tam kan oranı

Üretim İndeksi

Bileşen ayrıştırma işlemi sonrası imha oranları

Üretilen ve imha edilen kan bileşenlerinin oranının takibi hem kan toplama hedefleri için veri oluştururken hem de imha nedenleri alt kırılımları analiz edilerek imhaya sebebiyet veren uygunsuzlukların tespitini ve bunlara yönelik yapılabilecek önleme çalışmaları için bir öngörü oluşturulmasını sağlayacaktır. Üretilen ürün çeşitliliği hastanelerin talepleriyle orantılı olarak değişeceği için, her kan birim merkezinin kendi özel üretim indeksini oluşturması gerekecektir.

#### • Kan Bileşenlerinin Depo ve Dağıtım

Uygunsuz saklama koşulları nedeniyle imha oranı

Miat dolumu nedeniyle imha oranı

İade alınan kan bileşenleri oranı

Soğuk zincir transfer takip bildirim uygunsuzluk oranı

Transfüzyon merkezleri kan bileşeni taleplerinin karşılanma oranı

Ulusal kan bileşeni ihtiyaç ve transfüzyon merkezleri kan bileşeni taleplerinin karşılanma oranı, planlanacak kan bağış hedefleri için önemli kriterlerdendir. Miat dolumu nedeniyle imhaların izlenmesi kan bağış planlamalarındaki takvimsel hataların analizi ve önleme çalışmaları için değerlidir. Uygunsuz saklama koşulları nedeniyle imhaların analizi de depolama kapasitesi - toplanan bağış oranı - talep edilen kan bileşeni oranı arası dengenin sağlanması açısından önemlidir. Depo kapasitesine yönelik çalışmalar için öngörü oluşturacaktır. Uygunsuz saklama koşulları, soğuk zincir uygunsuzlukları mevcutsa hatalara yönelik önlemlerin planlanmasını sağlayacak veriler olacaktır. Kan bileşenleri iade oranlarının bilinerek bunların alt başlıklarının değerlendirilmesi de hataya sebebiyet olan alanların gözlemlenmesini ve gerekli önleme çalışmalarının yapılabilmesini sağlayacaktır.

#### • Hemovijilans Süreci

Hemovijilans kapsamında iade alınan bileşen oranı

Başlatılan istenmeyen olay ve doğrulanmış istenmeyen olay oranı

Başlatılan ve doğrulanan kan güvenliği tehdit eden durum oranı

Tüp torba karışıklığı oranı/ hatalı barkod oranı

Kan bağışı ile ilişkili istenmeyen reaksiyon oranı

Kan bağışçısında düşme yaralanma oranı

Hemovijilans kapsamında takip edilen kan bağışı ile ilişkili istenmeyen reaksiyonlar ve bunun sonucunda gelişen düşme, yaralanma oranlarının takibi, bu durumun gerçekleşme nedenlerinin analizini ve nedenlere yönelik iyileştirici faaliyetlerin oluşturulmasını sağlayacaktır (23). İstenmeyen olayların, kan güvenliğini tehdit eden durumların, hemovijilans kapsamında iade alınan bileşenlerin takipleri, hem kan bağış hedef planlarının oluşturulmasındaki kaybedilebilecek bağış miktarı açısından bir gösterge olurken hem de güvenli kan temini için risk olan alanların değerlendirilmesini



sağlayacaktır. Değerlendirmeler sonucuna göre de gerekli iyileştirme çalışmaları planlanacaktır.

#### • Kalite Yönetim Süreci

Bağışçı memnuniyet oranı

Transfüzyon merkezi memnuniyet oranı

Başlatılan düzeltici önleyici faaliyet oranı

Zamanında tamamlanmayan düzeltici önleyici faaliyet oranı

Zamanında değerlendirilmeyen iç denetim bulguları oranı

Genel anlamda kalite uzun süre müşteri memnuniyeti olarak değerlendirilmiştir (4). Her ne kadar kan bankacılığı ve transfüzyon sürecinde kalite bu kadar dar kapsamlı ele alınmasa da, müşteri memnuniyeti ve bunun ölçülmesi kalite sisteminin ne kadar doğru işletildiğinin önemli bir göstergesidir. Bu nedenle süreç içerisinde iletişim kurulan kurum ve şahısların memnuniyetlerinin kalite göstergeleri içerisinde değerlendirilmesi önemlidir. Kalite yönetim süreci içerisinde başlatılan düzeltici önleyici faaliyetlerin değerlendirilmesindeki ana hedef, hatanın ya da hata ihtimali olan alanların analiz edilerek bunların ortadan kaldırılması için kök nedenlerin tespit edilmesi ve tekrarını engelleyecek şekilde gerekli önlemlerin alınmasına yönelik veri oluşturmaktır. O yüzden bu kriterlerdeki sapmaların zamanında ele alınması, tekrarını engelleyecek şekilde başlatılan düzeltici önleyici faaliyetlerin işleyişi, belirlenen kök neden analizinin doğruluğunun değerlendirilmesi ve alınan aksiyonun etkinliğinin yerinde doğrulanarak sonuçlandırılması süreç için çok önemlidir.

#### • Biyomedikal Süreci

Kalibrasyonu geçmiş cihaz oranı

Zamanında tamamlanmayan ekipman kalifikasyon oranı

Kan bağış sürecinin gerçekleştirilmesinde güvenli

kan için önemli kriterlerden biri de sürecin doğru ölçümlerle işletilmesidir. Bu nedenle her alanda kullanılan cihazların kalibrasyon zamanlarının planlanması ve bu plana uygunluğun takip edilmesi, kalifikasyon çalışmalarının etkinliğinin izlenip değerlendirilmesi kapsamında iyileşmeye açık alanların tespit edilerek ortadan kaldırılması önemlidir.

#### • Çalışan Güvenliği

Çalışanın yaralanması ve kanla temas oranı

Güvenli bir sürecin işletilmesi çalışan güvenliğinin sağlanması ile pekişir. Her ne kadar bazı durumlarda söz konusu göstergeler ile kan ürününün güvenliği arasında doğrudan bir bağlantı görülemese de, kalitenin sürdürülmesinde, performansın izlenmesinde, alıcı, bağışçı ve personelin emniyet ve bütünlüğünün sağlanmasında göstergelerin sahip olduğu önemli roller vardır (19). Bu bağlamda çalışan güvenliğine yönelik kalite göstergeleri kan ürünü güvenliği açısından doğrudan ilişkili olmasa da, kalitenin sürdürülebilirliği açısından önemlidir. Çalışanlarda yaralanma ve kanla temas oranlarının takibi hem bu durumların minimize edilmesi için gerekli önlemlerin alınması ve güncellenmesini hem de konunun hassasiyeti konusunda çalışanda farkındalık oluşturacak eğitimlerin planlanmasını sağlayacaktır (8).

#### Bileşen Hazırlama ve Transfüzyon Süreci

##### • Bölge Kan Merkezi - Transfüzyon Merkezi Düzeyi

BKM'den talep edilen ve alınan kan bileşenleri sayısı

TM planlanan kritik stok seviyesi hata oranı

Uyumsuzluk nedenli iade edilen bileşen oranı

Acil durumda BKM'den talep edilen kan bağışı alımı için onam oranı

Bu göstergeler kritik stok seviyesinin doğru planlanması, dolayısıyla bileşen israfının önlenmesi

açısından çok önemlidir (16). Uygunsuzluk nedenli iadelerin takibi hem stok seviyesi planlamada kaybedilen kan miktarı açısından öngörü oluştururken hem de TM'nin iletişimde olduğu paydaşı BKM tarafından üretim süreçlerinin değerlendirilip sürekli iyileştirmenin güvence altına alınması adına ortak bir veri olarak değerlendirilebilir. Acil durumlarda, TM stoklarında, hasta için uygun kan bileşeni olmadığında O Rh Negatif eritrosit konsantrisi ve AB plazma kullanımını ya da bağlı BKM'den onay alarak hasta kan grubu ile uyumlu kan bağışının TM'de alınması yollarını tercih edilebilir (16). İlgili süreçte yapılacak olan tercihe göre oluşacak olan istatistiksel verilerin gösterge olarak değerlendirilmesi acil durumlarda karşılaşma sıklığı hakkında bilgi verirken yanı sıra bu durumların en aza indirilebilmesi adına kritik stok seviyelerinin doğru şekilde oluşturulması sürecinde alınabilecek tedbirler açısından da önem arz eder.

#### • Transfüzyon Merkezi Düzeyi

Transfüzyon komitesi eksik toplanma oranı

TM'de gerçekleştirilen kan bağış oranı

Uygunsuz / eksik kan bağışına esas form doldurulması oranı

Kesin ret / geçici, şartlı ret oranı

Kesin ret / geçici şartlı ret iptal oranı

Dış kalite değerlendirme çalışmaları uygunsuzluk oranı

Birime giren bileşen oranı

Miat nedenli imha edilen bileşen oranı

Diğer nedenlerle imha edilen bileşen oranı

Hastanelerde transfüzyon pratiğinin tüm yönleri transfüzyon komiteleri tarafından değerlendirilmekte ve denetlenmektedir (19,23). Transfüzyon komitelerinin yılda en az dört kere toplanması Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün 2004/ 66 sayılı genelgesi ile belirtilmiştir. Transfüzyon komitelerinin etkin biçimde işletilmesi transfüzyon tıbbının klinik süreçlerinin takibi açısından önemlidir. Bu nedenle transfüzyon komitelerinin toplanma sayısı ve etkinliği kalite göstergelerince takip edilmelidir.

Bileşen girdi, çıktı ve imha kayıtlarının göstergelerle takibi de stok seviyelerinin doğru belirlenebilmesi için önemlidir (8). Bu verilerin tüm bileşen türleri için ayrı başlık altında değerlendirilmesi kullanılan bileşen sıklığının değerlendirilerek stok seviyesi oluşturulmasını sağlayacaktır.

Transfüzyon merkezlerinin acil durumlarda BKM'den aldığı kan bağış kabul onay miktarının bilinmesi ve bu onay sonrası TM'de gerçekleştirilen kan bağış kabul sürecinin ne kadar sıklıkta yaşandığı da yine hedeflenen kan stok yönetimi açısından değerlidir (16). Bu bağlamda daha önceki BKM - TM iletişim sürecinde ele alınan "Acil durumda BKM' den talep edilen kan bağış alım onam oranı" maddesi ile bu madde ortak olarak değerlendirilebilir. Ancak bunu yaparken TM' de acil durumlar dışında kan bağış kabulünün yapılmadığından emin olunmalıdır.

Transfüzyon merkezlerinin, rutin kan bağış kabul alanı olarak çalışıyorsa, bu sürece yönelik bağışçı formlarının eksiksiz doldurulması, retler, bağışçı kayıp ve kazanımları gibi verilerin değerlendirilmesi gerekmektedir.

#### • Transfüzyon Merkezi - Klinik Düzeyi

Kliniklerden rutin kan bileşeni istek oranı

Kliniklerden acil kan bileşeni istek oranı

Kliniklerden gelen kan istem evrağı eksik / hatalı doldurma oranı

Çapraz karşılaştırma / transfüzyon sayısı oranı

Klinikden uygunsuz numune gönderim oranı

Kliniklerde imha edilen bileşen oranı

Kliniklerden TM'ye uygun iade edilen bileşen oranı

Kliniklerden TM'ye uygunsuz geri iade edilen bileşen oranı

Acil durumda kliniklere gönderilen O Rh Negatif eritrosit konsantrisi oranı

Uygunsuz transfüzyon oranı

Transfüzyon merkezinin diğer paydaşı klinikler, servis çeşitliliği ve sağlık çalışanı personel sayısının fazlalığı düşünüldüğünde kontrol mekanizmasının en zor olduğu alandır.

Kan ve kan bileşenlerinin kliniklerde, uygun endikasyonlarda doğru kan bileşenlerinin kullanımı kan hizmet birimlerinin verimli çalışması için esastır. Bağışa dayalı elde edilmesi ve seçim kriterleri düşünüldüğünde kritik ve krize açık bir kaynak olan kan ve kan bileşenlerinin makul bir şekilde kullanılması ve kullanım uygunluğunun takip edilmesi gereklidir. Klinikler tarafından aşırı ve uygunsuz endikasyonlarda kan transfüzyonlarının önlenmesi için kan ve kan bileşenleri talepleri planlı bir politika ile düzenlenmelidir. Gelişmekte olan ülkelerden elde edilen veriler servislere talep edilen eritrosit konsantrelerinin sadece %40-70'nin hastaya transfüze edildiğini göstermektedir ve beraberinde artan iş yükü, kan envanterlerinin israfı ve mali artışı getirmektedir (24-26). Gereksiz transfüzyonların gerçekleşmesi nedeni ile oluşabilecek hasta sağlığını riske atan durumları engellemek ve kan bileşeni kıtlığını önleyebilmek adına kanın klinik kullanımına yönelik rehberler ve el kitapları oluşturulmuştur (27). Klinik servislerin bu rehberlere bağlı olarak çalıştığı kalite göstergelerince takibi, uygunsuz kan bileşeni transfüzyonların engellenmesi açısından değerlidir.

Yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak klinik düzeyde kalite göstergelerinin; C / T oranı (çapraz karşılaştırma - transfüzyon oranı), kullanılmadan miat dolumu nedeni imha olan eritrosit konsantrisi oranı ve israf olan eritrosit konsantrisi oranının değerlendirildiği görülmektedir (24, 28).

WHO' ya göre C/T oranının 2'nin altında olması kabul edilebilir sınırlarda olsa da, hastane ve hasta türü popülasyonunun değerlendirilerek C/T oranının yorumlanması önerilmektedir (19). Eritrosit konsantrisi israf oranı için yayınlanmış bir eşik değer bulunmamaktadır (28). Friedman ve arkadaşları tarafından 1970'lerde maksimum cerrahi kan sipariş programı geliştirilmiştir. Avantajları arasında kan transfüzyon laboratuvarlarında çapraz karşılaştırma iş yükünde azalma, daha az israfla kan stoklarının yönetimi ve maliyetin azalması bulunmaktadır (29). Ülkemizde de uygulamada olan maksimum cerrahi kan

bileşeni istem çizelgesinin klinik süreçte daha aktif olarak kullanılır hale gelmesi TM'lerin klinik taleplere daha rahat ve hızlı yanıt vermesini sağlarken rutin cerrahideki gereğinden fazla kan bileşeni talebini ve kan bileşeni israfını da engelleyecektir.

Maksimum cerrahi kan bileşeni istem çizelgesinde belirlenen bir hastanın ameliyat öncesi sadece kan grubu ve antikor tarama testleri yapılır. Böylece hastanın ABO ve RhD tipi belirlenir ve beklenmedik eritrosit antikorları çapraz karşılaştırma yapılmadan taranmış olur. Sonuçta; kan bileşeni gereksinimi doğduğunda uygun kan bileşeni hızlı bir şekilde temin edilebilir (16).

Kan ve kan bileşenlerinin servislere uygun koşullarda ve sıcaklıkta transferi ve servislere kullanılmayan kan bileşenlerinin uygun sıcaklıkta ve sürede TM'ye iadesi de kanın güvenliği açısından önemlidir. Tam kan ve eritrosit konsantrelerinin 2-6 °C'de taşınması (24 saatin sonunda 10 °C aşmamalı) taşınması, klinik ve ameliyathanelerde aynı sıcaklıkta muhafaza edilmesi gereklidir. Tam kan ve eritrosit konsantrelerinin kan saklama dolabından çıktıktan sonra 30 dakika içinde hastaya transfüze edilmeye başlanmalı ya da kullanılmayacak ise 30 dakika içinde TM'ye iadesi yapılmalıdır. Güncel çalışmalarda oda ısısında muhafaza edilen trombosit torbalarında bakteri üreme riskinin daha yüksek olması nedeni 4 °C'de saklanan trombosit konsantrelerinde özellikle aktif kanama tedavisinde kullanılabilirliği yönünde görüşler vardır (30-32). Ancak halen kabul gören görüş Ulusal Kan Bileşenleri Hazırlama Kullanım Kalite ve Güvence Rehberi 'nde yer aldığı gibi trombosit konsantrelerinin 20-24 °C arasında muhafaza edilmesidir. Taze donmuş plazma -25 °C' de veya daha düşük sıcaklıkta saklanarak eritme sonrası 2-6 °C arasında tutularak muhafaza edilmeli, eritilme sonrası 30 dakika içinde kullanılmalıdır, eğer hemen kullanılmayacak ise 2-6 °C' de maximum 24 saat muhafaza edilmelidir. Oda sıcaklığında saklanması tam kan ve eritrosit konsantrisinde olduğu gibi plazmada bakteri üremesine sebep olabilir.

Kanın klinik kullanım süreçlerindeki her evre,

güvenli kan açısından önemlidir. Kanın uygun endikasyonlarda kullanımından, eksik evrak, doğru saklama koşulları, TM'ye geri iade şartlarına kadar her düzeyde kalite göstergeleri ile takibinin yapılması gereklidir. Bu takip kan ve kan bileşenlerinin güvenliği ile birlikte israfın ve iş yükünün azaltılmasına yönelik yapılacak çalışmalar açısından da değerli veriler sağlayacaktır. Doğru ve uygun değerlendirilen verilerde etkin stok yönetimini ve iyileştirici faaliyetleri beraberinde getirecektir.

#### • Transfüzyon Merkezi Hemovijilans Süreçleri

Hemovijilans kapsamında BKM' ye iade edilen kan bileşen oranı

Transfüzyon kaynaklı reaksiyon oranı

Transfüzyon kaynaklı reaksiyon formları eksik doldurma oranı

Başlatılan ve doğrulanmayan istenmeyen olay bildirim oranı

Hemovijilans kapsamında iade edilen bileşen oranı hakkındaki bilgi bu bağlamda kaybedilen kan bileşeni oranı ile doğru stok seviyesi öngörüsü için önem arz ederken, ayrıca süreçte karşılaşılan reaksiyonlar ve istenmeyen olayların takibinde ve bu durumların en aza indirilmesi için gerekli önleyici faaliyetlerin etkinliği açısından değerli veriler sağlayacaktır.

#### • Çalışan Güvenliği

Çalışanın yaralanması ve kanla temas oranı.

#### • Biyomedikal Süreci

Kalibrasyonu geçmiş cihaz oranı

Zamanında tamamlanmayan ekipman kalifikasyon oranı

Çalışan güvenliği ve cihaz kalibrasyon takipleri de aynen BKM'lerde olduğu gibi güvenli kan temini için TM' lerde de takip edilmesi gereken göstergelerdir (8).

Sayılan kalite göstergeleri, bileşen temini ve transfüzyon süreci içerisindeki kritik kabul edilen alanlar için oluşturulan kalite göstergeleridir. Bu göstergelerin değerlendirilmesinde, kan bileşenlerinin alt kısımları ile incelenmesi ve merkezde yoğunluklu olarak kullanılan kan bileşenlere göre oluşturulması daha işlevsel olacaktır.

Ulusal ve uluslararası veri paylaşımlarında kullanılmak üzere göstergelerde majör / minör ya da iç / dış gibi ayrımlar yapılabilir. İç göstergeler daha ayrıntılı oluşturulurken, ulusal ya da uluslararası paylaşımlarda daha sade ve net alanları vurgulayan göstergeler kullanılabilir (5).

## SONUÇ

Kalite göstergeleri kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbında hedeflediğimiz kalite seviyelerine ulaşıp ulaşılmadığının kanıtlarıdır. Kan tedarik sisteminin kritik kontrol noktalarının izlenmesi ile tüm sürecin kalitesi, güvence altına alınmış olur. Bu doğrultuda belirlenen kanıtlar daha güvenli kan temini çalışmaları için birer veri oluştururken, risk yönetimi kapsamında iyileştirme gerekecek alanların tespitinde net göstergeler olacaklardır. Bu göstergelerin oluşturulmasında paydaşlar olan BKM, TM ve kliniklerin kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbı sürecinde sadece ince çizgilerle ayrılan bir bütün olduğunun unutulmaması, her bir paydaş için aynı hassasiyet ile oluşturulması önemlidir. Göstergelerin etkin şekilde yönetilmesi için de politikalar, standartlar ve yönergelerle desteklenmesi gerekir. İlerleyen süreçte yetkili otorite tarafından onaylanmış, standardize edilmiş kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbı kalite göstergelerinin oluşturulacağı, oluşturulan bu göstergelerin bütün paydaşlarca özenle kullanılması gerektiği kanaatindeyiz.

**ÇIKAR ÇATIŞMASI**

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**KAYNAKLAR**

1. Beylik U. Sağlıkta akreditasyon denetim yönetimi: Türkiye sağlık hizmetleri kalite ve akreditasyon enstitüsü uygulaması. Sağlıkta Kalite ve Akreditasyon Dergisi, 2018; 1(1) : 6-13.
2. Senih MA. Dünya Sağlık Örgütü "Güvenli Kan" Günü. Kan merkezleri ve transfüzyon derneği Damla Dergisi, 2020 Mart- Nisan; 35:12.
3. Saygılı S. Kan ve kan ürünleri yasasında Kızılayın Rolü. Türk Hematoloji Derneği. 36. Ulusal Hematoloji Kongre Bildiri Kitabı, 2010: 84-6.
4. Kan hizmet birimlerinde kalite yönetimi. Türkiye kan merkezleri ve transfüzyon derneği (TKMTD) XXIII. Ulusal kan merkezleri ve transfüzyon tıbbi temel kurs kitabı; 2020: 191-7.
5. Anyaegbu CC. Quality indicators in transfusion medicine : the building blocks. ISBT science series, 2011; 6(1):35-45.
6. EDQM. Good practice guidelines for blood establishment required to comply with directive 2005/ 62/ EC; 2018.
7. ISBT. Quality indicators for blood establishments, march 2019. <https://www.isbtweb.org/working-parties/quality-management> (Erişim tarihi 15.05.2021).
8. T.C. Sağlık Bakanlığı. Sağlıkta kalite standartları hastane (SKS-Hastane), 2020:209-15.
9. T.C. Resmi Gazete. Sağlıkta kalitenin geliştirilmesi ve değerlendirilmesine dair yönetmelik, 27 Haziran 2015; Sayı: 29399: 2-4.
10. Uysal B, Yorulmaz M. Sağlıkta kalite standartları ve bilişsel mahremiyet. Selçuk Üniversitesi Sosyal ve Teknik Araştırmalar Dergisi, 2018; 16: 24- 33.
11. T.C. Sağlık Bakanlığı. Kan hizmet birimleri için kalite yönetim sistemi rehberi, 2016.
12. Vuk T, Oiu Y, Bust L, Strengers P, Seidl C. Quality monitoring and risk management in blood transfusion services. ISBT science series, 2018; 13: 284 -9.
13. T.C. Sağlık Bakanlığı. Kan hizmet birimleri için ulusal standartlar rehberi, 2016.
14. SEMICYUC. Quality Indicators In Critically Ill Patients, 2017.
15. AHRQ. Retirement of select AHRQ quality indicators, 2019. [https://www.qualityindicators.ahrq.gov/News/Retirement%20Notice\\_v2019\\_Indicators.pdf](https://www.qualityindicators.ahrq.gov/News/Retirement%20Notice_v2019_Indicators.pdf) (Erişim tarihi: 15.05.2021).
16. T.C. Sağlık Bakanlığı. Ulusal kan ve kan bileşenleri hazırlama, kullanım ve kalite güvencesi rehberi, 2016.
17. Türk Kızılay. Kan Hizmetleri Genel Müdürlüğü Faaliyet Kitabı, 2019: 14- 20.
18. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye sağlık hizmetleri genel müdürlüğü sağlıkta kalite, akreditasyon ve çalışan hakları dairesi başkanlığı sağlıkta kalite standartları gösterge yönetimi rehberi, 2020; 1175: 26.

19. World Health Organization. Safe blood and blood products indicators and quality of care WHO regional office for the western pacific manila, Philippines, October 1996.
20. Türk Kızılay Kan Hizmetleri Genel Müdürlüğü Performans Göstergeleri, Şubat 2021.
21. Zeger G, Selogie E, Shulman IA. Blood donation and collection. Hillyer CD, Ness PM, Robock JD, Silberstein LE, Anderson KC. Blood banking and transfusion medicine, 2007; Section II: 157- 82.
22. Grieve R, Willis S, De Corte K, Sadique MZ, Hawkins N, Perra S ve ark. Options for possible changes to the blood donation service: health economics modelling. Health Services and Delivery Research, 2018; 6: 40.
23. T.C. Sağlık Bakanlığı. Ulusal hemovijilans rehberi, 2020.
24. Memtombi DKh, Barindra SA, Dorendro SL, Vijayanta K, Lalhriatpuii ST, Meina SA. Quality Indicators of Blood Utilization in a Tertiary Care Centre in the North-Eastern India. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS), Jan 2014;13(1) : 50- 2.
25. Mahar FK, Moiz B, Khurshid M, Chawla T. Implementation of Maximum Surgical Blood Ordering Schedule and an Improvement in Transfusion Practices of Surgeons subsequent to Intervention. Indian J Hematol Blood Transfus, Sep 2013; 29(3) : 129- 133.
26. Chawla T, Kakepoto GN, Khan MA. An Audit of Blood Cross - match ordering practices at The Aga Khan University Hospital : First Step towards a Maximum Surgical Blood ordering Schedule. Journal Of Pakistan Medical association, July 2001; 51(7).
27. WHO. The clinical use of blood handbook, blood transfusion safety, Geneva, 2002. p. 3 -4.
28. Novis D, Renner S, Friedberg R, Walsh MK, Saladino AJ. Quality Indicators of Blood Utilization Three College of American Pathologists Q -Probes Studies of 12, 288, 404 Red Blood Cell Units in 1639 Hospitals. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, March 2002; 126( 2) : 150- 6.
29. Friedman BA, Oberman HA, Chadwick AR, Kingdon KI. The maximum surgical blood order schedule and surgical blood use in the United States. The journal of AABB Transfusion. July, August 1979; 16 (4) : 380-7.
30. Six KR, Compennolle V, Feys HB. When platelets are left in the cold. Annals of Blood , June 2020; 5.
31. Stolla SM, Bailey L, Dişi L, Fitzpatrick L, Getiren I, Pellham E ve ark. Effects of storage time prolongation on in vivo and in vitro characteristics of 4°C - stored platelets. The journal of AABB Transfusion, March 2020; 60 (3): 613- 21.
32. Mack PJ, Miles J, Stolla M. Cold- Stored Platelets: Review of Studies in Humans Transfusion Medicine Reviews, October 2020; 34(4) : 221-6.

## 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

