



T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

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

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

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 78 ■ Sayı/Number 2 ■ Yıl/Year 2021

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND  
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü adına

On behalf of General Directorate of Public Health

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

## EDİTÖR

EDITOR IN CHIEF

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

## EDİTÖR YARDIMCILARI

DEPUTY EDITORS

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

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

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

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

## YAYIN KURULU

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

## İSTATİSTİK EDİTÖRLERİ

STATISTICAL EDITORS

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

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

## İNGİLİZCE DİL EDİTÖRÜ

ENGLISH LANGUAGE EDITOR

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

## TEKNİK KURUL

TECHNICAL BOARD

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

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

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

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

## HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

### Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

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

### Baskı ve Cilt / Press and Binding :

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

### Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

### Basım Tarihi / Date of Publication :

Haziran - 2021 / June - 2021

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç

Anna PAPA, Yunanistan

Aziz SANCAR, ABD

Cristina DOMINGO, Almanya

Daniel MOTLHANKA, Botsvana

Dwight D. BOWMAN, ABD

Isme HUMOLLI, Kosova

Isuf DEDUSHAJ, Kosova

Iva CHRISTOVA, Bulgaristan

Johan LINDH, İsveç

Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail

Manfred WEIDMANN, İngiltere

Paul HEYMAN, Belçika

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba

Sıraç DİLBER, İsveç

Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya

Takashi AKAMATSU, Japonya

Varalakshmi ELANGO, Hindistan

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Alanya

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Ankara

Banu ÇAKIR, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Afyonkarahisar

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Cemile SÖNMEZ, Ankara

Çağatay GÜLER, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Ebubekir CEYLAN, Ankara

Emrah RUH, Kıbrıs

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fehminaz TEMEL, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnaz ÇULHA, Hatay

Gülnur TARHAN, Adıyaman

Hakan ABACIOĞLU, İzmir

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

Hanefi ÖZBEK, İzmir

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

## I) YAYIN İLKELERİ

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

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

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

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

Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.

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

## II) ETİK KURALLAR

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

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

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

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar için de gereken izinler alınmalı; yazıda deneklere ağır, acı ve rahatsızlık verilmemesi için neler yapıldığı açık bir şekilde belirtilmelidir. Hayvan deneylerinde, çalışma "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı Kılavuzunda" ([www.nap.edu/catalog/5140.html](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.

## III) 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 özellikle olmalıdır.

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

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

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

a. Yazımın başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.

b. Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.

c. Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka yazılmalıdır. Herhangi bir ticari ürün ve/veya şirketle bir ilişki yoksa, başvuru yazısında belirtilmelidir.

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

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

4. Metin içinde geçen mikroorganizma isimleri ilk kullanıldığında tam ve açık yazılmalı, daha sonraki kullanımlarda kısaltılarak verilmelidir. Mikroorganizmaların orijinal Latince isimleri italik yazılmalıdır: Örneğin; *Pseudomonas aeruginosa*, *P. Aeruginosa* gibi. Yazıda sadece cins adı geçen cümlelerde stafilokok, streptokok gibi dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir. Antibiyotik isimleri dil bütünlüğü açısından okunduğu gibi yazılmalı; uluslararası standartlara uygun olarak 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 atfı alabilmesi için özetler son derece kapsamlı hazırlanmalı; gramer, imlâ ve yazım hataları barındırmamalıdır.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- **Süreli 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 pancreas (Editorial). Br Med J, 1981; 283:628.

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

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

- **Kitap:** Yazar(lar)ın soyadı adının baş harf(ler)i. Kitabın adı. Kaçınıcı baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı.
- **Örnek:** Eisen HN. Immunology: an Introduction to Molecular and Cellular Principles of the Immune Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974.
- **Kitap bölümü:** Bölüm yazar(lar)ın soyadı adının başharf(ler)i. Bölüm başlığı. In: Editör(ler)in soyadı adının başharf(ler)i ed/eds. Kitabın adı. Kaçınıcı baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı: Bölümün ilk ve son sayfa numarası.
- **Örnek:** Weinstein L. Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic Physiology: 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, Mascaró 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 savaklarının hidrolik karakteristiklerinin deneysel olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005. GenBank/DNA dizi analizi: Gen kalıtım numaraları ve DNA dizileri makale içinde kaynak olarak gösterilmelidir. Konuyla ilgili ayrıntılı bilgi için "National Library of Medicine" adresinde "National Center for Biotechnical Information (NCBI)" bölümüne bakınız.
- **Şekil ve Tablolar:** Her tablo veya şekil ayrı bir sayfaya basılmalı, alt ve üst çizgiler ve gerektiğinde ara sütun çizgileri içermelidir. Tablolar, "Tablo 1." şeklinde numaralandırılmalı ve tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne

yazılmalıdır. Açıklayıcı bilgiye başlıkta değil dipnotta yer verilmeli, uygun simgeler (\*,+,,+,+, v.b.) kullanılmalıdır. Fotoğraflar "jpeg" formatında ve en az 300 dpi olmalıdır. Baskı kalitesinin artırılması için gerekli olduğu durumlarda fotoğrafların orijinal halleri talep edilebilir.

9. **Araştırma Makalesi** türü yazılar için kaynak sayısı **en fazla 40** olmalıdır.
10. **Derleme** türü yazılarda tercihen yazar sayısı ikiden fazla olmamalıdır. Yazar(lar) daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olması; bu deneyimlerini derleme yazısında tartışmalı ve kaynak olarak göstermelidir. Derlemelerde Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet (**en az 250, en fazla 400 sözcük içermelidir**) ve anahtar sözcükler bulunmalıdır. Derleme türü yazılar için kaynak sayısı **en fazla 60** olmalıdır.
11. **Olgu sunumlarında** metin yedi sayfayı aşmamalıdır. Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet ve anahtar sözcükler ayrıca giriş, olgu ve tartışma bölümleri bulunmalıdır. Olgu sunumu türü yazılar için kaynak sayısı **en fazla 20** olmalıdır.
12. **Editöre Mektup:** Daha önce yayımlanmış yazılara eleştiri getirmek, katkıda bulunmak ya da bilim haberi niteliği taşıyacak bilgilerin iletilmesi amacıyla yazılan yazılar, Yayın Kurulu'nun inceleme ve değerlendirmesinin ardından yayınlanır. Editöre Mektup bir sayfayı aşmamalı ve kaynak sayısı **en fazla 10** olmalıdır.
13. **Teknik Rapor** türü yazılar ilgili alanda önemli katkısı olabilecek bilgileri içermelidir. Teknik raporlarda Türkçe ve İngilizce başlık, tek paragraf olacak şekilde Türkçe ve İngilizce özet, Türkçe ve İngilizce olmak üzere anahtar kelimeler yer almalıdır. Kaynak sayısı **en fazla 10** olmalıdır.
14. Bu kuralara uygun olmayan metinler kabul edilmez.
15. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

## ETİK İLKELER VE YAYIN POLİTİKASI

### ETİK İLKELER

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

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

### ÇIKAR ÇATIŞMASI POLİTİKASI

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

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

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

### YAYIN POLİTİKASI ve SÜRECİ

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

Makalelerin tıbbi ve etik sorumluluğu yazarlara ve telif hakları THDBD'ye aittir. Makalelerin ve kaynakların içeriğinden, yayımlanan makalelerdeki veriler, fikirler ve ifadelerden yazarlar sorumludur; editörler, yayın kurulu ve T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü bu konularda herhangi bir sorumluluk kabul etmemektedir.

Makaleler gönderildikten sonra öncelikle editörler tarafından değerlendirilmektedir. Editörler hakem değerlendirme sürecinden önce makalelerin THDBD yazım kurallarına uygun yazılıp yazılmadığını değerlendirmektedirler. Bu kurallara göre yazılmayan makaleler değerlendirilmeye alınmamaktadır. Sonrasında, makalenin değerlendirilmesi için iki hakem atanır. Hakemler aynı alanda yayınları olan uzmanlar arasından seçilir. Makaleler ihtiyaç halinde istatistik editörü tarafından da kontrol edilebilir. Tüm makaleler İngilizce dil editörü tarafından da incelenir. Hakemlere değerlendirme için 20 gün süre verilmektedir ve eğer herhangi bir düzeltme istenirse yazarların gerekli düzeltmeleri yapmak için 30 gün süresi vardır. Editör, editör yardımcıları, istatistik editörü ve İngilizce dil editörü kabul edilen makalenin asıl anlamını değiştirmeyen küçük düzeltmeler yapabilirler.

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

Telefon : (0312) 565 55 79

Faks : (0312) 565 55 91

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

**I) PUBLISHING POLICY**

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

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

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

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

The authors have the all the scientific and legal responsibilities of the articles The authors must fully obey the ethics of research and publication.

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

**II) ETHICAL RULES**

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

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

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

In case animal studies, approval also is needed; it should be stated clearly that the subjects will be prevented as much as possible from pain, suffering and inconvenience. In animal experiments, the study should be conducted in accordance with the ethical regulations specified in the “Guide to the Care and Use of Laboratory Animals” ([www.nap.edu/catalog/5140.html](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.

**III) WRITING RULES**

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

Applications are made online at [www.turkhijyen.org](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 corresponding author, telephone numbers (landline and mobile), e-mail address should be given.

a. The title should be short and written in lower case.

b. The short title should not exceed 40 characters.

c. The study supported by a fund or scientific organisation must be mentioned in a footnote or in the acknowledgements.

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

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

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

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

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

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

**8. Research Articles;**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- **Periodicals:** Author(s) Last Name initial(s) name of author(s) (if there are six or fewer authors, all authors should be written; if the number of authors are seven or more, only the first six of the authors should be written and the rest as

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

“et al”). The title of the article, the abbreviated name of the journal according to the Index Medicus, Year; Volume (Issue): The first and last page numbers.

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

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

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

## ETHICAL PRINCIPLES AND PUBLICATION POLICY

### ETHICAL PRINCIPLES

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

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

### CONFLICT OF INTEREST POLICY

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

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

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

### PUBLICATION POLICY

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

The authors are responsible for the scientific and ethical liability of the manuscripts and the copyright of the manuscripts belongs to the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology. Authors are responsible for the contents of the manuscript and the references. The data, opinions and statements of published articles are authors' responsibility, and the Editors, Editorial Board and Republic of Turkey Ministry of Health General Directorate of Public Health deny any responsibility on these subjects.

All manuscripts are underwent an initial process by the Editors after the submission. Editors firstly evaluates whether the manuscript is prepared according to the journal's manuscript submitting rules before peer review process. Manuscripts which are not appropriate for those rules will not be evaluated. Then, two reviewers are assigned for manuscript evaluation. Reviewers are selected among specialists who also have publications in literature in the same medical field. Articles might be checked by the statistical editor in addition if needed. All manuscripts are also inspected for English grammatical and manuscript preparation rules. 20 days are given for reviewer and, if any corrections are required, the author(s) has 30 days to make the requested corrections. The Editor-in-Chief, Associate Editors, statistical editor and English language editor may make minor corrections to accepted manuscripts that do not change the main meaning of the manuscript.

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 79

Fax : +90 312 565 55 91

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



## YAYIN İLKELERİ

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

## YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

## EDITORIAL POLICY

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

## CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne  
[www.turkhijyen.org](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

## CORRESPONDENCE

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

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

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

Tel: 0312 565 55 79

Faks: 0312 565 55 91

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

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

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



## ■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Kan donörlerinde *Brucella* seropozitifliğinin araştırılması  
The investigation of *Brucella* seropositivity in blood donors  
Kamber SÜMER, Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU, Sümeyye AKYÜZ, Mehmet PARLAK, Yasemin BAYRAM  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.46343 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 119 - 124 
2. The possible role of Kallikrein-6, 7, and potassium channel proteins in Alzheimer's disease  
Alzheimer hastalığında Kallikrein-6, 7 ve potasyum kanal proteinlerinin olası rolü  
Erkut Baha BULDUK, Filiz YILDIRIM, Zuhâl YILDIRIM  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.50374 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 125 - 132 
3. Türkiye'de COVID-19 ile ilgili web arama davranışlarının incelenmesi: Google trendleri kullanan bir dijital epidemiyoloji çalışması  
Investigation of COVID-19 related web search behaviors in Turkey: A digital epidemiology study using google trends  
Keziban AVCI  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.48991 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 133 - 146 
4. Pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerden üretilen *S. maltophilia* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin karşılaştırılması  
Comparing the biofilm formation properties of *S. maltophilia* isolates obtained from the pulmonary and extrapulmonary samples  
Kemal BİLGİN, Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI, İlnur BIYIK, Demet GÜR VURAL, Elif Gülsüm TORUN, Asuman BİRİNCİ  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.09365 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 147 - 152 
5. The evaluation of analytical performance of Total PSA and Free PSA tests by using 6-sigma method  
Total PSA ve serbest PSA testlerinin analitik performansının 6-sigma yöntemi ile değerlendirilmesi  
Çiğdem YÜCEL, Müjgan ERCAN, Murat KIZILGÜN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.19052 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 153 - 158 
6. Biological activity screening of some hydrazone and chalcone derivatives  
Bazı hidrazon ve kalkon türevlerinin biyolojik aktivite taraması  
Begüm EVRANOS AKSÖZ, Fatma KAYNAK ONURDAĞ, Erkan AKSÖZ, Selda ÖZGEN ÖZGACAR  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.02439 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 159 - 166 
7. Immunohistochemistry of norepinephrine transporters in the vagus nerve in a rat model of epilepsy  
Sıçanlarda epilepsi modelinde vagus sinirinde norepinefrin taşıyıcılarının immünohistokimyası  
Kristina Ayşe POLAT, Eslem GÜNEY, Züleyha DOĞANYİĞİT, Enes AKYÜZ  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.74507 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 167 - 174 
8. Kars yöresindeki gebelerde *Toxoplasma gondii*: Seroprevalans ve olası risk faktörleri  
*Toxoplasma gondii* in pregnant women in Kars province: Seroprevalance and possible risk factors  
Funda DEMİRCİ, Neriman MOR  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.77528 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 175 - 186 
9. Çanakkale ili Ezine bölgesinde kene ısırığı ve etkileyen faktörlerin incelenmesi  
Investigation of tick bites and affecting factors in Ezine district of Çanakkale  
Buse YÜKSEL, Esen EKER, Taylan ÖNDER, Özgür ÖZERDOĞAN, Alper ŞENER, Sibel OYMAK, Coşkun BAKAR  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.24992 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 187 - 196 
10. *In vitro* examination of toothpastes with *Cinnamomum cassia* methanolic extract  
*Cinnamomum cassia* metanolik ekstraktı ilave edilen diş macunlarının *in vitro* incelenmesi  
Gülşah TOLLU, Elif Ayşe ERDOĞAN ELİUZ  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.25993 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
- 197 - 204 
- Derleme / Review
11. Geçici orta serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan serebral iskemi modeli  
Cerebral ischemia model created by transient middle cerebral artery occlusion  
Güven AKÇAY  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.73693 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 205 - 218 
12. Aşı epidemiyolojisi: Gözlemsel aşı güvenliliği çalışma tasarımları  
Vaccine epidemiology: Observational vaccine safety study designs  
Can Hüseyin HEKİMOĞLU  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2021.29567 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
- 219 - 232 



## Kan donörlerinde *Brucella* seropozitifliğinin araştırılması

### The investigation of *Brucella* seropositivity in blood donors

Kamber SÜMER<sup>1</sup> (ID), Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU<sup>2</sup> (ID), Sümeyye AKYÜZ<sup>3</sup> (ID), Mehmet PARLAK<sup>2</sup> (ID),  
Yasemin BAYRAM<sup>2</sup> (ID)

#### ÖZET

**Amaç:** Bruselloz, gelişmiş ülkelerde kontrol altına alınmış olsa da ülkemizde endemik olarak görülen bir halk sağlığı problemidir. Endemik bölgelerde yaşayan insanların çoğunda klinik olarak enfeksiyon belirtileri olmamasına rağmen bruselloz serolojik göstergeleri pozitif olabilmektedir. Bu durumdaki asemptomatik hastalardan sağlıklı kişilere kan transfüzyonu ile bulaş olabilmektedir. Bu çalışmada bölgemizdeki sağlıklı kan donörlerinde *Brucella* seropozitifliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmaya Mayıs 2016 - Haziran 2017 tarihleri arasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi'ne bağışta bulunan 4018 sağlıklı kan donörü dahil edilmiştir. Bütün kan serumlarına Rose Bengal Pleyt Testi (RBPT) uygulanmış ve aglütinasyon saptanan numuneler Standart Tüp Aglütinasyon (STA) testi ile teyit edilmiştir. STA test sonucunda  $\geq 1/160$  titre pozitif olarak kabul edilmiş, düşük titrede pozitiflik (1/40 ve 1/80 titre) saptanan serum örnekleri Coombs testi ile çalışılmıştır. Coombs testinde de  $\geq 1/160$  titre pozitif olarak kabul edilmiştir.

**Bulgular:** Çalışmada toplam 4018 serum örneğinin RBPT tarama sonucuna göre 107 (%2,7)'si pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan kan örneklerine uygulanan STA testi sonucunda 13 tanesi şüpheli pozitif ve 13 tanesi

#### ABSTRACT

**Objective:** Although brucellosis is controlled in developed countries, it is a public health problem that is seen as endemic in our country. Although most people living in endemic areas do not have clinical signs of infection, the serological indicators of brucellosis may be positive. The illness can be transmitted to healthy people from asymptomatic patients through blood transfusion. In this study, it is aimed to investigate *Brucella* seropositivity in healthy blood donors in our region.

**Methods:** The study included 4018 healthy blood donors who donated to the Blood Center of Van Yüzüncü Yıl University Medical Faculty between May 2016 and June 2017. Rose Bengal Plate Test (RBPT) was applied to all blood serums and samples with agglutination were confirmed by Standard Tube Agglutination (STA) test. Serum samples with low titer positive (1/40 and 1/80 titer) who were considered  $\geq 1/160$  titer positive as a result of the STA test were studied with Coombs test.  $\geq 1/160$  titer positive in Coombs test.

**Results:** In the study, 107 (2.7%) of the total 4018 serum samples were positive for RBPT screening. As a result of the STA test applied to positive blood samples, 13 were suspect positive and 13 (0.3%) were positive. Of the 13 serum samples that gave

<sup>1</sup>Hakkâri Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu, Hakkâri

<sup>2</sup>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Van

<sup>3</sup>Erzincan Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Erzincan



İletişim / Corresponding Author : Sümeyye AKYÜZ

Mengücek Gazi Eğt. Araş. Hast. Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı -1. Kat, Erzincan - Türkiye

E-posta / E-mail : sumeyye\_sfl@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 13.09.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 09.03.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.46343

Sümer K, Güdücüoğlu H, Aküz S, Parlak M, Bayram Y. Kan donörlerinde *Brucella* seropozitifliğinin araştırılması  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 119 - 124

(%0,3) pozitif olarak bulunmuştur. STA testiyle şüpheli pozitiflik veren 13 serum örneğinin 3 tanesi Coombs testi ile pozitiflik vermiştir. Dolayısıyla çalışmamızda tüm örnekler içerisinde seropozitiflik oranı RBPT ile %2,7 (n=107), STA testiyle %0,3 (n=13), STA+Coombs testiyle %0,4 (n=16) olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** Ülkemizin de dâhil olduğu endemik bölgelerde klinik bulgusu olmayan ancak aktif hastalığa bağlı *Brucella* serolojisi pozitif olan hastaların, az da olsa kan tranfüzyonu ile ilişkili bulaş riski taşıdığı akıldta tutulmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Bruselloz, kan tranfüzyonu, sağlıklı kan donörü

suspected positivity with the STA test, 3 of them were positive with Coombs test. Therefore, in our study, seropositivity rate among all samples was 2.7% (n=107) with RBPT, 0.3% (n=13) with STA test and 0.4% (n=16) by Coombs test+STA test.

**Conclusion:** It should be considered that patients with positive *Brucella* serology due to active disease but without clinical findings, carry the risk of Brucellosis associated with blood transfusion in endemic regions including our country.

**Key Words:** Brucellosis, blood transfusion, healthy blood donor

## GİRİŞ

Bruselloz, *Brucella* cinsi bakterilerin neden olduğu sıklıkla sığır, koyun, keçi, domuz vb. hayvanların et, süt ve süt ürünlerinin tüketimi ile bulaşan bir zoonozdur. Bunun dışında bulaş; bu hayvanların genital organ, mukoza salgıları ve diğer enfekte atıkları ile direk temas ve kontamine aerosollerin inhalasyonu ile olabilmektedir. Nadir görülse de anne sütü, transplasental yol, cinsel ilişki ve kan tranfüzyonu ile insandan insana geçebilmektedir (1). Literatürde 24 haftalık prematüre bir bebekte kan tranfüzyonundan beş gün sonra bruselloz geliştiği ve yapılan incelemeler sonrası etkenin *B. melitensis* olduğu rapor edilmiştir (2).

Ülkemizde endemik olan bruselloz, fakültatif intrasellüler bakterilerle ortaya çıktığından birçok organ ve sistemi etkileyebilmektedir. Bu durum farklı klinik tablolara ve dolayısıyla tanı koymada güçlüğü neden olmaktadır. Brusellozda kesin tanı; kan, kemik iliği ve/veya doku örneklerinden yapılan kültür ile mümkün olmaktadır. Ancak çeşitli sebeplerle kültürde etkeni üretmek her zaman mümkün olmamakta ve tanıda serolojik yöntemler öne çıkmaktadır (3). Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek birçok serolojik test

olsa da, brusellozun laboratuvar tanısında Rose Bengal Pleyt Testi (RBPT) ve Standart Tüp Aglutinasyon (STA) testi en çok kullanılan yöntemlerdir (4).

2017 yılındaki Sağlık Bakanlığı resmi verilerine göre ülkemizde 6457 bruselloz olgusu bildirilmiştir. Brusellozun en yoğun olduğu iller; Van, Siirt, Bitlis, Hakkari, Batman, Aksaray, Isparta, Kars ve Iğdır olarak bildirilmiştir (5). Van yöresinde yapılan çalışmalar dikkate alındığında, ilimizin *Brucella* seropozitifliğinin ülkemiz ortalamasının oldukça üzerinde ve bruselloz açısından endemik bir bölge olduğunu ortaya koymaktadır (6).

Çalışmada, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi kan merkezine bağışta bulunan sağlıklı kan donörlerinde *Brucella* seropozitifliği araştırılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kan Merkezi'ne kan bağışında bulunan 4018 sağlıklı kan donörü (yaş aralığı: 18-60 yıl) çalışmaya dahil edilmiştir.

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'na



19.07.2016 tarih ve 09 nolu Etik Kurulu Kararı onayı alınarak Mayıs 2016 - Haziran 2017 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Kişilere bağışçı onam formu onaylatıldıktan sonra kanları alınarak santrifüj edilip serumlarına ayrıldı. Çalışma yapılarına kadar -80 °C'de saklanan serum örneklerine öncelikle tarama testi olarak RBPT (Seromed, İstanbul) uygulandı. Bu amaçla, lam üzerine bir damla (0.03 ml) serum örneği ve aynı hacimde Rose Bengal antijeni eklendi. Karışım rotatör yardımıyla çevrilerek 4 dakika beklendi. Test sonucunda iri tanecikli çökelti oluşmaları 'pozitif', ince tanecikli çökelti oluşmaları 'şüpheli' ve homojen görüntü oluştuğunda test 'negatif' olarak değerlendirildi. Pozitif ve şüpheli çıkan sonuçlar doğrulanmak üzere STA testine (Seromed, İstanbul) tabi tutuldu. STA testi yapılan tüm örnekler 1/1280 titre kadar çalışıldı. 1/160 ve üstündeki titrasyonlar pozitif olarak değerlendirilirken, test sonuçları şüpheli pozitif çıkan numuneler için (titresi 1/40 ve 1/80 olanlar) Coombs testi (Seromed, İstanbul) yapıldı. Böylece aglütinasyon vermeyen blokan (inkomplet) antikörlerin ortaya çıkarılması sağlandı. Coombs testinde de 1/160 ve üstündeki titrasyonlar pozitif kabul edildi (7, 8). Verilerin istatistiksel

analizinde sayısal değerler, sayı ve yüzde dağılımları ve Ki-kare testi kullanılmıştır. Hesaplamalarımızda istatistiki anlamlılık seviyesi  $p < 0.0001$  olarak kabul edilmiş ve hesaplamalar için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) istatistik paket programı kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 18 ila 60 yaş aralığındaki 4018 kişinin 3637 (%90,5)'si erkek ve 381 (%9,5)'i kadındı. RBPT sonuçlarına bakıldığında 4018 serum örneğinin 107 (%2,7)'si pozitif/şüpheli sonuç vermiştir. RBPT pozitif/şüpheli 107 serum örneğine STA testi uygulanmış; bunların 81'i negatif, 13'ü şüpheli pozitif ve 13'ü pozitif olarak bulunmuştur. STA testinin ayrıntılı sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

Coombs testi yalnız STA testiyle şüpheli pozitiflik saptanan 13 serum örneğine uygulanmış ve 3 tanesinde (% 23)  $\geq 1/160$  titrede pozitiflik saptanmıştır. Böylece toplam 4018 serum örneğinin 16 (% 0,4)'sü hem RBPT ile aglütinasyon vermiş olup hem de STA testi veya Coombs testinden herhangi biri ile  $\geq 1/160$  titrede pozitiflik vermiştir.

Tablo 1. STA testi şüpheli pozitif ve pozitif olan numunelerin titrelerinin dağılımı

Sonuç	Titre	n
Şüpheli Pozitif	1/40	5
	1/80	8
	Toplam	13
Pozitif	1/160	9
	1/320	4
	1/640	0
	1/1280	0
	Toplam	13

Çalışmamızda seropozitiflik oranı RBPT ile % 2,7 (107/4018), STA testiyle % 0,3 (13/4018), STA+Coombs testiyle % 0,4 (16/4018) olarak bulunmuştur. Her üç testle belirlenen seropozitiflik oranları Tablo 2’de verilmiştir. Pozitif kan örneklerinin 2’si kadın (% 0,5, 2/381) ve 14’ü erkek (% 0,4, 14/3637) bireydir. Cinsiyet ile *Brucella* seropozitifliği arasında anlamlı

bir ilişki saptanmamıştır. RBPT testi, duyarlılığı % 100 olarak bildirilen bir tarama testidir (9). Bu bilgi doğrultusunda negatif olarak saptanan örnekler STA ve Coombs testi ile de negatif kabul edildiğinde; RBPT testinin pozitiflik oranı STA ve Coombs testi ile karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı saptanmıştır.

**Tablo 2.** Çalışılan serumların testlere göre pozitiflik oranları

Test Adı	n	Pozitiflik sayısı (%)	Tüm örneklerdeki pozitiflik oranı
RBPT	4018	107 (2.7)	% 2.7
STA Testi + Coombs Testi	107	16 (15)	% 0.4

RBPT: Rose Bengal Pleyt Testi, STA: Standart Tüp Aglutinasyon Testi, n: Test edilen örnek sayısı

## TARTIŞMA

Bruselloz daha çok genç ve orta yaşlı erişkinlerde olmak üzere her yaşta görülebilen ve birçok hastalıkla kolaylıkla karışabilen bir zoonozdur. Kanada, Yeni Zelanda, İngiltere ve Avusturalya gibi gelişmiş ülkelerde çeşitli eradikasyon programları ile prevalansı oldukça düşük olmasına karşın ülkemiz gibi gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde halen en sık görülen hastalıklardan biridir. Hastalık, dünyanın hemen hemen tüm bölgelerinde görülebilmekle birlikte Portekiz, İspanya, Kuzey Afrika ülkeleri, Güney Fransa, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Arap Yarımadası, Meksika, Hindistan, Orta ve Güney Amerika’da endemiktir. *Brucella* insandan insana kan transfüzyonu yoluyla bulaşabilmektedir. Ancak ülkemizde sağlıklı kan donörlerinde yasal olarak zorunlu taranan parametreler (HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV ve RPR/VDRL) arasında yer almamaktadır (10-12).

Çeşitli illerde yürütülen *Brucella* seroprevalans çalışmaları incelendiğinde Aral ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada Kahramanmaraş ilinde bruselloz seroprevalansını % 1, Tavşan ve ark. 2010 yılında

Şanlıurfa il merkezinde yaptıkları çalışmada ise % 0,9 olarak bulmuşlardır. Yücel ve ark. Malatya’da 2012 yılında yaptıkları çalışmada bruselloz şüpheli 2942 hastada *Brucella* seroprevalansını RBPT ile % 8,5, STA testi ile % 4,5, Coombs testi ile % 5,5 bulmuşlardır (13-15). Bu oranlar çalışmamızın oranlarına göre daha yüksektir. Çalışmamızın sağlıklı kan donörlerinde yapılması ve  $\geq 1/160$  titrenin anlamlı kabul edilmesi oranlarımızın topluma göre daha düşük çıkmasına neden olmuş olabilir.

Van İli’nde Ceylan ve arkadaşları tarafından besicilerde yapılan bir çalışmada bruselloz seropozitifliği insanlarda RBPT ile % 26,7, STA testi ile % 27,2 olarak bulunmuştur. Âlim ve ark. (2006) çalışmalarında 106 kişinin ve 16 (%15,1)’sını *Brucella* açısından seropozitif olarak bulmuşlardır (6, 16). Bu çalışmalarda STA testinde sırasıyla 1/20 ve 1/80 titrelerin anlamlı kabul edilmesi, çalışmaların hayvan yetiştiriciliğinin yaygın olduğu yerlerde yapılmış olması ve bireylerin kırsal bölgelerde yaşamalarından dolayı seroprevalans oranları çalışmamızdan çok daha yüksektir.

*Brucella* enfeksiyonu ile alakalı literatürde oldukça fazla bilgi ve çalışma olmasına rağmen insanlarda ve özellikle kan donörlerinde bu alanda yapılmış çalışma az sayıdadır. Bu durum sağlıklı insanlarda hastalığın seroprevalansını ortaya koyacak yeterince veri olmamasına neden olmaktadır. Sayan ve ark. 2010 yılında sağlıklı kan donörlerinde yaptıkları çalışmada *B. canis* seropozitifliğini laboratuvar yapımı lam aglütinasyon test (LAT) antijeni ile taramışlar ve doğrulama yöntemi olarak 2-Merkaptoetanol LAT yöntemi kullanmışlardır. Çalışmaya dahil edilen serumların tamamı RBPT ile test edilmiş ve negatif olanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Doğrulama yönteminin sonucunda 1930 kan serumunun 16'sını şüpheli pozitif (12'si 1/50, 4'ü 1/100 titrede) 15'ini ise pozitif (1/200 ve üzeri titrede) olarak rapor etmişlerdir. Çalışmanın seropozitifliği % 1,6 (31/1930) olarak belirlenmiş olup çalışmamızdaki orandan daha yüksek bulunmuştur (17). Çalışmamızda STA testiyle 13 (% 0,3) serum örneğinde pozitiflik saptanmıştır. Diğer ülkelerde de sağlıklı kan donörlerinde *Brucella* seroprevalans çalışmaları mevcuttur. Torres-padilla ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada Meksika'da üç kan bankasına başvuran toplam 500 kan donöründe *Brucella* seropozitifliğini % 3,6 (n=18), Vaishnavi ve Kumar (2007) Hindistan'da 292 kan donöründe % 10,6 olarak tespit etmişlerdir (18, 19). Bu oranlar çalışmamızdaki oranlardan daha yüksektir. Khorasgani ve ark. (2008) İran'ın Boushehr kentinde toplam 10.500 kan donöründe yaptıkları çalışmada *Brucella* seropozitifliğini RBPT ile % 0,76 ve STA ile % 0,57 olarak bulmuşlardır (20). Zadsar ve ark. (2020) İran'ın çeşitli illerini kapsayan çalışmalarında 14.706 kan donörününün 63 (% 0.43)'ünü STA testiyle pozitif (STA titresi  $\geq 1/80$ ) olarak saptamışlar ve gübre ürünlerine maruz kalma ile

seropozitiflik arasında önemli bir ilişki saptamışlardır (21). İran'da yapılan bu çalışmaların STA sonuçları bakımından çalışmamızla paralellik göstermesi komşu ülkede *Brucella* seropozitifliği açısından benzer bir yaygınlık gösterdiğimizi düşündürmektedir.

Güney Etiyopya'da yapılan bir araştırma, kan donörlerinde insan brusellozunun yüksek seroprevalansını (% 10,6) göstermiş, evcil hayvanlarla temas ve evde hayvancılık uygulamaları ana risk faktörleri olarak bulunmuştur (22). Wang ve ark. (2015) Çin'in endemik bölgelerinde kan transfüzyonu ile *Brucella* taşınma potansiyelini araştırdıkları çalışmalarında; Kashi Kan Merkezinden aldıkları 3896 serum örneğinin 135 (% 3,5)'ini RBPT ile, bunların da 120 (% 3,1)'sini STA ile pozitif olarak bulmuşlardır (23). Çalışmamızda tüm örnekler içerisinde seropozitiflik oranı RBPT ile % 2,7, STA testiyle % 0,3, STA+Coombs testiyle % 0,4 olarak bulunmuş olup bu çalışmayla paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak bruselloz ülkemizde yadsınamaz derecede önemli bir halk sağlığı problemidir. Asıl amaç her ne kadar brusellozun hayvanlarda kontrolü, eradikasyonu ve hayvanlardan insanlara bulaşın önlenmesi olsa da hastalığın insandan insana bulaşı da en aza indirilmelidir. Ülkemizin de dahil olduğu endemik bölgelerde insandan insana bulaş yollarından biri de kan transfüzyonudur. Klinik bulgusu olmayan ancak *Brucella* serolojisi pozitif olan hastalar büyük olasılıkla daha önce bruselloz ile karşılaşmış, hala serolojik testleri pozitif hastalar olup bulaştırıcılık için çok büyük sorun oluşturmasalar da aktif hastalığa bağlı test pozitifliklerinin olabileceği akılda tutulmalıdır.

## TEŞEKKÜR

Çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı (BAPB) Araştırma Fonu tarafından TYL-2017-5944 numaralı proje olarak desteklenmiş olup katkılarından dolayı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 19.07.2016 ve Karar no: 09).

## KAYNAKLAR

- Głowacka P, Żakowska D, Naylor K, Niemcewicz M, Adrózd A. Brucella virulence factors, pathogenesis and treatment. *Pol J Microbiol*, 2018;67(2):151-61.
- Al-Kharfy TM. Neonatal brucellosis and blood transfusion: case report and review of the literature. *Ann Trop Paediatr*, 2001;21(4):349-52.
- Gültekin E, Uyanık MH, Albayrak A, Aksoy O, Ayyıldız A. Bruselloz tanısında kullanılan çeşitli serolojik yöntemlerin karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2012;42(4):142-7.
- Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory diagnosis of human brucellosis. *Clin Microbiol Rev*, 2019;33:e00073-19.
- <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoontikvektorel-bruselloz/istatistik>.
- Ceylan E, Irmak H, Buzğan T, Karahocagil MK, Evirgen O, Sakarya N. Van iline bağlı bazı köylerde insan ve hayvan populasyonunda bruselloz seroprevalansı. *Van Tıp Derg*, 2003;10(1):1-5.
- Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents*, 2010;36:12-7.
- Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. *The Lancet infectious dis*, 2007;7(12):775-86.
- Çiftci C, Öztürk F, Öztekin A, Karaoğlan H, Saba R, Gültekin M et al. Comparison of the serological tests used for the laboratory diagnosis of brucellosis. *Mikrobiyol Bul*, 2005;39(3):291-9.
- Tuon FF, Gondolfo RB, Cerchiari N. Human-to-human transmission of Brucella-a systematic review. *Tropical Med Inter H*, 2017;22(5):539-46.
- Heper Y. Transfüzyonda mikrobiyolojik tarama testleri. *TKMTD Derg*. 2011;79:2-6.
- Sabah-Özcan S, Daar-Ede G, Yılmaz N. Yozgat çevresinde yaşayan çocuklarda brusella antikor seropozitifliği. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2019;76(2):125-30.
- Aral M, Köprülü N, Ekerbiçer HÇ, Gül M, Çıragil P, Koçtürk S. Kahramanmaraş İl Merkezinde Bruselloz Hastalığının Seroprevalansı. *Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg*, 2011;4(1):17-23.
- Tavşan Ö, Koruk S, Koruk İ. Şanlıurfa il merkezinde bruselloz prevalansı ve ilişkili risk faktörleri. *Klimik Derg*, 2011;28(1):11-7.
- Duman Y, Tekerekoğlu MS, Batı NS, Otlu B. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde bruselloz seroprevalansı: Rose Bengal, Wright, Coombs Aglutinasyon Test Sonuçları. *Med Science*, 2013;2(3):679-88.
- Âlim A, Özdemir L, Arslan S, Nur N, Sümer H. Sivas'ın bir köyünde Brusella seroprevalansı. *Toplum Hekimliği Bül*, 2006;25(1):19-23.
- Sayan M, Erdenliğ S, Etiler N. Sağlıklı Kan donörlerinde Brucella canis seropozitifliğinin laboratuvar yapımı lam aglutinasyon test antijeni ile araştırılması. *Mikrobiyol Bül*, 2011;45(4):655-63.
- Torres-Padilla JC, Lopez-Merino A, Garcia-Escamilla RM, J N Gutierrez-Garcia J-A, 140, 4, 391-8. Anti-Brucella antibody seroprevalence in blood donors for therapeutic ends at three blood banks of the Mexican Institute of Social Security. *Gac Med Mex*, 2004;140(4):391-8.
- Vaishnavi C, Kumar S. Investigation for background prevalence of Brucella agglutinins among blood donors. *Indian J Med Mic*, 2007;25(3):302
- Khorasgani MR, Esmaeili H, Pourkarim MR, Mankhian AR, Salehi TZ. Anti-brucella antibodies in blood donors in Boushehr, Iran. *Comparative Clin Path*, 2008;17(4):267-9.
- Zadsar M, Shirzadi MR, Zeynali M, Rasouli M, Karimi G. Human brucellosis: risks and prevalence among Iranian blood donors residing in endemic areas. *Transfus Med Hemother*, 2020;47(103-109).
- Workalemahu B, Sewunet T, Astatkie A. Seroepidemiology of human brucellosis among blood donors in southern Ethiopia: calling attention to a neglected zoonotic disease. *Am J Trop Med Hyg*, 2017;96(1):88-92.
- Wang W, Liao Q, Wu X, Hou S, Wang Y, Wu J, et al. Potential risk of blood transfusion-transmitted brucellosis in an endemic area of China. *Transfusion*, 2015;55(3):586-92.

# The possible role of Kallikrein-6, 7, and potassium channel proteins in Alzheimer's disease

## Alzheimer hastalığında Kallikrein-6, 7 ve potasyum kanal proteinlerinin olası rolü

Erkut Baha BULDUK<sup>1</sup> (ID), Filiz YILDIRIM<sup>2</sup> (ID), Zuhal YILDIRIM<sup>3</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** Although the formation mechanism of Alzheimer's Disease (AD) is not known with certainty, two major proteins, beta amyloid of senile plaques and tau protein of neurofibrillary tangles are responsible for AD. One of the major factors in the development of the disease is the formation of insoluble amyloid deposits, and the other one is the increased tau phosphorylation. Kallikreins (KLK's) are a sub-family of serine proteases that play a role in the etiology of AD which is characterized by neuronal damage and loss of function. Kallikrein (KLK)-6 and KLK-7 are known to be age-related protease and are found at high levels in the central nervous system (CNS). It was previously shown to be involved in proteolysis of extracellular proteins implicated in neurodegenerative diseases such as AD. In this study, we aimed to investigate the possible role of KLK-6 and KLK-7 in the pathogenesis of AD and the relationship between potassium channel proteins.

**Methods:** A total of 35 Alzheimer's patients over the age 65 years, followed-up by Polatlı Duatepe Government Hospital and 35 healthy individuals (control group) admitted to the neurology clinic for routine screening with cognitive status considered normal were included in this study. After a 12-hour hunger, KLK-6 and KLK-7 were measured with

### ÖZET

**Amaç:** Alzheimer hastalığının (AH) oluşum mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte AH'dan sorumlu başlıca iki protein, senile plakların yapısındaki beta amiloid ve nörofibriller yumakların yapısındaki tau proteindir. Hastalığa yol açan en önemli etmenlerden biri çözünür olmayan amiloid çökeltilerin oluşumu, diğeri ise artmış tau fosforillenmesidir. Kallikreiner, nöronal hasar ve işlev kaybı ile belirgin AH'nin etiolojisinde rol oynayan, serin proteazların bir alt familyasıdır. Kallikrein (KLK)-6 ve KLK-7'nin merkezi sinir sisteminde (MSS) yüksek seviyelerde bulunan yaşa bağlı proteaz olduğu bilinmektedir. Daha önce AH'ı gibi nörodejeneratif hastalıklarda yer alan hücre dışı proteinlerin proteolizine karıştığı gösterilmiştir. Bu çalışmada KLK-6 ve KLK-7'nin AH patogenezindeki olası rolünü ve potasyum kanal proteinleri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

**Yöntem:** Çalışmaya Polatlı Duatepe Devlet Hastanesinde takip edilen yaşları 65'in üzerinde olan 35 AH ve rutin tarama amacıyla nöroloji polikliniğine başvuran kognitif durumu normal olarak değerlendirilen 35 sağlıklı birey (kontrol grubu) dahil edildi. 12 saat açlığı takiben antekübital venden alınan kan örnekleri

<sup>1</sup>Atılım University, Faculty of Medicine, Department of Neurosurgery, Ankara

<sup>2</sup>Polatlı Duatepe Government Hospital, Clinic of Internal Medicine, Ankara

<sup>3</sup>Ankara Health Directorate, Public Health Services Presidency, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Filiz YILDIRIM

Karapınar Eskişehir yolu üzeri İstiklal mah. Abdülaziz cad. No:2, Polatlı, Ankara, Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 26.10.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 19.12.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.50374

Bulduk EB, Yıldırım F, Yıldırım Z. The possible role of Kallikrein-6, 7, and potassium channel proteins in Alzheimer's disease  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 125 - 132

inwardly rectifying potassium channel protein (KCNJ3), and two-pore potassium channel protein (KCNK9) levels were measured by the Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) in the serum of the blood samples which were taken from the antecubital vein after centrifuging for 10 minutes at 2500xg. The differences between the two groups were tested by T- test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

**Results:** All the groups were matched for age and gender, but not statistically significant difference was observed ( $p > 0.05$ ). According to our findings, serum KLK-6 and KLK-7 levels of Alzheimer's group were significantly increased ( $p < 0.05$ ). A significant difference was not detected when the levels of serum KCNJ3 and KCNK9 of the Alzheimer's group compared with the control group ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** It is thought that the failure in preventing the abnormal protein folding and accumulation leads to AD in the brain. According to the findings of the present study, a positive correlation was detected between the levels of KLK-6 and KLK-7 and AD's pathology.

**Key Words:** Alzheimer's disease, Kallikrein-6, Kallikrein-7, KCNJ3, KCNK9

4°C'de 2500xg'de 10 dakika santrifüj edilerek, serum örneklerinde KLK-6 ve KLK-7 ile içeri doğru düzeltici potasyum kanalı (KCNJ3) ve iki gözenekli potasyum kanalı (KCNK9) protein düzeyleri enzim-bağımlı immunosorbent assay (ELISA) ile ölçüldü. Gruplar arasındaki fark T-test ile incelendi.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Bulgular:** Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından bir fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ). Alzheimer grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum KLK-6 ve KLK-7 düzeyleri anlamlı olarak artarken ( $p < 0.05$ ), KCNJ3 ve KCNK9 protein düzeylerinde bir fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ).

**Sonuç:** Beyinde anormal protein katlanmasının ve birikmesinin önüne geçilememesinin AH'ye yol açtığı düşünülmektedir. Bu araştırmanın bulgularına göre KLK-6 ve KLK-7 düzeyleri ile AH'nin patolojisi arasında bir ilişki saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer hastalığı, Kallikrein-6, Kallikrein-7, KCNJ3, KCNK9

## INTRODUCTION

Neurodegenerative disorders are widely known healthy problems for elderly people. Aging is considered as the major risk factor in most neurodegenerative disorders. Alzheimer's Disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder characterized by a selective neuronal cell death associated with two hallmark pathological lesions. The intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) and extracellular amyloid deposits in the form of senile plaques (1). The etiological events leading to AD pathogenesis have not been clearly defined. One of the major factors in the development of the disease is the formation of insoluble amyloid deposits, and

the other one is the increased tau phosphorylation (2).

Kallikreins (KLK's) are a sub-family of serine proteases that play a role in the etiology of AD, which is characterized by neuronal damage and loss of function. Fifteen Kallikrein (KLK)-related peptidase family proteins have been identified and act in a complex network as a cascade reaction (3).

KLK-6 is a major KLK-related peptidase protein in the central nervous system (CNS). KLK-6 is widely expressed in several cells (3, 4). The KLK-7 in the human tissue, a chymotrypsin-like cool protease, causes desquamation and catalyzes the inter-adhesive

structures in the corneous skin layer. In this way, KLK-7 plays roles in cancer invasion and metastasis. However, it was emphasized that kallikrein (KLK-5, 6, 7, 8, 11) may be a new cancer marker in other types of tumors outside the CNS tumors (ovary, breast, prostate) (5).

Especially the brain and nervous system diseases, genetically-induced diseases, and sensory system disorders occur because of the mutations in the genes of potassium channels (6, 7). Potassium channels act in a wide range of physiological functions which include the regulation of heartbeat rate, insulin release, electrolyte transport, and immune system functions (8). In addition, there might be a connection between epilepsy, cardiac rhythm, musculoskeletal diseases, and hereditary diseases like diabetes and potassium canal disorders (9-12). Inwardly rectifying potassium channels (KCNJ3) transmit potassium ions inwards not outwards. This type of potassium channel is activated by hyperpolarization not by depolarization, unlike other potassium channels. The main function of KCNJ3 is to stabilize the potential of the resting membrane (13). Two-pore potassium channels (KCNK9) are continuously open in the potential of the physiological membrane, and in this way, help to adjust the membrane potential at resting time (14, 15).

The aim of this study was to investigate the role of KLK's and potassium channel proteins in the pathogenesis of AD by measuring the serum KLK-6, 7 and KCNJ3, KCNK9 protein levels of Alzheimer's patients.

## MATERIAL and METHOD

A total of 35 Alzheimer's patients aged over 65 years, followed-up by Polatlı Duatepe Government Hospital, and 35 healthy individuals (control group) admitted to the neurology clinic for routine screening with cognitive status considered normal, were included in this study. For cognitive assessment, Mini-

Mental State Examination (MMSE) and clock drawing tests were performed. The diagnosis of AD was made according to Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders (DSM-IV) and National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the AD and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) criteria after cognitive assessment and neuroimaging performed using magnetic resonance (MR). Clinical Dementia Rating Scale (CDR) scores of the patients with AD were 1 and over. All the subjects were nonsmokers, nonalcohol users, and also did not have anemia, malnutrition, thyroid, Diabetes mellitus, hypertension, chronic renal failure, chronic inflammatory, and cardiovascular diseases. They were not taking any supplements such as vitamins and/or antioxidants. The present study was carried out according to the Eskişehir Osmangazi University Clinic Research Committee and Human Ethical Committee Regulations. After a 12-hour hunger, the KLK-6, KLK-7, KCNJ3, and KCNK9 levels were measured by the Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) in the serum of the blood samples which were taken from the antecubital vein after being centrifuged for 10 minutes at 2500xg.

## Statistical analysis

The data were analyzed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 20.0, Chicago, IL, USA) statistics program. The differences between the two groups were tested by T- test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

All the groups were matched for age and gender, but not statistically significant difference was observed ( $p > 0.05$ ). The levels of KLK-6 and KLK-7 in the serum were significantly higher in the Alzheimer's group than in the control group ( $p < 0.05$ ). A significant difference was not detected when the levels of serum KCNJ3 and KCNK9 of the Alzheimer's group compared with the control group ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

**Table 1.** The serum KLK-6, KLK-7, KCNJ3, and KCNK9 levels in Alzheimer's patients and the control group (Mean±SD).

Groups	Alzheimer's (n=35)	Control (n=35)
F/M	28/7	28/7
Age (year)	80.218±7.794	80.064±8.016
KLK-6 (ng/mL)	1.013±0.335*	0.741±0.178
KLK-7(ng/mL)	0.803±0.234*	0.589±0.187
KCNJ3 (ng/mL)	0.897±0.288	0.905±0.240
KCNK9 (ng/mL)	0.634±0.174	0.554±0.156

\* $p < 0.05$ , compared to control group.

## DISCUSSION

Aging is the accumulation of changes which increase the risk of mortality. Environmental and genetic factors and disease are the causes of aging. Oxidative stress is proposed as a key element in the aging process (16, 17). Furthermore, oxidant and antioxidant status may also cause the degenerative changes encountered in aging. Parkinson's Disease, AD, and stroke disease are the well-known examples of age-related neurodegenerative disorders (18).

AD is the most common neurodegenerative disease, which is characterized with dysfunctions in cognitive abilities like execution function, attention, language, and visual skills, confusion, aggression, memory loss, and mood changes (15, 18, 19), and results in death approximately 5-9 years after the diagnosis (20).

AD, represents another serious problem and is rising in prevalence worldwide, especially among the aging population (21). Although age and the inheritance of predisposing genetic factors appear to play a major role, more recent evidence suggest that the development and progression of AD is subject to a wide variety of both environmental and genetic modifiers (22).

The enlightening of the pathogenesis of AD will lead the way in slowing, stopping and improving the pathogenesis process in the development of new AD preventive treatment strategies. For this reason, many studies were conducted on AD. However, the exact pathogenesis has not yet been enlightened, and the treatment method has not been identified yet (23).

When the pathogenesis of AD is examined, it is observed that the intracellular and extracellular aggregations occur in certain parts of the brain. Although intracellular aggregation is seen as neurofibrillary glomus resulting due to hyperphosphorylation of the Tau protein in insoluble helical filaments, the extracellular accumulations are in the form of amyloid plaques which consist of AB peptides in insoluble amyloid fibrils (24).

KLK's are a subgroup of cool protease that undertake various physiological functions in human metabolism. Although KLK's potential interest in neurological diseases is accepted at an increasing level, little is known about its pathophysiological effects. KLK's appear before us as an important mediator of neurological diseases like AD (25-27), frontotemporal dementia (28), Parkinson's Disease (26-30), Multiple Sclerosis (31-32), and Post-polio



Syndrome (33). It has been shown that KLK's play roles in various pathologies, and are investigated now as a potential therapeutic target. Many studies show that KLK's has the potential to be the biological markers of cancer and neurological diseases (34).

In the present study, we aimed to analyze the potential of the age-related proteases KLK-6, and KLK-7 as a biomarker for AD.

Previous studies show that members of the human tissue KLK family are associated with malignancy. It has been speculated that some KLK's (KLK-5, 6, 7, 8, 11) exist in the CNS, and might be associated with brain physiology and pathobiology (35).

Shimizu et al. (35) showed that KLK-1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13 and 14 exist both in the cerebral cortex and in the hippocampus. It was determined in the study that KLK-8 mRNA levels increased 11.5-fold compared to the control group in the AD hippocampus.

KLK-6 is known to be an age-related serine protease predominantly expressed within the brain and spinal cord, particularly in neurons and oligodendrocytes. It was previously shown to be involved in proteolysis of extracellular proteins implicated in neurodegenerative disease such as AD prompting validation of KLK-6 as potential biomarker of diseases (25, 36-38). Diamandis et al. (25) found that the KLK-6 concentration in AD brain tissue extracts was approximately twice as low as the extracts obtained from the normal control group. They reported that the full blood KLK-6 concentration in AD patients was approximately ten times higher than KLK-6 concentration in normal controls.

The levels of KLK-6 in the body fluids are increasing with age (36, 37). This age association was proposed to be disrupted in AD (38). Patra et al. (39) demonstrated that the plasma KLK-6 levels of AD group were significantly increased compared with control group. In our study, it was also determined that the serum KLK-6 levels were significantly higher in the Alzheimer's group when compared to the control group.

Scarbrick et al. (32) determined in an in vitro test which involved murine cortical neurons that KLK-1 and KLK-6 directly cause neuron loss. Probably, KLK's contribute to neurological function loss by causing direct axon damage and the death of neuron cells.

KLK-7 was originally identified as an inflammation-induced proteolytic enzyme in the skin. However, the expression level of KLK-7 was decreased in the cerebrospinal fluid and brains of AD patients (28, 40). Moreover, it was observed that KLK-7 is able to cleave the hydrophobic core motif of AB fibrils, thereby attenuating neurotoxicity in vitro (41).

It was reported that expression of KLK-7 mRNA was significantly decreased in the brains of AD patients (41). In our study, it was determined that the serum KLK-7 levels were significantly higher in the Alzheimer's group when compared to the control group.

Nevertheless, it remains unclear whether up-regulation of KLK-7 in the brain causes noxious effect by degrading the other substrates. It is important to understand the physiological function and substrate of KLK-7 in the brain by a proteomic approach (40-42).

Various potassium channels, which are active in different cells, especially in brain cells, have been identified. KCNK9 exists at low levels in normal tissues other than in the brain, and its physiological role is not yet clear. However, it is speculated that it has roles in respiration, aldosterone release, neuronal activity, and neuron apoptosis (14, 15).

Lee et al. (43) examined the suppressive role of the KCNJ3 destruction in tumor formation and concluded that the KCNJ3 destruction in cancerous cells causes the aging of cancer cells.

In our study, it was determined that the serum KCNJ3 and KCNK9 protein levels were not significant different in Alzheimer's group when compared to the control group. It is thought that the failure in preventing the abnormal protein folding and

accumulation in brain leads to AD. However, according to the findings of the present study, a positive correlation was not detected between the levels of KCNJ3 and KCNK9 proteins and AD's pathology.

Aging is an inevitable biological process characterized by a general decline in various physiological functions and resistance to stress. Aging alone is one of the major risk factors for AD. But little is known about the molecular process that distinguish healthy aging from pathological aging. Process linked

to inflammation is believed to play an important role in AD pathogenesis. Serum KLK-6 and KLK-7 levels may be of value as a biomarker only for patients with advanced AD.

In conclusion, we can conclude that KLK-6 and KLK-7 levels can be used in the diagnosis of AD due to the increased serum levels in pathological AD. It is expected that this study would give a direction to new researches on this topic. There is a need for further studies on this subject.

### ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* The study was approved by the Eskişehir Osmangazi University Clinic Research Committee and Human Ethical Committee (Date: 04.06.2020 and Number: 80558721-050.99-E.61665).

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### REFERENCES

- Holtzman DM, Goate A, Kelly J, Sperling R. Mapping the road forward in Alzheimer's disease. *Sci Transl Med*, 2011; 3 (114): 114-48.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2011; 377 (9770): 1019-31.
- Sotiropoulou G, Pampalakis G, Diamandis EP. Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem*, 2009; 284 (48): 32989-94.
- Parassas I, Elssa A, Poda G, Diamandis EP. Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nat Rev Drug Discovery*, 2015; 14 (10): 183-202.
- Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: Physiologic roles and applications in cancer. *Molecular Cancer Research*, 2004; 2(5): 257-80.
- Aronson JK. Potassium channels in nervous tissue. *Biochem Pharmacology*, 1992; 43 (1): 11-4.
- Pongs O. Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Letters*, 1999; 452 (1-2): 31-5.
- Bronstein-Sitton S. K<sup>+</sup> channels and cancer. *Pathways*, 2006; 12 (1): 18-20.

9. Kaneko S, Okada M, Iwasa H, Yamakawa K, Hirose S. Genetics of epilepsy: current status and perspectives. *Neurosci Res*, 2002; 44 (1): 11-30.
10. Marban E. Cardiac channelopathies. *Nature*, 2002; 415 (3): 213-18.
11. Jurkat-Rott K, Lerche H, Lehmann-Horn F. Skeletal muscle channelopathies. *J Neurol*, 2002; 249 (1): 1493-1502.
12. Nichols CG, Koster JC. Diabetes and insulin secretion: whither KATP? *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002; 283 (3): E403-12.
13. Olesen SP, Bundgaard M. ATP-dependent closure and reactivation of inward rectifier K<sup>+</sup> channels in endothelial cells. *Circ Res*, 1993; 73 (3): 492-95.
14. Bayliss DA, Sirois JE, Talley EM. The TASK family: two-pore domain background K<sup>+</sup> channels. *Mol Interv*, 2003; 3 (5): 205-19.
15. Lauritzen I, Zanzouri M, Honore E, Duprat F, Ehrengruber MU, Lazdunski M, et al. K<sup>+</sup> dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem*, 2003; 278 (34): 32068-76.
16. Yildirim Z, Ucgun NI, Yildirim F. The role of oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011; 66(5): 743-46.
17. Yildirim Z, Yildirim F, Ucgun NI, Dincel AS. Choroidal Neovascular Membrane in Age-Related Macular Degeneration is Associated with Increased Interleukin-6. *International J Gerontology*, 2012; 6(2): 101-4.
18. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*, 2012; 2012: 1-11.
19. Sutherland GT, Chami B, Youssef P, Witting PK. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product? *Redox Report*, 2013; 18 (4): 134-41.
20. Wolfson C, Wolfson DB, Asgharian M, M'Lan CE, Ostbye T, Rockwood K, et al. A reevaluation of the duration of survival after the onset of dementia. *N Eng J Med*, 2001; 344 (15): 1111-16.
21. Alzheimer's A. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 2010; 6: 158-94.
22. Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*, 2005; 120: 545-55.
23. Yang Y, Song W. Molecular links between Alzheimer's disease and Diabetes mellitus. *Neuroscience*, 2013; 250: 140-50.
24. Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr*, 2005; 25: 151-74.
25. Diamandis EP, Yousef GM, Petraki C, Soosaipillai AR. Human kallikrein 6 as a biomarker of Alzheimer's disease. *Clin Biochem*, 2000; 33 (8): 663-67.
26. Ogawa K, Yamada T, Tsujioka Y, Taguchi J, Takahashi M, Tsuboi Y, et al. Localization of a novel type trypsin-like serine protease, neurosin, in brain tissues of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Psychiatry and Clin Neurosci*, 2000; 54(4): 419-26.
27. Zarghooni M, Soosaipillai A, Grass L, Scorilas A, Mirazimi N, Diamandis EP. Decreased concentration of human kallikrein 6 in brain extracts of Alzheimer's disease patients. *Clin Biochem*, 2002; 35(3): 225-31.
28. Diamandis EP, Scorilas A, Kishi T, Blennow K, Luo LY, Soosaipillai A, et al. Altered kallikrein 7 and 10 concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Clin Biochem*, 2004; 37(3): 230-37.
29. Menendez-Gonzalez M, Castro-Santos P, Calatayud MT, Perez-Pinera P, Ribacoba R, Martinez-Rivera M, et al. Plasma level of neurosin predicts outcome of mild cognitive impairment. *Int Arch Med*, 2008; 1(11): 1-7.
30. Iwata A, Maruyama M, Akagi T, Hashikawa T, Kanazawa I, Tsuji S, et al. Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Hum Mol Genet*, 2003; 12(20): 2625-35.
31. Scarisbric IA, Blaber SI, Lucchinetti CF, Genain CP, Blaber M, Rodriguez M. Activity of a newly identified serine protease in CNS demyelination. *Brain*, 2002; 125(6): 1283-96.

32. Scarisbrick IA, Linbo R, Vandell AG, Keegan M, Blaber SI, Blaber M, et al. Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegeneration. *Biol Chem*, 2008; 389(6): 739-45.
33. Gonzalez H, Ottervald J, Nilsson KC, Sjogren N, Miliotis T, Von Bahr H, et al. Identification of novel candidate protein biomarkers for the post-polio syndrome implications for diagnosis, neurodegeneration and neuroinflammation. *J Proteomics*, 2009; 71(6): 670-81.
34. Huang X, Moir RD, Tanzi RE, Bush AL, Rogers JT. Redox-active metals, oxidative stress and Alzheimer's disease pathology. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1012: 153-63.
35. Shimizu-Okabe C, Yousef GM, Diamandis EP, Yoshida S, Shiosaka S, Fahnestock M. Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport*, 2001; 12 (12): 2747-51.
36. Bayani J, Diamandis EP. The physiology and pathobiology of human kallikrein-related peptidase 6 (KLK6). *Clin Chem Lab Med*, 2011; 50 (2): 211-33.
37. Menendez-Gonzalez M, Castro-Santos P, Suarez A, Calatayud MT, Perez-Pinera P, Martinez-Rivera M, et al. Value of measuring plasmatic levels of neurosin in the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2008; 14 (1): 59-67.
38. Mitsui S, Okui A, Uemura H, Mizuno T, Yamada T, Yamamura Y, et al. Decreased cerebrospinal fluid levels of neurosin (KLK6), an aging-related protease, as a possible new risk factor for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2002; 977: 216-23.
39. Patra K, Soosaipillai A, Sando SB, Lauridsen C, Berge G, Meller I, et al. Assessment of kallikrein 6 as a cross-sectional and longitudinal biomarker for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 2018; 10 (1): 1-11.
40. Bossers K, Wirz KT, Meerhoff GF, Essing AH, van Dongen JW, Houba P, et al. Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer's disease. *Brain*, 2010; 133: 3699-3723.
41. Shropshire TD, Reifert J, Rajagopalan S, Baker D, Feinstein SC, Daugherty PS. et al. Amyloid beta peptide cleavage by kallikren 7 attenuates fibril growth and rescues neurons from Abeta-mediated toxicity in vitro. *Biol Chem*, 2014; 395: 109-18.
42. Kidana K, Tatebe T, Ito K, Hara N, Kakita A, Saito T, et al. Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's disease model mice. *EMBO Mol Med*, 2018; 10 (3): 1-13.
43. Lee I, Park C, Kang WK. Knockdown of inwardly rectifying potassium channel Kir2. 2 suppresses tumorigenesis by inducing reactive oxygen species-mediated cellular senescence. *Mol Cancer Ther*, 2010; 9(11): 2951-59.

# Türkiye’de COVID-19 ile ilgili web arama davranışlarının incelenmesi: Google trendleri kullanan bir dijital epidemiyoloji çalışması

## Investigation of COVID-19 related web search behaviors in Turkey: A digital epidemiology study using google trends

Keziban AVCI (ID)

### ÖZET

**Amaç:** İnternet verilerinin kullanımı, insan davranışını tahmin etmek ve analiz etmek için sağlık alanında giderek daha fazla tercih edilmektedir. Ayrıca çevrimiçi arama verileri, hastalıkların ortaya çıkışını ve salgınları tahmin etmek ve izlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Sağlık alanında internet verilerini kullanmanın en popüler aracı, hem gerçek zamanlı hem de arşivlenmiş arama bilgilerini sunan açık bir çevrimiçi araç olan Google Trends’dir. Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de 1 Ocak 2020’den 1 Mayıs 2020’ye kadar internetteki dijital ayak izlerinin kantitatif analizini kullanarak toplumun COVID-19 pandemisi farkındalığını araştırmaktır. Ayrıca bu çalışma, COVID-19 ile ilgili çevrimiçi arama davranışlarının virüsün farklı bölgelere yayılma hızını ve uygulanan bazı önleme stratejilerinin arama davranışı üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlamaktadır.

**Yöntem:** COVID-19 farkındalığını araştırmak için aşağıdaki arama terimleri kullanılmıştır; “Corona+Korona”, “Coronavirus+Koronavirüs+Koronavirus”, “Covid 19” + “Covid-19”, “Pandemi”, “Salgın”. Bu çalışmada “veya” anlamına gelen artı işareti (+) çoklu terimlerin birleşimini temsil etmek için kullanılmıştır. Ardından, ülkede bu anahtar kelimeleri en çok arayanlar için göreceli arama hacimleri (RSV) belirlenmiştir. Son

### ABSTRACT

**Objective:** The use of internet data is being increasingly preferring in health area for predicting and analysing human behavior. In addition online search data are being widely used to predicting and monitor diseases occurrence and outbreaks. The most popular tool in health area for use of internet data is Google Trends, an open online tool that provides both real-time and archived information. The purpose of this study is to explore the public awareness of COVID-2019 pandemic in Turkish using quantitative analysis of its digital footprints on the internet from January 1, 2020 to May 1, 2020. In addition, this study aims to investigate the relationship between online search behaviors about COVID-19 and the spreading speed of virus among different region and the effect of applied some precautionary strategies on search behavior.

**Methods:** The following search terms were used to investigate awareness of COVID-19; “Corona+ Korona”, “Coronavirus+Koronavirüs+Koronavirus”, “Covid 19”+“Covid-19”, “Pandemi (pandemic)”, “Salgın (epidemic)”. In this study, plus sign (+) which means “OR” was used to represent the combination of those multiple terms. Then relative search volumes (RSV) were determined for the most searching these keywords in country. Finally, for the purpose of comparing the

<sup>1</sup>Türkiye Sağlık Hizmetleri Kalite ve Akreditasyon Enstitüsü & Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sağlık Yönetimi Bölümü, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Keziban AVCI

Yıldırım Beyazıt Üni. Sağ. Bil. Fak., Sağ. Yön. Böl., Esenboğa Kampüsü, Çubuk Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : kezibanavci1@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 09.09.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 11.01.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.48991

Avcı K. Türkiye’de COVID-19 ile ilgili web arama davranışlarının incelenmesi: Google trendleri kullanan bir dijital epidemiyoloji çalışması  
Türk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 133 - 146

olarak, COVID-19 ile ilgili olarak Türkiye genelinde halkın algısı ve dikkatini karşılaştırmak amacıyla, 1) Sağlık Bakanlığı'nın vaka ve ölüm sayılarını açıkladığı gün ile RSV' nin zirveye ulaştığı gün arasındaki benzerlik, 2) Resmi otoritenin önleme stratejisini açıkladığı gün ile RSV' nin zirveye ulaştığı gün arasındaki benzerlik değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Türkiye'de COVID-19 ile ilgili aramalar, Çin'de salgının duyurulduğu 30 Ocak 2020 civarında hızla artmış ve küçük bir zirveye ulaşmıştır. Ardından, İtalya'da enfeksiyon sayısının hızla arttığı 26 Şubat 2020 civarında net bir zirve görülmüştür. Son olarak tepe noktası ülkedeki ilk vakanın duyurulduğu 11 Mart 2020 civarında görülmüştür. Arama ilgisi, okul ve sınırların kapatılması, seyahat kısıtlamaları gibi büyük önlemlerin alınmasıyla devam etmiştir. Türkiye'de kamuoyunun dikkat süresi 11 Mart 2020'den 5 Nisan 2020'ye kadar 26 gün sürmüştür.

**Sonuç:** Bulgular risk algılarını, bunun çevrimiçi arama davranışına nasıl yansıdığını gösteren bir dikkat ölçüsü olarak düşünülebilir. Hastalık Türkiye'ye girene kadar COVID-19 ile ilgili çok sayıda araştırma yapılması önemlidir. Ancak Nisan ortasından sonra, tüm arama terimlerine ilişkin sorgular belirgin şekilde düşmüştür. Sonuç olarak bu çalışma yetkililerin COVID-19'un ulusal çapta tanıtımını daha fazla güçlendirmesi ve kamuoyunu bilgilendirmesi gerektiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, pandemi, toplumsal farkındalık, risk algısı, google trends, dijital epidemiyoloji

difference of public perception and attention about COVID-19 across Turkey, 1) The similarity between the day when Ministry of Health announces the numbers of death and case, and the day when RSV reached the apex, 2) The similarity between the day when official authority announces the precaution strategy and the day when RSV reached the apex were evaluated.

**Results:** Searches related to COVID-19 in Turkey rapidly increased following around 30th January 2020 when the epidemic was announced in China and reached a small peak. Then clear peak was seen around 26th February 2020 when the number of infections rapidly increased in Italy. Finally, the apex point was seen around 11 th March 2020 when the announcements of the first case in the country. The search interest was continued with the massive precaution measures which were taken such as the closure of schools, and mosques, and travel restrictions. The duration of public attention in Turkey was 26 days from the 11th March 2020 to the 5th April 2020.

**Conclusion:** Results can be thought of as an attention measure that captures perceptions of risk, how this is reflected in online searching behavior. It is important that until disease introduction to Turkey, there were lots of COVID-19 related searches. However, after mid-April, queries for all search terms had been dramatically declining. As a conclusion this study shows that the authorities should more strengthen the publicity of COVID-19 nationally and inform public.

**Key Words:** COVID-19, pandemic, public awareness, risk perception, google trends, digital epidemiology

## GİRİŞ

2019 yılında Çin'in Wuhan kentinde koronavirüs kaynaklı bir solunum hastalığı olarak ortaya çıkan ve Ocak 2020'de Çin sağlık otoriteleri tarafından insandan insana bulaştığı bildirilen COVID-19 (1), küresel olarak hızla yayılmış ve Mart 2020'de Dünya

Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından pandemi olarak nitelendirilmiştir (2). COVID-19'dan 6 Ağustos 2020 itibarıyla dünya genelinde 216 ülke etkilenmiş, 18.902.735 teyit edilen vaka ve 709.511 ölüm bildirilmiştir (3). Bu açıdan bu yüzyılın tespit edilen

en büyük küresel halk sağlığı sorunu haline gelmiştir.

Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü (MERS-CoV) ve Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü (SARS-CoV) ile aynı aileden olan bu yeni tip koronavirüs; SARS-CoV-2 (COVID-19) olarak adlandırılmış ve çok daha güçlü bir bulaşıcılık ile seyrettiği tespit edilmiştir. Yayılma hızının yarattığı korkunç durum dikkate alındığında pek çok ülke, karantina uygulamalarına başlayarak enfeksiyonun yayılımını sınırlamaya çalışmıştır (4,5). Türkiye’de karantina uygulamasına dahil olan ülkelerden biri olmuştur.

COVID-19 dünyaya hızla yayılırken, insanlar da ne ile karşı karşıya olduklarına dair bilgi arayışına girmiştir. Dijital çağın bir gerekliliği olarak bu endişe internet aramalarına da yansımaktadır. Bu kapsamda Google, dünya çapında en popüler arama motoru olarak karşımıza çıkmaktadır (4). Öte yandan internet hem gerçeğe örtüşen ve hem de çelişen bilginin hızla yayılması için iyi bir zemin niteliğindedir (6). Bu endişeye rağmen internetin ve internet verilerinin kullanımı, insan davranışını tahmin ve analiz etmek için sağlık ve tıp alanında giderek daha fazla tercih edilmektedir. Bu kapsamda zaman içinde seçilen anahtar kelimeler ve konulardaki eğilimlere ilişkin çevrimiçi varyasyonlar hakkında bilgi sağlayan, açık erişimli bir araç niteliğindeki Google Trends, çevrimiçi davranışları incelemek için en popüler araçlardan biri haline gelmiştir (7).

Google Trends verileri, eğer uygun şekilde analiz edilirse, epidemiyolojik çalışmalar açısından önemli veri kaynaklarından biridir (7). Bu kapsamda Ginsberg ve ark. (2009), çevrimiçi arama aktivitelerine göre influenza seyrini belirlemek amacıyla Google Trends verilerini kullanılarak geliştirdikleri tahmin modeli ile Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention: CDC)’ne göre daha hızlı ve yakından takip edilebilir sonuçlara ulaşmışlardır (8). Bu çalışmadan sonra “influenza salgınlarını tahmin etmek için erken

uyarı sistemleri geliştirilebilir mi?” sorusuna cevap aramak ve bu konuda model geliştirmek için pek çok araştırmacı Google Trends verilerini kullanmıştır (9-12).

Çoğu sağlık verisine erişilebilirliğin sınırlı olması, özellikle salgın dönemlerinde hastalığın ortaya çıkması ve yaygınlığı ile ilgili sağlık verilerinin toplanması ve analizi için ihtiyaç duyulan büyük zaman aralığı, araştırmacıların verilere gerçek zamanlı olarak erişilemediği anlamına gelmektedir. Ancak bu durum, konu sağlık olduğunda son derece önemli olabilmektedir. Bu nedenle çeşitli çevrimiçi kaynaklardan elde edilen verilerin; salgınların oluşumu ve yayılımını saptamak, analiz etmek ve öngörmek, insanların davranışları ve eğilimleri gibi konuları incelemek ve tahmin etmek için son dönemde giderek artan sayıda kullanıldığı görülmektedir (7,9). Burada önemli olan husus dijital altyapının uygunluğu ve erişiminin yaygınlığıdır.

Türkiye dijital uygulamalar ve internete erişim açısından dünyada öncü ülkelerden biridir. Bu kapsamda Türkiye’de bilişim teknolojilerini kullanan kurum ve kuruluş sayısı 2019 yılında %96,7 olarak tespit edilmiştir. Aynı dönem internete erişim imkânına sahip ev oranı %88,3 olarak saptanmıştır. Nüfusun büyük bir bölümünü kapsayan 16-74 yaş aralığında internet kullanım oranı %75,3 (13) iken günlük internette geçirilen zaman ise ortalama 7’saattir (14). Bu açıdan dijital ayak izlerini takip ederek ulaşılan verilerin toplumun davranışlarını ve genel yaklaşımlarını yansıtacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de 1 Ocak 2020’den 1 Mayıs 2020’ye kadar internetteki dijital ayak izlerinin kantitatif analizini kullanarak toplumun COVID-19 pandemisi farkındalığını araştırmaktır. Ayrıca bu çalışma, COVID-19 ile ilgili çevrimiçi arama davranışlarının virüsün farklı bölgelere yayılma hızını ve uygulanan bazı önleme stratejilerinin arama davranışı üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlamaktadır.

## Türkiye’de COVID-19 Pandemisi

11 Mart 2020 tarihinde Türkiye’de ilk COVID-19 vakasının tespit edildiği T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından kamuoyuna duyurulmuştur. 17 Mart 2020 tarihinde ise COVID-19 kaynaklı ilk ölümün gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu tarihten sonra SARS-CoV-2 İstanbul, İzmir ve Ankara illeri başta olmak üzere Türkiye genelinde yaygın şekilde görülmüştür. 6 Ağustos 2020 itibari ile Türkiye’deki toplam vaka sayısı 237.265, ölüm sayısı 5.798’dir (15).

Türkiye’de COVID-19 ile ilgili ulusal ve uluslararası gelişmeler doğrultusunda T.C. Sağlık Bakanlığı başta olmak üzere resmi otoriteler tarafından bilim kurulu tavsiyeleri doğrultusunda Tablo 1’de görülen tedbirler arka arkaya uygulamaya koyularak enfeksiyon kontrol altına alınmaya çalışılmıştır (16-18). Bu kapsamda pandemi süresince elde edilen veriler; akademik çalışmalar ve deneyimler ışığında değerlendirilmekte, tanı yaklaşımları ve algoritmaları sürekli güncellenerek paylaşmaktadır (19).

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Google Trends ile elde edilen verilerinin analizini içeren bir çalışmadır. Bu tür çalışmalarda kullanılan metotlar geleneksel istatistik tekniklerinden genel olarak analiz yöntemi, veri kaynağı ve veri türü açısından farklılaşmaktadır.

### Analiz Yöntemi

Google Trends, kimliği açık ya da belirtilmemiş kullanıcıların Google arama motoru ve diğer bağlı web sitelerinde yaptığı çevrimiçi arama tercihlerini yansıtmaktadır. Bu açıdan toplanan büyük veri, makine öğrenmesi teknikleri kullanılarak belirli bir dönem, zaman ve alandaki belirli bir terim ya da konu için arama aktivitesini belirlemeyi mümkün kılan 0 ile 100 arasında indekslenmiş bir değer sağlamaktadır. Bu değer göreceli arama hacmi (relative search volumes: RSV) olarak ifade edilmektedir. Bu açıdan Google Trends mutlak arama sayıları hakkında bilgi sağlamaz. Bu yöntem ile ulaşılan 100 değeri, belirli bir dönem

ve alandaki belirli bir terim ya da konu için en yüksek arama etkinliğini ve buna göre verilen gün, hafta ya da aylar için arama hacmini temsil etmektedir. Çok düşük arama hacmine sahip dönemler ise sıfır etkinlik olarak tanımlanmaktadır (7,10,20-22).

Bu çalışma elde edilen Google Trends verileri Microsoft Excel programı kullanılarak hazırlanan grafikler aracılığı ile incelenmiştir.

### Veri Kaynağı

Bu çalışmada veri kaynağı çok miktarda veri üreten, çevrimiçi paylaşım imkân veren, web tabanlı arama motorudur. Web sorgulamalarının kullanıcıların kimlik bilgilerine gerek olmaksızın anonim olarak yapılabilmesi Google Trends verilerinin; bulaşıcı hastalıklar, intihar ve majör depresyon gibi mental sorunlar ile uyuşturucu kullanımı gibi yasa dışı durumları içeren hassas konularda toplanması zor bilgilere erişim imkânı sağladığı belirtilmektedir (4,21,23-26). Ayrıca verilere erişim gerçek zamanlı olduğu için, anket gibi diğer geleneksel yöntemlerin kullanımı için gerekli olan uygulama zamanı ihtiyacı bu yöntemde ortadan kalkmaktadır (27).

### Veri Türü

Çalışmada analiz için kullanılan veriler, gerçek zamanlı çevrimiçi web arama kayıtlarından elde edilen dijital verilerdir.

### Arama Terimlerinin Seçimi ve Veri Toplanması

Çevrimiçi arama trendlerini belirlerken doğru anahtar kelimelerin seçimi sonuç geçerliliği açısından önemlidir (28). Bu nedenle, geçerli bir Google Trends analizi için aşağıdaki hususlara dikkat edilmesi önerilmektedir (7,28,29);

1) Trends aramaları büyük ya da küçük harfe duyarlı değildir, ancak çoğul veya tekil isimlere ve yazım hatalarına duyarlıdır. Bu nedenle, anahtar kelime seçimi veya anahtar kelime kombinasyonu ne olursa olsun, konu ile ilgili bir kısım arama analizde dikkate alınmayacaktır. Bu kısıtlılığı kısmen azaltmak için “veya” anlamına gelen artı (+) işareti ile seçilen terime ilişkin yazım hataları ve yazım varyasyonları ile



Tablo 1. Türkiye’de uygulanan COVID-19 tedbirleri (16-18)

Başlama Tarihi	Tedbir Türü
3 Şubat 20	İran’a uçuş yasağı uygulaması başladı.
23 Şubat 20	Çin’e uçuş yasağı uygulaması başladı.
29 Şubat 20	İtalya / Irak / Güney Kore’ye uçuş yasağı uygulaması başladı.
8 Mart 20	İran ve Irak arasındaki sınır kapıları kapatıldı.
13 Mart 20	Almanya / Fransa / İspanya / Norveç / Danimarka / Belçika / İsveç / Hollanda / Avusturya’ya uçuş yasağı uygulaması başladı.
16 Mart 20	Mısır / İngiltere / İsviçre / Suudi Arabistan / İrlanda / Birleşik Arap Emirlikleri’ne uçuş yasağı uygulaması başladı.
	Umre ziyaretinden dönen kişiler Ankara, Konya, Kayseri ve Isparta şehirlerinde boşaltılan öğrenci yurtlarında Karantinaya alındı.
	Geçici olarak başlayan ancak devam kararı ile sürdürülen ilköğretim, lise ve üniversitelerin örgün eğitimine ara verildi ve uzaktan eğitim uygulamasına geçildi.
	Cami, mescit gibi alanlarda toplu ibadetlere ara verildi.
17 Mart 20	Kamu kurum ve kuruluşlarında çalışan hamileler, yasal süt izni kullananlar, engelliler, yönetici pozisyonundakiler hariç 60 yaş ve üzerinde olanlar idari izinli sayıldı.
	Tiyatro, sinema, lokanta, kahvehane, internet kafe ve kapalı çocuk oyun alanlarının faaliyetleri durduruldu.
19 Mart 20	Yunanistan ve Bulgaristan’a açılan sınır kapıları kapatıldı.
21 Mart 20	65 Yaş ve üstü ile kronik rahatsızlığı olanlara sokağa çıkma yasağı getirildi.
	Uçuş yasağı uygulanan ülke sayısı 68’e çıkarıldı.
	Lokanta ve restoranlara kısıtlama getirildi. Oturma alanlarına müşteri kabul etmeme uygulaması hayata geçirildi.
	Berber, kuaför, güzellik merkezlerinin faaliyetleri geçici olarak durduruldu.
22 Mart 20	Kamu kurumlarında esnek çalışma uygulamasına geçildi.
28 Mart 20	İller arası otobüs seferlerinin valilik izni ile yapılması zorunlu hale getirildi.
30 Mart 20	3 büyükşehirde ticari taksilere kısıtlamalar getirildi.
3 Nisan 20	20 yaş altına sokağa çıkma yasağı getirildi.
	30 Büyükşehir ve Zonguldak’ın şehir giriş ve çıkışlarına kısıtlama getirildi.
	Vatandaşların sosyal mesafe kurallarına uygun hareket etme zorunluluğu getirildi.
10 Nisan 20	30 büyük şehir ve Zonguldak’a hafta sonları sokağa çıkma yasağı uygulanmaya başlandı.
22 Nisan 20	2020 ramazan etkinlikleri (iftar, sahur gibi toplu katılım olan ) iptal edildi/ yasaklandı.

oluşturulacak kombinasyonlar kullanılabilir.

2) İki veya daha fazla kelimeye sahip anahtar kelimeler için bir diğer önemli husus, kelime seçiminde tırnak işaretleri kullanımınıdır. Örneğin, COVID-19 tırnak işareti kullanılarak veya kullanılmadan aranabilir. Tırnak işareti olmadan “COVID 19” terimi,

olası herhangi bir kombinasyonda “COVID” ve “19” kavramlarını içeren sonuçlar verecektir. Bu tür aramalarda elde edilen sonuçlara ilişkin eğilim, bazen doğru yapılan arama sonuçlarına benzeyebilir. Ancak arama hacimlerinde farklılık bulunmaktadır.

3) Bir diğer önemli konu girilen anahtar kelimenin “terim” olarak mı “hastalık” (veya “konu”) olarak mı seçileceğidir. Kavramın “terim” olarak seçimi tüm anahtar kelimeler için sonuç vermektedir.

4) Bir anahtar kelime ile yapılan arama türü de elde edilen sonuçları etkilemektedir. Google Trends araştırmacıya “Web Araması”, “Görsel Arama”, “Haber Arama”, “Google Alışveriş” ve “YouTube Arama” seçeneklerini sunmaktadır. Çok özel durumlar dışında, varsayılan seçenek olan “Web Aramasının” seçilmesi arama hacmini genişleten bir nitelik sağlamaktadır.

5) Veriler seçilen dönem için normalleştirildiğinden, verilerinin alındığı zaman dilimi sonuçların geçerliliği için önemli bir diğer husustur. İncelenen zaman diliminin seçimi, Google Trends araştırmalarında en sık yapılan hatalardan biridir. Terimler arası karşılaştırmalarda seçilen dönemlerin eşit olması, verilerin alınma zamanına bağlı olarak sonuçları değiştirebileceğinden önemlidir. Bu nedenle zaman sınırına bağlı olarak verilerin kullanılabilir olduğu aralık, bir başka ifade ile arama periyodunu kapsayan başlangıç ve bitiş tarihi ile saati dikkatle belirlenmelidir.

Bu kapsamda 1 Ocak 2020-1 Mayıs 2020 tarihleri arası Google Trends verileri kullanılarak Türkiye’de toplumunun COVID-19 farkındalığını belirlenmeyi amaçlayan bu çalışmada; COVID-19 farkındalığını araştırmak için “Corona + Korona”, “Coronavirus + Koronavirüs + Koronavirus”, “” Covid 19 “+” Covid-19 “”, “Pandemi”, “Salgın” arama terimleri, araştırma sonuçlarını etkileyecek daha önce ifade edilen kritik hususlar dikkate alınarak seçilmiştir. Ardından Türkiye’de bu arama terimlerini en çok arayan şehirler belirlenmiştir. Son olarak, COVID-19 ile ilgili Türkiye genelinde halkın algısı ve dikkatini karşılaştırmak amacıyla;

1) Sağlık Bakanlığı’nın vaka ve ölüm sayılarını açıkladığı gün ile RSV’nin zirveye ulaştığı gün arasındaki benzerlik,

2) Resmi otoritenin önleme stratejisini açıkladığı gün ile RSV’nin zirveye ulaştığı gün arasındaki benzerlik değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

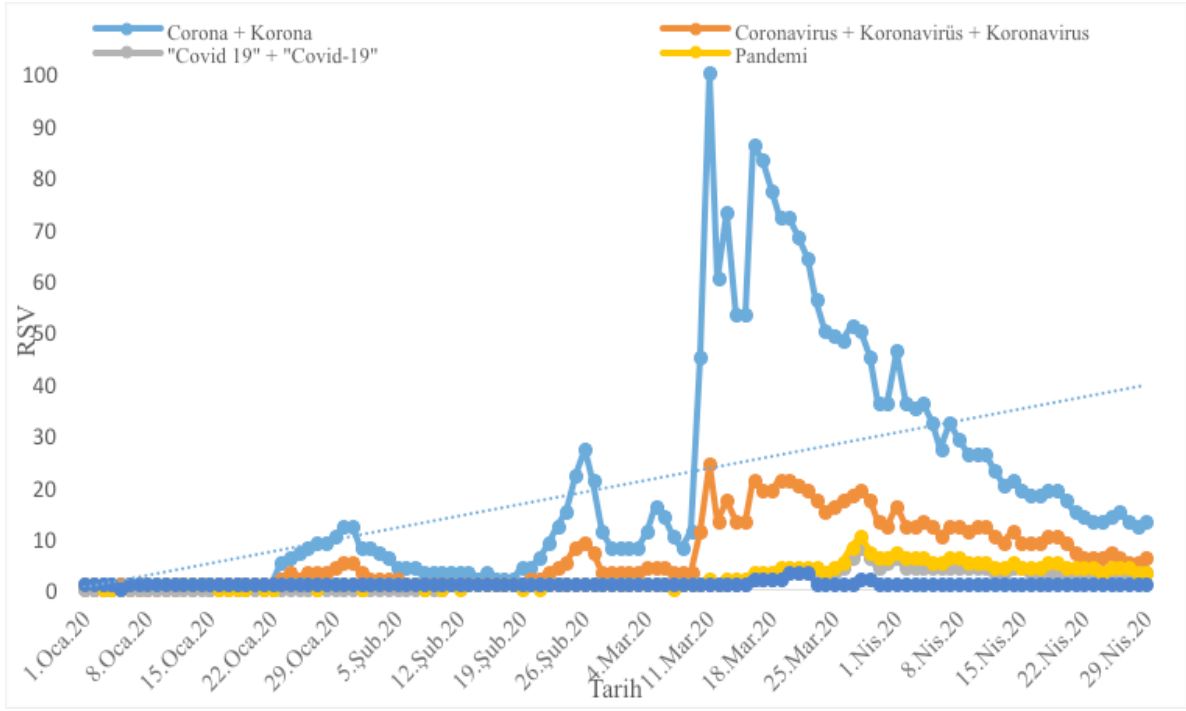
### COVID-19 İle İlgili Web Arama Eğilimleri

“Corona + Korona”, “Coronavirus + Koronavirüs + Koronavirus”, “” Covid 19 “+” Covid-19 “”, “Pandemi”, “Salgın” arama terimleri Google Trends sonuçlarına ilişkin eğilim Şekil 1’de görülmektedir. Buna göre en çok arama yapılan terim; “Corona + Korona” terimidir. Bu terim ile “Coronavirus + Koronavirüs + Koronavirus” arama terimlerine ilişkin sonuç eğilimleri benzerdir. Bu arama terimlerine toplumun ilgisi en üst düzeye ulaşmadan evvel, 30 Ocak 2020 ve 26 Şubat 2020 tarihinde küçük bir artış trendi oluşmuştur. Tepe noktası olarak ifade edilecek en üst düzeye ise 11 Mart 2020 tarihinde ulaşılmıştır. Takibinde arama eğilimi düşme trendine girmiş ve bir sonraki yukarı yönlü hareketlilik 16 Mart 2020’de gerçekleşmiştir. Son yükseliş trendi ise 1 Nisan 2020’de izlenmiştir. Öte yandan COVID-19’a 11 Mart ile 5 Nisan 2020 tarihleri arasında yoğun bir ilginin olduğu görülmektedir.

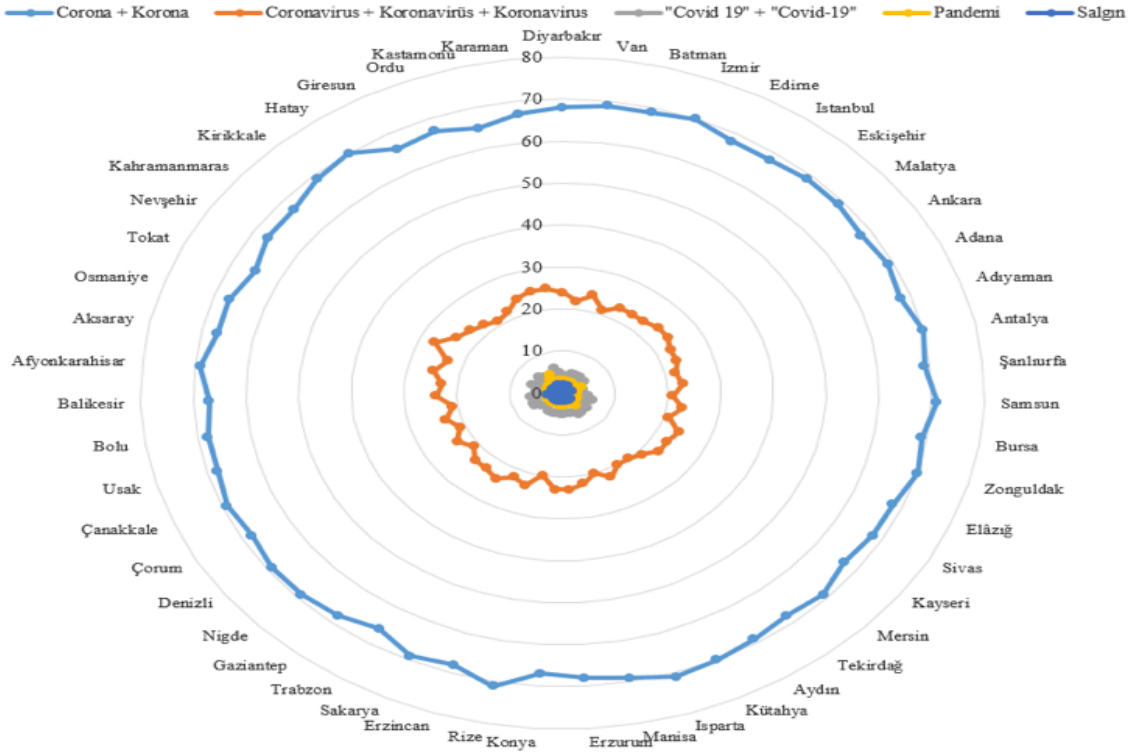
“”Covid 19 “+” Covid-19 “” ile “Pandemi” terimlerinin arama trendleri de benzerdir. Bu terimlere ilişkin RSV zirvesine 28 Mart 2020’de ulaşılmıştır. Ancak bu gruplarda yer alan terimlere olan ilgi diğer iki grup arama teriminden oldukça azdır. Son olarak “Salgın” arama terimi RSV düzeyi sınır seviyesinde seyretmiştir.

### COVID-19 İle İlgili Web Arama Eğilimlerinin Şehirlere Göre Durumu

COVID-19 ile ilgili arama terimlerinin illere göre dağılımına bakıldığında; 10 il merkezinde (Kocaeli, Mardin, Muğla, Muş, Siirt, Sinop, Şırnak, Tunceli, Yalova ve Yozgat) yapılan web tabanlı aramalar diğer illere kıyasla çok az olduğu için RSV değerleri 0 olarak görülmektedir. Bu nedenle bu iller RSV değerlerine göre illerin Google Trends arama



Şekil 1. COVID-19 ile ilgili google trends arama sonuçları



Şekil 2. COVID-19 ile ilgili google trends arama sonuçlarının şehirlere göre dağılımı

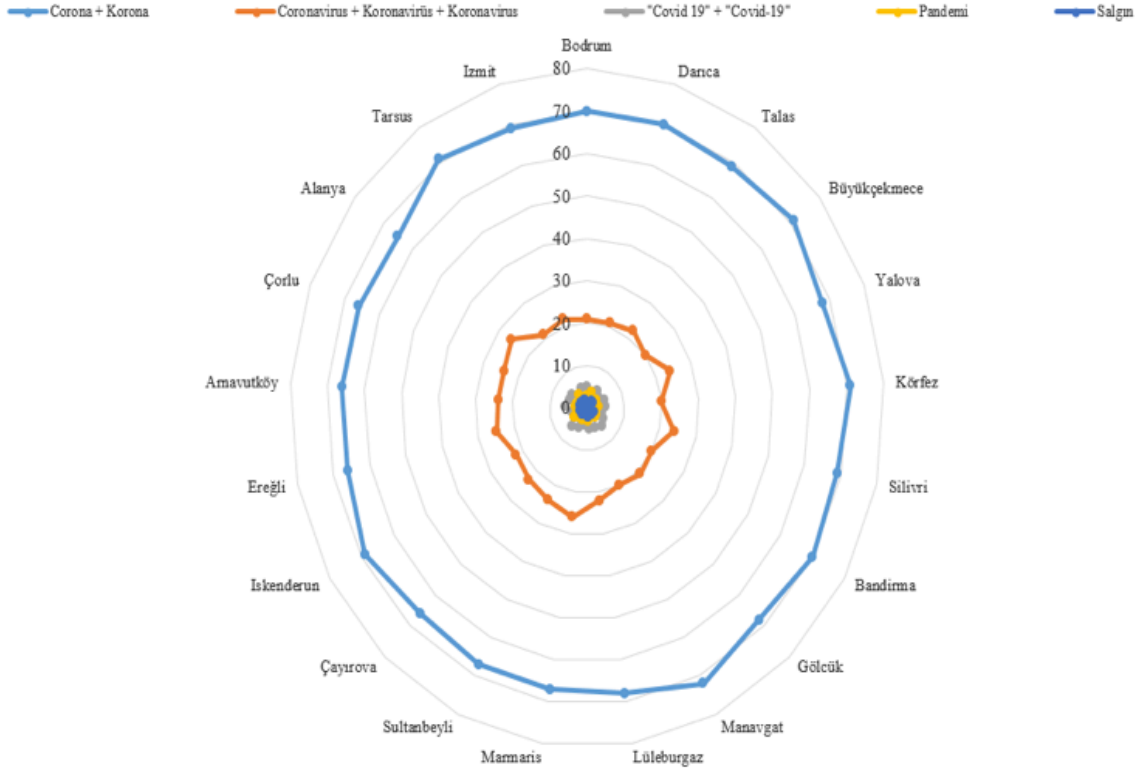
sonuçlarını gösteren Şekil 2'de yer almamaktadır.

Bununla birlikte 20 ilçe pek çok ili aramalarda geride bırakarak öne çıkmıştır. Şekil 3'te Tarsus, Manavgat, Büyükçekmece, Marmaris, Körfez, Darıca, İzmit ve Bodrum gibi bazı ilçelerin aramalarda büyükşehirlerle benzer RSV düzeyine sahip olduğu görülmektedir.

#### Arama Terimleri Açısından Öne Çıkan Aramalar

Seçilen terimlere ilişkin ilk on arama ve patlama

yapan aramalara ilişkin sonuçlar incelendiğinde; Türkiye'de toplumunun hastalığın seyri, COVID-19 testi, belirtileri, vaka sayısı, ülkede ve dünyada güncel durum gibi konuların yanında özellikle İtalya'daki durumdan etkilendikleri görülmektedir. Öte yandan "pandemi" ile ilişkili aramaların büyük çoğunluğunun sosyal destek ve yardım konuları etrafında şekillendiği görülmektedir. "Salgın" terimi altında ise film içerikli aramalar yapılmıştır (Tablo 2).



Şekil 3. COVID-19 ile ilgili google trends arama sonuçları açısından öne çıkan ilçeler

Tablo 2. Google trends verilerinde öne çıkan arama terimleri

Corona + Korona			"Covid 19"+"Covid-19"		
En Çok Arananlar	RSV	Patlama Yapan Aramalar	En Çok Arananlar	RSV	Patlama Yapan Aramalar
corona virüs	38	son dakika corona	covid 19 belirtileri	100	covid 19 belirtileri
son dakika corona	34	korona virüs	covid 19 map	92	covid 19 map
türkiye corona	34	corona virüsü son dakika	covid 19 gov	85	covid 19 gov
corona belirtileri	32	corona son durum	covid 19 sağlık	70	covid 19 sağlık
corona son durum	13	corona vaka	Covid 19 Türkiye	68	Covid 19 Türkiye
corona vaka	12	Türkiye corona virüsü	Sağlık Bakanlığı	50	Sağlık Bakanlığı
Türkiye corona virüsü	11	corona haritası	covid 19 haritası	49	covid 19 dünya
corona haritası	10	korona belirtileri	covid 19 dünya	32	son dakika covid 19
corona İtalya	6	corona İtalya	son dakika covid 19	31	covid 19 tablosu
Türkiyede corona	6	corona tablosu	covid 19 tablosu	28	covid 19 testi
Coronavirus + Koronavirüs+ Koronavirus			Pandemi		
En Çok Arananlar	RSV	Patlama Yapan Aramalar	En Çok Arananlar	RSV	Patlama Yapan Aramalar
koronavirüs Türkiye	90	koronavirüs Türkiye	pandemi nedir	100	pandemi sosyal
koronavirüs belirtileri	59	koronavirüs belirtileri	pandemi sosyal	74	pandemi destek
son dakika koronavirüs	54	son dakika koronavirüs	pandemi destek	56	pandemi ne
korona virüs haritası	51	korona virüs haritası	pandemi yardımı	36	pandemi yardımı
coronavirus map	41	coronavirus map	e devlet pandemi	36	e devlet pandemi
Türkiye coronavirus	39	Türkiye coronavirus	pandemi başvuru	28	pandemi başvuru
koronavirüs son durum	39	koronavirüs son durum	pandemi sorgulama	21	pandemi sorgulama
coronavirus belirtileri	35	koronavirüs tablosu	pandemi sonuçları	19	pandemi sonuçları
koronavirüs tablosu	31	koronavirüsvaka sayısı	pandemi hastanesi	16	pandemi hastanesi
koronavirüsvaka sayısı	27	Sağlık Bakanlığı	sosyal yardım	13	sosyal yardım
Salgın					
En Çok Arananlar	RSV	Patlama Yapan Aramalar			
salgın izle	100	contagion			
salgın filmi	67	salgın contagion			
salgın hastalık	28	salgın 2011			
film izle salgın	25	salgın full izle			
contagion	18	salgın hd izle			
salgın filmleri	17	Çin salgın			
salgın 2011	15	salgın altyazılı izle			
salgın Türkçe izle	14	salgın filmi 2011			
salgın Türkçe dublaj	11	Çinde salgın			
salgın netflix	6	corona filmi			

## TARTIŞMA

1 Ocak 2020-1 Mayıs 2020 tarihleri arası Google Trends verileri kullanılarak Türkiye’de toplumunun COVID-19 farkındalığının belirlenmeye çalışıldığı bu çalışmada bulgular; risk algılarını, bunun web arama davranışlarına nasıl yansıdığını gösteren bir dikkat ölçüsü olarak düşünülebilir. Bu kapsamda elde edilen bulgular SARS-CoV-2 Türkiye’de tespit edilene kadar toplumun COVID-19 ile ilgili çok sayıda web araması yaptığını göstermektedir. Bu kapsamda COVID-19 ile ilgili web aramalarına ilişkin;

1. İlk olarak Çin’de salgının duyurulduğu 30 Ocak 2020 tarihi (1) civarında küçük bir zirve görülmüştür.

2. İkinci olarak, İtalya’da enfeksiyon sayısının hızla arttığı 26 Şubat 2020 tarihi (30) civarında ikinci bir zirve görülmüştür.

3. Tepe noktası 11 Mart 2020 civarında, ilk vakanın ülkede duyurulduğu tarihte görülmüştür. Bu dönem aynı zamanda DSÖ tarafından pandemi ilan edildiği ve İtalya, Güney Kore, İran, ABD ve Hindistan gibi ülkelerde hastalığın görüldüğü, küresel ölçekte dramatik sonuçların ortaya çıktığı dönemdir (31). Arama ilgisi okul, ibadethane ve sınırların kapatılması gibi enfeksiyonun yayılmasını engellemeye yönelik oldukça sıkı ve kapsamlı önleme stratejilerinin uygulanmasıyla devam etmiştir. Dünya genelinde, COVID-19 yayılımının azaltılması için önleme stratejilerinin neler olabileceğine yönelik yapılan çalışmalar ve kapsamı değişmekle birlikte hayata geçirilen önleme stratejileri bulunmaktadır. Bu doğrultuda örneğin Çin virüsün yayılmasını kontrol etmede en etkili yönteminin karantina ve sosyal izolasyon önlemleri olduğunu ileri sürmüştür. Güney Kore, enfeksiyon kontrol önlemlerinin temel bileşeni olarak test yapılmasını önermiştir. Bazı çalışmalar el hijyeni ve yüz maskelerinin önemine dikkat çekmektedir (4,32). Bir diğer strateji sokağa çıkma kısıtlamalarıdır. Kısıtlamalar bir başka ifade ile izolasyon önlemleri insanların hareketini kısıtlamaya yönelik eylemlerdir. Bu kapsamdaki uygulamalar

genel olarak yaklaşık 1,5 metrelik (6 feet) güvenli bir mesafeyi korumak ve bu tür mesafenin korunamayacağı yerlerden kaçınmak anlamına gelmektedir. İkincisi, koronavirüse veya koronavirüsü olan hastalara uygulanan karantina önlemleridir. Burada şüpheli ya da hasta bireylerin belirtiler geliştirip geliştirmediklerini görmek için virüsün kuluçka dönemi boyunca diğer insanlarla teması engellenmektedir. İzolasyon yoluyla insanların buldukları yeri terk etmelerine izin verilmemektedir (32). Bu kapsamda sosyal izolasyon uygulamalarının pandemi döneminde hala en güçlü azaltma önlemi olduğu belirtilmektedir (33).

Araştırma kapsamında ulaşılan bir diğer bulgu olan COVID-19’a ilişkin Türkiye’de toplumun dikkat süresi 11 Mart 2020’den 5 Nisan 2020’ye kadar 26 gün sürmüştür. Hu ve ark. (2020) bu süreyi ABD’de 27, Birleşik Krallık’ta 23, Avustralya’da 22, Kanada’da 13, Yeni Zelanda’da 11 olarak bulduğunu belirtmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar COVID-19 ile ilgili RSV’lerin, Çin’de SARS-CoV-2 ile enfekte olan hasta sayısının duyurulması ve özellikle yakın coğrafyalarda (İtalya ve İran gibi) çok sayıda vakanın açıklanması ve dramatik olayın medyaya yansması ile ilişkili görünmektedir. Bu durum çoğu ülke için benzerdir (4,30). ABD’de toplumun dikkat süresinin uzunluğu; pandemi ilanından bu yana hastalığın yayılmasını önlemek için uygulanan önlemlere ve CDC gibi birçok federal ve yerel sağlık kuruluşunun halkın sağlıkla ilgili konulara yönelik farkındalığını artırmada oynadıkları kritik role bağlanmıştır (4). Bu kapsamda Türkiye’nin T.C. Sağlık Bakanlığı liderliğinde izlediği sistematik çaba 2020 yılının ilk yarısı itibari ile COVID-19 pandemi sürecini pek çok ülkeden daha iyi yönettiğini göstermektedir (3). Ancak 5 Nisan 2020 tarihi itibarıyla toplumun ilgi düzeyinin azalması dikkatle ele alınmalıdır. Bu açıdan pandemi gibi olağanüstü durumlarda hızlı bir şekilde test kapasitesinin artırılması için hazırlıklı olunması, yetkin insan kaynaklarının tükenmişlik içine düşmesinin önüne geçecek şekilde organize edilmesi, bu amaçla profesyonellere ve halka yönelik iletişim ve sürekli bilgi akışının sağlanması, plan,

strateji ve rehberlerin yaygın işbirliği ile üretilmesi sürecin başarısı için önemlidir (16). Öte yandan, hastalığa ilişkin farkındalık düzeyi arttıkça ihtiyati davranışların yaygınlaşması beklenmektedir (34).

Ayrıca ülkenin farklı şehirlerinde COVID-19'a ilgilinin düzeyi farklı bulunmuştur. Özellikle bazı ilçelerin arama davranışı açısından çoğu ili geçtiği görülmektedir. Bu ilçelere ilişkin ilk dikkat çeken husus; bazılarının (Marmaris, Datça, Bodrum, Alanya gibi) turizm kenti olmasıdır. Bu durum önlemler çerçevesinde uluslararası hareketliliğe ilişkin bölge insanının ilgisi olabileceği gibi, büyükşehirlerden sosyo-ekonomik düzeyi yüksek bir grup insanın karantina dönemi için buraları tercih etmesinden de kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca COVID-19'a ilişkin arama davranışı yüksek olan ilçelerin genel olarak gelişmiş ekonomiye, ulaşım sistemine ve yoğun nüfusa sahip yerler olduğu görülmektedir.

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Bu kısıtlılıklar aynı zamanda Google Trends analizlerinin de temel kısıtlılığıdır. Araştırma periyodu süresince kaç kişinin, ne kadar arama yaptığı tespit edilemediği için çalışmanın evren ve örneklem büyüklüğü bilinmemektedir. Bu nedenle belirlenen bir periyotta, belirlenen bir bölge için belirlenen arama terimleri ile tespit edilen temsili bir örneklem üzerinde çalışılmaktadır. Ancak Türkiye'de artan internet erişim ve kullanım oranı dikkate alındığında, internet tabanlı verilerin ampirik olarak davranışı keşfetme ve tahmin etmede geçerli sonuçlar sağladığı ve gerçek verilerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bir diğer kısıtlılık; Google Trends için sonuçların arama terimleri ile ilişkili olarak elde edilmesi dikkate alındığında tüm olası arama terimleri bilinemediğinden konu ile ilgili bir kısım arama analizde dikkate alınamamıştır.

Ancak arama terimleri seçilirken çoklu terim ve terim kombinasyonları kullanılarak kapsam genişletilmeye çalışılmıştır. Son olarak veriler tek bir arama motorundan (Google) alındığı için yalnızca bu arama motorunu kullanarak arama yapan belirli bir kitleden veri toplanabilmiştir. Dolayısıyla çalışmada seçim yanlılığı söz konusudur. Ayrıca Google Trends verilerinde kullanıcıların sosyo-demografik özelliklerini yansıtacak verilere erişilemediğinden arama davranışını etkileyebilecek bu tür özellikler hakkında bilgi bulunmamaktadır.

Türkiye'de halkın COVID-19 ile ilgili çevrimiçi arama davranışlarının, SARS-CoV-2'nin farklı bölgelere yayılma hızını ve uygulanan enfeksiyon kontrol stratejilerin arama davranışı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada; COVID-19 ile ilgili arama trendinin tepe noktasına ilk vakanın ülkede tespit edildiğinin duyurulduğu 11 Mart 2020'de ulaştığı görülmüştür. Arama ilgisi, okul, ibadethane ve sınırların kapatılması gibi büyük çaplı önlemlerin alınmasıyla devam etmiş ve 5 Nisan 2020'de ise belirgin bir düşme trendine geçmiştir. Bu açıdan; COVID-19'a bağlı kayıpları en aza indirmek amacıyla yetkililerin toplumsal farkındalığı artırma çalışmalarını sürekli hale getirmesi önerilmektedir. Ayrıca topluma yeterli ve yerinde önlemlerle koruma yolları hakkında bilgilendirmelerin bir sistem dahilinde yapılması önemlidir. Böylece pandemi kaynaklı çok sayıda acil hasta talebini engellemek, toplumun COVID-19'la ilişkili durumlara yönelik tepki süresini kısaltmak ve olası kayıpları en az düzeyde tutmak söz konusu olacaktır.

Sonuç olarak bu çalışma yetkililerin COVID-19' un ulusal çapta tanıtımını daha fazla güçlendirmesi ve kamuoyunu bilgilendirmesi gerektiğini göstermektedir.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma Etik Kurul İzni gerektirmemektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak- A n update on the status. *Military Medical Research*. 2020.
2. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020.
3. WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. [Internet]. WHO. 2020 [cited 2020 Aug 6]. p. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available from: <https://covid19.who.int>.
4. Hu D, Lou X, Xu Z, Meng N, Xie Q, Zhang M, et al. More Effective Strategies are Required to Strengthen Public Awareness of COVID-19: Evidence from Google Trends. *SSRN Electron J*. 2020.
5. Graham Carlos W, Dela Cruz CS, Cao B, Pasnick S, Jamil S. Novel Wuhan (2019-NCoV) coronavirus. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2020. p. 201(4):P7-P8.
6. Kata A. Anti-vaccine activists, Web 2.0, and the postmodern paradigm - An overview of tactics and tropes used online by the anti-vaccination movement. *Vaccine* [Internet]. 2012 May;30(25):3778-89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11019086>.
7. Mavragani A, Ochoa G. Google Trends in Infodemiology and Infoveillance: Methodology Framework. *JMIR Public Heal Surveill* [Internet]. 2019 May 29;5(2):e13439. Available from: <http://publichealth.jmir.org/2019/2/e13439/>.
8. Ginsberg J, Mohebbi MH, Patel RS, Brammer L, Smolinski MS, Brilliant L. Detecting influenza epidemics using search engine query data. *Nature* [Internet]. 2009 Feb 19;457(7232):1012-4. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature07634>.
9. Chunara R, Goldstein E, Patterson-Lomba O, Brownstein JS. Estimating influenza attack rates in the United States using a participatory cohort. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Aug 2;5(1):9540. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep09540>.
10. Zhang Z, Zheng X, Zeng DD, Leischow SJ. Tracking Dabbing Using Search Query Surveillance: A Case Study in the United States. *J Med Internet Res* [Internet]. 2016 Sep 16;18(9):e252. Available from: <http://www.jmir.org/2016/9/e252/>.
11. Woo H, Cho Y, Shim E, Lee J-K, Lee C-G, Kim SH. Estimating Influenza Outbreaks Using Both Search Engine Query Data and Social Media Data in South Korea. *J Med Internet Res* [Internet]. 2016 Jul 4;18(7):e177. Available from: <http://www.jmir.org/2016/7/e177/>.



12. Liang F, Guan P, Wu W, Huang D. Forecasting influenza epidemics by integrating internet search queries and traditional surveillance data with the support vector machine regression model in Liaoning, from 2011 to 2015. *PeerJ [Internet]*. 2018 Jun 25;6:e5134. Available from: <https://peerj.com/articles/5134>.
13. TÜİK. Türkiye İstatistik Kurumu Haber Bülteni, Hanehalkı Bilişim Teknolojileri (BT) Kullanım Araştırması, 2019. [Internet]. TÜİK, 2019, Ağustos 27. [cited 2020 Aug 6]. Available from: <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=30574>.
14. Deloitte Digital. E-Ticaretin Gelişimi, Sınırların Aşılması ve Yeni Normlar 2019 [Internet]. TÜSİAD. [cited 2020 Aug 6]. Available from: <http://www.tubisad.org.tr/tr/images/pdf/dd-tusiad-eticaret-raporu-2019.pdf>.
15. T.C. Sağlık Bakanlığı. T.C. Sağlık Bakanlığı Korona Tablosu; Türkiye'deki Güncel Durum, [Internet]. 2020. [cited 2020 Aug 6]. Available from: <https://covid19.saglik.gov.tr/>.
16. T.C. İçişleri Bakanlığı, AramaSonuçları. [Internet]. T.C. İçişleri Bakanlığı. [cited 2020 Aug 6]. Available from: <https://www.icisleri.gov.tr/arama/ara/korona>.
17. Ajansı A. Koronavirüs [Internet]. Anadolu Ajansı. [cited 2020 Aug 6]. Available from: <https://www.aa.com.tr/tr/koronavirus>.
18. Campaign TR. COVID-19 Salgınına Karşı Alınan Tedbir ve Önlemler [Internet]. Campaign TR. [cited 2020 Aug 6]. Available from: <https://www.campaigntr.com/covid-19-salginina-karsi-alinan-tedbir-ve-onlemler/>.
19. Erensoy S. [SARS-CoV-2 and Microbiological Diagnostic Dynamics in COVID-19 Pandemic]. *Mikrobiyol Bul [Internet]*. 2020 Jul;54(3):497-509. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32755524>.
20. Jarynowski A, Wójta-Kempa M, Belik V. Perception of Emergent Epidemic of COVID-2019 / SARS CoV-2 on the Polish Internet. *SSRN Electron J [Internet]*. 2020; Available from: <https://ssrn.com/abstract=3572662>.
21. Lucas B, Elliot B, Landman T. Online Information Search During COVID-19. 2020 Apr 15;1-13. Available from: <http://arxiv.org/abs/2004.07183>.
22. Google Trends. Trends Help [Internet]. Google Trends. [cited 2020 Jun 20]. Available from: [https://support.google.com/trends/answer/6248105?hl=en&ref\\_topic=6248052](https://support.google.com/trends/answer/6248105?hl=en&ref_topic=6248052).
23. Solano P, Ustulin M, Pizzorno E, Vichi M, Pompili M, Serafini G, et al. A Google-based approach for monitoring suicide risk. *Psychiatry Res [Internet]*. 2016 Dec;246:581-6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165178116301949>.
24. Mavragani A, Ochoa G. Forecasting AIDS prevalence in the United States using online search traffic data. *J Big Data [Internet]*. 2018 Dec 19;5(1):1-17. Available from: <https://journalofbigdata.springeropen.com/articles/10.1186/s40537-018-0126-7>.
25. Mavragani A, Ochoa G. The Internet and the Anti-Vaccine Movement: Tracking the 2017 EU Measles Outbreak. *Big Data Cogn Comput [Internet]*. 2018 Jan 16;2(1):2. Available from: <http://www.mdpi.com/2504-2289/2/1/2>.
26. Lin Y-H, Liu C-H, Chiu Y-C. Google searches for the keywords of “wash hands” predict the speed of national spread of COVID-19 outbreak among 21 countries. *Brain Behav Immun [Internet]*. 2020 Apr; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159120304748>.
27. Jun S-P, Yoo HS, Choi S. Ten years of research change using Google Trends: From the perspective of big data utilizations and applications. *Technol Forecast Soc Change [Internet]*. 2018 May;130:69-87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040162517315536>.

28. Scharrow M, Vogelgesang J. Measuring the Public Agenda using Search Engine Queries. *Int J Public Opin Res* [Internet]. 2011 Mar 1;23(1):104-13. Available from: <https://academic.oup.com/ijpor/article-lookup/doi/10.1093/ijpor/edq048>.
29. Ayyoubzadeh SM, Ayyoubzadeh SM, Zahedi H, Ahmadi M, R Niakan Kalhori S. Predicting COVID-19 Incidence Through Analysis of Google Trends Data in Iran: Data Mining and Deep Learning Pilot Study. *JMIR Public Heal Surveill*. 2020 Apr 14;6(2):e18828.
30. Strzelecki A. The Second Worldwide Wave of Interest in Coronavirus since the COVID-19 Outbreaks in South Korea, Italy and Iran: A Google Trends Study. 2020 Mar 24;March 25. Available from: <http://arxiv.org/abs/2003.10998>.
31. The Lancet Infectious Diseases. Challenges of coronavirus disease 2019. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020 Mar;20(3):261. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309920300724>.
32. Bhattacharya S, Singh S. Visible Insights of the Invisible Pandemic: A Scientometric, Altmetric and Topic Trend Analysis. 2020 Apr 22; Available from: [www.dimensions.ai](http://www.dimensions.ai).
33. Jackson D, Bradbury-Jones C, Baptiste D, Gelling L, Morin K, Neville S, et al. Life in the pandemic: Some reflections on nursing in the context of COVID-19. *Journal of Clinical Nursing*. 2020.

# Pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerden üretilen *S. maltophilia* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin karşılaştırılması

## Comparing the biofilm formation properties of *S. maltophilia* isolates obtained from the pulmonary and extrapulmonary samples

Kemal BİLGİN<sup>1</sup> (ID), Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI<sup>1</sup> (ID), İlknur BIYIK<sup>1</sup> (ID), Demet GÜR VURAL<sup>1</sup> (ID), Elif Gülsüm TORUN<sup>2</sup> (ID), Asuman BİRİNCİ<sup>1</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** *Stenotrophomonas maltophilia*, toplum kökenli enfeksiyonlarda bildirilmiş olmakla birlikte, genellikle çoklu ilaç direncine sahip nozokomiyal bir patojendir. *S. maltophilia*'nın etkeni olduğu enfeksiyonların tedavisinde ilk tercih edilecek olan antibiyotik trimetoprim-sülfametoksazoldür. Hastanede yatan hastalarda solunum yolu, en sık izole edildiği vücut bölgesidir. Bakteri hakkında, plastik yüzeylere tutunabilme yeteneği sayesinde biyofilm oluşumuna neden olduğu bilinmekle birlikte, virülans faktörleri açısından nispeten az şey bilinmektedir. Çalışmamızın amacı, pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerden üretilen *S. maltophilia* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin karşılaştırılmasıdır.

**Yöntem:** Çalışmaya 37 adet pulmoner, 41 adet ekstrapulmoner örnekten izole edilmiş olan toplam 78 adet *S. maltophilia* izolatı dahil edilmiştir. Suşların identifikasyonu Vitek MS otomatize sistemi (bioMérieux, Fransa) ile yapılmıştır. Ayrıca disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılık testi çalışılmıştır. Tüm izolatlar, mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm oluşturma yönünden araştırılmıştır. Örneğin pulmoner veya ekstrapulmoner olmasının biyofilm üretimi ile

### ABSTRACT

**Objective:** *Stenotrophomonas maltophilia* is commonly a nosocomial pathogen with multiple drug resistance, although it has been reported in community-acquired infections. Trimethoprim-sulfamethoxazole is preferred as the first antibiotic in the treatment of *S. maltophilia* infections. In hospitalized patients, the respiratory tract is the body area that it is most frequently isolated. Although it is known about the bacteria that it causes the formation of biofilms due to its ability to attach to plastic surfaces, relatively little is known in terms of virulence factors. The aim of our study is to compare the property of biofilm formation of pulmonary and extrapulmonary isolates of *S. maltophilia*.

**Methods:** A total of 78 *S. maltophilia* isolates isolated from 37 pulmonary and 41 extrapulmonary specimens were included in the study. The identification of the isolates were performed in Vitek MS (bioMérieux, Fransa) automated system. In addition, antibiotic susceptibility was tested using the disc diffusion method. All isolates were investigated for biofilm formation by microtitration plate method. The relation of the pulmonary or extrapulmonary specimens with the

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Samsun

<sup>2</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Kahramanmaraş



İletişim / Corresponding Author : Kemal BİLGİN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Samsun - Türkiye

E-posta / E-mail : kemal.bilgin@omu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 13.07.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 17.10.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.09365

Bilgin K, Tanrıverdi-Çaycı Y, Bıyık İ, Gür-Vural D, Torun EG, Birinci A. Pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerden üretilen *S. maltophilia* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin karşılaştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 147 - 152

ilişkisi istatistiksel olarak incelenmiştir.

**Bulgular:** Tüm izolatlar trimetoprim-sülfametoksazole duyarlı bulunmuştur. Toplam 78 *S. maltophilia* izolatının 68 (%87,2)'inde biyofilm oluşumu saptanmıştır. Pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerden izole edilen *S. maltophilia* suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri sırasıyla; 35/37 (%94,6), 33/41 (%80,5) şeklinde bulunmuştur. *S. maltophilia*'nın üretildiği örneğin pulmoner veya ekstrapulmoner olması, biyofilm oluşturma özelliği ile istatistiksel olarak ilişkili bulunmamıştır.

**Sonuç:** Çalışmaya dahil edilen tüm suşların önemli bir kısmının (%87,2) biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Pulmoner örneklerdeki biyofilm aktivitesinin ekstrapulmoner örneklerle göre oransal olarak daha fazla olduğu görülmektedir. Ancak pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerden izole edilen suşlar arasında biyofilm oluşumu yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ayrıca trimetoprim-sülfametoksazole karşı bir direnç gelişiminin söz konusu olmadığı görülmektedir. Bu konuda daha geniş kapsamlı yeni çalışmaların yapılması *S. maltophilia*'nın virülans mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** *S. maltophilia*, biyofilm, virülans faktörü

biofilm formation was statistically investigated.

**Results:** All of the isolates were found susceptible to trimetoprim-sulphametoxazole. Biofilm formation was detected in 68 of 78 (87.2%) *S. maltophilia* isolates. Biofilm formation of *S. maltophilia* isolates that isolated from pulmonary and extrapulmonary specimens were detected as 35/37 (94.6%), 33/41 (80.5%), respectively. There was no statistical relationship between pulmonary or extrapulmonary samples and biofilm forming capability.

**Conclusion:** It was observed that a significant part (87.2%) of all strains included in the study were formed biofilms. It was seen that the biofilm activity of the pulmonary specimens was proportionally higher than extrapulmonary specimens. However, there was no significant difference in terms of biofilm formation between the strains isolated from pulmonary and extrapulmonary specimens. It was also detected that there was no development of resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. New comprehensive studies on this subject may contribute to a better understanding of the virulence mechanisms of *S. maltophilia*.

**Key Words:** *S. maltophilia*, biofilm, virulence factor

## GİRİŞ

*Stenotrophomonas maltophilia* önemli bir fırsatçı patojendir ve birçok antibiyotiğe karşı intrinsek direnç nedeniyle tedavisi oldukça güç olabilen bir mikroorganizmadır (1, 2).

*S. maltophilia* toplum kökenli enfeksiyonlarda da etken olarak bildirilmiş olmakla birlikte, genellikle nozokomiyal bir patojendir (3). Hastanede yatan olgularda sıklıkla solunum sisteminden izole edilmektedir. Pnömoni dışında; kan akımı enfeksiyonları, cilt ve cerrahi alan enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, endokardit, menenjit,

intraabdominal enfeksiyonlar ve endoftalmit gibi farklı klinik tablolar da gösterebilmektedir (4).

Santral venöz kateter, üriner sistem kateterleri ve kardiyak kapaklar gibi materyaller üzerinde biyofilm oluşturma *S. maltophilia*'nın önemli bir özelliğidir (4). Biyofilm; mikroorganizmanın, bir yüzey, ara yüzey ya da birbirlerine geri dönülmez olarak bağlayan, ekstrasellüler polimerik maddeden oluşan bir matris içerisine yerleşmesi olarak tanımlanabilmektedir (5).

Antibiyotik ilaç dozları belirlenirken biyofilm yapıları göz ardı edilerek, planktonik formlara göre

düzenlendiği için, çoğu hastalığın tedavisinde etken tamamen ortadan kaldırılamamaktadır. Bu nedenden dolayı biyofilm yapısının, doğasının ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir (6).

*S. maltophilia*'nın olası virülans faktörleri hakkında nispeten az şey bilinmekte ve etkili enfeksiyon stratejilerinin geliştirilmesi için bakterinin bulaşma yolları hakkında daha fazla bilgi edinilmesi gerekmektedir (3).

Çalışmamızın amacı, pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerden izole edilen *S. maltophilia* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin karşılaştırılmasıdır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### İzolatlar

Çalışmaya Ocak 2018 - Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli servislerden gönderilen, 37 adet pulmoner, 41 adet ekstrapulmoner örnekten izole edilmiş olan toplam 78 adet *S. maltophilia* izolatı dahil edildi. Kontrol suşu olarak biyofilm oluşturmayan *Escherichia coli* ATCC 25922 ve biyofilm oluşturan *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 kullanıldı.

Çalışmaya dahil edilen izolatların tanımlanması, konvansiyonel yöntemler (gram boyama ve oksidaz testi) ve Vitek-MS (bioMérieux, Fransa) sistemi kullanılarak yapıldı.

### Antibiyotik Duyarlılık

Tüm izolatların trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) (Oxoid; 25 µg) duyarlılıkları The European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile çalışıldı (7).

### Biyofilm Varlığının Araştırılması

Biyofilm varlığı mikrotitrasyon plak yönetimi kullanılarak araştırıldı. Bunun için kanlı agar (Himedia, Hindistan) üretilen *S. maltophilia* suşları %0,25 glukoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB) (BD, Fransa) besiyerine ekildi ve 36°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1/20 dilüe edildi ve

96 kuyucuklu düz tabanlı polistren mikrotitrasyon plağına, her kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklendikten sonra 36°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işlemi sonunda kuyucuklardaki besiyeri boşaltıldı, 3 kez steril distile su ile yıkandı ve ters çevrilip kurutuldu. Kuyucuklara hazırlanan %1'lik kristal viyole (Merck, China) solüsyonundan 100'er µl dağıtıldı ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Boyama işleminden sonra plak 3 kez steril distile su ile yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Üzerine boyayı çözmek için hazırlanan etanol/aseton (80:20) solüsyonundan 200'er µl dağıtıldı ve 10 dakika boyanın çözülmesi beklendi. Bu işlemden sonra plaklar 492 nm dalga boyunda ELISA (ChroMate, Amerika) okuyucuda okutuldu (8, 9).

Mikrotitrasyon plak yöntemiyle her izolat 3 kez çalışıldı. Sonuçlar pozitif ve negatif kontrol izolatlarının optik dansite değerlerine göre yorumlanarak değerlendirildi (9, 10).

### İstatistiksel Analiz

*S. maltophilia*'nın izole edildiği örneğin pulmoner veya ekstrapulmoner olmasının biyofilm üretimi ile ilişkisi istatistiksel olarak incelendi. Veriler SPSS Statistic 21 programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlarının karşılaştırılmasında Pearson Kikare testi kullanıldı ve önem düzeyi p<0,05 olarak alındı.

## BULGULAR

Çalışmaya toplam 78 *S. maltophilia* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların 37'si pulmoner, 41'i ekstrapulmoner örneklerden izole edilmiştir. Pulmoner örneklerden 20'si balgam, 17'si trakeal aspirat olmak üzere iki çeşit örnek bulunmaktadır ve bunların tamamı yatan hastalardan izole edilmiştir. Pulmoner dışı örneklerin ise en sık 17'si kan 7'si idrar, 5'i kateter ucu olacak şekilde diğer örnekler de azalarak sıralanmıştır. Örnek dağılımı Tablo 1'de toplu olarak görülmektedir.

Yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucunda, tüm izolatlar SXT'ye duyarlı olarak bulunmuştur.

Çalışmaya dahil edilen toplam 78 *S. maltophilia* izolatının 68 (%87,2)'inde mikrotitrasyon plak yönetimi ile biyofilm oluşumu saptanmıştır. Pulmoner 37 örneğin 35 (%94,6)'inde biyofilm üretimi saptanmıştır. Pulmoner dışı 41 örneğin 33 (%80,5)'ünde biyofilm

üretimi saptanmıştır.

*S. maltophilia*'nın izole edildiği örneğin pulmoner veya ekstrapulmoner olması biyofilm oluşturma özelliği ile istatistiksel olarak ilişkili bulunmamıştır.

Tablo 1. Pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerden elde edilen izolatların dağılımı

Örnek türü		n (%)
Pulmoner	Balgam	20 (25,6)
	Trakeal Aspirat	17 (21,8)
Ekstrapulmoner	Kan	17 (21,8)
	İdrar	7 (8,9)
	Kateter ucu	5 (6,4)
	Yara	4 (5,1)
	Diyalizat	2 (2,6)
	Mayi	2 (2,6)
	Abse	1 (1,3)
	Açlık mide suyu	1 (1,3)
	Safra	1 (1,3)
	Vücut sıvısı	1 (1,3)

## TARTIŞMA

Nozokomiyal enfeksiyonlarda sıklıkla karşımıza çıkan *S. maltophilia*, antibiyotiklere yüksek oranda çoğul direnç gösterebilmektedir (11). Sıklıkla solunum sistemi örneklerinden izole edilmekle birlikte, üriner sistem enfeksiyonları, kulak-burun-boğaz enfeksiyonları ve bakteriyemilerde de sorumlu etken olabileceği bilinmektedir (4, 11).

Taşçılar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 105 *S. maltophilia* izolatının %12,6'sını SXT'ye dirençli bulmuşlardır (12).

Hazırolan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 2008-2016 yılları arasında izole edilen 195 *S. maltophilia* izolatını retrospektif olarak incelemişlerdir. Sekiz yıllık süreçte SXT direnç ortalamasını %4,08 (0-13,58) olarak tespit etmişlerdir (13).

Tanrıverdi Çaycı ve arkadaşları Ocak 2014 - Aralık 2015 tarihleri arasında hastanemiz yoğun

bakım ünitelerindeki yatan hastalardan izole edilen *S. maltophilia* suşlarını retrospektif olarak değerlendirmişlerdir. Bu tarihlerde izole edilen 22 *S. maltophilia* suşunun 21 (%95,45)'inin SXT'ye duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (14). Bizim çalışmamızın sonucunda, çalışmaya dahil edilen tüm *S. maltophilia* izolatları SXT'ye duyarlı olarak bulunmuştur. Tanrıverdi Çaycı ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla karşılaştırıldığında, hastanemizde izole edilen *S. maltophilia* izolatlarında SXT'ye karşı bir direnç gelişiminin söz konusu olmadığı görülmektedir.

Özkaya ve arkadaşları yaptıkları çalışmada SXT'ye dirençli *S. maltophilia* izolatlarında, bu dirence neden olduğu bilinen sul1, sul2, dfrA9, dfrA10, dfrA20 genlerinin ve sınıf I, II integron gen kasetlerinin araştırılmasını amaçlamışlardır. Sonuç olarak çalışmalarında, *S. maltophilia*'da SXT direncine yol açabilen sul1 geninin varlığını göstermişlerdir. Sul1 saptanan izolatın dışındaki izolatlarda görülen fenotipik direncin nedeninin efluks pompa sistemi,

biyofilm oluşturma gibi farklı mekanizmalardan kaynaklanabileceği ya da henüz tanımlanmamış gen bölgelerinin varlığına bağlı olarak oluşabileceği görüşünü ortaya koymuşlardır (15). Aslında direkt olarak bir direnç mekanizması olmayan biyofilm üretim özelliği, antimikrobiyal ajanlara karşı direnci arttırabilmektedir (4).

Di Bonaventura ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *S. maltophilia*'nın iki saatlik inkübasyondan sonra polystyrene bağlandığı ve biyofilm oluşumunun zamanla artarak 24 saatte maksimum büyümeye ulaştığı gösterilmiştir (16).

Biocanın ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada üçüncü basamak bir çocuk hastanesinden izole edilen 88 adet *S. maltophilia* suşlarının biyofilm oluşturma aktivitesinin çeşitli özellikleri araştırılmıştır. Araştırmacılar bu izolatların %89,8'inin biyofilm oluşturduğunu sadece 9 suşun biyofilm aktivitesinin negatif olduğunu açıklamışlardır (17).

Flores ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 73 (%61,3)'ü solunum yolu örneği olan toplam 119 *S. maltophilia* izolatının biyofilm oluşturma özelliği araştırılmıştır. Tamamı biyofilm üretmiş olan izolatların 57 tanesi zayıf (%47,9), 46 tanesi orta (%38,7) ve 16 tanesi güçlü (%13,4) olarak sınıflandırılmıştır. Çalışmada aynı zamanda klonal ilişki Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi ile araştırılmış ve 89 farklı PFGE tipi tanımlanmıştır (18).

Pompilio ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 85 adet *S. maltophilia* izolatının biyofilm oluşturma özelliği ve PFGE yöntemiyle klonal yakınlıkları araştırılmıştır. Altmışdört farklı PFGE tipinin tanımlandığı çalışmada, izolatların %88,2'si biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. Ayrıca kistik fibrozis hastalarından elde edilen suşların, hem solunum yolu hem de kan örneklerinde kistik fibrozis olmayan hastalardan elde edilen suşlardan daha düşük

biyofilm ürettiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar biyofilm üretiminin duyarlı bakteriler için bir hayatta kalma mekanizması olarak işlev görebildiğini ve klinik izolatların biyofilm oluşumu yönünden rutin incelenmesi gerektiği yorumunu yapmışlardır (19).

Sun ve arkadaşları yaptıkları çalışmada farklı hastanelerin cerrahi servisleri ve yoğun bakım ünitelerinde, nozokomiyal enfeksiyonu olan hastalardan elde ettikleri 51 klinik *S. maltophilia* izolatını çalışmalarına dahil etmişlerdir. Bu izolatların 42'sinde biyofilm oluşumu saptamışlardır. Ayrıca çalışmaya dahil ettikleri izolatlarda biyofilm oluşumunun levofloksasin hariç test edilen birçok antibiyotige duyarlılığı büyük ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir (20).

Çalışmaya dahil edilen tüm *S. maltophilia* izolatlarının önemli bir kısmının (%87,2) biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerden izole edilen *S. maltophilia* suşlarının biyofilm oluşturma aktiviteleri sırasıyla; 35/37 (%94,6), 33/41 (%80,5) şeklinde bulunmuştur. Pulmoner örneklerdeki biyofilm aktivitesinin ekstrapulmoner örneklere göre oransal olarak daha fazla olduğu görülmektedir. Bununla birlikte pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerden izole edilen suşlar arasında biyofilm oluşumu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Çalışmamıza dahil edilen izolat sayısının istenilen düzeyde olmaması ve moleküler olarak tiplendirilememiş olması çalışmamızın kısıtlılığı olarak görülmektedir.

Çalışmaya dahil edilen *S. maltophilia* izolatlarının SXT'ye karşı bir direnç gelişimi olmadığı görülmekle birlikte, önemli bir virülans faktörü olan biyofilm oluşumuna yüksek oranda rastlanmıştır. Konu ile ilgili yapılacak geniş kapsamlı çalışmaların *S. maltophilia*'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisine ve virülans mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma Etik Kurul İzni gerektirmemektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji. 4th ed. İzmir: Asya Tıp Kitapevi, 2005.
2. Arabacı Ç, Yanılmaz Ö, Uzun B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg, 2019; 33 (2): 58-64.
3. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clinical Microbiology Reviews, 1998; 11 (1): 57-80.
4. Kandemir Ö. *Stenotrophomonas maltophilia*. Yoğun Bakım Dergisi, 2007; 7 (1): 151-7.
5. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev, 2002; 15 (2): 167-93.
6. Diani M, Ariafar MN, Akçelik N. İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73 (1): 71-80.
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://eucast.org>.
8. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol, 1985; 22 (6): 996-1006.
9. Milletli Sezgin F, Çoban AY, Günaydın M. Investigation of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* isolates and their colistin susceptibilities in biofilm. Int J Antimicrob Agents, 2013; 41 (2): 199.
10. Us D. Serolojik Tanı Yöntemleri. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2006.
11. Dülger D, Berktaş M. *Stenotrophomonas maltophilia* Suşlarının Klinik Önemi. Van Tıp Dergisi, 2007; 14 (3): 90-5.
12. Taşçılar MO, Habip Z, Özekinci T, Koçoğlu ME. Klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antimikrobiyal direnci açısından değerlendirilmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg, 2020; 50 (1): 44-8.
13. Hazırolan G, Araz H, Kocagül Çelikbaş A, Aksu N. Dikkat! Klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının trimetoprim-sülfametoksazol ve levofloksasin direncinde belirgin artış var (2008-2016). Turk Mikrobiyol Cemiy Derg, 2018; 48 (2): 134-40.
14. Tanrıverdi Çaycı Y, Bıyık İ, Birinci A. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen nonfermentatif gram negatif bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg, 2015; 45 (4): 170-4.
15. Özkaya E, Aydın F, Bayramoğlu G, Buruk CK, Sandallı C. Klinik örneklerden izole edilen trimetoprim-sülfametoksazole dirençli *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında integron, sul1-2 ve dfr genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2014; 48 (2): 201-12.
16. Di Bonaventura G, Spedicato I, D'Antonio D, Robuffo I, Piccolomini R. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. Antimicrob Agents Chemother, 2004; 48 (1): 151-60.
17. Bioçanın M, Madı H, Vasiljević Z, Kojić M, Jovčić B, Lozo J. Temperature, pH and trimethoprim-sulfamethoxazole are potent inhibitors of biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. Pol J Microbiol, 2017; 66 (4): 433-8.
18. Flores-Trevin S, Gutierrez-Ferman JL, Morfin-Otero R, Rodriguez-Noriega E, Estrada-Rivadeneira D, Rivas-Morales C, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. JJ Med Microbiol, 2014; 63: 1524-30.
19. Pompilio A, Savini V, Fiscarelli E, Gherardi G, Di Bonaventura G. Clonal diversity, biofilm formation, and antimicrobial resistance among *Stenotrophomonas maltophilia* strains from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. Antibiotics, 2020; 9 (15): 2-16.
20. Sun E, Liang G, Wang L, Wei W, Lei M, Song S, et al. Antimicrobial susceptibility of hospital acquired *Stenotrophomonas maltophilia* isolates biofilms. Braz J Infect Dis, 2016; 20 (4): 365-73.



# The evaluation of analytical performance of Total PSA and Free PSA tests by using 6-sigma method

## Total PSA ve serbest PSA testlerinin analitik performansının 6-sigma yöntemi ile değerlendirilmesi

Çiğdem YÜCEL<sup>1</sup> (ID), Müjgan ERCAN<sup>2</sup> (ID), Murat KIZILGÜN<sup>1</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** Sigma Metrics Methodology is a quality measurement method in order to evaluate and compare the analytical performance of laboratories. Six Sigma can be used as a clinical analytical phase assessment methodology to form an internal quality control (IQC) strategy and plan its frequency. In this study, we aimed to evaluate the analytical performance of the tumor markers total and free prostate specific antigen (PSA) by calculating process sigma values.

**Methods:** Sigma levels for both tests were analyzed by using IQC values retrieved from laboratory information system for consecutive 3 months. Bias and coefficient of variation (CV) were calculated. Biological variation databases were used for Total Allowable Error (TEa). The calculated sigma values were classified as follows: ">5", "4-5", "3-4" and "<3" as very good, good, minimum and unacceptable respectively.

**Results:** The sigma values of total PSA and free PSA tests according to the 3-month data of two IQC levels were found to > 5 and 4-5 for total PSA, while those for free PSA were <3 for both levels.

**Conclusion:** Our results showed that performance of total PSA is good while performance of free PSA is unacceptable. It is possible to determine a test with

### ÖZET

**Amaç:** Sigma metrik yöntem, laboratuvarların analitik performansını değerlendirmede ve karşılaştırmada kullanılan bir kalite ölçüm yöntemidir. 6 sigma yöntemi ile klinik analitik faz değerlendirilebilir ve iç kalite kontrol (İKK) stratejisi ve sıklığı planlanabilir. Bu çalışmada tümör belirteçleri olan total PSA ve serbest PSA testlerinin sigma değerlerinin hesaplanarak analitik performanslarının değerlendirilmesi amaçlandı.

**Yöntem:** Her iki test için de ardışık 3 aylık iç kalite kontrol sonuçları değerlendirilerek sigma seviyeleri hesaplandı. Bias ve varyasyon katsayısı (CV) hesaplandı. Toplam izin verilebilir hata (TEa) değeri için biyolojik varyasyon veritabanları kullanıldı. Hesaplanan sigma değerleri sırasıyla şöyle değerlendirildi: ">5", "4-5", "3-4" ve "<3" çok iyi, iyi, minimum ve kabul edilemez.

**Bulgular:** 3-aylık iki seviye iç kalite ile değerlendirilen sigma değerleri total PSA için >5 ve 4-5, serbest PSA için ise her iki seviyede <3 olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** Bulgularımız, total PSA analitik performansının iyi, serbest PSA'nın ise kabul edilemez derecede olduğunu göstermiştir. Yüksek hata oranına sahip bir testi sigma değerlendirmesi

<sup>1</sup>University of Health Sciences, Ankara Gülhane Training and Research Hospital, Department of Clinical Biochemistry, Ankara  
<sup>2</sup>Harran University Faculty of Medicine, Clinical Biochemistry Department, Şanlıurfa



İletişim / Corresponding Author : Çiğdem YÜCEL

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane EAH, Tıbbi Biyokimya Kliniği, Etlik, Ankara - Türkiye  
E-posta / E-mail : yucelcigdem80@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 30.01.2020  
Kabul Tarihi / Accepted : 02.11.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.19052

Yücel Ç, Ercan M, Kızılgün M. The evaluation of analytical performance of Total PSA and Free PSA tests by using 6-sigma method  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 153 - 158

high error probability by evaluating the fine sigma levels and the tests that must be guarded by more stringent quality control applications. Our study has shown that we need to apply a more stringent IQC regime for free PSA test.

**Key Words:** Total PSA, free PSA, 6 sigma

ile saptamak mümkündür ve bu test daha sıkı kalite kontrol uygulamaları ile kontrol altında tutulabilir. Bizim çalışmamız, kendi laboratuvarımız için serbest PSA testine daha katı bir İKK protokolü uygulamamız gerektiğini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Total PSA, serbest PSA, 6 sigma

## INTRODUCTION

Clinical laboratory processes are simply divided into three major steps: preanalytical, analytical and postanalytical. Laboratory errors in each of these phases affect test results and therefore the aim is to detect and minimize the sources of error at every step (1,2). When the sources of laboratory errors are evaluated, it is found that most of the errors occur in the pre-analytical phase followed by post-analytical phase. Analytical phase errors seem to be the least source of error in clinical laboratories (3). Although the impact of analytical phase errors on total laboratory errors is low, it is important to manage laboratory processes correct to improve the quality of health service provided to patients. Standardization of the analytical phase, increased evaluation of internal and external quality control programs and technological improvements have increased the reliability of laboratory results to a great extent (4).

Two types of analytical errors are random errors and systematic errors which are expressed as inaccuracy and imprecision respectively (5). The expression of inaccuracy is bias and the expression of imprecision is coefficient of variation (CV), which are used in combination to detect total error (TE) as  $Bias + 1.65 CV$  (6).

Allowable total error (TEa) is a simple comparative quality concept which is used to define acceptable analytical performance and can be used

for (1) assessment of an individual instrument's analytical performance, which is of benefit if one uses this information during instrument selection or assessment of in-clinic instrument performance, (2) Quality Control validation, and (3) as a measure of agreement or comparability of results from different laboratories (eg, between the in-clinic analyzer and the reference laboratory) (7).

The six-sigma technology, which was first used in evaluation of errors in the industrial field, has been widely used recently also in evaluation of laboratory errors. Six-sigma metrics combines bias, imprecision and TEa. Being a statistical method, six-sigma methodology includes 5 steps known as define, measure, analyze, improve, control (DMAIC). The sigma model provides an objective evaluation of the performance of a method and therefore for laboratories it is valuable measure for self-control in the laboratories. The sigma value of a test enables to determine targets for improving the quality of the test in laboratory, or to accept the current quality of the test if the quality is adequate (8,9).

Sigma Metric is calculated by using the formula of  $\sigma = (TEa - bias) / CV$  (5). High sigma values means low analytical errors and acceptable test results (6). Low sigma metric value is accepted as an error or a defect. The defect value is measured in defects per million (DPM). The Six-Sigma is focused to control a process in 6 standard deviations (SD) and it is equal

to 3.4 DPM. The success with Six Sigma Quality is accepted as the perfection standard. A performance at the 3-sigma level is considered as the minimum quality for manufacturing process (2, 5).

Total PSA and free PSA are the two most commonly used diagnostic tools in clinical practice for prostate cancer screening accepted worldwide. The analytical phase in total and free PSA measurement is of critical importance as their ratio gives discriminative diagnosis between prostate cancer and benign prostate hyperplasia (10,11).

In the present study, based on these facts, we aimed to evaluate the analytical phase by using sigmometrics and also to reveal the quality control (QC) strategy of these two critical tests.

## MATERIAL and METHOD

The present study was conducted in the Clinical Biochemistry Laboratory of University of Health Sciences Gülhane Training and Research Hospital. Internal quality control (IQC) data of the two analytes were analyzed retrospectively over a period of 3 months from August 2019 to October 2019 using Dxl 800 analyzer (Beckman Coulter Inc, USA). Both tests were immunoassay methods, all reagents were obtained from Beckman Coulter Inc and used according to the manufacturer's directions.

Two level controls; normal (Seronorm-1), and pathological (Seronorm-2,) levels of QC materials were assayed before analysing of patient samples every day during the study period. The lot numbers of the QC material used were the same: 1804832 for normal and 1805833 for pathological controls respectively. The instruments were calibrated on a regular basis. IQC data were obtained from Laboratory Information System (FONET LIS). Faulty values arising from false control samples were excluded.

The values given in the insert provided by Beckman Coulter Inc. for IQC target values were used as reference values. % Bias values were calculated for

each test for every month during the 3 month study period. TEa, is determined by biological variation and the performance of the analytical method. TEa values given in Westgard biological variation database were used to calculate the sigmometric performance characteristics (7).

Following determination of mean and SD values, %CV, bias and sigma values were calculated according to the following formulations. Coefficient of variation (CV%):

Coefficient of variation (% CV) is the expression of imprecision. It is the percent ratio of standard deviation (SD) to the mean ( $\bar{x}$ ) for a given data set. It was determined from the calculated mean and Standard deviation evaluated from IQC data.

$$CV(\%) = (SD / \text{Mean of IQC data}) \times 100.$$

### Bias:

Bias was calculated as the percentage difference of the average of observed results for each analyte from the target values provided in the Beckman Coulter's control material inserts. %Bias values of each test were calculated by getting the mean values between August, September and October 2019.

$$\%Bias = [(IQC \text{ data mean of our laboratory} - \text{target mean of IQC data}) / \text{target mean of IQC data}] \times 100$$

### Allowable total error (TEa):

Detected for total PSA and free PSA using the Desirable Biological Variation Database and The Royal College of Pathologists of Australasia and the Australasian Clinical Biochemist association Quality Assurance Program (RCPA) respectively. These sources are regularly updated and can be freely accessed through <http://www.westgard.com> and <https://www.westgard.com/rcpa-biochemistry.htm>.

### Sigma ( $\sigma$ ) value:

Sigma value was calculated by using CV (obtained from IQC data), %Bias (obtained from target values of IQC data) and TEa values. Sigma value calculated

using the standard equation;

$$\sigma \text{ metric} = (\%TEa - \%Bias) / \%CV$$

Sigma values were calculated to determine the analytical performance characteristics of each analyte. Sigma values “>5”, “4-5”, “3- 4” ve “<3” were categorized as “very good”, “good”, “minimum” and “unacceptable” respectively (8).

## RESULTS

For each level of free PSA and total PSA tests, the target mean given by manufacturer, laboratory mean and SD values are presented in Table 1.

TEa% for total PSA is taken both from Westgard and RCPA guidelines, while for free PSA, it is only taken from RCPA guideline (12,13). Quality control strategy used to evaluate the parameters is explained in Table 2.

**Table 1.** Sigma values for tests according to two different TEa % values obtained from internal quality control results

Assay	Mean		SD		Target mean		CV%		Bias%		TE <sub>a</sub> %		Sigma			
	QC1	QC2	QC1	QC2	QC1	QC2	QC1	QC2	QC1	QC2	BV Desirable*	RCPA**	BV Desirable		RCPA	
													QC1	QC2	QC1	QC2
Total PSA	3.53	24.16	0.16	1.34	3.79	25.80	4.58	5.57	6.68	6.34	33.6	15	5.87	4.89	1.81	1.55
Free PSA	1.68	12.97	0.08	0.82	1.80	12.80	5.24	6.37	6.29	1.32	-	15	-	-	1.66	2.14

\*Desirable Quality Specifications based on Biological Variation.

\*\*The Royal College of Pathologists of Australasia and the Australasian Clinical Biochemist association Quality Assurance Program

QC: Quality control, SD: Standard deviation

**Table 2.** Quality control strategy

Sigma metrics	Quality performance	Westgard Rule
<3	Unacceptable	$1_{3s} / 2_{2s} / R_{4s} / 4_{1s}$
3- <4	Minimum	$1_{3s} / 2_{2s} / R_{4s} / 4_{1s}$
4-5	Good	$1_{2.5s}$
>5	Very good	$1_{3s}$

## DISCUSSION

PSA is known as the leading tumor marker in evaluation of effectiveness of therapy for prostate cancer patients, assessment of tumor mass and early detection of recurrence. It is also different from other tumor markers as it is very useful in the screening and early diagnosis of prostate cancer. PSA is found free or protein-bound in circulation. Total PSA test has low specificity, especially in patients with total PSA concentration within the “diagnostic gray zone” (total PSA concentration range of 4-10 ng/mL). Free to total PSA ratio (PSA free/PSA total) is the most commonly used diagnostic index for distinguishing between benign prostate hypertrophy and prostate cancer. With the improving immunoassay techniques, it has been proven that the %fPSA is lower in men with prostate cancer. If the free/total ratio is below 8%, the risk of prostate cancer is predicted to be around 80% (14,15). That’s why accurate laboratory measurement of these analytes has critical importance.

The practice of using Sigma metrics to improve and design high quality products has been around for several decades. 3-sigma assay is being generally considered as the minimum acceptable performance and a 6-sigma assay performance considered world-class (8). One problem encountered in calculation of sigma values is the differences caused by differences in TEa. It is important to determine which TEa to use as TEa values for many measurands differ greatly, depending on the source. While there is a recommended hierarchy to consider when choosing an appropriate TEa, there is no uniform consensus on which source is most appropriate for a given measurand (16).

For total PSA, sigma values calculated according to Westgard BV guidelines, sigma levels were very good for level 1 and good for level 2. But when the

values are evaluated according to RCPA rules, both 1 and level 2 were in the unacceptable range for PSA. These differences point that sigma levels can change depending on the reference we take for TEa values. Since there was no biological variation data in Westgard’s site for free PSA, we evaluated fPSA level 1 and level 2 performances solely depending on RCPA values. The results came out as both levels are in the unacceptable range for fPSA.

RCPA gives TEa for both total and fPSA tests as 15%. While Westgard’s BV rules give these value as 33.6 % for total PSA and there is no value assigned for fPSA in Westgard’s site. These differences in allowable total error values also affect the sigma value calculated for these tests.

In the present study, we evaluated the analytical performances of total and fPSA tests in our laboratory with sigma metric approach. There are very limited studies in the literature evaluating immunoassay tests with sigmometrics. This information can also assist the laboratory in knowing the kind of performance to expect. Another point to consider when using Sigma metrics is that bias and precision influence the Sigma metrics differently, with precision having a greater impact.

Our study is unique as it evaluates the performance of total PSA based on two different BV sources being Westgard and RCPA. Also for sigma metric evaluation of fPSA, this will be the first study.

In conclusion, while defining QC strategies, clinical laboratories should calculate their sigma values according to most recently updated TEa sources and choose their QC rule strategies accordingly. According to our data, we can conclude that we should follow 13S rule for total PSA and 13S / 22S / R4S / 41S rule for fPSA test. It can also be concluded that fPSA test needs a more strict IQC regimen to minimize analytical errors.

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* This study does not require Ethics Committee Approval.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Nar R, Emekli DI. The evaluation of analytical performance of immunoassay tests by using six-sigma method. *J Med Biochem*, 2017;36(4):301-8.
- Mao X, Shao J, Zhang B, Wang Y. Evaluating analytical quality in clinical biochemistry laboratory using Six Sigma. *Biochem Med*, 2018;28(2):020904.
- Nanda SK, Ray L. Quantitative application of sigma metrics in medical biochemistry. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2013;7(12):2689-91.
- Zaninotto M, Plebani M. Understanding and managing interferences in clinical laboratory assays: the role of laboratory professionals. *Clin Chem Lab Med*, 2019 doi: 10.1515/cclm-2019-0898.
- Zhou B, Wu Y, He H, Li C, Tan L, Cao Y. Practical application of Six Sigma management in analytical biochemistry processes in clinical settings. *J Clin Lab Anal*, 2019 Nov 27:e23126. doi: 10.1002/jcla.23126.
- Harr KE, Flatland B, Nabity M, Freeman KP. ASVCP guidelines: allowable total error guidelines for biochemistry. *Vet Clin Pathol*, 2013, 42(4):424-36.
- Ercan Karadağ M, Kirit A. Tiroid Fonksiyon testlerinin analitik performansının değerlendirilmesinde; 6 sigma metodolojisi. *Harran Univ Vet Fak Derg, (Journal of Harran University Medical Faculty)* 2019;16(3):505-8.
- Westgard JO, Klee GG. Quality management. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics* St. Louis, MO: Elsevier Saunders, 2006: 485-529.
- Schoenmakers CH, Naus AJ, Vermeer HJ, van Loon D, Steen G. Practical application of Sigma Metrics QC procedures in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med*, 2011; 49(11): 1837-43.
- Vezyraki P, Vlachaki A, Baltogiannis D, Batistatou A, Tsampalas S, Simos YV et al. Impact of total PSA and percent free PSA in the differentiation of prostate disease: a retrospective comparative study implicating neoplastic and non-neoplastic entities. *J BUON*, Sep-Oct 2019;24(5):2107-13.
- Lamy PJ, Brouillet JP, Bermont L, Fouillet G, Loric S. Relevance of total PSA and free PSA prescriptions. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2018 Dec 1;76(6):659-63.
- Ricós C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario J, Hernandez A, Jimenez C, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*, 1999;59(7):491-500.
- Allowable Limits of Performance: Programs, Analytes and Allowable Limits of Performance. Royal College of Pathologists of Australasia, Quality Assurance Programs; c2012 [updated 2014] Available from: <http://www.rcpaqap.com.au/docs/2014/chempath/ALP.pdf>. Accessed February 27, 2018.
- Prcic A, Begic E, Hiros M. Actual Contribution of Free to Total PSA Ratio in Prostate Diseases Differentiation. *Med Arch*, 2016 Jul 27; 70(4): 288-92.
- Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, Wang TJ, Rittenhouse HG, Ratliff TL et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA*, 1995; 274: 1214-20.
- Petrides V, Schneider S. Using Sigma metrics to establish analytical product performance requirements and optimize analytical performance of an in vitro diagnostic assay using a theoretical total PSA assay as an example. *Biochem Med (Zagreb)*, 2018 Jun 15;28(2):020903.

# Biological activity screening of some hydrazone and chalcone derivatives

## Bazı hidrazon ve kalkon türevlerinin biyolojik aktivite taraması

Begüm EVRANOS AKSÖZ<sup>1</sup> (ID), Fatma KAYNAK ONURDAĞ<sup>2</sup> (ID), Erkan AKSÖZ<sup>3</sup> (ID), Selda ÖZGEN ÖZGACAR<sup>4</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** Today, the development of resistance to antibiotics is increasing rapidly. Loss of antibiotics effectiveness due to the development of resistance causes serious hazards. Especially methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* create life-threatening conditions in patients with a weak immune system. For this reason, it is important to develop new drug active substances against these microorganisms. In this article, hydrazones and chalcones were synthesized and some biological activities of these compounds such as antimicrobial and antituberculosis were investigated. This study was conducted to investigate new antimicrobial and antituberculous drug-active substances instead of antibiotics that lost their effectiveness due to the rapidly increasing resistance to existing antibiotics.

**Methods:** The compounds were obtained by synthesis of chalcones via Claisen Schmidt condensation and then by reacting these chalcones with hydrazides to form hydrazone. Antimicrobial and antituberculosis activities of the compounds were evaluated by microdilution method and microplate alamar blue assays, respectively.

**Results:** All compounds displayed the same activity against *Mycobacterium tuberculosis* (MIC: 64 µg/mL). E4,

### ÖZET

**Amaç:** Günümüzde antibiyotiklere karşı direnç gelişimi hızla artmaktadır. Direnç gelişmesi nedeniyle antibiyotik etkinliğinin kaybı ciddi tehlikelere neden olmaktadır. Özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* izolatu, bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda yaşamı tehdit eden durumlar oluşturmaktadır. Bu nedenle, bu mikroorganizmalara karşı yeni ilaç etken maddeleri geliştirmek önemlidir. Bu makalede, hidrazonlar ve kalkonlar sentezlenmiş ve bu bileşiklerin antimikrobiyal ve antitüberküloz gibi bazı biyolojik aktivitelerinin araştırılması yapılmıştır. Bu çalışma, mevcut antibiyotiklere karşı hızla artan direnç nedeniyle etkinliğini kaybeden antibiyotiklerin yerine antimikrobiyal ve antitüberküloz etkili yeni ilaç etken maddelerinin araştırılması için yapılmıştır.

**Yöntem:** Bileşikler, Claisen Schmidt kondensasyonu yoluyla kalkonların sentezi ve daha sonra bu kalkonların hidrazon oluşturmak üzere hidrazidlerle reaksiyona girmesiyle elde edilmiştir. Bileşiklerin antimikrobiyal ve antitüberküloz aktiviteleri, sırasıyla mikrodilüsyon yöntemi ve mikropalak alamar mavisi deneyleri ile değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Tüm bileşikler *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı aynı etkiyi göstermiştir (MİK: 64 µg/

<sup>1</sup>Süleyman Demirel University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Isparta

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

<sup>3</sup>Süleyman Demirel University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Isparta

<sup>4</sup>Ministry of Health of Turkey, Turkish Medicines and Medical Devices Agency, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Begüm EVRANOS AKSÖZ

Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık fakültesi, Farmasötik Kimya AD, Isparta - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 17.03.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 02.07.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.02439

Evranos-Aksöz B, Kaynak-Onurdağ F, Aksöz E, Özgen-Özgarar S. Biological activity screening of some hydrazone and chalcone derivatives. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 159 - 166

4'-Bromo-4-methyl chalcone, displayed the best activity against Meticilline resistant-*Staphylococcus aureus* (MIC: 16 µg/mL). The most effective compounds against *Enterococcus faecalis* isolate and *Enterococcus faecalis* were found B26 (N-(1-(4-fluorophenyl)-3-p-tolylallylidene) thiophene-2-carbohydrazide) and E8 (4'-fluoro-3-methyl chalcone), respectively (MIC: 32 µg/mL).

**Conclusion:** Hydrazones have been found to be more effective than chalcones against *S. aureus* ATCC 29213. However, chalcones exhibited a remarkable effect against meticilline resistant-*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. In terms of tuberculosis bacillus, it did not differ whether the compounds had a chalcone or hydrazone structure. Both chalcones and hydrazones exhibited the same activity against candida species. All compounds were observed to be more effective than gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

**Key Words:** Hydrazone, chalcone, antitubercular, antimicrobial, microbial resistance

mL). E4, 4'-Bromo-4-metil kalkon, metisiline dirençli-*Staphylococcus aureus*'a karşı en iyi etkinliği göstermiştir (MİK: 16 ug/mL). *Enterococcus faecalis* izolatu ve *Enterococcus faecalis*'e karşı en etkili bileşikler sırasıyla B26 (N-(1-(4-florofenil)-3-p-tolilaliden)tiyofen-2-karbonhidrazit) ve E8 (4'-floro-3-metil kalkon) olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** Hidrazonların *S. aureus* ATCC 29213 suşu üzerine kalkonlardan daha etkili olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte kalkonlar, metisiline dirençli-*Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* üzerine dikkate değer bir etki göstermiştir. Tüberküloz basili açısından, bileşiklerin kalkon veya hidrazon yapısında olması fark göstermemiştir. Hem kalkonlar hem de hidrazonlar kandida türlerine karşı aynı aktiviteyi sergilemiştir. Tüm bileşiklerin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* üzerine gentamisinden daha etkili olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hidrazon, kalkon, antitüberküloz, antimikrobiyal, mikrobiyal direnç

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is a microorganism that is important due to its pathogenicity from the beginning of the microbiological era to the present day. This bacterium, which can be found in the skin and mucous flora, can cause fatal diseases such as bacteremia and pneumonia when immunity is weakened. *S. aureus*, which was previously treatable with penicillins, began to develop resistance to methicillin in the 1960s, resulting in Meticilline resistant-*Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. MRSA has *mecA* gene which encodes the penicillin-binding protein of MRSA. Thus, resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics develops (1-3). Also, MRSA, which started to develop resistance against antibiotics such as linezolid and daptomycin, is a very important health threat (2, 3). Resistance was not developed only by *S. aureus* but also by other bacteria that neutralize antibiotics which makes the

discovery of new antibiotics is essential.

Balsacone C (figure 1), a dihydrochalcone derivative, draws attention with its activity against MRSA (4). Balsacone C displayed very good activity against 34 MRSA isolates, which are resistant to many antibiotics [Minimum Inhibitory Concentration (MIC): 3-11.6 µg/mL] (3). Licochalcone A (Figure 1), which is a natural chalcone as balsacone C, also shows antibacterial properties (5). Beside its many activities such as antidepressant (6,7) anticonvulsant (8, 9), analgesic, antiinflammatory, antiplatelet (10-12) and anticancer (13-16), hydrazones attract researchers with their antibacterial activities. In this study, we synthesized a group of hydrazones and their starting materials, chalcones, and investigated the antimicrobial and antituberculosis activities of these compounds.



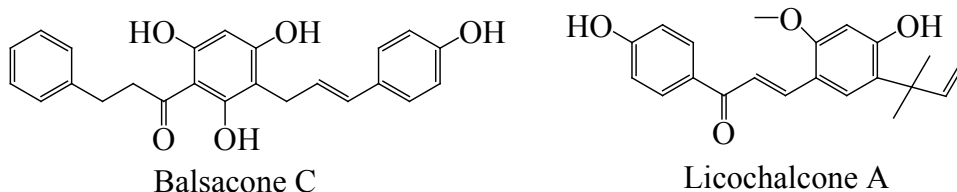


Figure 1. Some natural antibacterial chalcones

## MATERIAL and METHOD

Details of used chemicals for synthesis (17) and for biological activities (18) and used apparatus to prove the structures of the compounds (17) are given in our previous publications.

### Synthesis

Chalcone derivatives were synthesized by reacting of equimolar amounts of acetophenone and benzaldehyde derivatives in KOH/methanol. The hydrazone compounds were obtained by reacting the chalcone derivatives with the hydrazide compounds. Reaction and product details have been previously published (18).

### Biological activities of compounds

#### Antibacterial and antifungal activity

Antibacterial and antifungal susceptibility testing were applied through CLSI-M100-S16 guidelines (19) and M27-A3 (20) standards, respectively. *E. coli* ATCC 25922 [1], *E. coli* ATCC 35218 [2], *E. coli* isolate (ESBL) [3], *P. aeruginosa* ATCC 27853 [4], *P. aeruginosa* isolate (resistant to gentamicin) [5], *S. aureus* ATCC 29213 [6], *S. aureus* isolate (MRSA) [7], *E. faecalis* ATCC 29212 [8], *E. faecalis* isolate (VRE) [9], *C. albicans* ATCC 10231 [10] and *C. krusei* ATCC 6258 [11] and their clinical isolates were used in the study. *E. coli* isolate produces extended spectrum beta lactamase enzyme and used as the ESBL strain. *C. krusei* ATCC 6258 strain was used because it is resistant to fluconazole naturally. A methicillin resistant *S. aureus* isolate which is resistant to all beta lactam antibiotics (MRSA), and *E. faecalis* isolate

which is resistant to vancomycin (VRE) were also used in the study. The lowest concentrations inhibiting macroscopic growth was determined as MICs. Details of the method is given in the literature (18).

#### Antitubercular activity

*Mycobacterium tuberculosis* H37RV (ATCC 27294) [12] was used as the quality control strain. MABA method was used in order to assess the antituberculosis activity as described by Franzblau et al, 1:1 mixture of 10X Alamar Blue reagent were added to wells. A blue color or a pink color formation indicated no proliferation and proliferation, respectively. The MIC was determined as the lowest drug concentration preventing formation of pink color (21). Details of the method is given in our previous publication (18).

## RESULTS

### Chemistry

Chalcones (E4, E5, E7, E8) (Table 1) were synthesized via Claisen-Schmidt condensation. Then, chalcones were reacted with appropriate hydrazide to give corresponding hydrazones (Table1) as shown in the diagram (Figure 2).

### Biological Activity

Antimicrobial and antitubercular activities of the compounds were examined by using different standards. Antimicrobial activities were examined by microdilution method while antitubercular activities were assessed by microplate alamar blue assay (MABA). Conclusions were given in Table 2.

Table 1. Formula of compounds

Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
B26	-F	-H	-CH <sub>3</sub>	Thiophene-2-yl (T)
B27	-F	-CH <sub>3</sub>	-H	T
B28	-Br	-H	-CH <sub>3</sub>	T
B29	-Br	-H	-CH <sub>3</sub>	4-Methyl-1,2,3-thiadiazole-5-yl (MT)
B31	-Br	-CH <sub>3</sub>	-H	MT
E4	-Br	-H	-CH <sub>3</sub>	-
E5	-Br	-CH <sub>3</sub>	-H	-
E7	-F	-H	-CH <sub>3</sub>	-
E8	-F	-CH <sub>3</sub>	-H	-

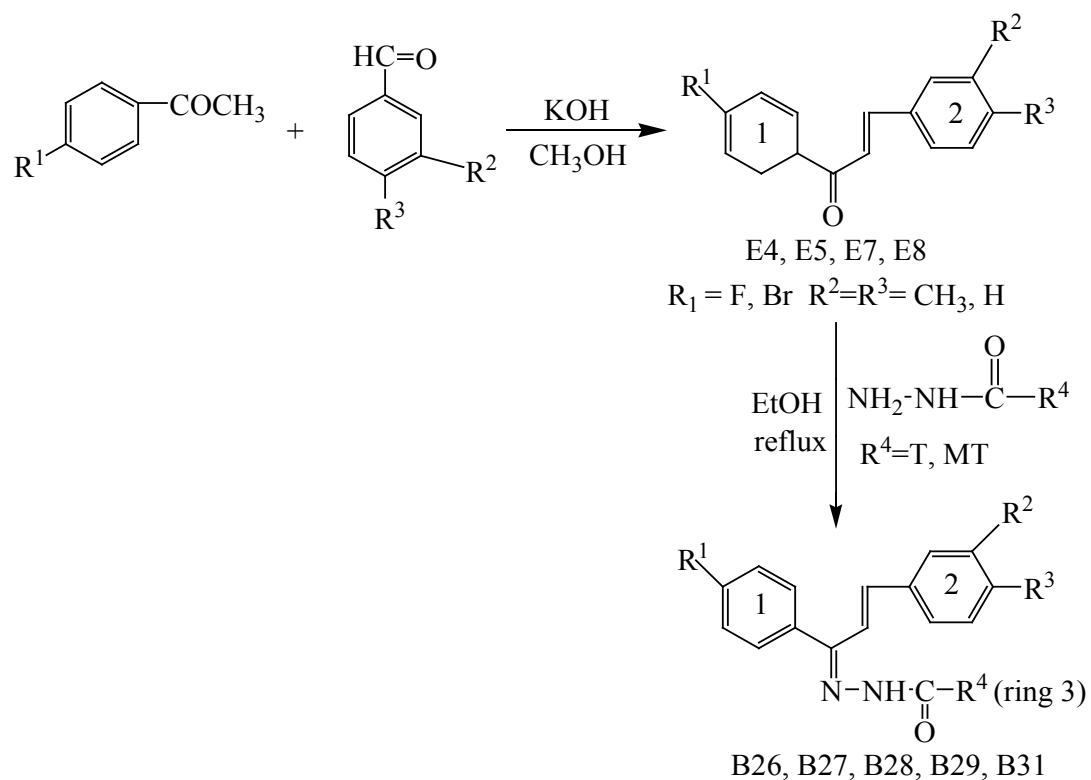


Figure 2. Synthesis of compounds

**Table 2.** Antimycobacterial, antifungal and antibacterial activities of compounds

Compounds	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B26	64	128	128	64	128	128	64	64	32	128	64	64
B27	128	128	128	128	128	128	64	128	64	128	64	64
B28	64	128	128	128	128	128	64	64	128	128	64	64
B29	64	128	128	128	128	128	64	128	128	128	64	64
B31	128	128	128	128	128	128	64	64	128	128	64	64
E4	128	128	128	64	128	256	16	128	128	128	64	64
E5	128	128	128	64	128	256	64	128	128	128	64	64
E7	128	128	128	64	128	256	64	128	128	128	64	64
E8	128	128	128	64	128	256	32	32	128	128	64	64
Gentamicin	0.25	-	256	1	64	0.5	128	8	8	-	-	-
Ampicilin	2	-	>1024	-	-	0.5	-	0.5	0.5	-	-	-
Meropenem	0.008	-	0.015	0.25	0.015	0.03	-	4	8	-	-	-
Ofloxacin	0.015	-	16	1	1	0.125	0.5	1	4	-	-	-
Fluconazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0625	32	-
Vancomycin	-	-	-	-	-	0.5	1	1	8	-	-	-
Amphotericin B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.03	0.5	-
Ampicilin/ sulbactam (1/1)	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoxicilin/ clavulonic acid (2/1)	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethambuthol												4
Isoniazid												0.125

Names of the bacteria and explanation of numbers in the table and article is given in Materials and Methods.

MIC: µg/mL

## DISCUSSION

Compounds **B26**, **B28** and **B29** were displayed the best activity against *E. coli* [1] (MIC= 64 µg/mL). Against this strain, hydrazone derivatives have been shown to be more effective than chalcones. **B27**, a derivative of hydrazone, had the same activity as chalcones. For this activity, it is important that ring 2 has methyl in the para position. Placing the methyl group in the meta position instead of para reduced the activity. Chalcones generally outperformed than hydrazones against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. One of the hydrazones, compound **B26**, showed the same activity as chalcones. **E4**, a compound in the structure of chalcone containing bromine at 4th position of ring 1 and methyl at 4th position of ring 2, showed the best activity against MRSA (MIC=16 µg/mL). The **E8** compound, which is a chalcone carrying fluorine atom in the 4th position of ring 1 and carrying methyl in the meta position of ring 2, was the second compound showing the best activity against MRSA. According to Xu et al., electron-withdrawing (-Cl, - F and - Br) groups at the 2nd and 4th positions of phenyl ring is more preferable for antibacterial activity than electron-donating (-Me and -OMe) substituents (22).

The **E8** compound was found to be the most active compound against *E. faecalis* [8] (MIC=32 µg/mL). It is observed that the activity decreases in **B27**, which is the hydrazone formed by the reaction of **E8** with thiophene hydrazide. Against this microorganism, compounds **B26**, **B28** and **B31** showed the same activity (MIC=64 µg/mL). **B26** is the most effective compound with 32 µg/mL MIC against VRE, which

contains fluorine atom in position 4 of the first ring, methyl in position 4 of the 2nd ring, and thiophene as the 3rd ring. Unlike **B26**, compound **B27** maintains the methyl in the meta position of ring 2 instead of para. **B27** was found to be the second most effective compound (MIC=64 µg/mL) against VRE. Therefore, including p-methyl on the 2nd ring is important for the activity against VRE. All compounds except **B26** and **B27** displayed the same activity against VRE (MIC=128 µg/mL). Unlike **B26**, **B28** compound has p-bromine instead of p-fluorine of the 1st ring. The replacement of the fluorine atom with a bromine atom caused a serious decrease in the activity. For the activity against VRE, presence of p-fluorine at the 1st ring and the presence of the methyl group in the 4th position of the 2nd ring is necessary. When the methyl group attached to the second ring is taken into the meta position instead of para, the activity decreases. Both chalcone and hydrazone derivatives displayed the same activity against *E. coli* [2], ESBL, *P. aeruginosa* [5], *C. albicans*, *C. krusei* and *M. tuberculosis* strains. Hydrazones were found to be more effective than chalcones against *S. aureus* [6].

In summary, some chalcones and their hydrazones were designed, synthesized and their antitubercular and antimicrobial activities were examined. Compound **E4** with its activity against MRSA, compound **E8** against *E. faecalis* and compound **B26** against VRE came into prominence. It is hoped that our study can contribute to the development of new antibiotics in an environment where bacterial resistance development is so frequent. Further studies are necessary to find the antibiotics.

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* This study does not require Ethics Committee Approval.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest, 2003; 111: 1265-73.
2. Monaco M, Araujo FP, Cruciani M, Coccia EM, Pantosti A. Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017; 409: 21-56.
3. Côté H, Pichette A, Simard F, Ouellette ME, Ripoll L, Mihoub M, et al. Balsacone C, a new antibiotic targeting bacterial cell membranes, inhibits clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) without inducing resistance. Front Microbiol, 2019; 10: 2341.
4. Riviere C. Dihydrochalcones: Occurrence in the plant kingdom, chemistry and biological activities. In: Atta-ur Rahman (Ed.). Studies in Natural Products Chemistry. John Fedor Publisher, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2016; 253-373.
5. Osório TM, Monache FD, Chiaradia LD, Mascarello A, Stumpf TS, Zanetti CR, et al. Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Bioorg Med Chem Lett, 2012; 22: 225-30.
6. De Oliveira KN, Costa P, Santin JR, Mazzambani L, Bürger C, Mora C, et al. Synthesis and antidepressant-like activity evaluation of sulphonamides and sulphonyl-hydrazones. , 2011; 19(14): 4295-306.
7. Can ÖD, Altıntop MD, Özkay ÜD, Üçel UI, Doğruer B, Kaplancıklı ZA. Synthesis of thiazazole derivatives bearing hydrazone moieties and evaluation of their pharmacological effects on anxiety, depression, and nociception parameters in mice. Arch Pharm Res, 2012; 35(4): 659-69.
8. Sridhar SK, Pandeya SN, Stables JP, Ramesh A. Anticonvulsant activity of hydrazones, schiff and mannich bases of isatin derivatives. Eur J Pharm Sci, 2002; 16: 129-32.
9. Angelova V, Karabeliov V, Andreeva-Gateva PA, Tchekalarova J. Recent developments of hydrazide/hydrazine derivatives and their analogs as anticonvulsant agents in animal models. Drug Dev Res, 2016; 77: 379-92.
10. Rollas S, Küçükgülmez ŞG. Biological activities of hydrazone derivatives. Molecules, 2007; 12: 1910-39.
11. Asif M, Husain A. Analgesic, anti-inflammatory, and antiplatelet profile of hydrazones containing synthetic molecules. Journal of Applied Chemistry, 2013; 2013: Article ID 247203, 7 pages.
12. Verma G, Marella A, Shaquiquzzaman M, Akhtar M, Ali MR, Alam MM. A review exploring biological activities of hydrazones. J Pharm Bioallied Sci, 2014; 6(2): 69-80.
13. Sundaree S, Vaddula BR, Tantak MP, Khandagale SB, Shi C, Shah K, et al. Synthesis and anticancer activity study of indolyl hydrazide-hydrazones. Med Chem Res, 2016; 25: 941-50.
14. Shah P, Abadi LF, Gaikwad S, Chaudhari D, Kushwah V, Jain S, et al. Synthesis and biological evaluation of 8-hydroxyquinoline-hydrazones for Anti-HIV-1 and anticancer potential. Chemistry Select, 2018; 3: 10727-31.
15. Şenkardeş S, Han Mİ, Kulabaş N, Abbak M, Çevik Ö, Küçükgülmez İ, et al. Synthesis, molecular docking and evaluation of novel sulfonyl hydrazones as anticancer agents and COX-2 inhibitors. Mol Divers 2019.

16. Alotabi SH. Synthesis, characterization, anticancer activity, and molecular docking of some new sugar hydrazone and arylidene derivatives. Synthesis, characterization, anticancer activity, and molecular docking of some new sugar hydrazone and arylidene derivatives. *Arab J Chem*, 2020; 13: 4771-84.
17. Evranos Aksoz B, Baysal I, Yabanoglu-Ciftci S, Djikic T, Yelekci K, Ucar G, et al. Synthesis and screening of human Monoamine oxidase-A inhibitor effect of new 2-pyrazoline and hydrazone derivatives. *Arch Pharm*. 2015; 348: 743-56.
18. Evranos Aksöz B, Onurdağ FK, Özgacar SÖ. Antibacterial, antifungal and antimycobacterial activities of some pyrazoline, hydrazone and chalcone derivatives. *Z Naturforsch C*, 2015; 70(7-8): 183-9.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). 2006a. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 6th informational supplement. CLSI M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). 2006b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast approved standard, M27-A, clinical and laboratory standards institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA
21. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate alamar blue assay. *J Clin Microbiol*, 1998; 36: 362-6.
22. Xu M, Wu P, Shen F, Ji J, Rakesh KP. Chalcone derivatives and their antibacterial activities: current development. *Bioorg Chem*, 2019; 91: 103-33.

# Immunohistochemistry of norepinephrine transporters in the vagus nerve in a rat model of epilepsy

## Sıçanlarda epilepsi modelinde vagus sinirinde norepinefrin taşıyıcılarının immünohistokimyası

Kristina Ayşe POLAT<sup>1</sup> (ID), Eslem GÜNEY<sup>2</sup> (ID), Züleyha DOĞANYİĞİT<sup>3</sup> (ID), Enes AKYÜZ<sup>4</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** Epileptic seizures occur as a result of the excessive and uncontrolled spread of electrical activity. Studies have reported that epileptic seizures may affect the autonomic function. However, the main molecular mechanism has not been elucidated yet. Since the vagus nerve (VN) carries 75% of all parasympathetic autonomic system fibers, it is of great importance in the autonomic center associated with epilepsy pathogenesis. Afferent sensory fibers of the VN have connections to associated regions in the brainstem, providing norepinephrine (NE) transmission. Therefore, the suppressive effect of NE on seizures and the role of NE transporters (NET) in neurotransmitter reuptake may occur. Examining the neurotransmitters and related transporters in the autonomic nervous system at the molecular level may help to understand the related mechanism. In this study, we aimed to determine the NET-associated immunoreactivity in the VN in pentylentetrazole (PTZ) epilepsy model.

**Methods:** Epileptic seizures were induced in Wistar rats (280-380g) by administering PTZ [first 12 injections 35 mg/kg, intraperitoneal (I.P.) and last injection 50 mg/kg I.P.] for 28 days. Subsequently, the VN was

### ÖZET

**Amaç:** Epileptik nöbetler elektriksel aktivitenin aşırı ve kontrolsüz şekilde yayılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar epileptik nöbetlerin otonomik işlevi etkileyebileceğini bildirmiştir. Ancak moleküler mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Vagus siniri (VS) tüm parasempatik sistem liflerinin %75'ini taşıdığından dolayı epilepsi patogeneziyle ilişkili otonomik merkezde büyük bir öneme sahiptir. Afferent duyuşal lifleri beyin sapındaki ilişkili bölgelerdeki bağlantılar aracılığıyla sinapslar arası norepinefrin (NE) iletimini sağlamaktadır. Böylece, NE'nin nöbetler üzerinde baskılayıcı etkisi ve NE taşıyıcılarının (NET) nörotransmitter geri alımındaki görevi oluşabilir. Otonom sinir sisteminde görev alan nörotransmitterler ve ilgili taşıyıcıların moleküler düzeyde incelenmesi ilişkili mekanizmanın anlaşılmasına yardımcı olabilir. Bu çalışmada pentilentetrazol (PTZ) epilepsi modelinde NET ile ilişkili immünoaktivitenin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Epileptik nöbetler Wistar sıçanlarında (280-380g) 28 gün boyunca PTZ [ilk 12 enjeksiyon 35 mg/kg, intraperitoneal (I.P.) ve son enjeksiyon 50 mg/kg I.P.] uygulanarak indüklendi. Daha sonra VS torakal ve servikal

<sup>1</sup>Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Yozgat

<sup>2</sup>Zonguldak Bulent Ecevit University, Faculty of Medicine, Zonguldak

<sup>3</sup>Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Histology, Yozgat

<sup>4</sup>Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Yozgat



İletişim / Corresponding Author : Enes AKYÜZ

Yozgat Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Yozgat - Türkiye

E-posta / E-mail : enesakyuz25@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 27.11.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 20.12.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.74507

Polat KA, Güney E, Doğanıyğit Z, Akyüz E. Immunohistochemistry of norepinephrine transporters in the vagus nerve in a rat model of epilepsy. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 167 - 174

dissected as two parts, in terms of the thoracic and cervical sections. The NET levels were evaluated by immunohistochemical staining on the tissue samples.

**Results:** Expression of NETs in the thoracic VN region of the male and female experimental groups significantly increased. In the cervical VN, NET expression was significantly increased in epileptic male rats, while decreased in epileptic female rats compare to control groups.

**Conclusion:** Our study may disclose significant regional enhancement in the NET immunoreactivity. It is assumed that NET, which plays a role in NE regulation, may be characterized by abnormal neural stimulation. The findings provide proof-of-concept that alterations in NET expression may affect the ANS dysfunctions associated with epilepsy.

**Key Words:** Epilepsy, PTZ, autonomic nervous system, norepinephrine

kesitler açısından iki parça halinde diseke edildi. NET seviyeleri doku örnekleri üzerinde immünohistokimyasal boyama ile değerlendirildi.

**Bulgular:** Erkek ve dişi deney gruplarının torakal vagus bölgesinde NET ifadesinin anlamlı olarak arttı. Servikal VS'de NET ekspresyonu epileptik erkek sıçanlarda önemli ölçüde artarken, epileptik dişi sıçanlarda kontrol gruplarına göre azaldı.

**Sonuç:** Çalışmamız VS'de NET ifadesinin anlamlı bölgesel artışlarını ortaya koymuştur. NE regülasyonunda rol alan NET'in parasempatik sinirsel uyarım bozukluğu ile karakterize olabildiği düşünülmektedir. Gözlemlenen NET ifadesindeki değişiklikler epilepsi ile ilişkili otonom sinir sistemi işlev bozukluklarını etkileyebileceğine dair kanıtlar sunabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Epilepsi, PTZ, otonom sinir sistemi, norepinefrin

## INTRODUCTION

Epilepsy is a neurological symptom complex. This disease includes multiple risk factors and genetic predisposition. Seizures may occur in more than 70 million people (1, 2). Epileptic seizures generally can affect autonomic functions. Therefore, triggers in central and autonomic networks may contribute to pathologies in the cardiovascular system. Chronic and repeated activation of the autonomic nervous system (ANS) in patients with epilepsy can trigger fatal arrhythmias (3-5). To elucidate of the ANS related molecular mechanism is of great importance to clarify epilepsy pathogenesis.

Sympathetic, parasympathetic, and enteric systems, maintain nervous control of all body parts except skeletal muscle (6). The vagus nerve (VN) provides a large part of the ANS-mediated nerve conduction (7-9). VN and brainstem are considered

autonomic targets in terms of sympathetic/parasympathetic effects in seizure suppression (10).

After triggering, VN fibers may accelerate the neural activity in the locus coeruleus (LC), which is the regulatory center of the noradrenergic system in the brainstem (11). The noradrenergic pathway is one of the main neuro-modulatory systems that play an essential role in attention, arousal, and cognition (12, 13). The LC releases the neurotransmitter norepinephrine (NE) in various anatomically and functionally diverse brain regions (13). Depending on the seizure type or the area of the brain affected, reduced NE expressions and decreased adrenergic receptor density is reported. Therefore, it has been observed that pharmacological agents that increase extracellular NE levels have anticonvulsant effects (14).



The NE transporter (NET) is responsible for the reuptake of sodium chloride ( $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ ) bound extracellular NE into the presynaptic neurons. NET also provides a reuptake of extracellular dopamine (DA) (15, 16). The uptake of these two neurotransmitters into the presynaptic neuron is of great importance in regulating the concentrations in the synaptic cleft.

In this study, we aimed to determine the NET-associated immunoreactivity in the VN of the experimental epilepsy model.

## MATERIAL and METHOD

A total of 28 adult male and female Wistar albino rats weighing between 280-400 g were randomly divided into 4 groups. The rats were placed in cages at controlled temperatures ( $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) and kept on a 12-hour light-dark cycle. Free access to water and standard food was provided to animals. All efforts were made to minimize suffering by anesthetizing rats with ketamine/xylazine [90/10 mg/kg, intraperitoneal (I.P.), respectively]. The experimental protocol of this study was approved by Kayseri Erciyes University Animal Ethics Committee (ethics committee decision no: 2019/027). All procedures were followed under the recommendations in the National Institutes of Health (USA) and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the Helsinki Declaration.

### 1. PTZ-Kindling Model

Female and male control groups ( $n=7$ ) were injected equally and a total of 0.5 cc intraperitoneal (I. P.) saline was given every two days.

Seizures were induced in female and male experimental groups ( $n=7$ ) with periodic administration of PTZ (35 mg/kg, I. P.) for one month. PTZ (P6500, Sigma, St. Louis, MO, USA), a GABAA receptor antagonist used in the model, was dissolved in 0.9% NaCl solution and adjusted to 35 mg/kg dose. The solution was injected into rats three days a week for a month for a total of 12 doses, and seizure

behavior was observed 30 minutes after injection and calculated according to the Racine scoring protocol.

One week after the last PTZ injection, animals were given high dose PTZ (50 mg/kg, I.P.) to demonstrate improved seizure sensitivity in both female and male PTZ groups. Phase 4 or 5 was expected to be seen to observe the ignition pattern (17).

### 2. Racine Scoring System

Racine scoring (RS) was used to assess seizure severity in rodent experimental epilepsy models (18). RS, which categorizes the stages of seizures,

Stage 0: No answer,

Stage 1: Twitching in the ear and face,

Stage 2: Myoclonic jerks in the body,

Stage 3: Standing up on hind legs,

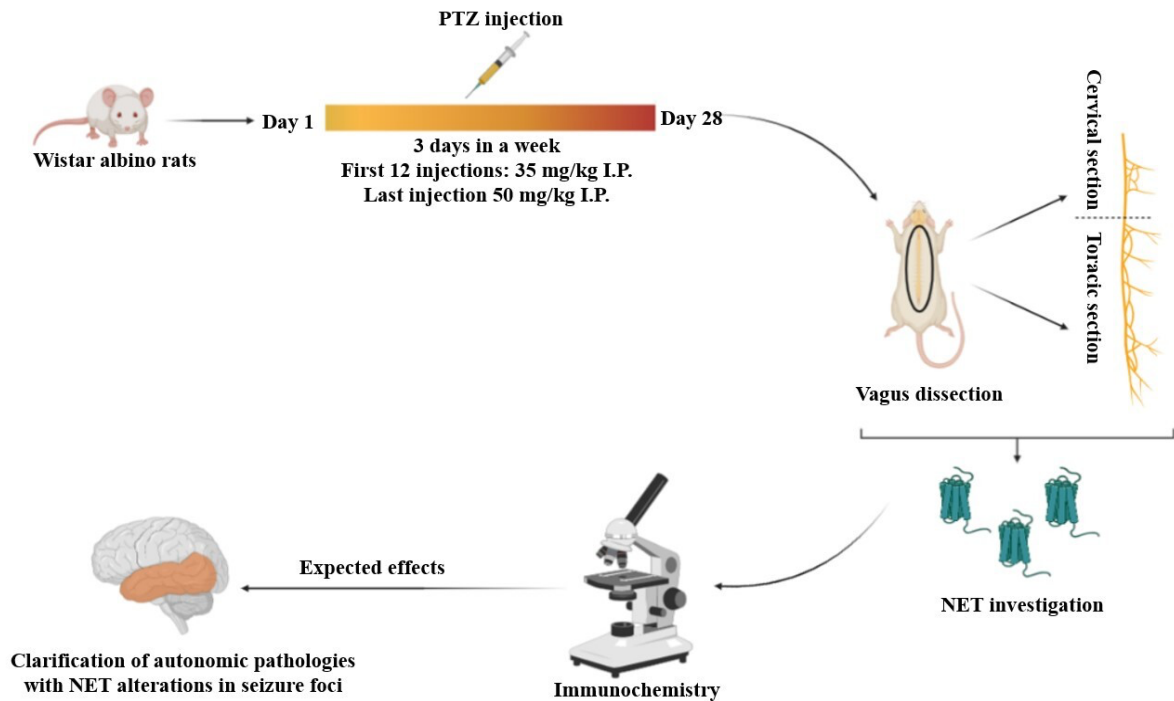
Stage 4: Tonic-clonic seizures with the animal falling to the ground,

Stage 5: Recurrent (generalized) severe tonic-clonic seizures.

### 3. Immunohistochemical Analysis

NET immunoreactivity was detected in thoracic and cervical nerve samples of the experimental groups using the Avidin-Biotin peroxidase method (Figure 1).

After the deparaffinization of the sections taken at 5  $\mu\text{m}$  thickness, citrate buffer was used to open the epitopes (pH: 6.0). Subsequently, 3% hydrogen peroxide in methanol was taken into the solution to prevent endogenous peroxidase activity. Apply Ultra V block solution to prevent unspecific staining. Sections were incubated overnight at  $40^\circ\text{C}$  with Anti-NET Antibody (Alomone lab: AMT-002). The sections were counterstained with Gill Hematoxylin by applying biotinylated secondary streptavidin-HRP (TP-125-HL; Thermo Scientific) and DAB chromogens, respectively. It was dehydrated through increasing alcohol series and closed with a sealer called entellan. Sections were examined with an Olympus BX53 light microscope. The evaluation of immunoreactivity levels was made with the Image J program.



**Figure 1.** Diagram summarizing the methodology steps used in the study. After the PTZ induction model, vagus dissection was performed. NET changes were observed with immunohistochemical examinations. PTZ, Pentylentetrazole; NET, Norepinephrine transporter

#### 4. Statistical analysis

Considering the norepinephrine variable, power analysis results with  $\alpha=0.05$ ,  $\text{power}=80\%$ . Accordingly, it was calculated that there should be at least 7 subjects in each group. In addition, the data obtained were statistically compared with each other in the SPSS statistical package program.

### RESULTS

#### 1. Scores of PTZ Kindling Epilepsy Model

After the PTZ kindling, epileptic seizures were gradually induced. Generalized tonic-clonic seizures, corresponding to phase 5 of the Racine's scaling system score, were observed in both male and female rats at the 13th injection. Latency to first seizure was calculated for both groups. PTZ-kindled female rats had their first seizure in  $266 \pm 66$  s, while PTZ-kindled

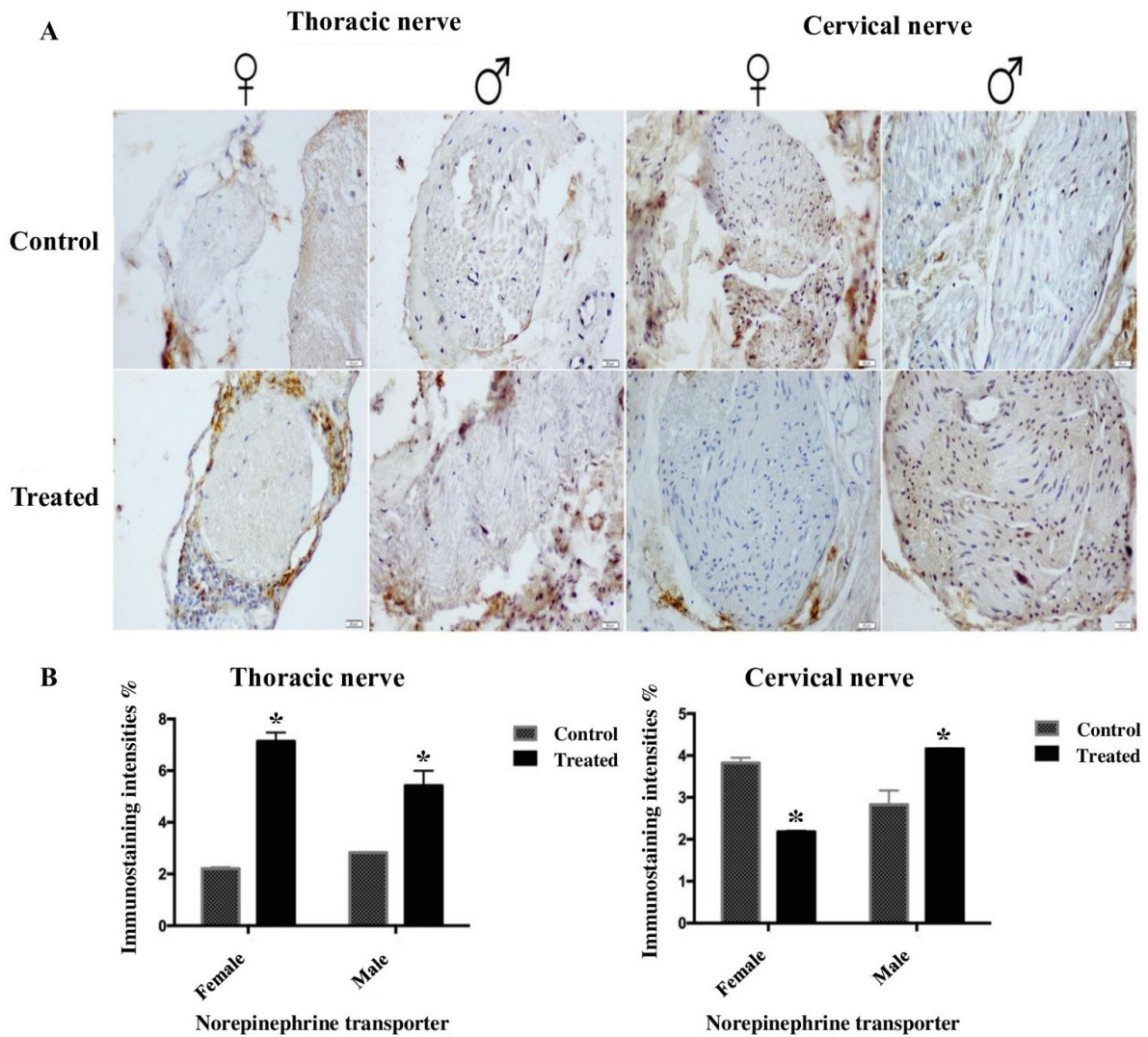
male rats had their first seizure in  $308 \pm 95$  s. No significant changes were observed in the body weights of the rats during the PTZ injection procedure.

#### 2. Immunohistochemical Findings

NET significantly increased in both male and female experimental groups in thoracic VN tissue ( $p < 0.05$ ). In the cervical VN region, NET expression decreased in the experimental groups in female rats, while it increased in the experimental groups in male rats ( $p < 0.05$ ) (Figure 2).

### DISCUSSION

In this paper, the role of autonomic VN involvement in epilepsy was investigated in terms of the NET, which plays a key role in central nervous system. In the thoracic VN of epileptic rats, a significant increase in NET immunoreactivity was observed. On



**Figure 2.** Immunoreactivity results of NET in the VN. In both groups, increased immunoreactivity in thoracic VN was observed. Pictures were taken at a magnification of  $\times 40$ . Scale bar:  $20 \mu\text{m}$  (A). The histogram graph showing the fold change in immunoreactivity for NET in the VN. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (B). One-way ANOVA variance analysis and Sidak's multiple comparison test were applied.

\*  $p < 0.05$ . NET, Norepinephrine transporter; SEM, Standard error; ANOVA, Analysis of variance

the other hand, NET expression was reduced in the cervical VN in male PTZ rats, while it increased in female PTZ rats. We hypothesized that NET, which is characterized by regional increases in the VN, may trigger the reuptake of synaptic NE to the presynaptic region, producing excitation that occurs in epilepsy.

Several studies conducted that endogenous NE has an anticonvulsant role in epilepsy. Additionally, NE reduction has been characterized by increased neuron damage in limbic regions and susceptibility to epileptic seizures (19, 20).

Convulsive activity is partially regulated by inhibiting neuronal processes, and catecholamines, DA, and NE act as central seizure suppressors. Although current evidence provides implications for the antiepileptic role of DA at the receptor level, NE has been revealed as the primary seizure suppressor (21). Recent studies revealed that NE plays an important role in modulation seizures by diminishing stimulation of limbic areas such as the amygdala and hippocampus (22, 23). Considering NE innervation, the anterior piriform cortex was examined in rats to examine susceptibility to seizures. Damage to the LC terminals was accomplished by the selective neurotoxin bromobenzyl amine (60 mg/kg I.P.). In intact rats, a marked increase in NE release in the contralateral piriform cortex was accompanied by sporadic seizures. The observations disclosed that epileptic rats developed neuronal loss in various limbic regions (24). The fact that NE shows a decrease in epilepsy due to damage to the brain regions suggests that it may lead to neuroinflammation.

In vitro studies have shown that excitotoxicity occurs in neurons as a result of electrical VN stimulation (VNS) for 12-14 hours (25, 26). Besides, VNS is known to be a method used in epilepsy and preventing autonomic system disorders (27). VNS activates the parasympathetic components of the VN to achieve therapeutic effects. However, in addition to the parasympathetic nerves, the cervical and thoracic VN regions contain components that form sympathetic nerve fibers (28, 29). Due to the connection between stellate ganglion (SG) and VN, stimulation of the sympathetic component with NE may activate the ganglion cells in SG at high rates. Current data have shown that VNS may have antiadrenergic effects in acute studies and suppress SG nerve activity during chronic trials (30).

In our study, the increase of NE-related receptors in the thoracic VN region and a decrease in the cervical VN in male rats showed that noradrenergic reuptake mechanisms in sympathetic and parasympathetic

fibers might be increased in epilepsy. Additionally, we assume that NE reuptake may cause neuronal damage by mediating excitotoxicity in sympathetic ganglia.

NE, acetylcholine (ACh), and serotonin provide astrocyte-mediated extracellular K<sup>+</sup> regulation. It has been reported that NE and serotonin-mediated K<sup>+</sup> flow reduces as a result of Kir4.1 channel blockade (31). Considering all data, we estimate that NE may prevent abnormal depolarization by providing K<sup>+</sup> flow into the cell.

The effects of the VN in the autonomic system can vary depending on gender as a result of the difference in receptors and ion channels. A study examining ACh receptors on the vagus nerve in epilepsy, revealed that the increase in ACh was greater in female rats (32). Studies examining the effect of sympathetic activity on blood pressure through catecholamines disclosed that NE-related voltage-dependent K<sup>+</sup> (KV) channels are expressed at various rates between genders depending on hormonal and developmental effects. Accordingly, catecholamine release due to increased channel activity in female rats was significantly reduced (33). Furthermore, Kir channel expressions and cardiac morphology have been reported to vary depending on gender (34, 35). In our study, NET expression was decreased in females and decreased in male experimental rats in the cervical VN. The results demonstrated that NE may affect pathologies, such as neuronal damage concerning the number of sex-based receptors. However, gender-based change in ion channels and receptor interactions of neurotransmitters has not been fully elucidated.

This study provided evidence that NET change in the VN, which acts as a “bridge” between the brain and heart, may be associated with autonomic dysfunction accompanying epilepsy.

In conclusion, despite extensive development in pre-clinical and clinical research, the precise mechanism of the noradrenergic system in VN origin for epilepsy is not fully known. In this study, we

hypothesized that NET increase in the thoracic VN and decrease in the cervical VN in male rats may occur as a result of the imbalance of NE reuptake mechanisms in sympathetic-parasympathetic fiber connections as

a result of epileptic discharges. Thus, new treatment methods should be investigated, especially for drug-resistant cases, by enlightening the entire molecular mechanism centered on the VN.

## ACKNOWLEDGMENTS

The data used in this study were financially supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) the 2209-A University Students Research Projects Support Program with the project number 1919B011902031.

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* The study was approved by the Kayseri Erciyes University Animal Ethics Committee (Date: : 13.02.2019 and Number: 2019/027).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 2014;55: 475-82.
2. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*, 2019;393: 689-701.
3. Devinsky O, Ryvlin P, Friedman D. Preventing Sudden Unexpected Death in Epilepsy. *JAMA Neurol*, 2018;75: 531-2.
4. Goldenholz DM, Kuhn A, Austermuehle A, Bachler M, Mayer C, Wassertheurer S et al. Long-term monitoring of cardiorespiratory patterns in drug-resistant epilepsy. *Epilepsia*, 2017;58: 77-84.
5. Van der Lende M, Surges R, Sander JW, Thijs RD. Cardiac arrhythmias during or after epileptic seizures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2016;87: 69-74.
6. Wehrwein EA, Orer HS, Barman SM. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol*, 2016;6: 1239-78.
7. Tindle J, Tadi P. Neuroanatomy, Parasympathetic Nervous System. *StatPearls*, StatPearls Publishing LLC, 2020.
8. English BA, Jones CK. Chapter 14 - Cholinergic Neurotransmission. *Primer on the Autonomic Nervous System (Third Edition)*. San Diego: Academic Press, 2012.
9. Thompson N, Mastitskaya S, Holder D. Avoiding off-target effects in electrical stimulation of the cervical vagus nerve: Neuroanatomical tracing techniques to study fascicular anatomy of the vagus nerve. *J Neurosci Methods*, 2019;325: 108325.
10. Barot N, Nei M. Autonomic aspects of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Clin Auton Res*, 2019;29: 151-60.
11. Hulseley DR, Shedd CM, Sarker SF, Kilgard MP, Hays SA. Norepinephrine and serotonin are required for vagus nerve stimulation directed cortical plasticity. *Exp Neurol*, 2019;320: 112975.
12. Bouret S. Locus Coeruleus, Noradrenaline, and Behavior: Network Effect, Network Effects? *Neuron*, 2019;103: 554-6.
13. Schwarz LA, Luo L. Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Curr Biol*, 2015;25: R1051-r1056.
14. Kumar U, Medel-Matus JS, Redwine HM, Shin D, Hensler JG, Sankar R et al. Effects of selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors on depressive- and impulsive-like behaviors and on monoamine transmission in experimental temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2016;57: 506-15.
15. Tellioglu T, Robertson D. Genetic or acquired deficits in the norepinephrine transporter: current understanding of clinical implications. *Expert Rev Mol Med*, 2001;2001: 1-10.

16. Wayment HK, Schenk JO, Sorg BA. Characterization of extracellular dopamine clearance in the medial prefrontal cortex: role of monoamine uptake and monoamine oxidase inhibition. *J Neurosci*, 2001;21: 35-44.
17. Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res*, 2017;42: 1873-88.
18. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972;32: 281-94.
19. Midzyanovskaya I, Shatskova A, MacDonald E, Van Luijtelaaar G, Tuomisto L. Brain aminergic deficiency in absence epileptic rats: Dependency on seizure severity and their functional coupling at rest. *J Behav Brain Sci*, 2020;10: 29-45.
20. Stevens L, Vonck K, Van Lysebettens W, Baekelandt V, Van Den Haute C, Carrette E et al. Genetic modification of Locus Coeruleus NE cells for chemogenetic activation remains challenging. *Front Neurosci Conference*, 2019.
21. Hui Yin Y, Ahmad N, Makmor-Bakry M. Pathogenesis of epilepsy: challenges in animal models. *Iran J Basic Med Sci*, 2013;16: 1119-32.
22. Deal AL, Mikhailova MA, Grinevich VP, Weiner JL, Gainetdinov RR, Budygin EA. In vivo voltammetric evidence that locus coeruleus activation predominantly releases norepinephrine in the infralimbic cortex: Effect of acute ethanol. *Synapse*, 2019;73: e22080.
23. Stevens L, Vonck K, Larsen LE, Van Lysebettens W, Germonpré C, Baekelandt V et al. A Feasibility Study to Investigate Chemogenetic Modulation of the Locus Coeruleus by Means of Single Unit Activity. *Front Neurosci*, 2020;14: 162
24. Giorgi FS, Ferrucci M, Lazzeri G, Pizzanelli C, Lenzi P, Alessandri MG et al. A damage to locus coeruleus neurons converts sporadic seizures into self-sustaining limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci*, 2003;17: 2593-601.
25. Jaiswal MK, Zech WD, Goos M, Leutbecher C, Ferri A, Zippelius A et al. Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci*, 2009;10: 64.
26. Chinda K, Tsai WC, Chan YH, Lin AY, Patel J, Zhao Y et al. Intermittent left cervical vagal nerve stimulation damages the stellate ganglia and reduces the ventricular rate during sustained atrial fibrillation in ambulatory dogs. *Heart Rhythm*, 2016;13: 771-80.
27. Planitzer U, Hammer N, Bechmann I, Glätzner J, Löffler S, Möbius R et al. Positional Relations of the Cervical Vagus Nerve Revisited. *Neuromodulation*, 2017;20: 361-8.
28. Onkka P, Maskoun W, Rhee KS, Hellyer J, Patel J, Tan J et al. Sympathetic nerve fibers and ganglia in canine cervical vagus nerves: localization and quantitation. *Heart Rhythm*, 2013;10: 585-91.
29. Seki A, Green HR, Lee TD, Hong L, Tan J, Vinters HV et al. Sympathetic nerve fibers in human cervical and thoracic vagus nerves. *Heart Rhythm*, 2014;11: 1411-7.
30. Rhee KS, Hsueh CH, Hellyer JA, Park HW, Lee YS, Garlie J et al. Cervical vagal nerve stimulation activates the stellate ganglion in ambulatory dogs. *Korean Circ J*, 2015;45: 149-57.
31. Wotton CA, Cross CD, Bekar LK. Serotonin, norepinephrine, and acetylcholine differentially affect astrocytic potassium clearance to modulate somatosensory signaling in male mice. *J Neurosci Res*, 2020;98: 964-77.
32. Akyüz E, Doğanyığıt Z, Paudel YN, Kaymak E, Yilmaz S, Uner A et al. Increased ACh-Associated Immunoreactivity in Autonomic Centers in PTZ Kindling Model of Epilepsy. *Biomedicine*, 2020;8.
33. Berg T. Kv7(KCNQ)-K(+)-Channels Influence Total Peripheral Resistance in Female but Not Male Rats, and Hamper Catecholamine Release in Hypertensive Rats of Both Sexes. *Front Physiol*, 2018;9: 117.
34. Akyüz E, Mega Tiber P, Beker M, Akbaş F. Expression of cardiac inwardly rectifying potassium channels in pentylenetetrazole kindling model of epilepsy in rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2018;64: 47-54.
35. Akyuz E, Polat K, Ates S, Unalmis D, Tokpinar A, Yilmaz S et al. Investigating Cardiac Morphological Alterations in a Pentylenetetrazol-Kindling Model of Epilepsy. *Diagnostics*, 2020;10: 388.

## Kars yöresindeki gebelerde *Toxoplasma gondii*: Seroprevalans ve olası risk faktörleri

### *Toxoplasma gondii* in pregnant women in Kars province: Seroprevalance and possible risk factors

Funda DEMİRCİ<sup>1</sup> (ID), Neriman MOR<sup>2</sup> (ID)

#### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışma ile Kars ilinde sağlıklı gebe kadınlarda *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansını saptamak ve enfeksiyonla ilişkili olabileceği düşünülen olası risk faktörlerini incelemek ve risk faktörlerinin seropozitiflik üzerine etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Eylül 2018 - Mart 2019 tarihleri arasında yaşları 15-45 yaş arasında değişen ve gebelik haftaları 6-39 hafta aralığına uyan örneklem seçimi ile sağlıklı 308 gebe kadın çalışmanın materyalini oluşturdu. Gebe kadınlara çalışma hakkında bilgilendirme yapıldıktan sonra gönüllülük ilkesine bağlı kalınarak her bir gebeye enfeksiyon ile ilişkili 26 sorudan oluşan anket bilgi formu doldurtuldu. Ayrıca rutin muayene sırasında bu kişilerden istenilen kanların serum örnekleri ticari mikro-ELISA yöntemi ile anti *T. gondii* antikoru yönünden incelendi. Anket ve laboratuvar sonuçları SPSS 20 programında istatistik olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Çalışmada gebe kadınlarda %44,8 (138/308) oranında anti - *T. gondii* IgG seropozitifliği tespit edildi. Anti - *T. gondii*'nin hem IgM hem de IgG'nin birlikte seropozitifliği %0,3 oranında (1/308) tespit edilirken, tek başına anti-*T. gondii* IgM seropozitifliği saptanmadı. Gebe kadınların sosyo-demografik

#### ABSTRACT

**Objective:** In this study, it was aimed to determine the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in healthy pregnant women in Kars province, to examine possible risk factors that may be associated with infection and to evaluate the effect of risk factors on seropositivity.

**Methods:** The material of the study was composed of 308 healthy pregnant women between the ages of 15-45 and matching 6-39 weeks of gestation between September 2018 and March 2019. After the pregnant women were informed about the study, each pregnant woman filled a questionnaire form consisting of 26 questions related to the infection by adhering to the voluntary principle. In addition, serum samples of blood requested from these individuals during routine examination were examined for anti *T. gondii* antibodies by commercial micro-ELISA method. Questionnaire and laboratory results were evaluated statistically in SPSS 20 program.

**Results:** Anti - *T. gondii* IgG seropositivity was detected as 44.8% (138/308) in the pregnant women in the study. While seropositivity of both IgM and IgG of anti - *T. gondii* was determined as 0.3% (1/308), anti - *T. gondii* IgM seropositivity alone was not detected. *Toxoplasma gondii* seropositivity was determined according to the

<sup>1</sup>Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ebelik Anabilim Dalı, Kars  
<sup>2</sup>Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kars



İletişim / Corresponding Author : Neriman MOR

Kafkas Üni. Tıp Fak. Temel Tıp Bil. Böl. Tıbbi Parazitoloji AD Merkez Kampüs Kars - Türkiye

E-posta / E-mail : nery.man@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 31.01.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 13.04.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.77528

Demirci F, Mor N. Kars yöresindeki gebelerde *Toxoplasma gondii*: Seroprevalans ve olası risk faktörleri  
Türk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 175 - 186

özellikleri, gebelik durumları, sosyal alışkanlıkları, beslenme alışkanlıkları ve hijyen alışkanlıkları gibi olası risk faktörlerine verdikleri yanıtlara göre *T. gondii* seropozitifliği belirlendi. Olası risk faktörleri arasında gelir durumunu düşük olarak belirten, yaşları 30-34 yaş aralığında değişen, çiğ yumurta tüketen, içme suyu kaynağı olarak musluk suyu kullanan gebe kadınlarda *T. gondii*'nin seropozitifliği diğer olası risk faktörlerine göre istatistiksel olarak anlamlı tespit edildi ( $P<0.05$ ).

**Sonuç:** Kars ilinde *T. gondii* seropozitifliğinin dikkate değer düzeyde olduğu gözlenmiştir. Sosyoekonomik koşullar, sosyal, beslenme ve hijyen alışkanlıkları gibi olası risk faktörlerinin gebe kadınlarda toxoplasmosis üzerinde etkili olduğu ve gebe kadınların enfeksiyon hakkında bilgi sahibi olmadıkları tespit edilmiştir. Bu sebeple enfeksiyondan korunma yolları hakkında gebe kadınlara eğitim verilmesinin önemli ve gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Toxoplasma gondii*, gebe, ELISA, seroprevalans, olası risk faktörleri, Kars

responses of pregnant women to possible risk factors such as socio-demographic characteristics, pregnancy status, social habits, eating habits and hygiene habits. The seropositivity of *T. gondii* in pregnant women who stated low income, aged between 30 and 34, consumed raw eggs, used tap water as a drinking water source among possible risk factors, was statistically significant compared to other possible risk factors ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** It was observed that *T. gondii* seropositivity was significant in Kars province. It has been determined that possible risk factors such as socioeconomic conditions, social, nutritional and hygienic habits are effective on toxoplasmosis in pregnant women and pregnant women do not have information about the infection. For this reason, it has been concluded that it is important and necessary to educate pregnant women about the ways of protection from the infection.

**Key Words:** *Toxoplasma gondii*, pregnant, ELISA, seroprevalence, possible risk factors, Kars

## GİRİŞ

Toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*'nin (*T. gondii*) etken olduğu zoonotik bir hastalıktır. İnsanlara enfekte hayvan etlerin çiğ ya da az pişmiş olarak yenmesiyle veya kedigillerin dışkıyla atılan ookistlerle kontamine olmuş gıda ve suların oral yolla alınmasıyla bulaşır. Kas, göz ve beyin olmak üzere birçok dokuyu enfekte edebilir. Enfekte gebeden transplasental yolla fetüse bulaşarak konjenital enfeksiyonlara, anomalilere ve abortuslara neden olur (1,2,3). Hastalığın hem yüksek oranda asemptomatik seyretmesi hem de belirti ve bulguların kısa süre içerisinde kendiliğinden kaybolması nedeniyle konjenital toxoplasmosis olarak sağlar (1,4).

Dünyada ve Türkiye'de *T. gondii* seroprevalansı ile ilgili gebe kadınlar üzerinde yapılan farklı veriler bulunmaktadır (5-9). Dünyada görülme sıklığı fazla olan toxoplasmosis enfeksiyonu Türkiye'de de sıklıkla görülmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda enfeksiyon sıklığı bölgeden bölgeye göre farklılık göstermektedir. Türkiye'de 1999-2009 yılları arasında yetişkinlerde %18-43,6 oranında, gebe-doğurganlık çağındaki kadınlarda da %26,6-96,5 seropozitivite tespit edilmiştir (10). Enfeksiyonun prevalansında, beslenme alışkanlıkları, yaşam tarzı, gelenekler, sosyoekonomik koşullar, konağın immünitesi, konağın duyarlılığı ve iklim durumunun belirleyici olduğu belirtilmiştir (3, 11-13).



Ulaşılan kaynak bilgilerde geçiminin büyük bir çoğunluğunu tarım ve hayvancılıkla sağlayan Kars yöresinde hayvanlarda toxoplasmosis seroprevalansının araştırıldığı çalışmalara rastlanılmıştır (14-21). Ancak insanlarda retrospektif olarak yürütülen iki çalışmanın birincisi, 2008-2013 yılları arasında doğurganlık çağındaki kadınlarda olup *Toxoplasma* IgG oranı %36,5 olarak tespit edilmiş (22). İkinci çalışmada ise gebe kadınlar dâhil edilerek *Toxoplasma* IgG %20,3 oranında belirlenmiştir (23). Kars yöresinde hayvancılık yaygın olması nedeniyle zoonoz enfeksiyonları açısından daha fazla epidemiyolojik çalışmalara gereksinim vardır. Bu çalışma sonuçlarına göre enfeksiyonun epidemiyolojisi belirlenecek ve korunmak için bir politika planlanabilecektir. Bu çalışmada da, Kars ilindeki gebelerde *T. gondii* enfeksiyonunun seroprevalansının belirlenmesi, epidemiyolojik olarak enfeksiyonun olası risk faktörleri ile ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmaya başlamadan önce Kars Kafkas Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı tarafından 14.03.2018/51 protokol sayısı ile gerekli izin alınmıştır. Ayrıca Kars İl Sağlık Müdürlüğü ve Kars Harakani Devlet Hastanesi'nden kurum izinleri alınmıştır (Sayı: 14739267/806.01.03/E.151). Kars ili merkez ilçesiyle birlikte 8 ilçe olup, Kars Harakani Devlet Hastanesi'ne ilin tüm ilçelerinden hastalar müracaat etmektedir. Çalışmanın evren büyüklüğü 2018 yılında Kars İl Sağlık Müdürlüğü istatistik biriminden alınan verilere göre, toplam gebe sayısı 4367 olarak bildirilmiştir. Araştırmada istatistiki olarak örneklem seçimine gidilerek %95 güven aralığı ve 0,05 duyarlılıkla toplam 318 olarak hesaplandı. Bu doğrultuda çalışmanın materyalini, Eylül 2018-Mart 2019 tarihleri arasında Kadın Doğum Polikliniğine rutin gebelik muayenesi için başvuran yaşları 15-45 yaş arasında değişen, gebelik haftaları 6-39 hafta aralığına uyan ve çalışmaya

gönüllü katılmak isteyen kadınlar oluşturmuştur. Ancak 318 adet serum örneklerinin laboratuvar aşamasında 10 tanesinin kanlı hemoliz olmasından dolayı toplam 308 serum örneği üzerinden çalışmaya devam edilmiştir. Gönüllü gebe kadınlara çalışma hakkında bilgilendirme yapılarak enfeksiyon ile ilişkili olabileceği düşünülen 26 sorudan oluşan anket bilgi formu doldurulmuştur. Rutin muayene sırasında istenilen kanların serum örneklerine ticari mikro-ELISA yöntemi (Diapro (Milano)-İtalya) ile bakılmıştır.

Araştırmada nicel verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma), nitel verilerin değerlendirilmesinde ise sayı ve yüzde dağılımları kullanılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki farklar “ki-kare testi” ile değerlendirilmiştir. Anket sonucunda elde edilen veriler ile birlikte laboratuvar sonuçları, “Statistical Package for Social Sciences” (IBM SPSS Statistic 20) istatistik programı ile analiz edilerek,  $p < 0.05$  düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmaya katılan gebelerin yaş ortalaması 27,25 tespit edilirken, gebelik haftası ortalaması 21,28; gebelik sayısı ortalaması 2,26 olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen 308 gebeden 106'sının (%34,4) ilk gebelik dönemlerini yaşadıklarını, 19 (%6,2) gebede düşük doğum hikâyesi olduğu tespit edilirken, ölü doğum ve erken doğum hikâyesine rastlanılmadı. Gebelerden 62'sinin (%20,1) gelir getirici bir işte çalıştığı, 246 gebenin (%79,9) ise ev hanımı olup çalışmadığı belirlenmiştir.

Çalışmaya gönüllü olarak katılan toplam 308 gebe kadından alınan kan örneklerinde anti-*T. gondii* IgM seropozitifliği %0,0 bulunurken, anti-*T. gondii* IgG seropozitifliği %44,8 oranında tespit edilmiştir. *Toxoplasma gondii*'nin hem IgM hemde IgG'nin birlikte seropozitifliği de %0,3 oranında (1/308) saptanmıştır (Tablo 1).

Sosyo-demografik özelliklere göre kategorik değişkenler arasında *T. gondii*'nin yaygınlığı yönünden karşılaştırma yapıldığında en yüksek seroprevalansın %45,7 oranında kırsal bölgede yaşayanlarda, %52,8 oranında gelir düzeyi düşük olanlarda, %61,3 oranında 30-34 yaş aralığında, %52,6 oranında üniversite ve üzeri eğitim düzeyi olanlarda ve %50,0

oranında çalışan gebelerde olduğu saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz neticesinde, yaş ve gelir düzeylerine ait parametrelerde gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulunurken ( $P<0,05$ ), yaşadıkları yer, eğitim ve katılımcıların çalışma durumlarına ait parametrelerde gruplar arasındaki farklılık önemsiz olarak tespit edilmiştir ( $P>0,05$ ), (Tablo 2).

**Tablo 1.** Gebe kadınlarda ELISA yöntemi ile *T. gondii*'nin seroprevalansı

Antikor Tipi	Pozitif		Negatif		Toplam
	n	%	n	%	
Sadece IgM	0	0,0	308	100,0	308
Sadece IgG	138	44,8	170	55,2	
IgM+IgG	1	0,3	307	99,6	

**Tablo 2.** Sosyo-demografik özelliklerine göre gebe kadınlarda ELISA ile *T. gondii*'nin seroprevalansı

Anket Soruları		n	Toxoplasma-IgG		P	X <sup>2</sup>
			Pozitif n (%)	Negatif n (%)		
Yaşanılan Yer	Kırsal	92	42(45,7)	50(54,3)	0,845	0,038
	Kentsel	216	96(44,4)	120(55,6)		
Gelir Durumu	Düşük	125	66(52,8)	59(47,2)	0,001	14,717
	Orta	107	32(29,9)	75(70,1)		
	İyi	76	40(52,6)	36(47,4)		
Yaş	15-19	23	13(56,5)	10(43,5)	0,028	10,868
	20-24	82	30(36,6)	52(63,4)		
	25-29	105	43(41,0)	62(59,0)		
	30-34	58	34(61,3)	24(38,7)		
	35 ve üstü	40	18(45,0)	22(55,0)		
Eğitim	Okur-Yazar Değil	12	2(16,7)	10(83,3)	0,136	5,536
	İlkokul	183	79(43,2)	104(56,8)		
	Lise	94	47(50,0)	47(50,0)		
	Üniversite ve Üzeri	19	10(52,6)	9(47,4)		
Çalışma Durumu	Ev Hanımı	246	107(43,5)	139(56,5)	0,357	0,847
	Diğer	62	31(50,0)	31(50,0)		
Genel Toplam		308	138(44,8)	170(55,2)		

Çalışmada katılımcıların anket sorularına verdikleri yanıtla gebelik durumlarına göre *T. gondii*'nin IgG sonuçları incelendiğinde; %57,5 oranında 6-12 gebelik haftası aralığında 46 hastada, %47,8 oranında 3 ve 3'ten fazla gebelik yaşayan 22 hastada, %46,1 oranında 1-3 arası canlı doğum yapan 88 hastada ve %47,4 oranında 1-3 düşük doğum aralığına uyan 9 hastada en yüksek *T. gondii*'nin

seropozitifliği saptanmıştır. Ancak gebelik durumları ile ilgili yöneltilen anket sorularında ölü doğum ve erken doğum öyküsü olan bir veriye rastlanılmamıştır. Yapılan istatistik analiz sonuçları; gebe kadınlarda *T. gondii*'nin seropozitiflik oranları ile gebelik haftası, gebelik sayısı, canlı doğum sayısı ve düşük doğum sayısı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ), (Tablo 3).

**Tablo 3.** Belirtilen gebelik durumlarına göre *T. gondii*'nin seroprevalansı

Anket Soruları	n	<i>Toxoplasma</i> -IgG		P	X <sup>2</sup>	
		Pozitif n(%)	Negatif n(%)			
Gebelik Haftası	6-12	80	46(57,5)	34(42,5)	0,092	7,997
	13-19	66	26(39,4)	40(60,6)		
	20-26	49	19(38,8)	30(61,2)		
	27-32	52	24(46,2)	28(53,8)		
	33+	61	23(37,7)	38(62,3)		
Gebelik Sayısı	1-3	262	116(44,3)	146(55,7)	0,655	0,200
	3+	46	22(47,8)	24(52,2)		
Canlı Doğum Sayısı	0	106	44(41,5)	62(58,5)	0,749	0,579
	1-3	191	88(46,1)	103(53,9)		
	4-6	11	5(45,5)	6(54,5)		
Düşük Doğum Sayısı	0	289	129(44,6)	160(55,4)	0,817	0,054
	1-3	19	9(47,4)	10(52,6)		
Genel Toplam		308	138(44,8)	170(55,2)		

Gebelerin sosyal alışkanlıklara göre (evde kedi besleme, bahçede kedi besleme, bahçe ve tarla işleriyle uğraş) *Toxoplasma* IgG sonuçlarının dağılımı incelendiğinde; evde kedi besleyenlerde %51,3, bahçede kedi besleyenlerde %50,0 bahçe ve tarla işleriyle uğraşan yani toprakla teması olan gebe kadınlarda %48,5 oranında en yüksek seropozitiflik tespit edilmiştir. Sosyal alışkanlıkların alt özellikleri ile *T. gondii* seropozitifliği arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık belirlenmemiştir ( $P>0,05$ ), (Tablo 4).

Beslenme alışkanlıklarına göre en yüksek *T. gondii* seropozitifliği, %47,5 oranında musluktan su içenlerde, %55,4 oranında çiğ veya az pişmiş yumurta yeme alışkanlığı olanlarda, %47,8 oranında çiğ süt içenlerde, % 47,4 oranında çiğ/az pişmiş et veya işlenmemiş gıda tüketenlerde ve %49,2 oranında yıkanmamış meyve sebze tüketenlerde saptanmıştır. *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalans oranı ile içme su kaynakları ve çiğ yumurta yeme arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $P<0,05$ ).

Beslenme alışkanlıklarının diğer alt özellikleriyle ilgili herhangi bir istatistiksel anlamlılık belirlenmemiştir ( $P>0,05$ ), (Tablo 4).

Çalışmada gebelerin anket sorularında yanıt verdikleri hijyen alışkanlıklarına göre; %48,5 oranında “Et ile temas eden mutfak gereçlerinin temizliğine önem verme” ve %47,3 oranında “Yıkanmamış meyve/ sebze ile temas eden mutfak gereçlerinin temizliğine

önem verme” sorusuna hayır yanıtı verenlerde *T. gondii* seropozitifliği daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Ayrıca “Yemek yapmadan önce ve yemek yaptıktan sonra ellerinizi yıkıyor musunuz?” sorusuna gebe kadınlarda %100 oranında evet yanıtı verilmiştir. Ancak *T. gondii* seropozitifliği ile hijyen alışkanlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ), (Tablo 4).

**Tablo 4.** Olası risk faktörlerine (sosyal, beslenme ve hijyen alışkanlıkları) göre gebe kadınlarda *T. gondii*'nin Seroprevalansı

Anket Soruları	n	<i>Toxoplasma</i> -IgG		P	2	
		Pozitif n(%)	Negatif n(%)			
Evde Kedi Besleme	Evet	39	20(51,3)	19(48,7)	0,384	0,757
	Hayır	269	118(43,9)	151(56,1)		
Bahçede Kedi Besleme	Evet	122	61(50,0)	61(50,0)	0,138	2,204
	Hayır	186	77(41,4)	109(58,6)		
Bahçe ve Tarla İşleriyle Uğraş	Evet	134	65(48,5)	69(51,5)	0,252	1,315
	Hayır	174	73(42,0)	101(58,0)		
İçme Suyu Kaynağı	Musluktan	255	121(47,5)	134(52,5)	0,048	6,089
	Hazır Damacandan	33	13(39,4)	20(60,6)		
	Dereden	20	4(20,0)	16(80,0)		
Çiğ Yumurta Yeme	Evet	74	41(55,4)	33(44,6)	0,035	4,426
	Hayır	234	97(41,5)	137(58,5)		
Çiğ Süt İçme	Evet	201	96(47,8)	105(52,2)	0,153	2,044
	Hayır	107	42(39,3)	65(60,7)		
Çiğ / Az Pişmiş Et veya İşlenmemiş Gıda (Sosis/Salam)	Evet	192	91(47,4)	101(52,6)	0,240	1,384
	Hayır	116	47(40,5)	69(59,5)		
Yıkanmamış Meyve/Sebze Yeme	Evet	122	60(49,2)	62(50,8)	0,211	1,564
	Hayır	186	78(41,9)	108(58,1)		
Et İle Temas Eden Mutfak Gereçlerinin Temizliği Önem	Evet	145	59(40,7)	86(59,3)	0,171	1,877
	Hayır	163	79(48,5)	84(51,5)		
Yıkanmamış Meyve/Sebze İle Temas Eden Mutfak Gereçlerinin Temizliğine Önem	Evet	160	68(42,5)	92(57,5)	0,398	0,715
	Hayır	148	70(47,3)	78(52,7)		
Genel Toplam		308	138(44,8)	170(55,2)		

## TARTIŞMA

Kars yöresinde hayvancılık yaygın olup insanlar hayvan ve hayvan ürünleri ile daha çok irtibat halindedir. Bu nedenle insanlarda *T. gondii* ile ilgili daha fazla araştırmaların yapılmasına gereksinim duyulmuştur. Bu doğrultuda yürütülen çalışmada 308 gebe kadında anti-*T. gondii* IgM seropozitifliği tespit edilmezken, anti-*T. gondii* IgG seropozitifliği %44,8 oranında tespit edilmiştir. Ancak *T. gondii*'nin hem IgM hem de IgG'nin birlikte seropozitifliği %0,3 oranında (1/308) saptanmıştır. *T. gondii*'nin seroprevalansı Kars ili merkez ilçesi dâhil olmak üzere 8 ilçede %25,0- %52,5 arasında değişmektedir. Çalışma bu yönüyle Türkiye geneli verileriyle benzerlik göstermiştir.

Gebe kadınlarda *T. gondii*'nin seropozitiflik dağılımları yerleşim yerine göre incelendiğinde; bazı araştırmalarda kırsal bölgede doğan ve ikamet eden kişilerdekentselbölgedeyaşayanlara göre seropozitiflik oranının daha yüksek olduğu bildirilirken (13,24), aksini ifade eden çalışmalara da rastlanılmaktadır (25,26). Ancak bu çalışmada kırsal alanda yaşayan gebelerde *Toxoplasma* IgG seropozitifliği kentsel bölgede yaşadığını bildiren kadınlara göre daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu durum kırsal alanda yaşayanların bahçe-tarla gibi toprakla temaslarının ve hayvancılıkla uğraşın çok olduğu, eğitim seviyesinin daha düşük olduğu, beslenme ve hijyen koşullarının kentsel alanda yaşayanlara göre daha kötü olduğu şeklinde açıklanabilir.

Dünyada ve Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarda, yaşın *T. gondii* prevalansı bakımından önemli olduğu ve yaş artışıyla birlikte pozitifliğin arttığı bildirilmektedir (1,24,26-29). Yaş artışıyla enfeksiyonun prevalansı arasında bir ilişkinin olmadığı da bildirilmiştir (30). Yapılan bu çalışmada ise gebe kadınlarda yaş aralıkları incelendiğinde seropozitifliğin en çok 30-34 yaş aralığında (%61,3) görüldüğü, sonraki pozitifliğin sırasıyla 15-19 yaş aralığında (%56,5) ve 35 yaş ve üzeri yaş aralığının (%45,0) olduğu görülmüştür. Yaş ile *T. gondii* seropozitifliği arasında istatistiksel olarak

farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bu durum her yaş grubunda toxoplazmosisin görülme düzeyinin yüksek olabileceğini göstermektedir.

Kuzeydoğu Brezilya'da 1540 kişi ile yapılan bir çalışmada (29) sosyoekonomik durum ile *Toxoplasma* seropozitifliği arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde Kilis'te doğurgan çağıdaki kadınlar üzerinde yapılmış olan yüksek lisans tez çalışmasında sosyoekonomik durum ile *T. gondii* seropozitifliği arasında önemli bir fark saptanmamıştır (11). Ancak Ürdün'de üniversiteli 202 kadın öğrencide yapılan bir çalışmada gelir durumu yüksek olan kişilerde seropozitiflik oranı daha yüksek bulunmuştur (31). İstanbul'da 102 gebe kadın üzerinde yürütülen bir çalışmada ise sosyoekonomik durumu iyi olan gebelerde seropozitiflik oranı %42,8, orta düzeyde olan gebelerde %47,8, düşük düzeyde olan gebelerde %53,1 olarak bildirilmiştir (30). Benzer olarak bu çalışmada da düşük gelirli gebe kadınlarda %52,8 seropozitif bulunurken, orta gelirli olanlarda %29,9; gelir durumunu iyi olarak belirtenlerde ise %52,6 olarak tespit edilmiştir. Gelir durumuna göre *Toxoplasma* seropozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Aydın'da 423 gebe ile yürütülen bir çalışmada eğitim ile *T. gondii* seropozitifliğinin artış göstermediği bildirilmiştir (26). Ankara'da birinci trimesterde olan 235 gebe kadının çalışmaya dahil edildiği bir araştırmada ilköğretim mezunu olanların Toxo IgG seropozitiflik oranının üniversite ve üzerindeki gruba göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (28). Ancak yapılan bu çalışmada, eğitim seviyesi arttıkça seropozitiflik oranında arttığı ancak eğitim durumu ile *T. gondii* seropozitifliği arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olmadığı görülmüştür ( $P>0,05$ ). Bu durum günümüzde pet hayvan yetiştiriciliğinin özellikle gelir durumu ve eğitim seviyesi yüksek kişiler tarafından tercih edilmesi ve dolayısıyla toxoplazmosis ile bulaş olma riskini daha da artırabileceği şeklinde açıklanabilir.

*T. gondii* enfeksiyonunda kedilerin son konak

olduğu ve enfeksiyonun yayılmasında kedilerin varlığının önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Gaziantep'te 150 gebe kadın üzerinde yürütülen bir çalışmada evcil hayvan sahibi olanlarda %90,9 oranında *Toxoplasma* IgG seropozitifliği saptanırken, olmayanlarda %54 olarak tespit edilmiştir. Evcil hayvan sahibi olanlarda *Toxoplasma* IgG ve IgM seropozitifliği istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir (12). İstanbul'da yapılan başka bir çalışmada ise kedilerle teması olan gebe kadınlardaki IgG seropozitifliği %60, kedilerle temas olmayanlarda ise seropozitiflik %48 oranında olduğu tespit edilmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı bildirilmiştir (30). Benzer şekilde yapılan bu çalışmada ise hem evde hemde bahçede kedi besleyen gebe kadınlarda anti-*Toxoplasma* IgG seropozitiflik oranları daha yüksek çıkmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $P>0,05$ ).

Bahçe ve tarla işleriyle uğraşan, toprakla teması oluşan kişiler *T. gondii* enfeksiyonu açısından risk altındadır. Toplumumuzda hijyen alışkanlığının çok üst düzeyde olmaması ve ilde hayvanlar üzerinde yürütülmüş olan çalışmalarda *T. gondii* seropozitifliğinin yüksekliği de göz önüne alındığında toxoplasmosise karşı seronegatif olan gebe kadınların olası risk grubu altında olduğu anlaşılmaktadır. Nitekim yapılan bu çalışmada "Yıkılmamış meyve /sebze tüketiyor musunuz?" sorusuna cevaben evet yanıtını veren, bahçe ve tarla işleriyle uğraşan gebelerde anti-*Toxoplasma* IgG seropozitifliği oldukça yüksek tespit edilmiştir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Gaziantep'te 150 gebe kadın üzerinde yürütülen bir çalışmada içme suyu temin şekline göre *Toxoplasma* IgG seropozitiflik dağılımları incelendiğinde; şebeke suyu kullananlarda %56,1, hazır su (damacana) kullananlarda %50 ve kuyu suyu kullananlarda ise %80 seropozitiflik tespit edilmiştir (12). Aydın'da yapılan bir çalışmada çeşme suyu tüketimi ile *T. gondii* seropozitifliğinin artış gösterdiği ve arasında istatistiksel önemli bir ilişki olduğu bildirilmiştir

(26). Kadınlarda yapılan çalışmalarda araştırmacılar Çanakkale'de (27) çeşme suyu tüketenlerde, Kilis'te (11) musluk ve kuyu suyu tüketenlerde *T. gondii* seropozitifliğinin artış gösterdiğini fakat aralarında istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada musluktan içilen suyun *T. gondii* seropozitiflik açısından daha yüksek olduğu (%47,5) görülmüştür ( $P<0,05$ ). Bu durum çeşme suyu yani şebeke suyu olarak bilinen içme suyunun seller ya da şiddetli yağmurlar sonrası topraktan gelen ookistlerin kuyu veya şebeke sularına karışabileceğini, ookistlerin uzun süre yaşayarak kişileri enfekte edebileceği şeklinde açıklanabilir. Ayrıca Eşkin'inin (12) yaptığı çalışmada olduğu gibi kentsel alanlarda görülen seropozitiflikte su şebekelerinin altyapılarının yetersizliğine ya da klorlama ve filtreleme çalışmalarının yetersiz olmasına bağlayabiliriz.

Toxoplasmosisin bulaşmasında etkili olan risk faktörlerinden birisi de çiğ veya iyi pişmemiş et ve et ürünlerinin tüketimidir (5,6,12,32). Nitekim Afyon, İstanbul, Malatya, Çanakkale, Kilis, ve Ankara'da yapılan çalışmalarda çiğ veya az pişmiş et tüketme ile *T. gondii* seropozitifliğinin yükseldiği bildirilmiştir (11,27-28,30). Bu çalışmalara benzer şekilde yapılan bu çalışmada çiğ/az pişmiş et veya işlenmemiş gıda (sosis, salam, çiğ köfte) tüketen gebelerde anti-*Toxoplasma* IgG seropozitifliği %47,4 tespit edilirken, tüketmeyenlerde %40,5 olarak bulunmuştur. Çalışmanın diğer çalışmalarda uyumlu olduğu ve bu durumun istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı görülmüştür ( $P>0,05$ ).

Dubey (1), tavuk yumurtasında *T. gondii* prevalansının düşük olduğunu belirtmiştir. Çanakkale'de yapılan bir araştırmada gebe kadınlarda *Toxoplasma* enfeksiyonuna ilişkin risk faktörleri araştırılmış ve çalışma neticesinde çiğ yumurta tüketimi ile *Toxoplasma* IgG seropozitifliği arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (27). Ancak sunulan çalışmada çiğ yumurta tüketen gebelerin *T. gondii* seropozitifliği %55,4 oranında olup istatistiksel olarak

anlamli bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Bölgede boğaz ağrısı ve soğuk algınlığına bağıli ses kısıklığı durumlarında çiğ yumurta içmenin iyileştirici özelliğe sahip olduğu inancı bu riskli davranışın seropozitifliğini açıklar niteliktedir.

Brezilya’da yapılan toplum tabanlı bir araştırmada çiğ süt tüketenlerin enfeksiyon açısından 2 kat riskli olduğu belirtilmiştir (29). Portekiz ve Angola’daki gebe kadınlar ile yürütölen bir araştırmada Angola’da çiğ süt tüketimi olan kadınlarda seropozitifliğin daha yüksek görölmüş ve bu durumu Angola’da sokaklarda süt ve süt türevi ürünlerin yaygın satılması, katılımcıların pastörize ürün tanımını yanlış yorumlaması ve ülkedeki olumsuz hijyenik koşullar gibi nedenlere yorumlamışlar (33). Ankara’da çiğ süt ve süt ürünleri (kaymak-taze peynir) tüketen gebe kadınlarda *Toxoplasma* IgG seropozitifliği %41,7 olarak yüksek bulunmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir (28). Aksine Aydın’da yapılan bir çalışmada süt ve süt ürünleri tüketimi ile *T. gondii* seropozitifliğinin artış göstermediği bildirilmiştir (26). Yapılan bu çalışmada ise Oral’ın (28) yaptığı çalışma ile benzer şekilde çiğ süt tükettiğini ifade eden gebe kadınların *Toxoplasma* IgG pozitifliği (%47,8), çiğ süt tüketmeyen gebelere (%39,3) oranla daha yüksek bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $P>0,05$ ).

Sri Lanka’da gebelerle yapılan bir çalışmada, çiğ et hazırlayıp satan gebelerin toxoplasmosis riski yüksek saptanmıştır (34). Araştırmalarda belirtilen ortak öneriler gebelerin işlenmiş gıdalardan uzak

durmaları, et ve et ürünleri ile temasta dikkatli olmaları, etlerle kesme pişirme gibi işlemler yapılırken hijyen kurallarına dikkat etmeleri ve kullanılan malzemeleri mutlaka temizlemeleridir (28,35,36). Yapılan bu çalışmada katılımcı gebelerin alışkanlıklarına yönelik sorulan çiğ et ve et ürünleri veya yıkanmamış meyve/sebze ile temas eden mutfak araç ve gereçlerin temizliğine dikkat etmeyen gebelerde anti-*Toxoplasma* IgG seropozitifliğin daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çalışmada sonuç olarak; araştırmanın yapıldığı bölgede kişilerin sosyo-demografik özellikleri, gebelik durumları ve olası risk faktörlerinden sosyal, beslenme ve hijyen alışkanlıklarının toxoplasmosis üzerinde etkili olduğu kanaatine varılmıştır. Bu durumdan dolayı tüm bireylerin ve özellikle gebelik planlayan veya gebe olanların korunma, kontrol, farkındalık ve olası risk faktörleri açısından değerlendirilmesi önerilir. Çiftlerin evlilik öncesi kan grubu tayininde olduğu gibi *T. gondii* testi de yaptırılmasının daha sağlıklı nesiller ve geleceğimiz için önemli olduğunun, nikâh işlemleri esnasında öneride bulunulmalı ve aşı konusunda çalışmalar desteklenmelidir. Yıl içerisinde düzenlenen eğitimlere toxoplasmosis ile ilgili bulaşma yolları ve risk faktörleri, tanı, tedavi, korunma ve kontrol eklenerek bilgilendirmeler yapılmalıdır. Kadınların gebelik öncesi ve gebelik sırasında *T. gondii* tarama testleri istenerek risk grubundaki gebelere gerekli bilgilendirme ve yönlendirme yapılmalıdır.

## TEŞEKKÜR

\* Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından 2018-TS-81 proje numarası ile desteklenmiştir.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Kars Kafkas Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 14.03.2018 ve Karar no: 14739267/806.01.03/E.151).

**ÇIKAR ÇATIŞMASI**

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**KAYNAKLAR**

1. Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans. Second edition, Beltsville, Maryland, USA: CRC Press, 2010
2. Şamdancı - Türkmen E, Taylan - Özkan A, Babür C, Mungan M, Aydın E. Evaluation of systemic tissue involvement in mice following intraperitoneal inoculation of Toxoplasma gondii RH Ankara strain. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2015; 72(1): 27-36
3. Miman Ö, Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. 1. Baskı, İstanbul Tıp Kitabevleri, 2018.
4. Jeffrey L, Jones JL, Parise ME, Fiore AE. Neglected parasitic infections in the United States: Toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg*, 2014; 90: 794-9.
5. Murebwayire E, Njanaake K, Ngabonziza JCS, Jaoko W, Njunwa KJ. Seroprevalence and risk factors of Toxoplasma gondii infection among pregnant women attending antenatal care in Kigali, Rwanda. *Tanzania Journal of Health Research*, 2017; 19(1):1-8.
6. Sakikawa M, Noda S, Hanaoka M, Nakayama H, Hojo S, Kakinoki S, et al. Anti-Toxoplasma Antibody Prevalence, Primary Infection Rate, and Risk Factors in a Study of Toxoplasmosis in 4,466 Pregnant Women in Japan. *Clinical and Vaccine Immunology*, CVI 2012; 19(3):365-7.
7. Hung CS, Su HW, Lee YL, Weng HW, Wang YC, Naito T, et al. Seroprevalence, Seroconversion, and Risk Factors for Toxoplasmosis among Pregnant Women in Taipei, Taiwan. *Jpn J Infect Dis*, 2015; 68(4):312-7.
8. Çalgın MK, Çetinkol Y, Altunçekiç Yıldırım A. Ordu İlindeki Gebelerde Toxoplasma gondii Seroprevalansının Değerlendirilmesi. *Jinekoloji Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi.* 2017; 14(1):22-4.
9. Akpınar O, Akpınar H, Şendil-Keskin E: Seroprevalence of Toxoplasma gondii among Pregnant Women in Isparta Province, Turkey. *DÜ Sağlık Bol Enst Derg.* 2017; 7(3):133-6.
10. Pullukçu H. Toksoplazmoz. Türkiye’de görülen zoonotik hastalıklar: dağılım, tanı ve tedavide yenilikler özel sayısı. *Türkiye Klinikleri J Inf DisSpecial Topics*, 2015; 8 (2) : 41-9.
11. Demiroğlu T, Akın Polat Z, Çelik C. Kilis Devlet Hastanesi Kadın Doğum Polikliniğine Başvuran Doğurgan Çağdaki Kadınlarda Toxoplasma gondii Seropozitifliğine Etki Eden Risk Faktörlerinin Araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2015;39:299-304.
12. Eşkin R. Gaziantep ve Yöresinde Hamile Kadınlarda Toxoplasma gondii Seropozitifliğinin Elisa Testi İle Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2018.
13. Shaaeldin Mohamed Abdelgadir, Khieri Sumeya A, Nasralla Khalid, Saadia Zaheera, Alsammani Mohamed Alkhatim: Toxoplasmosis in Pregnancy: Diagnosis, Risk Factors, and Management.
14. Aslantaş Ö, Babür C. Kars yöresinde sığır ve koyunlarda Bruselloz ve Toxoplazmoz üzerine seroepidemiyolojik araştırmalar. *Etlık Vet Mikrobiol Derg.* 2000; 11(1-2): 47-55.



15. Akca A, Babür C, Arslan MÖ, Gıcık Y, Kara M, Kılıç S. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in the province of Kars, Turkey. *Vet Med Czech*, 2004; 49(1): 9-13.
16. Mor N, Arslan MÖ. Kars yöresindeki koyunlarda *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 2007; 13(2): 165-170.
17. Akça A, Mor N. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle in the province of Kars, Turkey as determined by ELISA. *J Anim Vet Adv.* 2010; 9(5): 876-78.
18. Gıcık Y, Sarı B, Babür C, Çelebi B. Kars yöresinde köpeklerde *Toxoplasma gondii* ve *Listeria monocytogenes*'in seropozitifliği. *Türkiye Parazitol Derg.* 2010; 34(2): 86-90.
19. Erkıılıç EE, Mor N, Babür C, Kırmızıgül AH, Beyhan YE: The seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from the Kars region, Turkey. *Israel J WVet Med*, 2016; 71 (3): 31-5.
20. Taşçı GT, Mor N, Sarı B, Parmaksızoğlu Aydın N, Ölmez N, Arslan MÖ, Vatanserver Z, Akça A. Kazlarda Dolaşım Sistemi Protozoonları Üzerine Araştırmalar: *Toxoplasma gondii*.. *Mae Vet Fak Derg.* 2018; 3 (1): 17-23.
21. Ercan NE, KırmızıgülAH. Kars'ta Evde Bakılan Kedilerde *Toxoplasma gondii*'nin Yaygınlığı. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 2019; 14(1): 23-28.
22. Mor N, Akça A. A Six-Year Investigation of The Seropositivity of *Toxoplasma gondii* In Kars State Hospital. *Bakü World Forum Of Young Scientists.* 2014; 68-170.
23. Şahin L, Baykuş Y, Deniz R, Yavuz Y, Tazegün Z, Tazegün A, ve ark. The investigation of *Toxoplasma gondii* seropositivity in pregnant women. *J Eu Med*, 2015; 3(3): 6-8.
24. Olariu TR, Petrescu C, Darabus G, Lighezan R, Mazilu O. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Western Romania. *Infect Dis (Lond)*, 2015; 47(8):580-3.
25. Minbaeva G, Schweiger A, Bodosheva A, Kuttubaev O, Hehl AB, Tanner I, et al. *Toxoplasma gondii* infection in Kyrgyzstan: seroprevalence, risk factor analysis, and estimate of congenital and AIDS-related toxoplasmosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013; 7(2):e2043.
26. Ertuğ S, Okyay P, Turkmen M, Yuksel H: Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma* infection among pregnant women in Aydin province, Turkey. *BMC Public Health*, 2005; 5: 66.
27. Gencer M, Cevizci S, Saçar S, Vural A, Çakır G Ayşe N, ve ark. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Obstetri Polikliniğine Müracaat Eden Gebelerde Anti-*Toxoplasma gondii* Antikorlarının Dağılımı ve Risk Faktörlerinin İrdelenmesi, *Türkiye Parazitol Derg.* 2013; 38: 76-80.
28. Oral H. Birinci Trimesterdeki Gebelerde Toksoplazma, Sitomegalavirüs, Rubella, HIV, Hepatit B/C Prevalansı ve Risk Faktörleri. Yüksek Lisans Tezi, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2016.
29. De Almeida Aloise D, Coura-Vital W, Carneiro M, Venâncio Rodrigues M, Acácia da Silva Toscano G, Bernardino da Silva R, et al. Seroprevalence and Risk Factors for Human Toxoplasmosis in Northeastern Brazil. *Revista de Patologia Tropical*, 2017; 46(4):307.
30. Durdu B. Sağlıklı gebelerde *Toxoplasma* seropozitifliği, IgG avidite değerlerinin incelenmesi ve seropozitifliğe etki eden çeşitli risk faktörlerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 2008.
31. Obaidat MM, Al-Sheyab NA, Bani Salman AE, Lafi SQ. Seroepidemiology and Risk Factors of *Toxoplasma Gondii* Infection in Undergraduate University Female Students in Jordan. *Epidemiol Infect*, 2015; 143(9):1898-903.
32. Sroka S, Bartelheimer N, Winter A, Heukelbach J, Ariza L, Ribeiro H, et al. Prevalence and Risk factors of Toxoplasmosis Among Pregnant Women in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 2010; 83(3):528-33.

33. Lobo ML, Patrocinio G, Sevivas T, B DES, Matos O. Portugal and Angola: similarities and differences in *Toxoplasma gondii* seroprevalence and risk factors in pregnant women. *Epidemiol Infect*, 2017; 145(1):30-40.
34. Iddawela D, Vithana SMP, Ratnayake C: Seroprevalence of toxoplasmosis and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Sri Lanka: a cross sectional study. *BMC Public Health*, 2017; 17(1):930.
35. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *European Research Network on Congenital Toxoplasmosis*, *BMJ*, 2000; 321: 142-7.
36. Campos FA, Andrade GM, Lanna Ade P, Lage BF, Assumpção MV, Pinto JA. Incidence of congenital toxoplasmosis among infants born to HIV-coinfected mothers: case series and literature review. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(6):609-17.

# Çanakkale ili Ezine bölgesinde kene ısırığı ve etkileyen faktörlerin incelenmesi

## Investigation of tick bites and affecting factors in Ezine district of Çanakkale

Buse YÜKSEL<sup>1</sup> (ID), Esen EKER<sup>1</sup> (ID), Taylan ÖNDER<sup>2</sup> (ID), Özgür ÖZERDOĞAN<sup>1</sup> (ID), Alper ŞENER<sup>2</sup> (ID), Sibel OYMAK<sup>1</sup> (ID), Coşkun BAKAR<sup>1</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** Dünya Sağlık Örgütü'ne göre bulaşıcı hastalıkların yaklaşık %17'si vektör kaynaklıdır. Türkiye, iklimi ve bitki örtüsü özellikleriyle kene yaşamına uygun ve kene ile bulaşan hastalıklar açısından riskli bir konumdadır. Bu çalışmanın amacı, Çanakkale ili Ezine ilçesi kırsal alanında bulunan Mahmudiye ve Pınarbaşı köylerinde yaşayanlarda kene ısırığı prevalansının ve etkileyen faktörlerin incelenmesidir.

**Yöntem:** Kesitsel tipteki bu çalışma Çanakkale ili Ezine ilçesi Mahmudiye ve Pınarbaşı köylerinde 2018 yılında yürütüldü. Çalışma öncesinde Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan izin alındı. 'Evrenin Bilindiği Durumlarda Evren Oranını Tahmin Etmek için Örneklem Büyüklüğü' formülü kullanıldı ve örneklem büyüklüğü 329 kişi hesaplandı. Mahmudiye köyünden 292, Pınarbaşı köyünden 128 olmak üzere toplam 420 kişiye ulaşıldı. Köylerde belirlenen örneklem sayısına ulaşmak için olasılıksız gelişigüzel örnekleme yöntemi kullanıldı. Araştırmanın verileri yüz yüze görüşme tekniği ile uygulanan anket formu ile elde edildi. Anket formu, demografik özellikler ve kene ısırığı hakkında bilgi durumu ve tutumunu sorgulayan 23 sorudan oluşmaktaydı. Kene ısırığı ile ilişkili risk faktörlerinin incelenmesi için

### ABSTRACT

**Objective:** According to the World Health Organization, approximately 17% of all infectious diseases are vector-borne diseases. Turkey has convenient climate and vegetation conditions for ticks, therefore Turkey is a risky country for diseases transmitted by ticks. The aim of this study is to investigate the prevalence of tick bite and the factors affecting of tick bite in those living in Mahmudiye and Pınarbaşı villages in the rural area of Ezine district of Çanakkale.

**Methods:** This cross-sectional study was carried out in 2018 in the villages of Mahmudiye and Pınarbaşı of the Ezine district of Çanakkale. Before the study, permissions were obtained from the Clinical Research Ethics Committee of Çanakkale Onsekiz Mart University. The sample size was calculated as 329 people, by the formula of sample size used to estimate the population rate. A total of 420 people were contacted, including 292 from Mahmudiye and 128 from Pınarbaşı. The non-probability sampling method was used to reach the number of samples determined in the villages. The data of the study was obtained by a questionnaire which was applied by face to face interview technique. The questionnaire consisted of 23 questions questioning the demographic characteristics of participants, their knowledge and attitude about tick bite and tick-borne

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD, Çanakkale

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Çanakkale



İletişim / Corresponding Author : Buse YÜKSEL

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Kat: I Çanakkale - Türkiye

E-posta / E-mail : buseyuksele@windowslive.com

Geliş Tarihi / Received : 19.11.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 02.07.2020

lojistik regresyon analizi yapıldı. Araştırmanın veri toplama aşamasının ardından her iki köyde kadınlara ve erkeklere yönelik olarak kene ısırmasından korunmaları konusunda eğitim verildi.

**Bulgular:** Araştırmada kene ısırığı prevalansı %20 olarak saptandı. Erkek cinsiyet kadın cinsiyete göre 3,4 kat; lise seviyesi altında eğitime sahip olmak, lise ve üstü eğitime sahip olmaya göre 3,0 kat; çiftçilik/hayvancılık/ziraat teknikliği/kasaplık ile uğraşmak, diğer mesleklere göre 3,4 kat kene ısırığı riskini artırmaktaydı.

**Sonuç:** Kene ısırığından korunmak için koruyucu önlemler mevcuttur ve koruyucu sağlık hizmetlerinin temeli sağlık eğitimidir. Kırsal bölgede yaşayan, özellikle tarım ve hayvancılık ile uğraşan bireylere yönelik kene ısırıkları hakkında bilinçlendirme için yapılacak eğitimlerin yararlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca kene ısırığının beşte bir sıklıkta olduğu bu kırsal alanda kene ısırığının neden olabileceği sağlık sorunlarının da taranmasını önermekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Kene, kene ısırması, kene kaynaklı hastalıklar, Çanakkale

diseases. Logistic regression analysis was performed to analyze the risk factors associated with a tick bite. After the data collection phase of the research, education about prevention from tick bites was given to women and men in both villages to prevent tick bites.

**Results:** The prevalence of tick bite was 20%. The risk of tick bite was 3.4 times higher for males than females; 3.0 times higher for the people whom level of education below high school than high school and above; 3.4 times higher for occupations of farming, animal husbandry, agricultural technician, butchery than the other occupations.

**Conclusion:** There are protective measures to prevent tick bite and the basis of preventive health services is health education. It is thought that training to be made for raising awareness about tick bites for individuals who live in rural areas, especially those who are engaged in agriculture and animal husbandry will be beneficial. In addition, we recommend screening for health problems that may be caused by tick bite in this rural area where one of five people was bitten by a tick.

**Key Words:** Tick, tick bite, tick borne disease, Çanakkale

## GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre bulaşıcı hastalıkların yaklaşık %17'si vektör kaynaklıdır. Her yıl 700 bin kişi vektör kaynaklı hastalıklar nedeniyle ölmekte ve dünya popülasyonunun %80'i vektör kaynaklı hastalık riski ile karşı karşıya kalmaktadır (1). Kırım Kongo kanamalı ateşi (KKKA), Lyme hastalığı, tekrarlayan ateş, riketsiyal hastalıklar (Q Ateşi), kene kaynaklı ensefalit ve tularemi kenenin vektör olduğu zoonotik hastalıklardır (2).

Türkiye iklimi ve bitki örtüsü nedeniyle kene yaşamına uygun ve kene ile bulaşan hastalıklar açısından riskli bir ülkedir (3). Sağlık Bakanlığı'nın 2017 yılı verilerine göre; 343 KKKA vakası görülmüş ve bunların 16'sı ölmüştür. 2017 yılında KKKA için

morbidite hızı 100.000'de 0,42 iken; mortalite hızı 1.000.000'da 0,2'dir (4). Aynı yılda 476 tularemi tanısı konulmuştur ve morbidite hızı 100.000'de 0,59 olarak bildirilmiştir (5). Yapılan çalışmalar ile Türkiye'de *Borrelia burgdorferi* antikor pozitifliği sıklığının riskli popülasyonda %6-44, normal popülasyonda %2-6 olduğu saptanmıştır (6). Çanakkale ilinde 2008 yılında dokuz aylık dönemde kene tutunması 2391 ve Ezine ilçesinde 282 olarak belirtilmiştir (7). 2019 yılında yapılan Çanakkale ili Ezine ilçesi kırsalında *Borrelia burgdorferi* seroprevalansını inceleyen bir çalışmada ise anti-Borrelia IgG %2,4 sıklıkta saptanmıştır (8).

Kene ile bulaşan hastalıklar ülkemizde görülmektedir. Kene ile bulaşan hastalıkların

önlenmesinde öncelikle yapılması gereken kene ısırığının engellenmesidir. Kene ısırığının önlenmesinde de riskli grupların belirlenmesi ve yapılacak müdahalelerde bu gruplara öncelik verilerek uygulamaların gerçekleştirilmesi kene ısırığı nedeniyle oluşan hastalıklara bağlı mortalite ve morbiditenin azaltılmasında da katkı sağlayabilecektir. Bölgemizde kene ısırığı ve risk gruplar ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Çanakkale ili ve çevresinde kene ısırığı ve etkileyen risk faktörlerinin belirlenmesi keneye bulaşabilecek hastalıklarla ilgili yapılması gereken müdahale çalışmalarına yol gösterebilecektir.

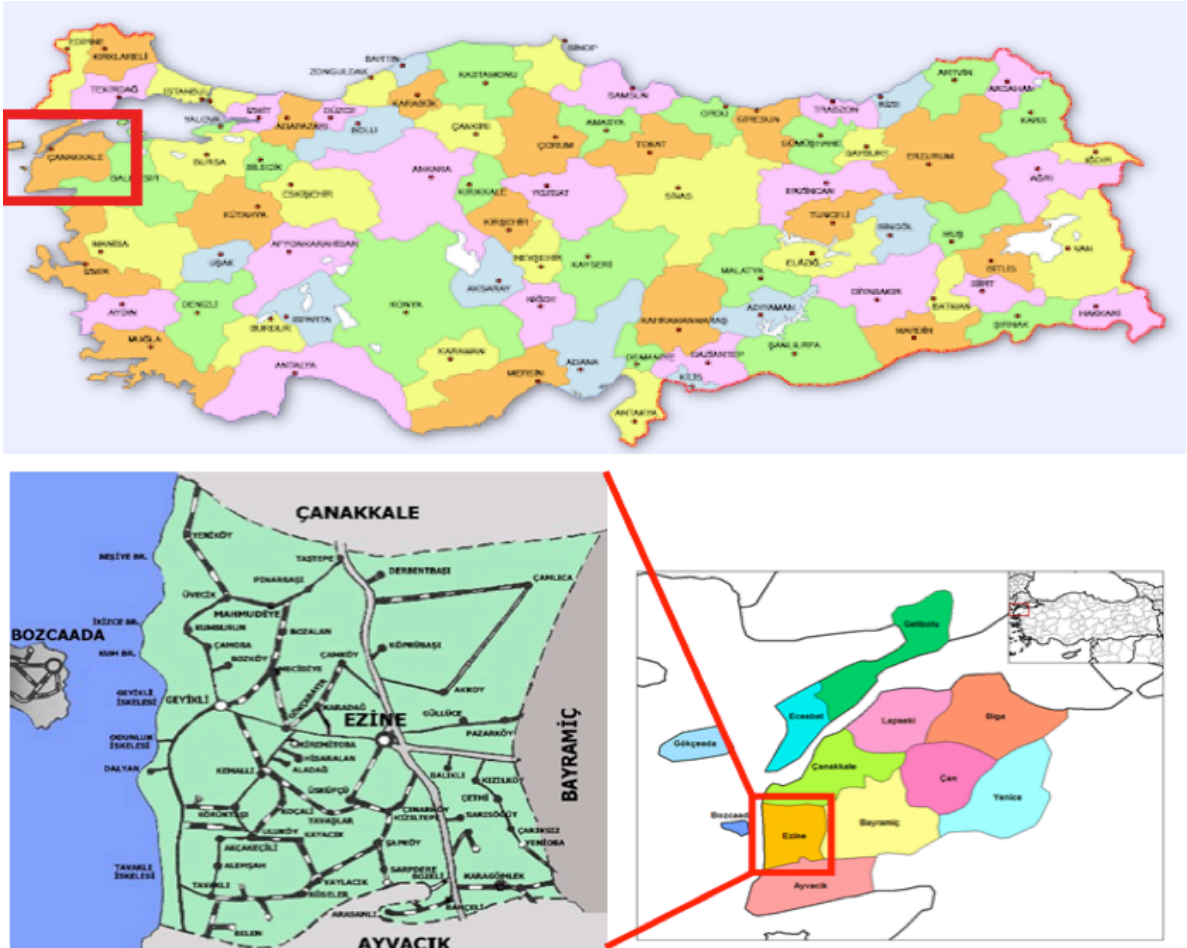
Bu çalışmanın amacı, Çanakkale ili Ezine ilçesi kırsal alanında bulunan Mahmudiye ve Pınarbaşı

köylerinde yaşayanlarda kene ısırığı prevalansının ve etkileyen faktörlerin incelenmesidir. Araştırma verilerinin kene ısırığı sıklığının belirlenmesinde ve keneye bulaşabilecek hastalıklarla mücadelede bilimsel katkı sunması beklenmektedir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Araştırma Bölgesi ve Popülasyonu

Bu araştırma kene ısırığı sıklığı ve ilişkili risk faktörlerinin incelendiği kesitsel tipte bir çalışmadır. Araştırma bölgesi Çanakkale ili Ezine ilçesine bağlı Mahmudiye ve Pınarbaşı köyleridir (Şekil 1). Çanakkale ili, Türkiye'nin batısında Güney Marmara



Şekil 1. Araştırma bölgesi, Çanakkale

bölgesinde yer alır. Akdeniz ile Karadeniz iklimleri arasında yarı nemli Marmara geçiş iklimine sahiptir (7). Araştırma bölgesi olan köylerde hayvancılık ve tarım önemli geçim kaynakları arasındadır. Bölgede bir adet çimento fabrikası bulunmaktadır. Çanakkale ilinde kene popülasyonunu inceleyen bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır. Aydın ve ark. araştırmasında Marmara Bölgesi'nde *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* ve *Argas* cinsi kenelerin bulunduğu belirtilmiştir (9). Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 2017 yılında Mahmudiye ve Pınarbaşı köylerinin nüfusu sırasıyla 1319 ve 923 kişidir (10). Örneklem hesaplanmasında 'Evrenin Bilindiği Durumlarda Evren Oranını Tahmin Etmek için Örneklem Büyüklüğü' formülü kullanıldı (11). Formülde yer alan evren (N) 2242, beklenen prevalans (p) birden fazla durum araştırılacağı için 0,5 ve prevalansta yapılmak istenen sapma (d) ise 0,05 olarak alındı; minimum örneklem büyüklüğü 329 kişi olarak hesaplandı. Hesaplanan örneklem büyüklüğü köylerin nüfuslarına göre oranlanarak Mahmudiye köyü için 194, Pınarbaşı köyü için 135 kişiye ulaşılması hedeflendi. Veri toplama aşamasının sonunda Mahmudiye köyünden 292 kişi, Pınarbaşı köyünden 128 kişi olmak üzere toplam 420 kişiye ulaşıldı. Köylerde belirlenen örneklem sayısına ulaşmak için olasılıksız gelişigüzel örnekleme yöntemi kullanıldı.

#### Araştırmanın tasarımı

Bu araştırma, 2018 yılı Ağustos ayında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı ve Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanları tarafından yürütüldü. Çalışma öncesinde veri toplama aşamasında yer alacak intern hekimlerle çalışmanın amacı ve uygulanışı hakkında 2 saatlik bir eğitim yapıldı. Araştırma bölgesine gidildi, evler ve sosyal yaşam alanları ziyaret edilerek 18 yaş ve üzerindeki bireylere çalışmanın amacı ve uygulanışı anlatıldı. Araştırmaya katılmayı kabul eden bireylerden sözlü onam alındı ve yüz yüze görüşme tekniği ile anket

formu uygulandı.

Çalışmanın verileri, demografik özellikler ve kene ısırığı hakkında bilgi durumu ve tutumunu sorgulayan 23 sorudan oluşan anket formu ile elde edildi.

Araştırmanın veri toplama aşamasının ardından her iki köyde kadınlara ve erkeklere yönelik olarak kene ile bulaşan hastalıklar ve kene ısırmasından korunma yöntemleri konusunda eğitim verildi. Her iki köyde de kadınların eğitime katılımının çok düşük olduğu gözlemlendi.

#### Etik Kurul İzni

Çalışma öncesinde Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan izin alındı (Tarih: 11.07.2018 / Sayı:2018-13).

#### İstatistiksel Analiz

Çalışmanın verileri SPSS paket program 19.0 sürümü ile analiz edildi. Tanımlayıcı verilerin sunumunda sayı, yüzde, ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum kullanıldı. Kene ısırığı öyküsü ile ilişkili olabileceği düşünülen risk faktörleri Lojistik Regresyon Analizi Enter Modeli ile incelendi. Bağımlı değişken kene ısırığı öyküsü; bağımsız değişkenler yaş, cinsiyet, meslek, eğitim düzeyi, kene ısırığından korunma yollarını bilme ve kene ısırığı sonrası hastalık gelişebileceğini bilme olarak alındı. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0,05$  kabul edildi.

#### BULGULAR

Çalışmaya %69,5'i (n=292) Mahmudiye Köyü'nden, %30,5'i (n=128) Pınarbaşı Köyü'nden olmak üzere 420 kişi dâhil edildi. Katılımcıların yaş grubu ortalaması  $55,7 \pm 16,0$  yıl, ortancası 58,0 (min: 18,0, maks: 92,0) yıldı. Katılımcıların %54,8'si erkek ve %45,2'si kadın idi. Katılımcıların %74,3'ü ilköğretim düzeyinde eğitime sahipti. Çalışma grubunun %48,4'ü çiftçilik ve/veya hayvancılıkla, %0,7'si kasaplık ya da ziraat teknikerliği ile uğraşmaktaydı (Tablo 1).

Katılımcıların %20'si (n=84) daha önce bir kene tarafından ısırıldığını belirtti. Kene tarafından en çok

Tablo 1. Çalışma grubunun sosyodemografik özellikleri, Çanakkale, 2018

Değişkenler	n (%)
<b>Cinsiyet</b>	
Kadın	189 (45,2)
Erkek	229 (54,8)
<b>Eğitim düzeyi</b>	
Okuryazar değil	32 (7,6)
İlköğretim	311 (74,3)
Lise	45 (10,7)
Üniversite ve üzeri	31 (7,4)
<b>Meslek*</b>	
Çiftçilik ve /veya hayvancılık	200 (48,4)
Kasap /ziraat teknikeri	3 (0,7)
Diğer	210 (50,8)

‰: sütun yüzdesi, \*: Belirtilen mesleklere sahip olan bireylerin tüm yanıt veren katılımcılara oranıdır.

ısırlan vücut bölgeleri kollar ve ellerdi (%32,1'i n=41). Katılımcıların kene ısırığını fark etmesini sağlayan en önemli durum kaşınma hissiydi (%40,7, n=46). Katılımcıların 'keneyi fark ettiğinizde ne yaptınız?' sorusuna verdikleri yanıtlar incelendiğinde %62,6'sının (n=55) kendisinin çıkardığı, %11,4'ünün (n=10) sigara ya da başka bir şey ile yaktığı, %10,2'sinin (n=9) sağlık personeli olmayan birine başvurduğu belirlendi (Tablo 2).

Katılımcıların %84,3'ü (n=354) kene ısırması sonrası hastalık gelişebileceğini, %14,0'ü (n=59) hastalık gelişmeyeceğini ve %1,7'si (n=7) bilgisi olmadığını belirtti. 'Kene ısırığını önlemek için koruyucu önlemler var mıdır?' sorusuna katılımcıların %71,5'i (n=293) 'evet', %28,5'i (n=117) 'hayır' yanıtını verdi. Koruyucu önlemlerin neler olduğu sorgulandığında ise katılımcıların %64,5'i (n=271) yanıt vermiş olup; yanıt verenlerin %68,6'sı ormanlık ve açık alanda açıkta bir yer kalmayacak şekilde giyinmek; %42,4'ü kene kovucu ilaçları kullanmak; %32,1'i kene öldürücü ilaçları kullanmak; %15,1'i piknik, açık alan, hayvanlarla temas sonrası tüm vücudu kontrol etmek, %10,7'si ormanlık ve açık alanlarda açık renk giysiler giymek ve %3,7'si hayvanların bulunduğu alanlarda

bitkilerin boylarının uzun olmamasına özen göstermek yanıtını vermişti.

Kene ısırığını etkileyen risk faktörleri Lojistik Regresyon Analizi ile incelendi. Erkek cinsiyet kadın cinsiyete göre 3,4 kat (%95 GA: 1,885-6,070) kene ısırığı riskini artırmaktaydı. Lise altında eğitime sahip olmak lise ve üzerinde eğitime sahip olmaya göre 3,0 kat (%95 GA: 1,125-8,166) kene ısırığı riskini artırmaktaydı. Çiftçilik/hayvancılık/ziraat teknikerliği/kasaplık ile uğraşmak, diğer mesleklere göre 3,4 kat (%95 GA: 1,870-6,096) kene ısırığı riskini artırmaktaydı. Keneden korunma yolları olduğunu bilme, kene ısırığı sonrası hastalık gelişebileceğini düşünme ve yaş ile kene ısırığı riski arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0,05) (Tablo 3).

## TARTIŞMA

Kene ısırığı sonrasında gelişebilecek hastalıklarla mücadelede keneden korunmak temel hedef olmalıdır. Kene temasından korunmak için riskli gruplar ve öncelikle bu gruplara yönelik yapılacak müdahalelerin belirlenmesi gerekmektedir.

Tablo 2. Çalışma grubunun kene ile temas durumları, Çanakkale, 2018

Daha önce kene tarafından ısırıldınız mı?	Sayı (n)
Evet	84 (20,0)
Hayır	335 (80,0)
<b>Vücudun hangi bölgesinden ısırıldınız?*</b>	
Kollar eller	41 (32,1)
Bacaklar ayaklar	35 (27,3)
Gövde	31 (24,2)
Baş boyun	16 (12,5)
Kasık bölgesi	5 (3,9)
<b>Kene tarafından ısırıldığınızı nasıl fark ettiniz?*</b>	
Kaşınma	46 (40,7)
Acı hissi	19 (16,8)
Banyo yaparken	15 (13,3)
Dokunurken	11 (9,7)
Giyinirken	8 (7,1)
Başkasının görmesi	6 (5,3)
Kendisinin görmesi	6 (5,3)
Kızarıklık/yara sanma	2 (1,8)
<b>Keneyi fark edince ne yaptınız?*</b>	
Kendisinin çıkartması	55 (62,6)
Sigara ya da başka bir şey ile yakma	10 (11,4)
Sağlık personeli olmayan birine başvurma	9 (10,2)
Sağlık kurumuna başvurma	6 (6,8)
Yağ sürme	4 (4,5)
Makasla kesme	2 (2,3)
Sirke sürme	1 (1,1)
Tuz basma	1 (1,1)

#: sütun yüzdesi, \*: toplam yanıt sayısı üzerinden hesaplanmıştır.

Bu çalışmada kene ısırığı sıklığı ve kene ısırığını etkileyen risk faktörleri araştırılmıştır. Katılımcıların %20'si kene ısırığına maruz kaldıklarını belirtmiştir. Amerika'da yapılan bir çalışmada katılımcıların %82,4'ü kene ısırığına maruz kaldıklarını belirtmiştir (12). Kene kaynaklı ensefalit ve Lyme hastalığının endemik olduğu Finlandiya'nın kene kaynaklı hastalıklar açısından riskli olan iki bölgesinde yürütülen bir çalışmada katılımcıların %47'si kene ısırığına maruz kaldığını belirtmiştir (13). Eskişehir'de

yapılan bir çalışmada katılımcıların %17,4'ü kene ısırığı olduğunu belirtmiştir (14). Epidemiyolojik çalışmalarda kene ısırığı öyküsü Türkiye'de ve dünyada farklı sıklıklarda saptanabilmektedir. Kenenin daha çok bulunduğu alanlarda yaşamak ya da çalışmak bunda etkili olabileceği gibi kene ısırığını engelleyecek koruyucu önlemlerin kullanımlarındaki değişiklikler de bölgesel farklılıkları açıklayıcı değişkenler arasında olabilir. Bu durumun açıklanması farklı araştırmalarla mümkün olabilecektir.



Tablo 3. Kene teması için risk faktörleri, Çanakkale, 2018

	B	p	OR	%95 GA	
Constant	-3,405	0,0001	0,033		
Yaş	-0,007	0,456	0,993	0,974	1,012
Cinsiyet					
Kadın	1,000				
<b>Erkek</b>	<b>1,219</b>	<b>0,0001</b>	<b>3,382</b>	<b>1,885</b>	<b>6,070</b>
Eğitim durumu					
Lise ve üzeri	1,000				
<b>Lise altı</b>	<b>1,109</b>	<b>0,028</b>	<b>3,031</b>	<b>1,125</b>	<b>8,166</b>
Meslek					
Diğer	1,000				
<b>Çiftçilik/hayvancılık/kasaplık/ziraat teknikerliği</b>	<b>1,217</b>	<b>0,0001</b>	<b>3,377</b>	<b>1,870</b>	<b>6,096</b>
Kene ısırığından korunma yolları var mıdır?					
Evet	1,000				
Hayır	0,023	0,940	1,023	0,566	1,847
Kene ısırığı sonra hastalık oluşabilir mi?					
Evet	1,000				
Hayır	-0,153	0,700	0,858	0,394	1,869

p: Lojistik Regresyon Analizi Enter Modeli. Bağımlı değişken: Kene tarafından ısırılma (1), Kene tarafından ısırılmama (0).

GA: Güven aralığı.

Kene ısırığı için erkek cinsiyet risk faktörü olarak saptanmıştır. KKKA virüsü seroprevalansının incelendiği bir çalışmada kadın cinsiyet; başka bir çalışmada ise erkek cinsiyet risk faktörü olarak saptanmıştır (15,16). Borrelia seroprevalansının araştırıldığı bir çalışmada erkekler kadınlara göre daha riskli saptanmıştır (17). Kene ısırığı sıklığı cinsiyete göre farklılık göstermektedir. Kenenin daha fazla bulunduğu ve kene ısırığı açısından riskli işler ile uğraşma durumu bölgelere göre kadın ve erkek cinsiyet açısından farklılık gösterebilmekte ve dolayısıyla riskli alanlarda ve çalışma ortamlarında bulunma durumuna göre kene ısırığı öyküsü de değişkenlik gösterebilmektedir.

Çalışmamızda çiftçilik/hayvancılık/kasaplık/ziraat teknikerliği ile uğraşan bireylerde diğer işlerle uğraşanlara göre kene ısırığı öyküsü 3,4 kat fazla saptanmıştır. Gürcistan'da yapılan bir çalışmada KKKA seropozitifliği ile hayvan kesim işi yapma

durumu arasında ilişki saptanmıştır (18). Tarım ve hayvancılık ile ilgili işlerle uğraşmanın kene ısırığı açısından risk faktörü olarak saptandığı birçok çalışma bulunmaktadır (15,16,19). Kene yumurtaları toprağa bırakıldığından dolayı larvalar toprağa, otlara, evcil ve vahşi hayvanlara kolaylıkla yerleşebilmektedir (20). Çiftçiler kene ile bulaşan hastalıklar için önemli bir mesleki risk grubudur, yaptıkları işler kenelerin bol bulunduğu kırsal aktivitelerdir (21). Çalışmamızın bulguları da tarım ve hayvancılık ile uğraşanlarda kene ısırığı öyküsünün daha fazla olmasını desteklemektedir.

Çalışmamızda 'Keneden korunma yolları var mıdır?' sorusuna evet yanıtı verenler ile hayır yanıtı verenler arasında kene ısırığı öyküsü açısından anlamlı ilişki saptanmamıştır. Malezya'da tarım işçilerinde kene ısırığı öyküsü olan ve olmayanlar arasında kişisel koruyucu önlem kullanım davranış puanı açısından arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır

(22). Kene ısırığından koruyucu önlemler mevcuttur. Çalışmamızda kene ısırığından koruyucu yöntemler olduğunu ifade edenlerin sıklığı %71 iken; bu koruyucu önlemlerin neler olabileceği sorgulandığında katılımcıların %68'i ormanlık ve açık alanlarda vücutta açıkta bir yer kalmayacak şekilde giyinmeli, yarısından azı kene kovucu ilaçlar kullanılmalı ve kene öldürücü ilaçlar kullanılmalı yanıtını vermiştir. Kene koruyucu yöntemlerin mevcut olduğu katılımcıların çoğu tarafından bilinse de bu yöntemlerin neler olduğu konusunda bilgi düzeyi yetersiz olabilmektedir. Bireylerin kene ısırığından koruyucu önlemler konusunda bilgi düzeyinin artırılması gerekmektedir. Bu amaçla araştırma yapılan köylerde yaşayan halka kene, keneye bulaşan hastalıklar ve korunma yöntemleri konusunda araştırmacılar tarafından eğitimler düzenlenmiştir. Öte yandan eğitimlerin devamlılığı doğru bilgilerin davranışa dönüşmesi için oldukça önemlidir. Bu nedenle yerel halk sağlığı yöneticilerinin bölgelerindeki riskli durumlar için topluma yönelik eğitimler planlaması bilgilerin kalıcılığını sağlayabilecektir.

Çalışmamızda kene ısırığı öyküsü ile yaş arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Malezya'da yapılan çalışmada da yaş ile kene ısırığı öyküsü arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır, fakat Eskişehir'de yapılan çalışmada 50 yaş üzerindeki gruplarda daha yüksek kene ısırığı öyküsü saptanmıştır (14,22). Düzc'e de orman işçilerinde ve çiftçilerde yapılan bir çalışmada 10-20 yaş aralığında anlamlı düzeyde seroprevalans daha yüksek saptanmıştır (23). Tokat'ta kene ısırığı nedeniyle hastaneye başvuranların özelliklerinin incelendiği bir çalışmada başvuranların yaklaşık üçte birini 40-64 yaş aralığındaki bireyler oluşturmuştur ve bu yaş grubunun yoğun tarımsal aktivitelerinin bu duruma neden olduğu düşünülmüştür (24). 2005-2010 yılları arasında Amerika'da Lyme hastalığı insidansının araştırıldığı bir çalışmada, insidans 5-9 yaş arası erkek çocuklarında ve her iki cinsiyette 60-64 yaş aralığında en yüksek saptanmıştır (25). Kene ısırığı çevresel bir risk olduğundan yaşla doğru orantılı olarak maruziyet riskinin artması beklenmektedir. Bu çalışmada yaşla

ilişki bulunmamasının sebeplerini yorumlayabilecek bir veri bulunmamaktadır.

Lise altında eğitime sahip olan bireylerde lise ve üzeri eğitime sahip olanlara göre 3 kat daha fazla kene ısırığı öyküsü saptanmıştır. Eğitim düzeyi daha az olan bireylerin koruyucu önlemler konusunda daha az bilgi sahibi olduğu düşünülebilir. Fakat literatür incelendiğinde eğitim düzeyi ile kene ısırığı öyküsü arasında ilişki saptanmayan çalışmalar mevcuttur (14,22). Çalışma grubumuz kırsal bölgede ikamet eden ve mesleksen açıdan heterojen olan bir gruptur. Eğitim durumu ile kene ısırığı öyküsü arasında ilişki saptanmayan araştırmalarda araştırma popülasyonu çiftçiler olup, kene ısırığından korunmak için mesleksen anlamda daha fazla bilgi sahibi olabilirler.

Bu araştırmada belirlenen örneklem büyüklüğüne ulaşmak için, şartlar nedeniyle köylerde duyuru yapılmış ve çalışmaya katılmaya gönüllü olanlar araştırmaya dahil edilmiştir. Bu durum sahada insanlara ulaşmada yaşanan sorunlar nedeniyle tercih edilmiş olup örneklem yönteminin tanımlanması "olasılıksız gelişigüzel örnekleme" yöntemi olarak ifade edilmiştir. Çalışmanın evreni Pınarbaşı ve Mahmudiye köylerdir. Uygulama sırasında yapılan bu tercihin elde edilen sonuçlar bakımından yarattığı temsil gücünün farkındayız. Ancak bu çalışma konuyla ilgili bölgemizde kırsal alanda yapılan ilk araştırmadır. Çalışma öncesinde muhtarlıklar vasıtasıyla köylüye gerekli duyurular yapılmıştır. Bu durumda elde edilen prevalansın ve risk faktörlerin bölgemizdeki durumu yansıtmak açısından sahada örneklem seçimin yarattığı kısıtlılıkların etkisini azalttığını düşünmekteyiz.

Kenelerin bol bulunduğu kırsal alanlarda yaşayan bireylerde kene ısırığı öyküsü ve etkileyen risk faktörlerinin belirlenmesi, kene ısırığı sonrası oluşabilecek hastalıklardan korunmaya yönelik yapılacak müdahalelerde yol gösterici olacaktır. Çalışmamızın en önemli bulgusu erkeklerde, tarım ve hayvancılık ile uğraşanlarda ve eğitim düzeyi lise altı olanlarda kene ısırığı öyküsünün daha yüksek

saptanmasıdır. Kene ısırığı için cinsiyetin risk faktörü olduğu düşünülmemekte, tarım ve hayvancılık gibi riskli meslek gruplarında erkeklerin daha fazla oranda yer almasının yarattığı bir risk artışı olarak yorumlanmaktadır. Eğitim düzeyinin düşük olması da çalışmamızda kene ısırığı için risk olarak saptanmıştır. Kene ısırığından korunmak için koruyucu önlemler mevcuttur ve koruyucu sağlık hizmetlerinin temeli sağlık eğitimidir. Kırsal bölgede yaşayan özellikle

tarım hayvancılık ile uğraşan bireylere yapılacak keneden korunma önlemleri ile kene ısırığı ve kene kaynaklı hastalıklardan korunmanın mümkün olacağı düşünülmektedir. Ayrıca kene ısırığının beşte bir sıklıkta olduğu bu kırsal alanda kenenin neden olabileceği sağlık sorunlarının da taranmasını önermekteyiz. Böylece buzdağının altında yer alabilecek sorunlar görünür hale getirilebilir ve bu bilgi sağlık hizmetlerini de yönlendirebilir.

## TEŞEKKÜR

\* Araştırmanın veri toplama aşamasında katkı sunan Ezine Tarım Ve Orman İlçe Müdürlüğü çalışanlarına, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi intern hekimlerine ve değerli katkılarını esirgemeyen Dr. Safiye Bilge Güçlü Kayta'ya teşekkür ederiz.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 11.07.2018 ve Sayı: 2018-13).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Vector control, WHO [İnternet]. Erişim: <https://www.who.int/vector-control/en/> [Erişim tarihi: 11 Kasım 2019].
2. Vector-borne diseases, WHO [İnternet]. Erişim: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases> [Erişim tarihi: 21 Ağustos 2019].
3. Nuhoğlu İ, Aydın M, Türedi S, Gündüz A, Topbaş M. Kene İle Bulaşan Hastalıklar. TAF Preventive Medicine Bulletin, 2008; 7(5): 461-8.
4. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi İstatistik Verileri, T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı [İnternet]. Erişim: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoonotikvektorel-kkka/zoonotikvektorel-kkka-istatistik> [Erişim tarihi: 11 Kasım 2019].
5. Tularemi İstatistik Verileri, T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı [İnternet]. Erişim: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoonotikvektorel-tularemi/istatistik> [Erişim tarihi: 11 Kasım 2019].
6. Doğanç L. Lyme Hastalığı. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3.Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri, 2008:978-88.
7. Çalışkan V. Çanakkale ilindeki hayvansal kaynaklı sağlık risklerinin değerlendirilmesi. Uluslararası İnsan Bilim Derg, 2009;6(1):460-86
8. Yüksel B. Çanakkale Ezine ilçesinde Borrelia seroprevalansı ve Risk Faktörlerinin İncelenmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2020.

9. Aydın L, Bakirci S. Geographical distribution of ticks in Turkey. *Parasitol Res.* 2007;101(2):163-6.
10. Türkiye İstatistik Kurumu [İnternet]. Erişim: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=95&locale=tr> [Erişim: 13 Kasım 2019].
11. Sümbüloğlu V, Sümbüloğlu K. Klinik ve Saha Araştırmalarında Örnekleme Yöntemleri ve Örneklem Büyüklüğü. 2005. Sayfa:104.
12. Bayles BR, Evans G, Allan BF. Knowledge and prevention of tick-borne diseases vary across an urban-to-rural human land-use gradient. *Ticks Tick Borne Diseases*, 2013;4:352-8.
13. Zöldi V, Turunen T, Lyytikäinen O, Sane J. Knowledge, attitudes, and practices regarding ticks and tick-borne diseases, Finland. *Ticks Tick Borne Diseases*, 2017;8:872-7.
14. Arıkan I, Kasıfoğlu N, Metintas S, Kalyoncu C. Knowledge, beliefs, and practices regarding tick bites in the Turkish population in a rural area of the Middle Anatolian Region. *Trop Anim Health Prod*, 2010;42:669-75.
15. Ertugrul B, Kirdar S, Ersoy OS, Ture M, Erol N, Ozturk B et al. The seroprevalence of Crimean-Congo haemorrhagic fever among inhabitants living in the endemic regions of Western Anatolia. *Scand J Infect Dis*, 2012; 44(4):276-81.
16. Çağlayık DY, Korukluoğlu G, Uyar Y. Seroprevalence and Risk Factors of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Selected Seven Provinces in Turkey. *J Med Virol*, 2014;86:306-14.
17. van Beek J, Sajanti E, Helve O, Ollgren J, Virtanen MJ, Rissanen H, et al. Population-based *Borrelia burgdorferi* sensu lato seroprevalence and associated risk factors in Finland. *Ticks Tick Borne Diseases*, 2018;9:275-80.
18. Akhvlediani T, Chitadze N, Chlikadze R, Rostiashvili N, Betashvili M, Imnadze P, et al. Multivariate relationships between epidemiologic risk factors and zoonotic infections among military personnel in the country of Georgia: A non-linear canonical correlation analysis. *Zoonoses Public Health*, 2019;66:835-41.
19. Gunes T, Engin A, Poyraz O, Elaldi N, Kaya S, Dokmetas at al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in High-Risk Population, Turkey. *Emerg Infect Dis*, 2009; 15(3): 461-4.
20. Akyazı R, Ecevit O. Keneler Ve Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 2006;21(3):340-9.
21. Li S, Juhasz-Horvath L, Trajer A, Pinter L, Rounsevell MDA, Harrison PA. Lifestyle, habitat and farmers' risk of exposure to tick bites in an endemic area of tick-borne diseases in Hungary. *Zoonoses Public Health*, 2018;65:248-53.
22. Kisomi MG, Wong LP, Tay ST, Bulgiba A, Zandi K, Kho KL, et al. Factors Associated with Tick Bite Preventive Practices among Farmworkers in Malaysia. *PLoS One*, 2016;11(6).
23. Kaya AD, Parlak AH, Ozturk CE, Behcet M. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers and farmers in Duzce, north-western Turkey. *New Microbiol*, 2008; 31: 203-9.
24. Keskin A, Bulut YE, Keskin A, Bursalı A. Tick attachment sites in humans living in the Tokat province of Turkey. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2017;74(2):121-8.
25. Nelson CA, Saha S, Kugeler KJ, Delorey MJ, Shankar MB, Hinckley AF, et al. Incidence of Clinician-Diagnosed Lyme Disease, United States, 2005-2010. *Emerg Infect Dis*, 2015; 21(9):1625-31.

# In vitro examination of toothpastes with *Cinnamomum cassia* methanolic extract

## *Cinnamomum cassia* metanolik ekstraktı ilave edilen diş macunlarının in vitro incelenmesi

Gülşah TOLLU<sup>1</sup> (ID), Elif Ayşe ERDOĞAN ELİUZ<sup>2</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** In recent years, it has developed resistance to antibiotics and antibacterial chemicals used in the treatment of a large number of bacterial diseases. For this reason, today, an alternative product has been searched for instead of synthetic chemicals. Phytochemicals in traditional medicine and isolated from plants are seen as a good alternative to synthetic chemicals. The purpose of this study; to investigate the antibacterial activity of toothpastes of different contents and toothpastes with *Cinnamomum cassia* methanolic extract added against *Staphylococcus aureus* bacteria.

**Methods:** In the study, the experimental set up of six different toothpastes, a positive control group of a fluoride free toothpaste and a distilled water negative control group. The content of *C. cassia* methanolic extract was determined by GC/MS. Anti-*S. aureus* activities of toothpastes alone and with *C. cassia* methanol extract were determined according to the agar disc diffusion method and n = 3 repeats. Inhibition zone diameters were determined using digital calipers and all results were evaluated statistically.

**Results:** According to the GC/MS, cinnamaldehyde, one of the main substances of *C. cassia* methanolic extract was found to be higher than other components.

### ÖZET

**Amaç:** Son yıllarda, çok sayıda bakteriyel hastalığın tedavisinde kullanılan antibiyotik ve antibakteriyel kimyasallara karşı direnç gelişmiştir. Bu nedenle, günümüzde sentetik kimyasalların yerine alternatif bir ürün arayışına girilmiştir. Geleneksel tıpta yer alan ve bitkilerden izole edilen fitokimyasallar, sentetik kimyasallara karşı iyi bir alternatif olarak görülmektedir. Bu çalışmanın amacı; farklı içerikteki diş macunlarının ve *Cinnamomum cassia* metanolik ekstraktı ilave edilmiş diş macunlarının *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı antibakteriyel etkinliğini incelemektir.

**Yöntem:** Çalışmada altı farklı diş macununun deney grubunu, florürsüz bir diş macununun pozitif kontrol grubunu ve distile suyun negatif kontrol grubunu oluşturduğu deney düzeneği kurulmuştur. *C. cassia* metanolik ekstraktının içeriği GC/MS ile belirlenmiştir. Diş macunlarının tek başlarına ve *C. cassia* metanol ekstraktı ile anti-*S. aureus* aktiviteleri agar disk difüzyon yöntemine göre ve n=3 tekrarlı olarak belirlenmiştir. İnhibisyon zon çapları dijital kumpas kullanılarak belirlenmiş ve tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** GC/MS ile belirlenen *C. cassia* metanolik ekstraktının ana maddelerinden olan cinnamaldehyde diğer bileşenlere göre daha yüksek oranda bulunmuştur. *C.*

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Teknik Bilimler MYO, Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü, Mersin  
<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi Teknik Bilimler MYO, Gıda Teknolojileri Bölümü, Mersin



İletişim / Corresponding Author : Gülşah TOLLU

Mersin Üniversitesi Teknik Bilimler MYO Çiftlikköy Kampüsü 33343 Yenişehir/ Mersin - Türkiye  
E-posta / E-mail : gulsahill@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 05.03.2020  
Kabul Tarihi / Accepted : 02.07.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.25993

Tollu G, Erdoğan Eliuz EA. In vitro examination of toothpastes with *Cinnamomum cassia* methanolic extract. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 197 - 204

The most effective toothpaste was found different after adding *C. cassia* methanol extract and the most effective toothpaste after adding *C. cassia* methanol extract ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** With this study, it has been shown that toothpaste with low or no anti-*S. aureus* effect can be enriched with herbal extracts to increase their biological activities. Studies that evaluate the effectiveness of toothpaste-methanolic extract combinations proved by us to have antibacterial efficacy, such as remineralization, whitening, desensitization, which constitute oral and dental health, should also be evaluated. In further studies, it has been determined that various studies can be performed to use the essential oils used in the study in place of various antimicrobials in the content of toothpastes.

**Key Words:** Antibacterial, toothpaste, *in vitro*, *Staphylococcus aureus*

*cassia* metanol ekstraktı eklenmeden önce en etkili olan diş macunu ile *C. cassia* metanol ekstraktı eklendikten sonra en etkili diş macunu farklı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

**Sonuç:** Bu çalışma ile anti-*S. aureus* etkisi düşük ya da hiç olmayan diş macunlarının bitkisel ekstraktlarla zenginleştirilerek biyolojik aktivitelerinin arttırılabileceği gösterilmiştir. Antibakteriyel etkinliği olduğu tarafımızdan kanıtlanan diş macunu-yağ kombinasyonlarının ağız ve diş sağlığını sağlayan remineralizasyonu, beyazlatma, hassasiyeti giderme gibi diğer bileşenleri için de etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmalar yapılması gerekmektedir. Daha ileride yapılacak olan çalışmalarda, çalışmada kullanılan uçucu yağların, diş macunlarının içeriğinde çeşitli antimikrobiallerin yerine kullanılması için çeşitli çalışmalar yapılabilineceği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibakteriyel, diş macunu, *in vitro*, *Staphylococcus aureus*

## INTRODUCTION

Due to its anatomy, the oral cavity has a favorable environment for the settlement of different types of microorganisms. It is also susceptible to almost any microorganism known for its different temperatures, various nutrient contents, abundant humidity and different oxygen pressures. The microorganism placement in the mouth starts with birth and changes with factors such as feeding regimen, loss of teeth, use of prosthesis, oral hygiene and general health condition and formation of oral microflora occurs. Oral microbiota has a very rich microbial diversity and when this balance is disrupted, many diseases, especially dental caries and gum diseases, occur. This diversity arises from the fact that various assets meet each other's needs and from various nutrients (1). With antibacterial substances added to toothpastes, it aims to prevent various diseases and caries by

controlling the pathogen formation in the bacterial plaque. Antibacterials are the most commonly used agents to affect the viability of bacteria in biofilm. However, if bacteria capable of producing biofilm develop resistance to antibiotics, pathologies will also progress (2). Therefore, researchers continue to search for an alternative product against synthetic chemicals (3). Phytochemicals found in traditional medicine and isolated from plants are seen as a good alternative to synthetic chemicals (4,5). Some studies have focused on reducing the microbial adhesion responsible for dental plaque formation by examining the effects of plant extracts and plant products on specific oral pathogens and their effects on inhibition of biofilm formation. (6,7).

The purpose of this study to compare the antibacterial activities of herbal ingredients after

and before the addition of toothpaste. To determine the antibacterial activity on *S. aureus* bacteria after adding *C. cassia* content obtained by dissolving in methanol extract to toothpastes. Investigation of the effectiveness of herbal ingredients in preventing the activities of microorganisms in natural ways can be an example in preventing antibiotic resistance which is one of the biggest problems of today.

## MATERIAL and METHOD

Microbiology studies were carried out in Mersin University Advanced Technology and Research Laboratory (MEITAM), between May 2019-August 2019 to investigate the anti-*S. aureus* activity of toothpastes with and without *C. cassia* methanolic extract.

### Selecting toothpastes to be used

In this study, six fluoride toothpaste (C, I, Se, V, P and S) experiment groups, one fluoride-free toothpaste (R) positive control group and distilled water negative control group was formed. Since it is not ethically appropriate, the names of the manufacturers are not given, and the toothpastes are named with various letters.

### Determination of the content of *C. cassia* methanolic extract

The qualitative and quantitative composition of *C. cassia* analysis were conducted at Giresun University central Research Laboratories Application and Research Center by GC-MS 7890A-(5975C inert MSD) instrument equipped with an Agilent 19091S-433 column (8). The chemical composition of *C. cassia* methanolic extract were determined by analyzing GC/MS in the scanning range of  $M^+=50-550$  m/z. 1L of the concentrated plant extract was filtered through 0.45 µL syringe filter and injected to GC-MS injection port (250 °C) in splitless mode. The extract was eluted using HP5-MS capillary column (30m x 0.25 mm x 0.25 µm) at helium gas (flow rate: 1.75 mL min-

1) under fixed 21.21 psi of pressure. The study was performed by applying the following sample elution temperature system for a maximum of 70 minutes. The oven temperature was gradually increased after it was kept at 50 °C for 2 min. Then, it was increased to 100 °C at 5 °C min<sup>-1</sup> and held for 5 min. Then, it was enhanced to 150 °C at 5 °C min<sup>-1</sup> and performed for 8 min. Finally, increased to 250 °C at 5 °C min<sup>-1</sup> and kept for 15 min. Characterization of *C. cassia* components was based on the library (Wiley and NIST) comparison with the mass spectra of the extract sample (8,9). The results of the GC / MS analysis contents are shown in Table 1.

### Preparing of anti- *S. aureus* culture

The inoculum of *S. aureus* were prepared in 4 mL Tryptic Soy Broth (Oxoid) for bacteria and incubated at 37 °C, overnight. After 24 hours, the culture suspension were adjusted as  $5.8 \times 10^6$  cfu/mL and stored at +4 °C until further use.

### Anti- *S. aureus* effects of toothpastes and toothpastes added to *C. cassia* methanolic extract

For anti- *S. aureus* activity of toothpaste samples and toothpastes combined with *C. cassia*, agar diffusion method used (10). Before the addition of *C. cassia* methanolic extract, toothpastes to be used in the study were formed the experimental groups, positive control group (fluoride-free toothpaste) and negative control group (distilled water).

For preparing the toothpastes combined with *C. cassia*; *C. cassia* methanolic extract were added to newly opened toothpastes which had never been used before and thereon 5µL distilled water was added. This mixture was homogeneously dispersed.

According to experiment, 5 mm thick agar medium was poured into the 9 cm diameter sterile petri dishes and frozen. Then, 0.5 mL-culture of 1 night active liquid cultures of bacteria was spread onto the surface of the medium with sterile L baguette. After waiting for about one hour at 37 °C, 6 mm diameter

**Table 1.** Chemical composition of *C. cassia* methanolic extract

RT	C	%	RT	C	%
7.369	Oxime-, methoxy-phenyl-	3.32	35.343	Beta-Jonone	5.32
7.924	4-Penten-1-amine	3.61	35.778	Octadecamethyl-cyclononasiloxane	1.98
20.049	Cinnamaldehyde	21.41	36.814	Caryophyllenol	2.22
20.827	p-Cymen-3-ol	8.0	37.838	Methyl palmitate	8.99
21.141	Carvacrol	3.70	39.028	Cyclododecasiloxane, eicosamethyl-	1.62
21.920	Cyclohexasiloxane- dodecamethyl	5.01	41.746	Methyl stearate	6.11
26.806	Cycloheptasiloxane-tetradecamethyl	4.59	41.906	Norepinephrine	3.67
27.195	2,4-di-tert-butylphenol	1.32	44.476	Tetracosamethyl-cyclododecasiloxane	1.74
31.344	Isoquinoline	1.77	45.500	2-(trimethylsilyl)ethyl4-(diphenylphosphino) benzoate	1.71
31.864	Hexadecamethylcyclooctasiloxane	2.15	46.873	1H-Purin-6-amine, trihydrate	2.91
34.645	3-(2,5-dimethylphenyl)butan-2-one	4.99	50.175	Cheilanth-13(14)-enic Methyl Ester	3.83
Total					99.97

RT: Retention Time

C: Compounds name

wells were drilled in the middle of the petri dish and toothpastes alone and toothpastes combined with *C. cassia* were put into the wells (n = 3). An equal amount of samples were placed in the prepared wells without dilution. Petri dishes were incubated at 37 °C for 24 hours. Inhibition zones formed after incubation were measured with digital caliper. Statistical analysis the significances of antibacterial analyses were measured by ANOVA (least significant difference -LSD) test in one-way analysis of variance for inhibition zones (%) using SPSS 25. From the values obtained, the average value and standart deviation were evaluated in Table 2. While evaluating the study data, Kruskal Wallis test was used for comparing quantitative data between groups that did not show a normal distribution and Bonferroni Corrected Mann Whitney U test was used

to determine the group that caused the difference. The experiments were repeated at least three times. Differences were considered as significant at  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

According to GC/MS analysis, the main ingredients of *C. cassia* methanolic extract were cinnamaldehyde (21.41%), methyl palmitate (8.99%), p-Cymen-3-ol (8.0%), methyl stearate (6.11%) and beta-Jonone (5.32%). In this study, to determine the anti-*S. aureus* activity of toothpastes and control groups in pure form without the addition of *C. cassia* methanol extract, toothpastes having the highest anti-*S. aureus* activity among toothpastes were S toothpaste (19 mm ± 0.00 mm) and C toothpaste (15.12 mm



**Table 2.** Inhibition zones of toothpastes alone and with *C. cassia* (Cs) against *S. aureus* (mm)

Toothpaste alone on <i>S. aureus</i>							
S	C	V	Se	P	R	I	Co
19 <sup>a</sup> ± 0.0	15.12 <sup>a</sup> ± 0.07	11.26 <sup>a</sup> ± 0.02	8.0 <sup>a</sup> ± 0.2	0.0 <sup>b</sup> ± 0.0	12.0 <sup>a</sup> ± 0.0	7.33 <sup>a</sup> ± 0.3	0.0 <sup>b</sup> ± 0.0
Toothpaste with <i>C. cassia</i> on <i>S. aureus</i>							
S+Cs	C+Cs	V+Cs	Se+Cs	P+Cs	R+Cs	I+Cs	Co+Cs
16.4 <sup>a</sup> ± 0.8	19.8 <sup>a</sup> ± 0.4	14.5 <sup>a</sup> ± 0.5	13.3 <sup>a</sup> ± 1.53	22.0 <sup>a</sup> ± 0.1	12.0 <sup>a</sup> ± 0.2	8.60 <sup>a</sup> ± 0.3	0.0 <sup>b</sup> ± 0.0

a, b: There is a significant difference between those shown exponentially with different letters

± 0.07 mm). Inhibition zones were 11.26 mm for V toothpaste zone, 8 mm for Se toothpaste, 12 mm for Co toothpaste, 7.33 for I toothpaste. However, P toothpaste alone did not show any anti-*S. aureus* activity (0 mm ± 0.00 mm). The inhibition zone of P toothpaste were found to be statistically different from the other all toothpastes ( $p \leq 0.05$ ). When the control groups were evaluated, positive control group R toothpaste (fluoride-free toothpaste) (12 mm ± 0.00 mm) was found to be S's toothpaste highest effective toothpaste. Distilled water (0 mm ± 0.00 mm), which is a negative control group, had no anti-*S. aureus* effect like P toothpaste. Also, after the addition of *C. cassia* methanol extract the highest anti-*S. aureus* activity among toothpastes was determined as P toothpaste (22.0 mm ± 0.1 mm) and C toothpaste (19.8 mm ± 0.4 mm). The inhibition zones were found as 16.4 mm for S toothpaste, 14.5 mm for V toothpaste zone, 13.26 mm for Se toothpaste and 8.60 mm for I toothpaste. When the control groups were evaluated, the positive control group had no fluoride-free toothpaste R toothpaste (12 mm ± 0.2 mm) and the negative control group distilled water (0 mm ± 0.00 mm) had no anti-*S. aureus* effect. According to the results of the study, it was seen that P toothpaste was the highest effective toothpaste in *C. cassia* methanol extract toothpaste mixture.

## DISCUSSION

The seconder metabolites in plants exhibit different anti-*S. aureus* effects because they contain various components and differences in the mechanisms of action of each of these components (11). GC/MS analysis is essential for determining the composition of them (12). Since the pure forms of their do not use solvents, they are thought to be cytotoxic because their pure forms can be highly hemolyzed in plaques. The *Cinnamomum* species, which belongs to the *Lauraceae* family, contains more than 300 aromatic trees and shrubs that can remain green for four seasons (13). *C. cassia*, also known as *Chinese Cinnamon* used in this study, was purchased from a local market. In studies, investigating the antimicrobial activity of cinnamon oil, it has been reported to have an effect on different bacterial species and fungi. In a study evaluating the antimicrobial activity of volatile oil obtained from the bark of *Cinnamomum zeylanicum* on three bacteria and two yeast fungus that may cause tooth decay, the plant's ethanolic, methanolic and acetonic extracts showed an antibacterial effect against *L. acidophilus* (14). According to the results of a previous study, *Cinnamomum camphora* essential oil showed the highest anti-*S. aureus* effect among the oils used (15). It is very important to increase the use of antimicrobial effective agents in the

fight against *Staphylococcus* which is known to be a significant food poisoning and threatens food workers (16). In literature, the high antibacterial activity of cinnamon oil was attributed to cinemic aldehyde (17,18). In studies conducted with different cinnamon species, the rate of cinematic aldehyde contained in the essential oils was found to be between 50% and 88%. Different extraction methods, the use of different solvents and the yield of the plant from which the oil is obtained may affect the composition of the essential oil and the rate of the presence of the major component (19). Wang et al. (20) analyzed the essential oil obtained from *C. cassia* by steam distillation by GC/MS and found that it contains 50% cinematic aldehyde. In another study evaluating the antimicrobial activity of *C. cassia* essential oil obtained by hydrodistillation, it was reported that the cinemic aldehyde in the essential oil is 85% (18). Another Cinnamon species, *C. zeylanicum* from the study of the composition of the essential oil obtained by the method of hydrodistillation of 99.4% cinematic aldehyde was found in the oil obtained (21). According to GC/MS analyzes, the main component of *C. cassia* methanol extract used in this study was found to be cinemic aldehyde (21.41%). In this study, S toothpaste, one of the toothpastes used in the study, showed the highest anti-*S. aureus* activity. Bhattacharjee et al. (22) compared toothpastes with different properties and reported that herbal toothpastes showed higher anti-*S. aureus* effects than fluoride and triclosan toothpastes. All methanol extracts used in the study showed antibacterial activity against *S. aureus*. When *C. cassia* methanol extract was added to toothpastes, it was observed that the effectiveness of toothpastes increased. P toothpaste, which did not initially have any anti-*S. aureus* activity, showed the largest zone of inhibition, surprisingly gaining activity with the addition of methanol extract. When all groups were evaluated together, the group with the best anti-*S. aureus* effect was found to be P toothpaste-*C. cassia* methanol extract and the group with the weakest anti-*S. aureus* effect was S toothpaste. It should be considered that the differences in the zone diameters obtained for each solvent may be due to the different

anti-*S. aureus* activities of the solvents and the interactions of the active ingredients in the solvents and toothpastes.

In conclusion, the toothpastes show antibacterial effect on *S. aureus* within the limits of our study in which the evaluation of anti-*S. aureus* activity of toothpastes and toothpastes with *C. cassia* methanol extract. R toothpaste from fluoride-free toothpastes showed lower inhibition zone diameter without addition of methanol extract, but higher after addition of methanol extract. R toothpaste also showed higher activity than some toothpastes containing fluoride. This may prove that fluoride-free toothpastes can be as effective as fluoride toothpastes and even show higher antimicrobial activity than some toothpastes. All toothpastes tested showed a higher inhibition zone diameter after addition of methanol extract. P toothpaste containing *C. cassia* extract and solvent showed the highest effect. P toothpaste showed no antimicrobial activity before the methanol extract was added. It is necessary to evaluate the efficacy of combinations of toothpaste methanol extract, which has been proven to have anti-*S. aureus* activity, for other components such as remineralization, whitening, desensitization, which form oral and dental health. In the future studies, it has been determined that methanol extracts used in the study can be used to replace various antimicrobials in the contents of toothpastes.

It is observed that toothpastes produced with different active substances examined in our study may show antimicrobial effects *in vitro*. However, taking into consideration the increasing variety of active substances in the market every day, *in vivo* studies are needed to examine the effects of toothpastes *in vitro* that will occur in the mouth environment. We all know that one of the biggest problems today is antibiotic resistance. It is seen that the efficiency on microorganisms increases by using plants with more natural content in the destruction of microorganisms. Plants and herbal ingredients are seen as the ideal alternative to prevent antibiotic resistance problem.

## ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to Giresun University and Mersin University Advanced Technology Research Centers to analysis supports.

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* This study does not require Ethics Committee Approval.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## FUNDING

\* This study was supported by Mersin University Scientific Research Projects Unit. Project no: 2018-2-AP3-2939.

## REFERENCES

1. Arweiler NB, Pergola G, Kuenz J, Hellwig E, Sculean A, Auschill TM. Clinical and anti-Staphylococcus aureus effect of an antiinflammatory toothpaste formulation with *Scutellaria baicalensis* extract on experimental gingivitis. *Clin Oral Invest*, 2011; 15: 909-13.
2. Projan SJ, Youngman PJ. Antimicrobials: new solutions badly needed. *Curr Opin Microbiol*, 2002; 5: 463-5.
3. Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S. Guaijaverin A. Plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol*, 2006; 101:487-95.
4. Chitme HR, Chandra R, Kaushik S. Studies on anti-diarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* RBR in experimental animals. *J Pharm Pharm Sci*, 2004; 7: 70-5.
5. Steinberg D, Feldman M, Ofek I, Weiss E. Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. *J Antimicrob Chemother*, 2004; 54: 86-9.
6. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*, 2005; 78: 431-41.
7. Barnes NA, Arnold PT. Investigation of anti-Staphylococcus aureus effects of Southern Appalachian plants: *phytolaccaamericana* and *juglans nigra* on selected bacteria. *Ga J Sci*, 2018; 76: 45.
8. Yabalak, E. Radical scavenging activity and chemical composition of methanolic extract from *Arum dioscoridis* Sm. var. *dioscoridis* and determination of its mineral and trace elements. *J Turkish Chem SocSec A: Chem*, 2018; 5(1): 205-18.
9. Sıcak, Y, Erdoğan Eliuz EA. Determination of the phytochemical profile, in vitro the antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Arbutus andrachne* L. wood growing in Turkey. *Turkish J Forestry*, 2019; 20(1), 57-61.
10. Kaynar P. Antimicrobial activity of *Quercus robur* L.(acorn). *Fresen Environ Bull*, 2017; 26 (12): 6992-5.
11. Calsamiglia M, Busquet PW, Cardozo L, Castillejos L, Ferret A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci*, 2007; 90: 2580-95.

12. Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem*, 2000; 48: 2576-81.
13. Ranasinghe P, Jayawardana R, Galappaththy P, Constantine GR, de Vas Gunawardana N, Katulanda P. Efficacy and safety of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as a pharmaceutical agent in diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabet Med*, 2012; 29: 1480-92.
14. Aneja KR, Joshi R, Sharma C. Antimicrobial activity of Dalchini (*Cinnamomum zeylanicum* bark) extracts on some dental caries pathogens. *J Pharm Res*, 2009; 2: 1387-90.
15. Chaudhari LKD, Jawale BA, Kumar HSCDM, Kulkarni PA. Antimicrobial activity of commercially available essential oils against *Streptococcus mutans*. *J. Contemp Dent Pract*, 2012; 13: 71-4.
16. Cakıcı N, Demirel NN, Akçalı A. Food industry employees and staphylococcal food poisoning. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2015; 72 (4): 337-50.
17. Choi O, Cho SK, Kim J, Park CG, Kim J. In vitro anti-*Staphylococcus aureus* activity and major bioactive components of *Cinnamomum verum* essential oils against cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2016; 6: 308-14.
18. Ribeiro M, Malheiro J, Grenho L, Fernandes MH, Simões M. Cytotoxicity and antimicrobial action of selected phytochemicals against planktonic and sessile *Streptococcus mutans*. *Peer J*, 2018; 6: e4872.
19. Ooi LS, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EY, Ooi VE. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *Am J Chin Med*, 2006; 34: 511-22.
20. Wang LL, Chen XP, Wei XJ. Study on chemical component of essential oil from *Cinnamomum cassia* presl and *Cinnamomum cassia petrophilum* leaves in Guangxi. *Technol Dev Enterp*, 2003; 6: 6-8.
21. Singh G, Maurya S, deLampasana MP, Catalan CA. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol*, 2007; 45: 1650-61.
22. Bhattacharjee S, Nath S, Bhattacharjee P, Chouhan M, Deb B. Efficacy of toothpastes on bacteria isolated from oral cavity. *Int J Med Sci Public Health*, 2018; 8: 89-92.

# Geçici orta serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan serebral iskemi modeli

## Cerebral ischemia model created by transient middle cerebral artery occlusion

Güven AKÇAY<sup>1</sup> (ID)

### ÖZET

Beynimiz ortalama 1500 g ağırlığında olup toplam vücut ağırlığımızın yaklaşık %2'sine karşılık gelmesine rağmen kardiyak debinin yaklaşık olarak %20'sini kullanmaktadır. Serebral kan akımı beyin beslenmesinde en önemli yeri oluşturmakta ve seçilmiş bir beyin bölgesinde veya tüm beyinde oluşan serebral kan akımındaki azalma sonucu beyin iskemisi gerçekleşmektedir. Serebral iskemi, beyni besleyen damarlarda veya kanın özelliklerine bağlı olarak damarların tıkanması ya da kanaması sonucu oluşmaktadır. Dünyada yılda yaklaşık olarak 17 milyon inme vakası görülmekte ve ülkemizde ise yılda yaklaşık 132.000 vaka görülmektedir. İnme vakaları her geçen yıl daha da arttığından dolayı gelecekte sağlıkla ve ekonomiyle ilgili sorunlara neden olacağı tahmin edilmekte, inmenin önlenmesi ve etkin tedavilerin uygulanması büyük önem arz etmektedir. Serebral iskemi tedavisi araştırmalarında yeni ajanların keşfedilmesi ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi için deneysel hayvan modelleri tercih edilmektedir. İnsanlardaki serebral iskemik hastalıkların fizyopatolojisinin araştırılmasında sıklıkla sıçan ve fare gibi kemirgenler üzerinde yapılan geçici global serebral iskemi, geçici fokal serebral iskemi ve geçici ön beyin iskemi modelleri

### ABSTRACT

Our brain weighs an average of 1500 g and uses approximately 20% of the cardiac output, although it corresponds to approximately 2% of our total body weight. Cerebral blood flow constitutes the most important place in the nutrition of the brain and cerebral ischemia occurs as a result of a decrease in cerebral blood flow in a selected brain region or the whole brain. Cerebral ischemia occurs as a result of blockage or bleeding in the vessels feeding the brain or depending on the characteristics of the blood. There are approximately 17 million stroke cases per year in the world, and approximately 132.000 cases are seen annually in our country. Since stroke cases are increasing every year, it is predicted that it will cause health and economic problems in the future, and the prevention of stroke and the application of effective treatments are of great importance. Experimental animal models are preferred for discovering new agents and developing new treatment protocols in cerebral ischemia treatment research. Transient global cerebral ischemia, transient focal cerebral ischemia and transient forebrain ischemia models are mostly used in rodents such as rats and mice to investigate the pathophysiology of cerebral ischemic diseases in humans. The most common type of ischemia

<sup>1</sup>Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı, Çorum



İletişim / Corresponding Author : Güven AKÇAY

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

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

Geliş Tarihi / Received : 29.12.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 26.01.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.73693

Akçay G. Geçici orta serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan serebral iskemi modeli  
Türk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 205 - 218

kullanılmaktadır. Klinikte en fazla karşılaşılan iskemi tipi, fokal serebral iskemi olup en önemli nedenleri internal karotis arter veya onun en büyük dalı olan orta serebral arterin oklüzyonudur. Geçici serebral iskemi hayvan modelleri karotis ve/veya vertebral arter oklüzyonu ile insanlarda oluşan iskemiye çok güzel taklit etmektedir. Geçici orta serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan iskemi modeli, inmenin patofizyolojisini araştırmada en yaygın kullanılan modellerden biridir. Bu derlemede; serebral iskeminin epidemiyolojisi, patofizyolojisi ve deneysel serebral iskemi hayvan modelleri arasında en çok kullanılan orta serebral arter oklüzyon yöntemi ile ilgili bilgiler sunulmuştur. Bu bilgiler ışığında, serebral iskemi tedavisi çalışmalarında sıklıkla tercih edilen geçici orta serebral iskemi modeli oluşturulmasında dikkat edilmesi gereken konular hakkında önemli bilgiler edinilmiş olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Serebral iskemi, orta serebral arter oklüzyonu, geçici serebral iskemi, iskemi reperfüzyon hasarı

encountered in the clinic is focal cerebral ischemia and the most important causes are occlusion of the internal carotid artery or its largest branch, the middle cerebral artery. Transient cerebral ischemia animal models (with carotid and / or vertebral artery occlusion) mimic very well human ischemia. The ischemia model created by transient middle cerebral artery occlusion is one of the most widely used models in investigating the pathophysiology of stroke. In this review; information on the epidemiology, pathophysiology of cerebral ischemia and middle cerebral artery occlusion method, which is the most used animal models of experimental cerebral ischemia, are presented. In light of this information, cerebral ischemia treatment studies often preferred model of transient middle cerebral ischemia important information about the issues to be considered in the creation will be acquired.

**Key Words:** Cerebral ischemia, middle cerebral artery occlusion, transient cerebral ischemia, ischemia reperfusion injury

## GİRİŞ

Serebrovasküler hastalıklar beyni besleyen damarlarda veya kanın özelliklerinde oluşan değişikliklere bağlı olarak damarların tıkanması ya da kanaması sonucu görülen merkezi sinir sistemi hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Serebrovasküler hastalıklar, hastanede tedavi gerektiren nörolojik hastalıkların %80'inden fazlasını meydana getirmekte ve bu hastalıkların % 87'sini iskemik, %13'ünü ise hemorajik inme oluşturmaktadır. Ülkemizde her yıl 132.000 inme vakasının olduğu rapor edilmiştir (1). Gelişmiş ülkelerde tanı ve tedavi yöntemlerinin ilerlemesi, inmenin sebep olduğu ölüm oranlarında azalmayı da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle inme hastalığında, iskemi sonrası reperfüzyon hasarını önleyerek, hastaların iyileşmesini hızlandıracak

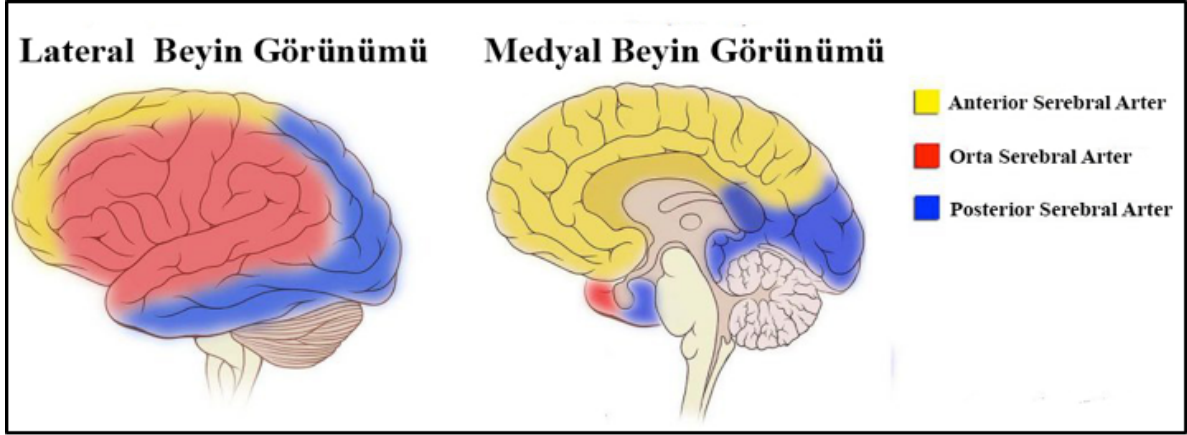
tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi esastır. İnme tedavisindeki asıl amaç, iskemik alandaki perfüzyonu tekrar sağlayarak, iskemi sonrası oluşabilecek ikincil hasarları önleyip vakaların iyileşmesini hızlandıracak ve mortaliteyi azaltacak tedavi yaklaşımlarını ortaya koymaktır. İskemi reperfüzyonun tedavisi için yeni ajanların keşfedilmesi ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi için deneysel hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır (2-6).

## SEREBRAL VASKÜLER ANATOMİ

Beynimiz, vücudumuzda metabolik olarak en aktif organlarımızdan biridir ve bu aktiviteyi gerçekleştirebilmesi için toplam kalp debisinin yaklaşık % 20'sini kullanmaktadır. Beyin arteriyel kan

akımını, ikisi internal karotis arter ve ikisi vertebral arter olmak üzere dört arter aracılığı ile sağlamaktadır (7). Beyni besleyen arterler, internal karotis arterin ikiye dallanması ile oluşan anterior ve orta serebral arterler ve baziller arterin ikiye dallanması ile de

posterior serebral arterlerdir (Şekil 1.) (7). Beyin sapı, serebellum, oksipital lob ve talamusu vertebral arterler ve dalları beslerken, geriye kalan serebral hemisferlerin kan akımını ise karotis internanın dalları beslemektedir (7)).



Şekil 1. Beyni besleyen arterler [2]

### SEREBRAL KAN AKIMI (SKA)

Beyin, uyku, uyanıklık, bilişsel ve fiziksel aktiviteler gibi fizyolojik fonksiyonları yerine getirebilmek için yeterli düzeyde oksijene ve enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Erişkin bir insan beyninin ortalama ağırlığı 1350 gram olup, toplam vücut ağırlığının yaklaşık % 2'sine karşılık gelmesine rağmen, her bir atım ile kalpten fırlatılan kanın % 20'si beyin tarafından kullanılmaktadır (8). Fizyolojik koşullarda SKA 45-55 mL/100g/dk'dır ve gri cevherdeki serebral kan akımı ve metabolizma hızı beyaz cevherden dört kat daha fazladır (Tablo 1). Beynimizdeki enerjinin yaklaşık % 40'ı hücrel homeostaziste kullanılırken, geriye kalan % 60'lık kısmı da sinaptik transmisyonunda kullanıldığından SKA'nın % 80 kadarı gri cevheri, % 20 kadarı da beyaz cevheri kanlandırmaktadır (7). Beynimiz vücuttaki toplam oksijenin % 20'sini ve glikozun da % 25'ini tüketmektedir (8). Beynin normal fizyolojik koşullarda oksijen metabolizma hızı 1,3-1,8  $\mu\text{mol/g/dk}$  olup, beyindeki hücrelerin ihtiyacına göre bu değer değişkenlik göstermektedir (9, 10).

Tüm vücudumuzda olduğu gibi beynimizdeki nöronların da birincil enerji kaynağı Adenozin 3- trifosfattır (ATP) Beyindeki nöronlar glikojen depolayamadıkları için sürekli olarak glikoza ihtiyaç duymaktadırlar (11). Beyin glikozun % 80'ini enerji üretiminde kullanırken, % 20'sini nötransmitter, protein ve lipid sentezinde kullanmaktadır (12). İskemi ya da hipoksi sonrası mitokondride aerobik solunum durarak, anerobik solunum sürdüğünden, ilk yanıt anaerobik glikoliz olmaktadır (13). İnfarkt bölgesinde ATP'nin azalması, Adenozin monofosfat (AMP) artışına sebep olmakta ve Fosfofruktokinaz (PFK) enziminin aktive olmasıyla, glikojenden ATP üretimi için anaerobik glikoliz devreye girmektedir (13). Parsiyel oksijen basıncı ( $\text{PaO}_2$ ), 0,1 mmHg'nin altına düştüğünde aerobik solunum (36 mol ATP) durarak, anaerobik glikoliz başlayıp 18 kat daha düşük yani 2 mol ATP üretilmektedir (14). Anaerobik glikoliz ile ATP üretimi en çok dört-beş kat arttırılabildiğinden nöronlar için gerekli enerji karşılanamamaktadır (15).

Tablo 1. Fizyolojik serebral kan değerleri (2)

Fizyolojik Serebral Kan Değerleri	
SKA	
Global	45-55 mL/100g/dk
Kortikal (Gri Cevher)	75-80 mL/100g/dk
Subkortikal (Beyaz Cevher)	20 mL/100g/dk
SMHO <sub>2</sub>	3-3.5 mL/100g/dk
SVR	1.5-2.1 mm Hg/100g/dk/mL
Serebral Venöz PO <sub>2</sub>	32-44 mm Hg
Serebral Venöz SO <sub>2</sub>	% 5-70
İKB	8-12 mm Hg
Serebral kan akımı (SKA); Oksijen serebral metabolizma hızı (SMHO <sub>2</sub> ); Serebral vasküler rezistans (SVR); Parsiyel oksijen basıncı (PO <sub>2</sub> ); Oksijen satürasyonu (SO <sub>2</sub> ); İntrakraniyel basınç (İKB).	

Beyinde iskemiye bağlı ATP eksikliği, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz pompa aktivitesinin ve iyon dengesinin bozulması, membran potansiyelinin değişmesine yol açıp, nöronlar ile glial hücrelerin depolarize olmasına ve nöronlardan nörotransmitterlerin salınmasına neden olmaktadır (11). Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz pompasının yetersizliği hücre içine sodyum, hücre dışına potasyum geçişine ve aynı zamanda izoosmotik su birikimi ile hücresel şişmeye neden olmaktadır (11). Glikoz, anaerobik glikoliz ile laktata metabolize olmakta, laktik asit ve hidrojen iyonu birikmekte ve bu da pH'yi düşürerek, hücrenin asidoza gitmesine neden olup serbest radikal üretimi artmaktadır (7, 16, 17). Sonuç olarak, geri dönüşümsüz iskemik hasar süreci başlamakta, kan beyin bariyeri bozulması iskemiden dakikalar/saatler sonra sitotoksik ödem ve 24-72 saat sonra vazojenik ödem başlayarak hücre ölümü gerçekleşmektedir (17, 18).

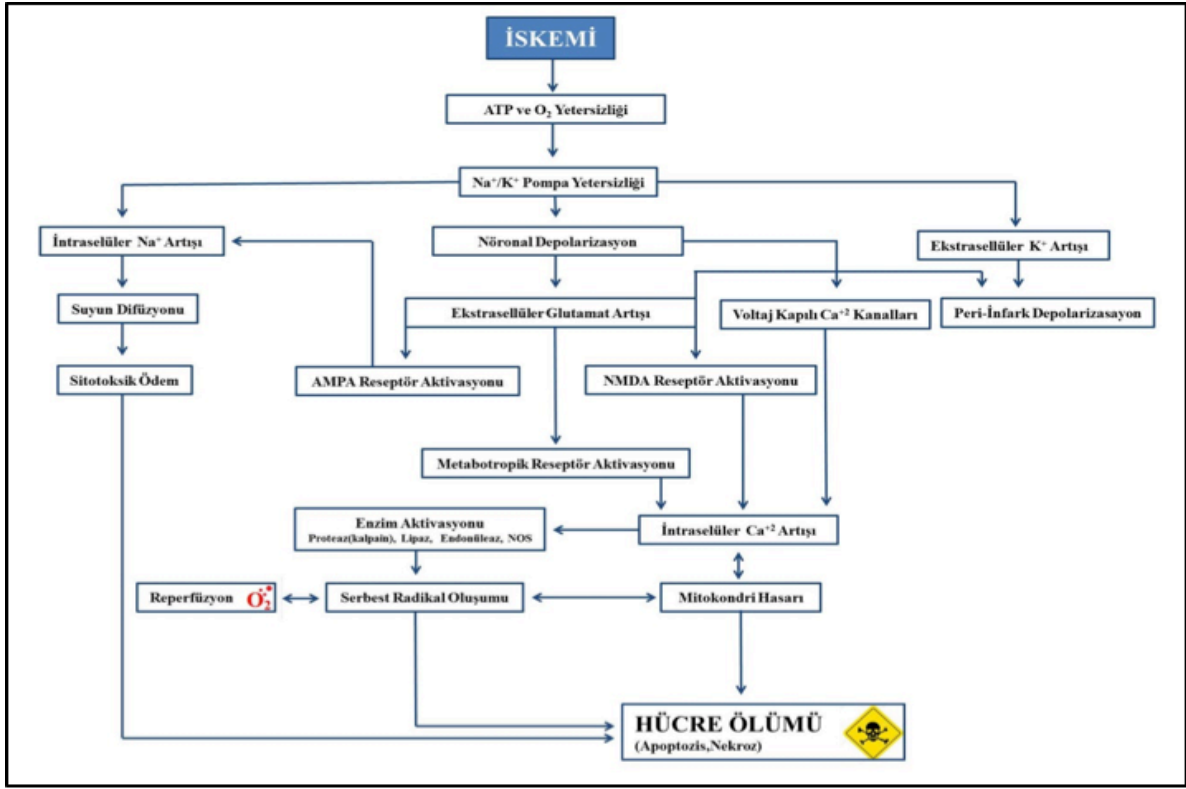
İskemiye takiben dakikalar içerisinde presinaptik uçtaki akson terminallerinden ekstrasellüler aralığa aşırı miktarda glutamat gibi eksitatör aminoasitlerin salınımı artmakta ve bu aminoasitlerin geri alınımı düşürerek, postsinaptik reseptörlerine bağlanan eksitatör aminoasitler hücre içine aşırı kalsiyum girişine neden olmaktadır (2, 19-21). Sinaptik aralıkta artan glutamat, postsinaptik glutamat reseptörlerini,

özellikle N-metil D-aspartik asit (NMDA) reseptörlerinin aşırı uyarılmasına sebep olmaktadır (21). NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, daha fazla kalsiyum iyonlarını hücre içine alarak proteaz, nükleaz, kaspaz gibi enzimleri aktive edip postsinaptik kısımda nöron ölümünü gerçekleştirmektedir (21). Kalsiyum-bağımlı enzimler, hücre ve dokuda protein yıkımına, nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) oluşumuna sebep olmaktadır (Şekil 2.) (11).

### SEREBRAL İSKEMİK ALAN BÖLGELERİ

İskemik inme, beyni besleyen damarların bir bölümünün veya tamamının tıkanması sonucu oluşmaktadır. İskemik alan üç bölgeden meydana gelmektedir (Şekil 3). Birinci bölge, kan akımının 10 mL/100g/dk'nın altına düştüğü ve iskemik bölgenin merkezini oluşturan "kor" bölgesidir (7). İskeminin kor bölgesinde ATP eksikliği ile kaspazlar inaktive olurken, hücre iyon dengesi bozulmakta, bol miktarda NO ve serbest radikaller üretilmektedir (22-25). Bunun yanı sıra kor bölgesinde, glutamat, sitotoksik sitokinler gibi eksitotoksinler aşırı miktarda artmakta (26, 27), sodyum ve kalsiyumun hücre içine girişi ile birlikte klorun hücre dışına çıkışı nöronal hücrelerde ve dendritte nekroz oluşturmaktadır (28). Bu süreç iskemiden hemen sonra başlamakta ve yaklaşık olarak beş gün sürmektedir (29). Kan akımının çok düşük





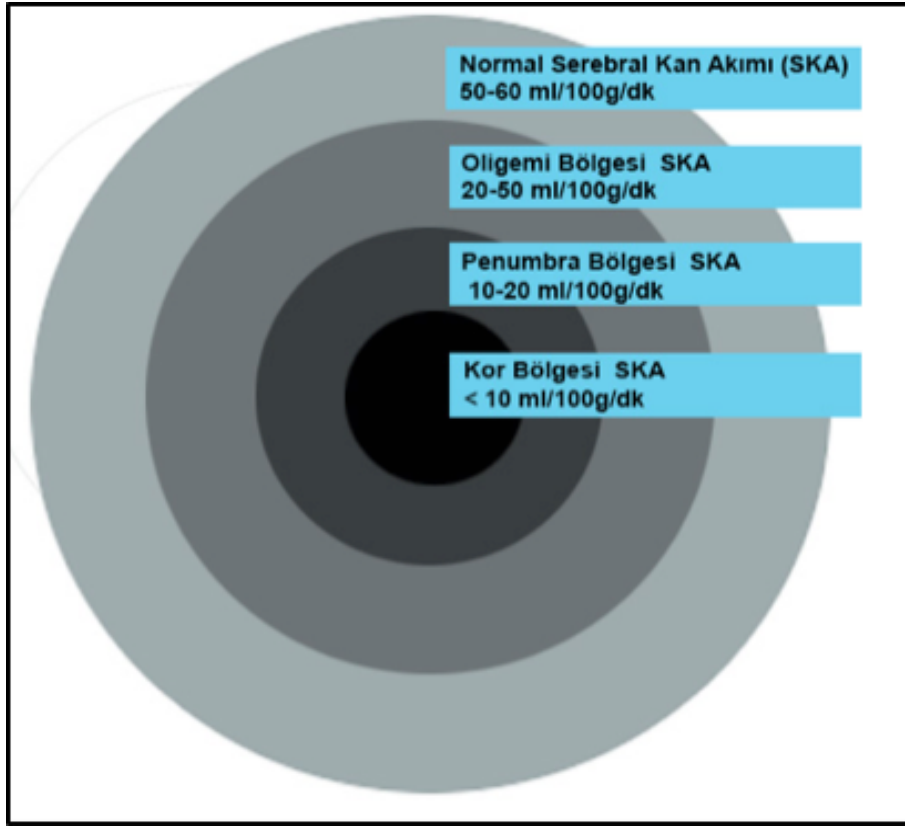
Şekil 2. İskemik hasar oluşum mekanizmaları (2)

olduğu bu kor bölgesinde hücrelerde geri dönüşümsüz hasar, nekroz ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Kor bölgesinin yakın çevresini oluşturan ve “Penumbra” bölgesi olarak adlandırılan ikinci bölgede ise, serebral kan akımı (SKA) 10-20 mL/100g/dk civarındadır (7). Penumbra alanında gözlenen apoptozis, aktif ve enerji bağımlı bir süreçtir. Penumbra alanında kan akımının azalması ve elektriksel potansiyellerin oluşmamasına rağmen hücreler membran potansiyellerini ve iyon dengesini koruyabilmektedirler (30). Bu nedenle penumbra alanındaki hücreler, yaklaşık dört-altı saat canlılığını sürdürebilmektedirler (27). Bu bölgede reperfüzyonun tekrar sağlanması ile kalıcı hasar önlenilmekte, eğer kısa sürede bu bölgeye kan akımı tekrar yeterli düzeyde sağlanamaz ise penumbra bölgesinde de geri dönüşümsüz hasar oluşup iskemik alanın kor bölgesine dönüşerek

nekroz gerçekleşmektedir (27). Bundan dolayı inme vakalarının tedavisinde asıl amaç, penumbra alanını kurtarmaya yönelik protokollerin geliştirilmesidir.

Üçüncü bölge ise “Oligemi” bölgesidir ve SKA 20-50 mL/100g/dk’dır (7). Oligemi bölgesi, kan akımının normalin altında olup, infarkt riskinin olmadığı penumbra’nın çevresindeki alandır (31).

İskemi sonrası nörolojik ve fonksiyonel iyileşmelerin özellikle ilk haftalarda olduğu ve bu iyileşmenin penumbra alanının geri kazanılması ile olduğu bilinmektedir (7). İskemi sonrası kor bölgesindeki hücre ölümü penumbra bölgesine göre daha hızlı gerçekleşmektedir, çünkü eksitotoksik ajanlar (glutamat ve kalsiyum), serbest radikaller ve apoptotik yollar doku hasarına yol açmaktadır (7, 32).



Şekil 3. İskemik alanın bölgeleri (2)

İskemiden dokunun nasıl etkileneceği, hücre hasarının geri dönüşümünün olup olmayacağı yani hücrenin apoptozis veya nekroza uğrayıp uğramayacağı, iskemiyin süresine, şiddetine ve kollateral kan akımına bağlıdır (33). SKA 5 mL/100g/dk olduğunda infarkt 30 dakika sonra meydana gelmekte, 10 mL/100g/dk olduğunda üç saat sonra, 15 mL/100g/dk olunca 3.5 saat sonra, 18 mL/100g/dk olduğunda ise dört saat sonra infarkt meydana gelmektedir (34). SKA'nın oligemik düzey olan 20-50 mL/100g/dk'da olduğunda ise infarkt gelişmeden, hücre fonksiyonları uzun süre devam edebilmektedir (7, 31). Eğer oligemik bölgede reperfüzyon hızlı bir şekilde tekrar sağlanırsa infarkt alanının azalması mümkün olmaktadır (31). Arteriyel kan basıncındaki ani azalma iskemik penumbra alanının hızla iskemik

kor bölgesine dönüşmesine yol açmaktadır (35). SKA'nda oluşan azalmaların hücrelerde meydana getirdiği hasarın boyutu Tablo 2'de özetlenmiştir.

İskemiden sonra SKA'nın azalmasına bağlı olarak oksijen eksikliği ile beraber 10 sn içerisinde önce kişide bilinç kaybı, iki-dört dakika içerisinde de glikoz eksikliği görüldüğü bilinmektedir (32, 36, 37). Bu süreci takiben beşinci-altıncı dakika ATP azalmaya başlamakta ve enerjinin yaklaşık %50'si ile %75'i tükendiğinden, iyon pompaları işlev göremez hâle gelmekte, hücre içine sodyum ve kalsiyum girişi, hücre dışına potasyum çıkışı gerçekleşmektedir (36, 37). İskemiyin şiddetine bağlı olarak altıncı-sekizinci dakikalarda iskemiyin kor bölgesinde kalıcı nöronal hasar başlamakta iken penumbra bölgesinde ise nöronlar canlılığını sürdürmektedir (32).

**Tablo 2.** Patolojik serebral kan akımı değerleri (2)

Patolojik Serebral Kan Akımı Değerleri	
45-55 mL/100g/dk	Normal koşullar
20 mL/100g/dk	Bilinç kaybı, EEG dalgalarında azalma
18 mL/100g/dk	İyonik hemostaziste bozulma ve nöronlarda anerobik yaşam
10 mL/100g/dk	Hücre membran bütünlüğünün tamamen bozulması, Ca <sup>2+</sup> hücre içine girişi, geri dönüşsüz hücre hasarı

### İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ MEKANİZMASI

İskeminin sonlanarak reperfüzyon ile kan akımının tekrar sağlanması, iskemik bölgeye daha fazla hasar vermektedir. Bu hasara “Reperfüzyon Hasarı” denilmekte ve hasarın şiddetini iskeminin süresi belirlemektedir (16). Perfüzyonun tekrar sağlanması hücre içerisine moleküler oksijen girişine yol açarak serbest radikal üretiminin hızlı artışına neden olmaktadır (16). Fizyolojik koşullar altında antioksidan sistemler ile serbest radikaller arasında denge söz konusudur. Fakat hipoksi, iskemi gibi durumlarda serbest radikaller çok hızlı arttığından serbest radikaller artık antioksidanlar tarafından dengelenemez hâle gelmektedir (38). Artan serbest radikaller lipid, protein, ve nükleik asitlerin yapısını bozarak, doğrudan nöron hasarına yol açtığı gibi beyinde apoptotik, nekrotik ve ekzitotoksik yolları aktifleştirerek de hücre ölümüne neden olmaktadır (39, 40). Sivenius ve ark. (41) gecikmiş reperfüzyonun beyin dokusunda iskemiden daha fazla hasara neden olduğunu rapor etmişlerdir. İskemi/reperfüzyon hasarının, iskeminin ikinci ve altıncı saatinde başlayıp, reperfüzyonun 24. saatinde en yüksek seviyeye ulaştığı bilinmektedir (42). İskemi esnasında oksijen ve glukoz eksikliğine bağlı olarak, nöronlarda ATP seviyeleri önemli ölçüde düşer ve iyonik denge bozulur (21). İlk kez 1981 yılında Granger ve ark. (43) tarafından iskemi sonrası perfüzyonun tekrar sağlanması aşamasında serbest radikallerin olduğu ortaya atılmıştır. Perfüzyondan sonra artan serbest radikallerin doku hasarına yol açmanın yanı sıra, hücresel kalsiyum homeostazisini de bozarak sitozolik ve mitokondriyal kalsiyum artışına neden

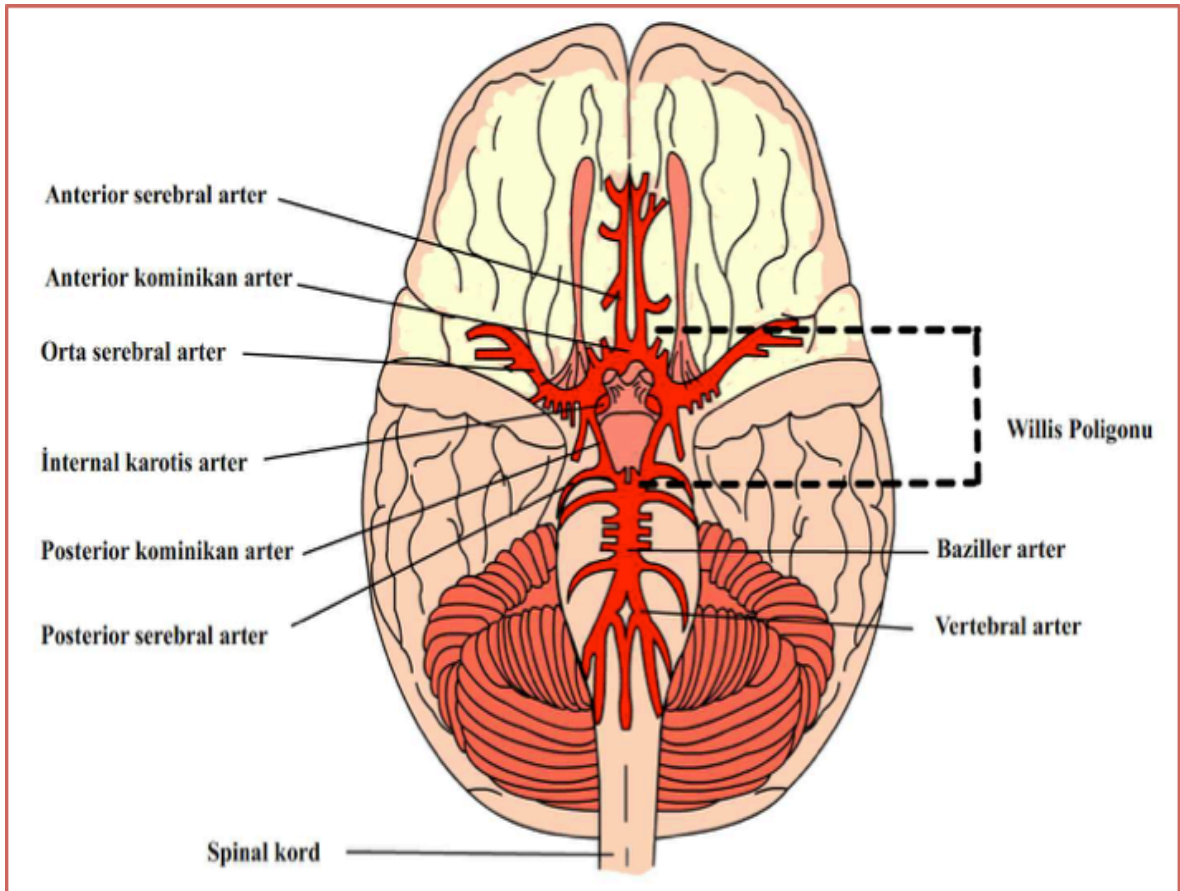
olduğu bilinmektedir. Bu durum mitokondriyal hasara sebep olup, hücreyi ölüme götüren enzim yollarını aktifleştirerek geri dönüşsüz hücre hasarına yol açıp hücrenin ölümü ile sonuçlanmaktadır (44, 45).

### DENEYSEL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELLERİ

İnsanlardaki serebral iskemik hastalıklarda yeni tedavi yaklaşımlarının araştırılması için en çok sığın ve fare gibi kemirgenler üzerinde yapılan global serebral iskemi, fokal serebral iskemi ve ön beyin iskemi modelleri kullanılmaktadır (Tablo 3) (2-4). Global veya fokal serebral iskemi modelleri, deney hayvanlarında arterlerden bir veya birkaçının mekanik ligasyonu veya arter lümeninin bir cisim ile tıkanmasıyla oluşturulmaktadır. Fokal iskemi ile global iskemi arasındaki en önemli fark, global iskemide kollateral akım yokken, fokal iskemide kollateral dolaşım ile iskemik alanın etrafında az da olsa kan akımının mevcut olması ve bu bölgedeki dokuların yaşamlarını belli bir süre devam ettirebilmeleridir (32). Klinikte en fazla karşılaşılan iskemi tipi, fokal serebral iskemi olup, bu iskemi türünün en önemli nedenleri internal karotis arter veya onun en büyük dalı olan orta serebral arterin oklüzyonudur (5). Deneysel serebral iskemi reperfüzyon modeli olarak en çok iki taraflı karotis arter ve orta serebral arter (OSA) oklüzyonları kullanılmaktadır (3, 4, 6). İnmelerin büyük çoğunluğu internal karotis arterin en büyük dalı olan OSA'nın beslediği beyin bölgesinde gelişmektedir (Şekil 4). Bu bölgede gerçekleşen lezyonların yaklaşık % 33'ü derin orta serebral arterde, % 10'u hem derin hem de yüzeysel dallarda, % 57'si ise sadece yüzeysel dallarda gerçekleşmektedir (7).

Tablo 3. Deneysel serebral iskemi hayvan modelleri (2)

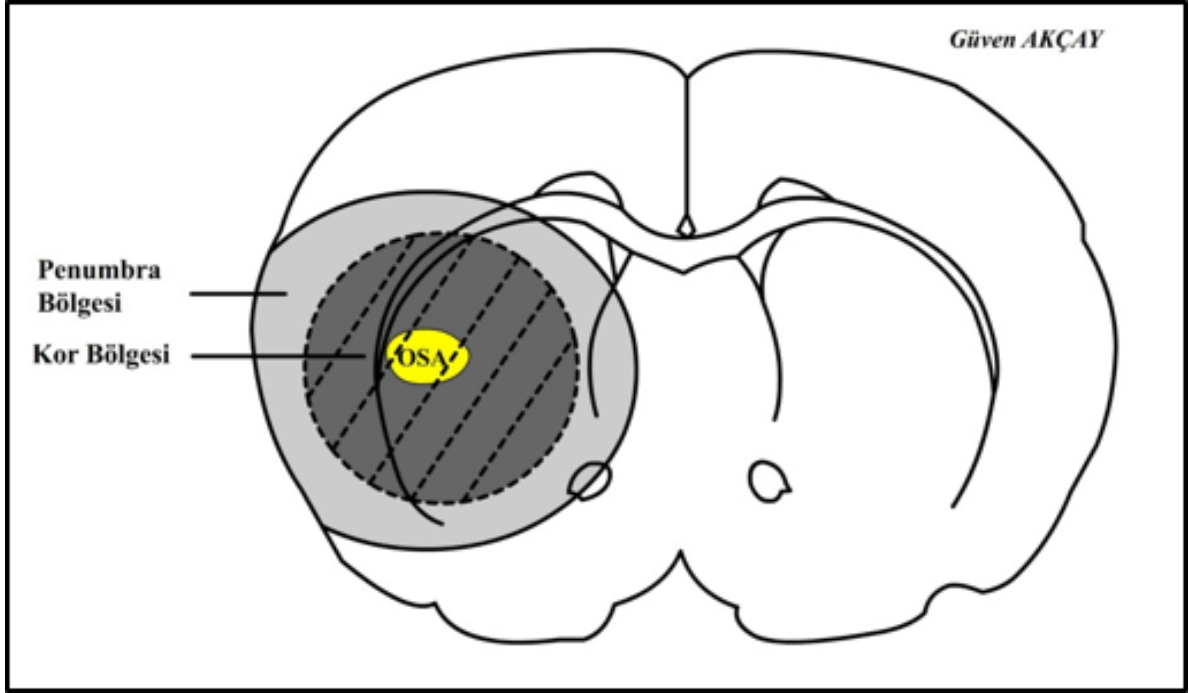
Deneysel Serebral İskemi Hayvan Modelleri		
Fokal Serebral İskemi Modelleri	Global Serebral İskemi Modelleri	Ön Beyin İskemisi Modelleri
Kalıcı veya geçici modeller Kalıcı emboli ve tromboz modelleri	Resüsitasyonsuz kardiyak arrest modeli Kardiyak arrest ve resüsitasyon modeli Derin sistemik hipotansiyon modeli Büyük damarların cerrahi tıkanması	İki taraflı AKK tıkanması Dört damar oklüzyon modeli Yüksek tansiyonlu sıçanlarda iki taraflı AKK tıkanması İki taraflı AKK oklüzyonu ile birlikte hipotansiyon oluşturulması



Şekil 4. Willis poligonu (2)

Karotis ve/veya vertebral arter oklüzyonu ile oluşturulan geçici serebral iskemi hayvan modelleri, insanlarda oluşan iskemiye çok güzel taklit etmektedir (2-4) (Şekil 5). Geçici orta serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan iskemi modeli, inmenin patofizyolojisini

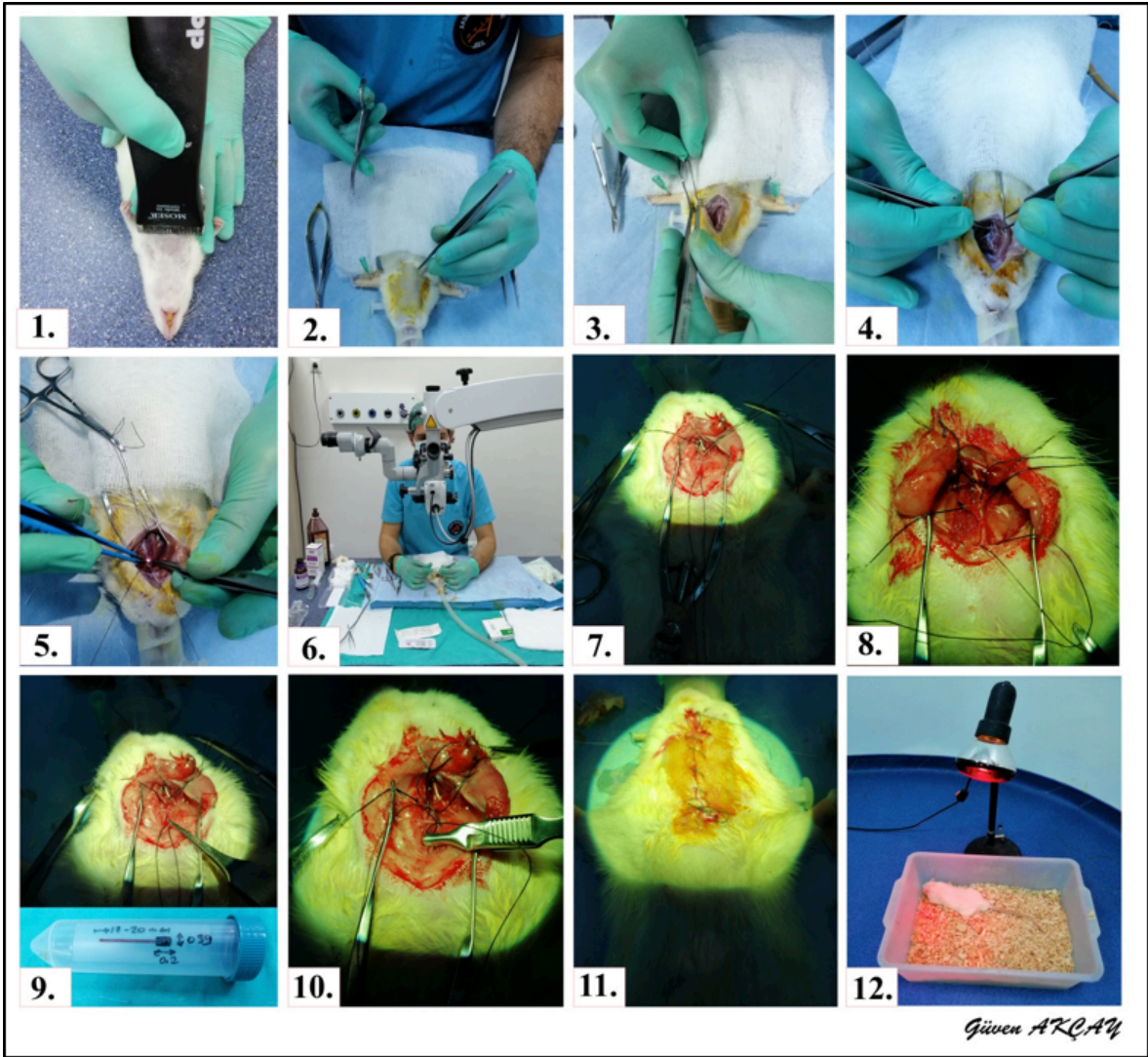
araştırmada en yaygın kullanılan modellerden biridir (2-4). Deneysel serebral iskemi çalışmalarında Longa ve ark. (46) tarafından geliştirilen orta serebral arter oklüzyonu (iskemi) ve reperfüzyonu modeli sıklıkla kullanılmaktadır (2-4).



Şekil 5. OSA oklüzyonu ve ilk dört saat hasar bölgeleri (2)

Serebral iskemi cerrahi işlemleri % 4'lük izofluran anestezisi altında gerçekleştirilmeli ve sıçanların vücut sıcaklıkları ameliyat süresince  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  düzeyinde tutulmalıdır (2). Boyun bölgesi Şekil 6.1'deki gibi iyice traşlanarak önce antiseptik solüsyon ve daha sonra da % 70'lik alkol ile temizlemelidir (Şekil 6.2) (2). Boyundan sol komon karotis arteri ortaya çıkaracak şekilde (Şekil 6.3-5) orta hat insizyonu yapılarak, internal ve eksternal karotis arterler açığa çıkarılarak ayrılmalıdır (Şekil 6.7) (2, 46). Sıçanların vücut ağırlığına bağlı olarak uzunluğu 18.5 ile 19.5 mm arasında değişen 4.0 monofilament naylon suture ile internal karotis arter lümenine girilerek OSA bloke edilinceye kadar suture ilerletilmelidir (Şekil 6.9.)

(2, 46). 30,60, 90 veya 120 dakikalık iskemi sonrası suture çıkartılarak reperfüzyon sağlanarak ve açılan kesi dikilerek cerrahi işlem sonlandırılmalıdır (Şekil 6.10-11) (2). İskemi sonrası hipoksiyi engellemek için denek kırmızı ışık altında tutulmalıdır (Şekil 6.12) (2). İskemi süresi arttıkça iskemik hasarın şiddeti artacağından süre oluşturacağı hasarın boyutuna göre belirlenmelidir. 30-60 dakikalık iskemi hafif şiddette hasar oluştururken 60-90 dakikalık iskemi orta şiddette hasar oluşturmaktadır ve 120 dakikalık iskemi ağır hasar şiddeti için tercih edilmelidir. Sıçanların motor davranış indeksi ameliyattan sonra değerlendirilerek, serebral iskeminin doğruluğu teyit edilmelidir (2, 47).



Güven AKÇAY

**Şekil 6.** OSA iske mi/reperfüzyon cerrahi işlemleri. Şekil 6.1. Cerrahi işlem öncesi boyun traşlanması, Şekil 6.2-5. Komon karotis arter diseksiyonu ile internal ve eksternal karotis arterlerin ortaya çıkarılması. Şekil 6.7-9. OSA'nın sütüre ile tıkanması. Şekil 6.10-12. İske mi sonrası sütürün çıkartılarak reperfüzyonun başlatılması

Sonuç olarak Serebral iske mi sonrası motor fonksiyon, öğrenme ve hafıza bozukluğu meydana geldiği bilinmektedir (48-51). Bu fonksiyon bozukluklarının patofizyolojisini araştırmak için deneysel global ve fokal iske mi modelleri sıklıkla tercih edilmektedir (26, 52-55). Özellikle geçici OSA oklüzyonu, bozulan öğrenme ve hafızanın moleküler

mekanizmasının aydınlatılmasında araştırmacılar için büyük önem arz etmektedir (26, 49-55). Reperfüzyondan sonra önemli bir gecikmiş nöron ölümü meydana geldiğinden dolayı inmenin patofizyolojisinin araştırmasında kalıcı iske mi modeline kıyasla geçici serebral iske mi modeli en yaygın kullanılan modellerden biri olmaktadır (56, 57). Serebral

iskemi, tüm dünyada yaygın nörolojik hastalıkların başında gelmekte ve her yıl binlerce kişi inmeden dolayı yaşamını yitirmektedir. Serebral iskemi de asıl hasarı reperfüzyon aşaması oluşturmakta ve tedavi yöntemleri reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik olmalıdır. Serebral iskeminin tedavi yöntemlerinin gelişmesinde özellikle deneysel çalışmalar büyük katkı sağlamaktadır. Yapılan deneysel patofizyolojik çalışmaların çoğu iskemi sonrası reperfüzyon hasarını önlemek, hastaların iyileşmesini hızlandıracak tedavi

yöntemlerin geliştirilmesi üzerine yapılmaktadır. İskemi reperfüzyonun tedavisi için yeni ajanların keşfedilmesi ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi için deneysel geçici serebral iskemi hayvan modelleri sıklıkla tercih edilmektedir. Bu nedenle deneysel geçici orta serebral oklüzyon modeli serebral iskemi araştırmalarında hayati önem arz etmekte ve yeni tedavi yöntemleri için daha fazla deneysel araştırmalar yapılmalıdır.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

### KAYNAKLAR

1. Kablan Y. İnme: Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri. Türkiye Klinikleri. 2018; ; 1-19.
2. Akçay G. Deneysel Serebral İskemi Modeline Bağlı Öğrenme ve Hafıza Değişikliklerine Transkraniyal Doğru Akım Stimülasyonunun Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2020.
3. Akçay G, Aslan M, Derin N. Serebral İskemi Sonrası Motor Fonksiyonların Tedavisinde Transkraniyal Doğru Akım Stimülasyonu Etkileri. 18. Ulusal Sinirbilim Kongresi. Kasım, 6-9 Ankara-Türkiye2020.
4. Akçay G, Derin N. Effects of Transcranial Direct Current Stimulation on Learning and Memory Changes after Experimental Cerebral Ischemia. in 4th International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society (4th TNED Congress). November, 26-28 Istanbul-Turkey,2020.
5. Gupta YK, Briyal S. Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. Indian J Physiol Pharmacol, 2004; 48 (4); 379-94.
6. Singh DP, Chopra K. Verapamil augments the neuroprotectant action of berberine in rat model of transient global cerebral ischemia. Eur J Pharmacol, 2013;720 (1-3); 98-106.
7. Kumral E. Santral Sinir Sisteminin Damarsal Hastalıkları. İkinci Baskı Güneş Tıp Kitapevleri, 2011.
8. Kaya D, Özdemir YG Serebral Kan Akımı ve Metabolizması, Kumral E. Santral Sinir Sisteminin Damarsal Hastalıkları. İkinci Baskı Güneş Kitapevleri, 2011,191-202.
9. Astrup J. Energy-requiring cell functions in the ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. J Neurosurg, 1982; 56 (4); 482-97.
10. Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. J Cereb Blood Flow Metab, 1989; 9 (2);127-40.

11. Oğul E. Klinik Nöroloji. Birinci Baskı Nobel ve Güneş Kitapevi, 2002.
12. Sahan M, Satar S, Koç AF, Sebe A. İskemik İnme ve Akut Faz Reaktanları. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 2010; 19 (2); 85-140.
13. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. The Glycolytic Pathway Is Tightly Controlled. 5th edition Biochemistry, 2002.
14. Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. Biochim Biophys Acta, 2010;1802 (1); 80-91.
15. Yager JY, Brucklacher R, Vannucci RC. Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in immature rats. Am J Physiol, 1992; 262 (3 Pt 2);672-7.
16. Zhang Y, Chen Z, Girwin M, Wong T. Remifentanyl mimics cardioprotective effect of ischemic preconditioning via protein kinase C activation in open chest of rats. Acta Pharmacol Sin, 2005; 26 (5); 546-50.
17. Simard JM, Tarasov KV, Gerzanich V. Non-selective cation channels, transient receptor potential channels and ischemic stroke. Biochim Biophys Acta, 2007; 1772 (8); 947-57.
18. Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. Stroke, 1988; 19 (9);. 1083-92.
19. Liang D, Dawson TM, Dawson VL. What have genetically engineered mice taught us about ischemic injury? Curr Mol Med, 2004; 4(2); 207-25.
20. Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. Early Hum Dev, 2004; 80 (2); 125-41.
21. Xing, C, Arai K, Lo EH, Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. Int J Stroke, 2012; 7(5);378-85.
22. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. Stroke, 1996; 27(6); 1124-9.
23. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996; 36; 83-106.
24. Nicotera P, Lipton SA. Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. J Cereb Blood Flow Metab, 1999; 19(6); 583-91.
25. Yamashita T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. Prog Neurobiol, 2000; 62(3);273-9.
26. Hillered L, Hallström A, Segersvärd S, Persson L, Ungerstedt U. Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. J Cereb Blood Flow Metab, 1989; 9(5);607-16.
27. Davalos A, Shuaib A, Wahlgren NG. Neurotransmitters and pathophysiology of stroke: evidence for the release of glutamate and other transmitters/mediators in animals and humans. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2000; 9(6 Pt 2); 2-8.
28. Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. J Clin Invest, 2000; 106(6); 723-31.
29. Yamashita T, Tonchev AB, Tsukada T, Saido TC, Imajoh-Ohmi S, Momoi T. Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. Hippocampus, 2003; 13(7); 791-800.
30. Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke, 1992; 23(4); 552-9.



31. Salford LG, Plum F, Brierley JB. Graded hypoxia-oligemia in rat brain. II. Neuropathological alterations and their implications. *Arch Neurol*, 1973; 29(4);234-8.
32. Kirdajova DB, Kriska J, Tureckova J, Anderova M. Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells. *Front Cell Neurosci*, 2020; 14; 51.
33. Ghosh A, Sarkar S, Mandal AK, Das N. Neuroprotective role of nanoencapsulated quercetin in combating ischemia-reperfusion induced neuronal damage in young and aged rats. *PLoS One*, 2013; 8(4); e57735.
34. Bouma GJ, Muizelaar JP, Stringer WA, Choi SC, Fatouros P, Young HF. Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *J Neurosurg*, 1992; 77(3); 360-8.
35. Suarez JI. Outcome in neurocritical care: advances in monitoring and treatment and effect of a specialized neurocritical care team. *Crit Care Med*, 2006; 34(9 Suppl);S232-8.
36. Yuan HJ, Zhu XH, Luo Q, Wu YN, Kang Y, Jiao JJ, et al. Noninvasive delayed limb ischemic preconditioning in rats increases antioxidant activities in cerebral tissue during severe ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*, 2012; 174(1);176-83.
37. Li MH, Inoue K, Si HF, Xiong ZG. Calcium-permeable ion channels involved in glutamate receptor-independent ischemic brain injury. *Acta Pharmacol Sin*, 2011; 32(6); 734-40.
38. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 2005; 12(10); 1161-208.
39. Ward JD, Becker DP, Miller JD, Choi SC, Marmarou A, Wood C. Failure of prophylactic barbiturate coma in the treatment of severe head injury. *J Neurosurg*, 1985; 62(3); 383-8.
40. Xiong L. Neuroanesthesia and neuroprotection: where are we now? *Chinese Medical Journal*, 2006; 119(11);. 883-886.
41. Sivenius J, Tuomilehto J, Immonen-Räihä P, Kaarisalo M, Sarti C, Torppa J, et al. Continuous 15-year decrease in incidence and mortality of stroke in Finland: the Finstroke study. *Stroke*, 2004; 35(2); 420-5.
42. Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999; 19(9); 1020-8.
43. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, 1981; 81(1); 22-9.
44. Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther*, 2006; 28(9); 1353-65.
45. Wyatt J. Applied physiology: brain metabolism following perinatal asphyxia. *Current Paediatrics*, 2002; 12(3);227-231.
46. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989; 20(1); 84-91.
47. Lee S, Hong Y, Park S, Lee SR, Chang KT, Hong Y. Comparison of surgical methods of transient middle cerebral artery occlusion between rats and mice. *J Vet Med Sci*, 2014; 76(12); 1555-61.
48. Yang WJ, Wen HZ, Zhou LX, Luo YP, Hou WS, Wang X, et al. After-effects of repetitive anodal transcranial direct current stimulation on learning and memory in a rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem*, 2019; 161; 37-45.
49. Sharifi ZN,, Abolhassani F, Hassanzadeh G, Zarrindast MR, Movassaghi SNeuroprotective Treatment With FK506 Reduces Hippocampal Damage and Prevents Learning and Memory Deficits After Transient Global Ischemia in Rat. *Archives of Neuroscience*, 2013; 1; 35-40.

50. Schmidt HL, Vieira A, Altermann C, Martins A, Sosa P, Santos FW, et al. Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation. *Neurobiol Learn Mem*, 2014;. 114;. 242-50
51. Braun R, Klein R, Walter HL, Ohren M, Freudenmacher L, Getachew K et al. Transcranial direct current stimulation accelerates recovery of function, induces neurogenesis and recruits oligodendrocyte precursors in a rat model of stroke. *Exp Neurol*, 2016; 279;. 127-136
52. Pascual JM, Carceller F, Roda JM, Cerdán S. Glutamate, glutamine, and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1998; 29(5); 1048-56; discussion 1056-7
53. Pulsinelli,WA. The therapeutic window in ischemic brain injury. *Curr Opin Neurol*, 1995; 8(1);3-5
54. Krzyżanowska W, Pomierny B, Filip M, Pera J. Glutamate transporters in brain ischemia: to modulate or not? *Acta Pharmacol Sin*, 2014; 35(4); 444-62
55. Hu Y, Zhan Q, Zhang H, Liu X, Huang L, Li H. Increased Susceptibility to Ischemic Brain Injury in Neuroplastin 65-Deficient Mice Likely via Glutamate Excitotoxicity. *Front Cell Neurosci*, 2017; 11; 110
56. Chen JC, Hsu-Chou H, Lu JL, Chian YC, Huang HM, Wang HL et al. Down-regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 in rat hippocampus and striatum and its modulation by a group III metabotropic glutamate receptor antagonist following transient global forebrain ischemia. *Neuropharmacology*, 2005; 49(5); 703-14
57. Shahjouei S, Cai PY, Ansari S, Shariffar S, Azari H, Ganji S, et al., Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Stroke in Rodents: A Step-by-Step Approach. *J Vasc Interv Neurol*, 2016; 8(5); 1-8

## Aşı epidemiyolojisi: Gözlemsel aşı güvenliliği çalışma tasarımları

### Vaccine epidemiology: Observational vaccine safety study designs

Can Hüseyin HEKİMOĞLU<sup>1</sup> (ID)

#### ÖZET

Bir aşı programının bir toplumda uygulanmaya başlanmasından itibaren aşının etkililiğinin izlemi kadar önemli bir husus da aşı güvenliliğinin izlemidir. Her ne kadar ruhsat öncesi dönemde güvenliliği kanıtlanmış olsa da, toplumda uygulanan aşının güvenliliği ile ilgili endişeler devam edebilir. Aşı programı sürerken toplumun aşı güvenliliği ile ilgili sorularına aşı etkililiği ile ilgili sorulardan daha çabuk yanıt vermek gerekebilir. Farmakovijilans raporları ve aktif sürveyans yoluyla ortaya çıkacak bu endişelerin gözlemsel epidemiyolojik çalışma tasarımları ile giderilmesi veya doğrulanması önemlidir. Ayrıca ruhsat öncesi tespit edilmiş advers etkiler de daha doğru ve kesin bir şekilde belirlenmelidir. Bu nedenle aşı güvenliliğinin gözlemsel çalışmalarla izlenmesi aşı programlarının bir parçası olmalıdır. Geleneksel kohort ve olgu kontrol çalışmalarında yüksek aşı kapsayıcılığı nedeniyle aşısız grup bulmanın ve aşılar ve aşısızlar arasında karşılaştırılabilirliği sağlamanın zorluğu gibi nedenlerle aşı güvenliliğinin ruhsat sonrası dönemde incelenmesi için alternatif tasarımlar geliştirilmiştir. Ancak aşılanmanın uzun dönem advers etkilerinin değerlendirilmesi, kısa dönemde görülen advers etkilerinin değerlendirilmesinden daha zordur. Çünkü aşının uzun dönemdeki advers etkileri

#### ABSTRACT

After a vaccine programme introduced into a population, vaccine safety monitoring is an important issue as much as vaccine effectiveness monitoring. Concerns about vaccine safety may continue in a population after licensure, although vaccine safety was proven before licensure. While a vaccination programme implemented, it may need to respond questions about vaccine safety more quickly than questions about vaccine effectiveness. These concerns that will be revealed by pharmacovigilance reports and active surveillance should be eliminated or verified. In addition adverse events that were detected before licensure should be shown more accurately and more precisely. Therefore vaccine safety monitoring with observational studies should be a part of a vaccine programme. In traditional cohort and case-control studies finding unvaccinated groups is difficult due to high vaccine coverage and providing comparability between vaccinated and unvaccinated groups is rarely possible. Therefore alternative study designs have been developed for vaccine safety monitoring at post-licensure stage. However evaluation of long term adverse events associated with vaccines is more difficult than

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



İletişim / Corresponding Author : Can Hüseyin HEKİMOĞLU

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 21.08.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 03.03.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2021.29567

Hekimoğlu CH. Aşı epidemiyolojisi: Gözlemsel aşı güvenliliği çalışma tasarımları  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(2): 219 - 232

yalnızca aşılı ve aşısızların izlenerek karşılaştırılması ile belirlenebilir. Aşı güvenliliğini değerlendirmek için geleneksel gözlemsel çalışma tasarımlarına alternatif olarak kullanılan çalışma tasarımları ise daha çok kısa dönemde ortaya çıkan ve özellikle nadir advers etkilerin değerlendirilmesini sağlamaktadırlar. Bu tasarımlar; 'risk aralığı tasarımı', 'kendi kendine kontrollü risk aralığı tasarımı', 'kendi kendine kontrollü olgu serisi tasarımı', 'olgu merkezli yaklaşım', 'olgu çaprazlama tasarımı', 'olgu zaman kontrol tasarımı', 'olgu kapsayıcılık tasarımı', 'ekolojik çalışmalar' olarak sayılabilir. Aşı güvenliliği çalışmasında cevap aranan soruya ve mevcut veri kaynaklarına göre bu geleneksel ve alternatif tasarımlar arasından uygun olanın seçilmesi doğru çıkarımlar yapılabilmesi açısından gereklidir. Bu nedenle aşı güvenliliği çalışma tasarımlarının kısıtlılıkları, güçlü yönleri ve varsayımları mutlaka bilinmeli ve göz önünde bulundurulmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Aşı güvenliliği, gözlemsel çalışma tasarımları, aşı epidemiyolojisi

evaluation of short term adverse events. Long term adverse events can only be determined with studying vaccinated and unvaccinated groups over a period of time and comparing them. However alternative designs are used for investigation of short term and rare adverse events. The alternative vaccine safety study designs are 'risk interval design', 'self-controlled risk interval design', 'self-controlled case series method', 'case-centered approach', 'case-crossover design', 'case-time-control design', 'case-coverage design' and 'ecologic studies'. According to the question sought in the vaccine safety study and available data sources, choosing the appropriate one from among these traditional and alternative designs is necessary to make correct conclusions. Therefore limitations, strenghts and assumptions of the vaccine safety study designs should be necessarily known and considered.

**Key Words:** Vaccine safety, observational study designs, vaccine epidemiology

## GİRİŞ

Bir aşı ruhsat almadan önce, aşı etkinliğinin yanı sıra aşı sonrası gelişen advers olayları (aşı sonrası istenmeyen etkileri) incelemek için klinik denemeler (clinical trials) oldukça uygun çalışma tasarımlarıdır. Ancak bu çalışmaların genellikle örneklem büyüklükleri aşıya bağlı nadir advers olayları incelemek için yetersiz kalmaktadır. Örneğin 2.000 birey üzerinde yürütülen bir randomize kontrollü klinik deneme 10.000'de 1 insidansı olan bir advers olayın aşı ile ilişkisinin ortaya çıkarılması için yeterli güce sahip olmayacaktır. Ruhsat öncesi yürütülen klinik denemelerde gözden kaçan bu nadir advers olaylar, ruhsat sonrası dönemde aşı güvenliliği ile ilgili endişelere neden olabilmektedir. Farmakovijilans raporları ve aktif süreyans yoluyla ortaya çıkacak bu endişelerin gözlemsel epidemiyolojik çalışma

tasarımları ile giderilmesi veya doğrulanması önemlidir. Ayrıca ruhsat öncesi belirlenmiş olan aşıya bağlı advers etkilerin daha doğru ve kesin bir şekilde ortaya konması gerekir. Bu nedenle aşı programlarının olmazsa olmaz bir parçası da aşı güvenliliğinin izlemidir (1-3).

Geleneksel kohort ve olgu kontrol çalışma tasarımları kullanılarak aşı ile advers olay arasındaki ilişkiyi incelemenin, yüksek aşı kapsayıcılığı nedeniyle aşısız grup bulmanın zorluğu veya aşısızların aşılılardan ilgili advers olayın görülmesini etkileyebilecek özellikler açısından sistematik olarak farklı olmaları gibi, bazı zorlukları vardır. Bu zorluklar nedeniyle aşı güvenliliğinin ruhsat sonrası dönemde incelenmesi için geleneksel gözlemsel çalışma

tasarımlarına alternatif tasarımlar geliştirilmiştir (1-4). Bu derlemenin amacı aşı güvenliliği konusunda kullanılabilir geleneksel ve alternatif gözlemsel çalışma tasarımlarının açıklanmasıdır.

### 1. Gözlemsel Aşı Güvenliliği Çalışma Tasarımlarına Genel Bakış

Aşıların toplumda uygulanmaya başlamasından sonra da devam eden aşı güvenliliği izleminde yürütülecek gözlemsel çalışmanın tasarımına karar vermeden önce, güvenlik ile ilgili endişenin ne olduğu net bir şekilde belirlenmeli ve kullanılabilir veri kaynakları göz önünde bulundurulmalıdır. Güvenlik sorusunun tanımlanması için ilk önce test edilecek hipotezin belirli bir aşı tipi ile mi, benzer aşı sınıfındaki tüm aşılarla maruziyetle mi ilgili olduğunun ayırımının yapılması gerekir (1). Örneğin advers olayın özellikle kabakulak bileşeni Urabe suşu olan bir kızamık kızamıkçık kabakulak (KKK) aşısı ile ilişkisi incelenmek istenebilir (5). Advers olayın tanımı da tasarıma karar verilmeden önce net bir şekilde yapılmış olmalıdır. Örneğin incelenmek istenen advers olay immun trombositopenik purpura olabileceği gibi, trombositopeni de olabilir (1,6,7). Advers olayın belirsiz olması, olgu tanımının geçerliliğinin azalmasına ve böylece çıkarımlarda yanlılığa (bias) yol açabilir. Aşılamadan sonra görülen advers olay için riskin belirli bir zaman diliminde ve geçici olduğu durumlarda ise risk periyodunun ayrıca tanımlanması gerekir (1). Advers olay görülme riski aşılamadan sonra, örneğin yalnızca 2 haftada veya 6 haftada artıyor ve sonrasında ortadan kalkıyor olabilir (8,9). Risk periyodunun önceden belirlenmemesi de olgu tanımının özgüllüğünün azalmasına yol açar (1).

Bir aşı güvenliliği sorusunu yanıtlamada kullanılacak çalışma tasarımını seçerken diğer bir önemli nokta mevcut veri kaynaklarının neler olduğudur. Veri kaynağının toplumdaki olguları belirleyebilmesi ve ayrıca maruziyet bilgisini de sağlayabilmesi gerekir. Güvenlik sorusunun yanıtlanmasında zamanındalık büyük bir önem taşıdığı için longitudinal bir kohort çalışması tasarlamak pratik değildir. Bu nedenle çeşitli

mevcut rutin veri kaynaklarından yararlanılabilir. Bunlar; aşılama kayıtları, hastane kayıtları, birinci basamak sağlık hizmetleri kayıtları, sağlık hizmetleri veri tabanları, sağlık güvencesi verileri, sörveyans verileri ve mevcut longitudinal kohort çalışmalarıdır. Kullanılan veri kaynağının kısıtlılıkları mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. Veri tabanının büyüklüğü, verilerin kalitesi, olası karıştırıcılara ilişkin verilerin mevcudiyeti, olguları belirlemek için kullanılan tanı kodlarının duyarlılığı ve özgüllüğü, toplumu temsil edebilirliği, etik konular ve verilerin kullanımı için gerekli izinler veri kaynağı seçimindeki önemli noktalardır (1).

Seçilecek gözlemsel tasarım hangisi olursa olsun aşılanma (maruziyet) ve advers olayların (sonuç) belirlenmesindeki yanlılık, aşılanma ile advers olay arasındaki ilişkinin tahminini etkiler. Toplum tabanlı rutin veri kaynaklarının kullanılması aşılanmanın ve olguların belirlenmesindeki yanlılığı azaltmanın bir yolu olabilir. Ancak test edilecek hipotezin yaygın olarak bilindiği durumlarda bu tip bir yanlılığa eğilim olabilir. Aşılanma bilgisinin bireylere sorularak elde edilmesi yerine aşılama kayıtlarının kullanılması tercih edilmesi bir çözüm önerisi olabilir. Bu durumda ise olası karıştırıcı değişkenlere ait eksik veriler bir sorun olarak karşımıza çıkabilir. Olası karıştırıcı faktörleri ele almak için veriler mevcut değilse bile bu karıştırıcıların nasıl bir yanlılığa neden olabileceğini anlamak önemlidir (1).

Çalışmanın gücünü etkileyen başka bir etmen ise olgu tanımının özgüllüğüdür. Olgu tanımının özgüllüğünün azalması, olguların ve olgu olmayanların yanlış sınıflandırılmasına yol açar ve aşılanma durumuna göre ayrımsal olmadıkça, etkinin gerçek büyüklüğünü düşürebilir (10,11). Rutin veri tabanlarında kullanılan olgu kodları ile olgu bildirimini geçerliliğinin yüksek olması her zaman sağlanamayabilir ve eğer çok fazla sayıda olgu varsa pahalı olabilir. Ancak olgu tanımına yanlılığın büyüklüğünü değerlendirebilmek için, veri tabanında kullanılan olgu kodlamasının özgüllüğü en azından olguların bir örnekleme üzerinde

belirlenebilir. Olgu tanımının özgülüğünün ayrımsal olmayan düşüklüğü ilişkinin boyutunu azaltsa bile atfedilen risk yüzdesi tahminini etkilemeyeceği unutulmamalıdır. Ayrıca aşı güvenliliği çalışmaları için özellikle önemli olan diğer bir nokta ise ilgili advers olayın başladığı zamanın belirlenmesidir. Bu tarih akut ve şiddetli advers olaylar için genellikle daha açık olsa da, bazen, örneğin otizm gibi durumlarda, başlangıç zamanını belirlemek kolay olmayabilir. Ayrıca aşılama zamanının yanlış sınıflandırması da yanlılığa neden olacaktır (1).

## 2. Geleneksel Gözlemsel Aşı Güvenliliği Çalışma Tasarımları

Aşı güvenliliği alanında da geleneksel gözlemsel epidemiyolojik çalışma tasarımları olan olgu kontrol ve kohort tasarımları sık kullanılmaktadır.

### 2.1. Kohort çalışması

Aşı güvenliliğini değerlendirmek için yürütülen kohort çalışmalarında aşıllılar ve aşısızlar veya başka bir aşıyla aşılanmış bireyler belirli bir zaman periyodu boyunca izlenerek advers olayın insidansı veya insidans hızı açısından karşılaştırılırlar (4). Bu çalışmalarla rölatif risk, mutlak risk ve atfedilebilir risk hesaplanabilmesi önemli bir üstünlüktür (2,4). Kohort çalışmaları nadir maruziyetleri ve bir maruziyetin birçok sonucunu incelemek açısından oldukça uygun çalışmalardır ancak sonuç nadir olduğunda uygulanması zor ve pahalıdır. Çünkü yeterli sonuç sayısına ulaşabilmek için çok büyük kohortlar gerekecektir (2,4,12). Ayrıca aşı güvenliliği çalışmaları genellikle yüksek aşı kapsayıcılığı olan toplumlarda yürütüldüğü için yeterli aşısız birey sayısına ulaşmak da güçtür. Bu çalışmalardaki diğer olası bir sorun ise aşı etkililiği çalışmalarında olduğu gibi aşı ve aşısız grupların karşılaştırılabilirliğinin sağlanabilmesinin zorluğudur (4,12,13). Kohort çalışmalarından türetilmiş olan yuvalandırılmış olgu kontrol çalışmaları ("nested case-control") ise advers olaylar gibi nadir sonuçlar için daha uygun ve ucuz çalışmalardır ve ayrıca olgular kontrollerle yaş ve takvim zamanına göre eşleştirildiği için zamanla

değişen karıştırıcıların da kontrolü sağlanabilir (12).

Advers olay gelişimi açısından kohortların izlemi retrospektif veya prospektif olabilir. Uygulamada daha çok retrospektif çalışmalar görülmektedir (2,4). Retrospektif kohort çalışmalarında kullanılan rutin veri kaynaklarının çok geniş olması gerekir ve genellikle bu veri kaynaklarında karıştırıcılara ait bilgiler bulunmaması önemli bir kısıtlılıktır (1).

Amerika Bileşik Devletleri'nde pentavalan rotavirus aşısının (RV-5) infantlarda uygulanmasının ardından invajinasyon gelişimi riskinin araştırıldığı bir kohort çalışmasında, yaklaşık dört yıllık bir sürede aşı güvenliliği veri tabanında olan infantlar kohortu oluşturmuştur. Infantlar 4-34. haftada RV-5 ile aşılananlar ve RV-5 dışındaki aşılarla aşılananlar olarak iki gruba ayrılarak, aşılanmadan itibaren 30 gün süresinde invajinasyon gelişimi açısından karşılaştırılmışlardır. Analizler tüm dozlar, 1., 2. ve 3. dozlar için ayrı ayrı yapılmış ve ayrıca 0-7. günde invajinasyon gelişimi riskleri de değerlendirilmiştir. Toplam 257.915 ikinci doz RV-5 sonrası 0-30. günde 4 invajinasyon gözlenirken, RV-5 dışındaki toplam 114.385 aşı dozu sonrası 0-30. günde 5 invajinasyon gözlenmiştir. Rölatif risk =  $(4 / 257.915) / (5 / 114.385) = 0,354$  (%95 GA: 0,07 - 1,65) bulunmuştur (13).

### 2.2. Olgu kontrol çalışması

Aşı güvenliliği çalışmalarında kullanılan olgu kontrol çalışma tasarımlarında aynı toplumdan seçilmiş advers olay görülen (olgu) ve görülmeyen (kontrol) bireylerde aşılama 'tahmini rölatif risk (odds)'leri karşılaştırılmaktadır. Advers olaylar gibi nadir görülen sonuçları incelemek için olgu kontrol çalışmaları kohort çalışmalarına göre daha ekonomiktir. Ayrıca nadir olaylar için bu çalışmalardan elde edilen odds ratio (OR), rölatif riske çok yakındır. Ancak bu çalışmalarda olgulara uygun kontrollerin seçilmesindeki güçlük önemli bir kısıtlılıktır. Eşleştirme ile karıştırıcıların kontrolü sağlanabilir (1,4).

Trivalan inaktif influenza aşısı ile spontan abortus arasındaki ilişkiyi incelemek için yürütülen bir olgu

kontrol çalışmasında 2005-2006 yılında 5-16 haftada spontan abortus yapan 18-44 yaş arası kadınlar olgu grubu olarak alınmıştır. Kontrol grubu olarak ise her bir olgu ile aynı sağlık kurumunda canlı doğum yapan ve son adet tarihi aynı olan kadınlar alınmıştır. Spontan abortus öncesi 28 gün içinde aşılanmış olmak maruziyet olarak kabul edilmiştir. Olguların eşleştirilmiş kontrollerinde de aynı tarihlerde aşılanmış olanlar maruz olarak değerlendirilmiştir. Çalışmadaki 243 olgunun 17'si, 243 kontrolün ise 15'inin maruz olduğu belirlenmiştir. 'Conditional' lojistik regresyon yöntemiyle anne yaşı, sağlık hizmeti kullanımı, maternal diyabetes mellitus varlığı ve doğum sayısına göre düzeltilmiş OR = 1,23 (%95 GA: 0,53 - 2,89; P=0,63) bulunmuştur (14).

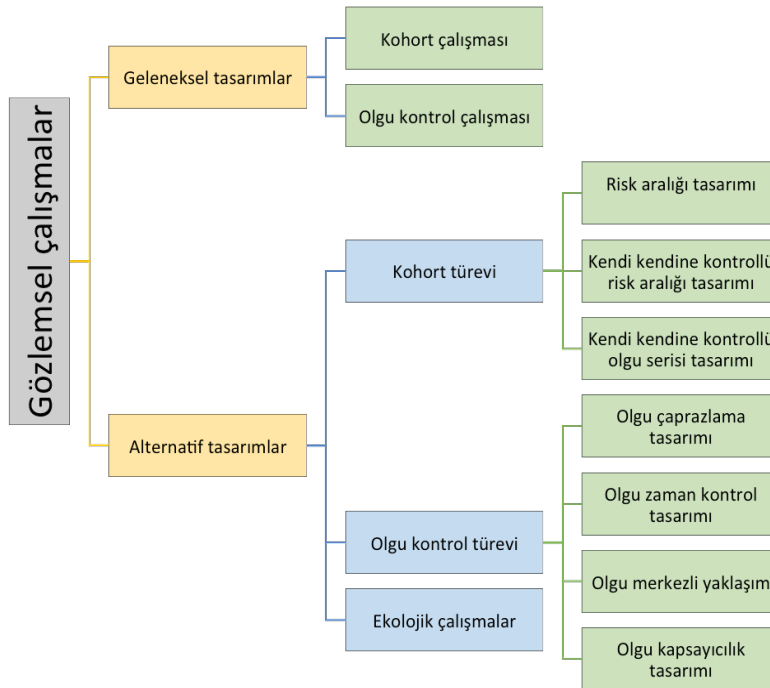
### 3. Alternatif gözlemsel aşı güvenliliği çalışma tasarımları

Bir aşı programı sürerken toplumun aşı güvenliliği ile ilgili sorularına aşı etkililiği ile ilgili sorulardan

daha çabuk yanıt vermek gerekebilir. Ancak aşılamanın uzun dönemdeki advers etkilerinin değerlendirilmesi, daha kısa dönemde ortaya çıkan advers etkilerinin değerlendirilmesinden daha zordur. Çünkü uzun dönemdeki advers etkiler yalnızca aşı ve aşısızların izlenerek karşılaştırılması ile çalışılabilir. Aşı güvenliliğini değerlendirmek için geleneksel gözlemsel çalışma tasarımlarına alternatif olarak kullanılan çalışma tasarımları ise kısa dönemde ortaya çıkan ve özellikle nadir advers etkilerin değerlendirilmesini sağlamaktadırlar. Bu alternatifler 'risk aralığı tasarımı', 'kendi kendine kontrollü risk aralığı tasarımı', 'kendi kendine kontrollü olgu serisi tasarımı', 'olgu merkezli yaklaşım', 'olgu çapraz kontrol tasarımı', 'olgu zaman kontrol tasarımı', 'olgu kapsayıcılık tasarımı' ve 'ekolojik çalışmalar' olarak sayılabilir (Şekil 1) (1-4, 15-19) .

#### 3.1. Risk aralığı tasarımı (= Aşılı kohort)

Risk aralığı (risk interval) tasarımı kohort çalışmasından türetilmiş bir tasarımdır. Kohort çalışmalarına olan temel üstünlüğü yalnızca aşı



Şekil 1. Aşı etkililiği için gözlemsel epidemiyolojik çalışma tasarımlarının sınıflandırılması

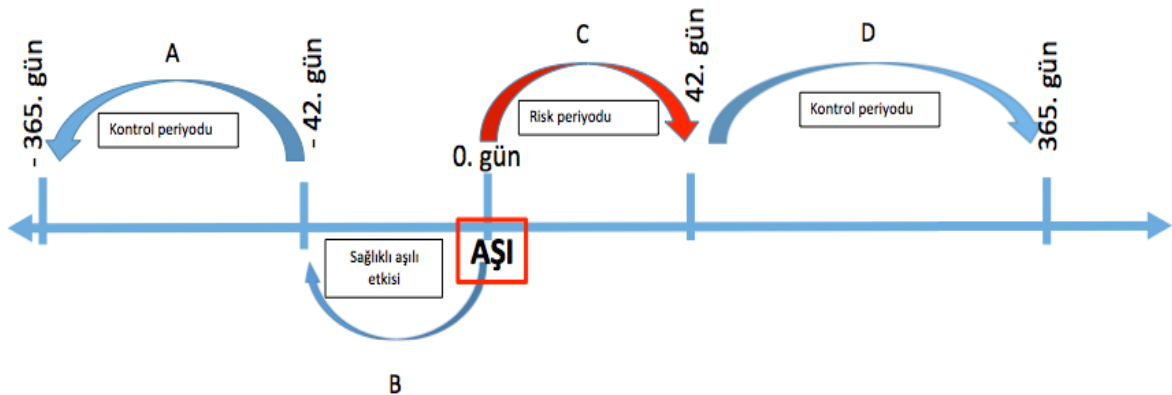
bireylerin analizde yer almasıdır. Böylece aşılar ve aşısızlar arasındaki ölçülmemiş karıştırıcılara bağlı yanlılık önlenerek, kohort çalışmalarındaki aşı ve aşısız bireylerin karşılaştırılabilirliği ile ilgili kısıtlılık aşılmış olur. Çünkü bu çalışma tasarımında aynı bireyler farklı zaman aralıkları temelinde karşılaştırılmaktadır. Bu çalışmaların başında aşıdan sonra advers olayın gelişme riskinin artmış olduğu düşünülen bir 'risk periyodu' belirlenir. Bu periyod 0-14. gün veya 0-6. hafta gibi bir zaman aralığıdır. Tümü aşı olan kohortun risk periyodundaki advers olay insidansı ile kontrol periyodundaki insidans karşılaştırılır. Kontrol periyodundaki risk aşıllardaki bazal riske karşılık gelir. Kontrol periyodu, aşılama öncesi veya sonrasındaki bir zaman aralığı olabilir. Aşılanmanın hemen öncesinde seçilecek bir kontrol periyodu, ilgili advers olay gelişimi açısından daha düşük riskli olabilir. Çünkü advers olayın varlığı aşılanmanın ertelenmesine neden olabilmektedir. Bu 'sağlıklı aşı etkisi'ni ele almak için aşılanmanın hemen öncesindeki belirli bir zaman aralığı kontrol periyodu içerisinde çıkarılabilir (Şekil 2). Ayrıca genellikle aşılama sonrasındaki riskin zaman içindeki dağılımının bilinmemesinden dolayı aşıya bağlı olan riskin bir kısmı kontrol periyodu içine kayabilir. Bunun önüne geçebilmek için risk periyodundan sonra bir arındırma dönemi (washout period) de belirlenebilir (Şekil 2) (4,12,20). Çalışmaya aşılama öncesi ve risk

periyodu sonrası kontrol periyodu da dahil edildiği için bu tasarım akut ve kendi kendini sınırlayan advers olayların incelenmesi için uygundur (12).

Çocuklarda kızamık kızamıkçık kabakulak (KKK) aşılanması sonrası immün trombositopenik purpura (ITP) riskini belirlemek için risk aralığı tasarımı kullanılan bir çalışmaya KKK aşısı olan 12-23 aylık çocuklar dahil edilmiştir. Aşılanma tarihi 0. gün olmak üzere, 0-42. günler risk periyodu olarak tanımlanmıştır. Kontrol periyodu ise aşılama sonrası 42-365. ve aşılama öncesi 42-365. günler olarak belirlenmiştir. Aşı öncesi 0-42. günler ise sağlıklı aşı etkisini göz önünde bulundurmak için analize dahil edilmemiştir. Risk periyodundaki toplam kişi-gün yaklaşık 45 milyondur ve 20 ITP olgusu gözlemlenmiştir. Risk periyodundaki ITP insidans hızı =  $20 / 45 \text{ milyon} = 0,11 / 1 \text{ milyon}$  olarak bulunmaktadır. Kontrol periyodundaki toplam kişi-gün ise yaklaşık 405 milyondur ve 43 ITP olgusu gözlemlenmiştir. Kontrol periyodundaki ITP insidans hızı =  $43 / 405 \text{ milyon} = 0,44 / 1 \text{ milyon}$  olarak bulunmaktadır. İnsidans hızları oranı (rölatif risk) ise  $0,44 / 0,11 = 4,0$ 'dır. Atfedilen risk yüzdesi ise  $(0,44 - 0,11) / 0,44 = 0,75$  (%75) olarak bulunmuştur (21).

### 3.2. Kendi kendine kontrollü risk aralığı tasarımı

Risk aralığı tasarımının bir türevi olan kendi kendine risk aralığı (self-controlled risk interval)



Şekil 2. Risk aralığı tasarımının şematik gösterimi



tasarımında aşılı olup advers olay gelişenler, yani aşılı olgular, analiz edilerek risk tahmin edilir. Risk aralığı tasarımında olduğu gibi aynı bireylerin risk ve kontrol periyodlarındaki advers olay insidansları karşılaştırıldığı için zamanla değişmeyen karıştırıcıların kontrolü sağlanmış olur. Ancak bu tasarımda farklı olarak aşılı olup advers olay gelişmeyenler, analize dahil olmadıkları için, toplam kişi-zamana katkı sağlamazlar. Her aşılı olgu maruz ve maruz olunmayan kişi-zamana katkı sağlamış olur. Maruz ve maruz olunmayan zaman periyodlarındaki insidans hızlarının oranı (risk periyodundaki insidans hızı / kontrol periyodundaki insidans hızı) rölaf insidans hızını verir. Oysa risk interval tasarımında advers olay gelişmeyen aşılılar kontrol periyodundaki kişi-zaman paydasında yer almaktadırlar. Kendi kendine kontrollü risk aralığı tasarımında da aşılama tarihi risk ve kontrol periyodlarının belirlenmesinde indeks tarih olarak kullanılmaktadır. Bu tasarım aşılama sonrası iyi tanımlanmış geçici risk aralıkları olan advers olayların incelenmesi için uygundur ve kendi kendine kontrollü olgu serisi tasarımının daha basit bir alternatifi olarak da düşünülebilir (3,4).

Amerika Birleşik Devletleri'nde infantlarda rotavirüs aşısı sonrası invajinasyon riskini belirlemek için yürütülen bir kendi kendine kontrollü risk aralığı tasarımında, Ocak 2004-Eylül 2011 arası 5-36,9 haftalık ve aşılardan itibaren 42 gün izlem süresi olan aşılı infantlar belirlenerek; içlerinde bu 42 günlük sürede invajinasyon gelişenler çalışma grubunu oluşturmuştur. Risk periyodu aşılardan itibaren 0-21. gün ve kontrol periyodu 22-42. gün olarak alınmıştır. Toplam 1.277.556 doz RV-5 yapılmış ve toplam 124 invajinasyon gelişmiştir. Bu olgular içinde 0-42. günde invajinasyon görülenlerin sayısı 30'dur. Aşılama ile invajinasyon riski bu 30 olgu üzerinden analiz edilmiştir. Risk periyodunda 17 invajinasyon ve kontrol periyodunda 13 invajinasyon gözlenmiştir. Risk ve kontrol periyodunun süresi eşit olduğu için kaba rölaf insidans hızı =  $17 / 13 = 1,307$  olarak bulunur. Çalışmada yaşa göre düzeltilmiş rölaf insidans hızı =  $1,6$  (%95 GA: 0,8 - 3,3) olarak bulunmuştur (18).

### 3.3. Kendi kendine kontrollü olgu serisi tasarımı

Kendi kendine kontrollü olgu serisi (self-controlled case-series) tasarımı, kohort ve olgu kontrol çalışma tasarımları ile birlikte aşı güvenliliği alanında en yaygın kullanılan epidemiyolojik yöntemlerden birisidir. Yalnızca advers olay gelişen bireylerin (olgu) verilerinin elde edilebildiği durumlarda aşı güvenliliği değerlendirmeleri için geliştirilmiştir. Aşılıların tespit edilmesinin zor ve advers olayın nadir olduğu durumlarda avantajlıdır (1,4). Bu tasarım kohort tasarımının basitliği, gücünü ve olgu kontrol tasarımının ekonomikliğini biraraya getirmektedir (12,22). Genellikle gözlem periyodu içindeki aşılama yaşındaki değişkenlik arttıkça tasarımın gücü de artmaktadır (23). Olguların tanımlanmasını ve aşılama tarihlerinin bilgisini gerektiren bu yöntem temel olarak kohort tasarımından türetilmiştir (2,23). Kendi kendine kontrollü risk aralığı tasarımında olduğu gibi aynı bireylerin risk ve kontrol periyodlarındaki insidans hızları karşılaştırılmaktadır ancak çalışma tabanı aşılılar ve aşısızlar dahil tüm olgularla kısıtlıdır (4,12). Böylece her aşılı olgu hem maruz olunan hem de maruz olunmayan kişi-zamana katkıda bulunurken, aşısız olgular maruz olunmayan kişi-zamana katkıda bulunurlar. Bununla birlikte tasarım kendi kendine kontrollü risk aralığı tasarımında olduğu gibi yalnızca aşılı olgularla da yapılabilir (4). Kendi kendine kontrollü risk aralığı tasarımından temel farkı ise gözlem periyodunun olmasıdır. Kendi kendine kontrollü olgu serisi tasarımında önceden belirlenmiş, aşılama tarihinden bağımsız bir gözlem periyodu vardır. Bu gözlem periyodunda tespit edilen tüm olgular çalışmaya alınır. Risk periyodu kendi kendine kontrollü risk aralığı tasarımında olduğu gibi önceden tanımlanır, ancak kontrol periyodu tüm gözlem periyodunun risk periyodu haricinde kalan kısmıdır. Eğer olgu aşısız ise tüm gözlem periyodu kontrol periyodu olarak analize girer. Sağlıklı aşılı etkisini hesaba katmak için aşılama öncesi belirli bir zaman aralığı analizden dışlanabilir (1,4). Tasarımın önceden belirlenmiş bir gözlem periyodu kullanmasının temel avantajı çoklu ve tekrarlayan

bağımsız maruziyetlerin değerlendirilmesine olanak sağlamasıdır (4). Bu yöntem de kendi kendine kontrollü olduğu için zamanla sabit değişkenlerden kaynaklanan karıştırıcılığı kontrol etse de, zamanla değişen değişkenlerden kaynaklanan karıştırıcılıktan daha fazla etkilenmektedir. Çünkü gözlem periyodu genellikle diğer alternatif çalışma tasarımlarındaki analize alınan periyotlardan daha uzundur (3,4).

Kendi kendine kontrollü olgu serisi tasarımının kullanıldığı bir çalışmada KKK aşısı sonrası konvülzyon riski değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 1 Nisan 1997 ile 30 Eylül 1998 tarihleri arasında konvülzyon tanısı alan ve tanı tarihi öncesi ve sonrası 60 gün içinde KKK aşısı olan 12-23 aylık çocuklar çalışmaya alınmıştır. Toplam 1260 çocuk nöbet geçirmiştir ve bu çocuklarda toplam 1305 epizod görülmüştür. Aşılamadan itibaren 6-11. gün ve 15-35. günler olarak iki risk periyodu tanımlanmış, sağlıklı aşıli etkisini hesaba katmak için -1.ile-14. günler dışlanmıştır. Gözlem periyodu -60 ile 60. günler olmak üzere toplam 121 gündür. Bu 121 günün -1 - -14., 6-11. ve 15-35. Günleri dışında kalan tüm zamanlar kontrol periyodunu oluşturmaktadır. Sağlıklı aşıli etkisi döneminde 12, birinci risk periyodunda 93 ve ikinci risk periyodunda 79 olgu saptanmıştır. Kontrol periyodunda ise toplam 1.121 olgu bulunmaktadır. Kontrol periyodu referans alınarak 'conditional' lojistik regresyon analizi ile rölatif insidans sağlıklı aşı etkisi periyodu için 0,31 (%95 GA: 0,18-0,53), birinci risk periyodu için 4,62 (%95 GA: 3,68-5,80) ve ikinci risk periyodu için 1,08 (%95 GA: 0,85-1,38) bulunmuştur. Bu analize göre kontrol periyoduna göre sağlıklı aşıli etkisi periyodunda risk düşük, birinci risk periyodunda risk artmış ve ikinci risk periyodunda ise risk değişmemiştir (2).

Kendi kendine kontrollü olgu serisi tasarımının kullanıldığı başka bir çalışmada ise influenza aşısı sonrası inme riski değerlendirilmiştir. 'Genel pratisyenler araştırma veri tabanı'na kayıtlı, 1 Eylül 2001 ile 31 Ağustos 2009 tarihleri arasında inme tanısı alan 18 yaş üstündeki ve en az 1 kez influenza aşısı olanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Her bir birey ilk

aşılama tarihinden 31 Mayıs 2009 tarihine kadar, bu tarihten önce izlemden çıkarılan izlemden çıktıkları tarihe kadar ve ölenler ise ölüm tarihine kadarki süre boyunca çalışmada yer almıştır. Aşılama öncesi 14 gün sağlıklı aşıli etkisi periyodu olarak, aşılamadan sonraki 1-3., 4-7., 8-14., 15-28., 29-59., 60-90., 91-120 ve 121.-180. günler arası ise risk periyodları olarak belirlenmiştir. Her bir birey için bu periyotlar dışındaki tüm süre kontrol periyodu olarak alınmıştır. Birden fazla kez aşılanmış olanların her aşı sonrası risk periyodları ayrıca belirlenmiştir. Kontrol periyodunda toplam 53.738 kişi-yılda 10.001 olgu kaydedilirken, sağlıklı aşıli etkisi periyodunda 2.983 kişi-yılda 334 ve 1-3. gün risk periyodunda 733 kişi-yılda 72 olgu kaydedilmiştir. Buna göre insidans hızları kontrol periyodunda =  $10.001 / 53.738 = 0,186$ , sağlıklı aşıli etkisi periyodunda =  $334 / 2.983 = 0,124$  ve 1-3. gün risk periyodunda  $72 / 733 = 0,098$  bulunmaktadır. Kontrol periyoduna göre insidans hızları oranı ise sağlıklı aşıli etkisi periyodunda =  $0,124 / 0,186 = 0,66$  ve 1-3. gün risk periyodunda  $0,098 / 0,186 = 0,526$  olarak bulunmaktadır. Ancak olguların kendi kendilerinin kontrolü olduğu dikkate alınmalıdır. Bu nedenle araştırmacılar 'conditional' Poisson regresyon yöntemi ile mevsimselliğe göre düzeltilmiş insidans hızları oranlarını (IRR) hesaplamışlardır. Buna göre kontrol periyodu referans alınarak, sağlıklı aşıli etkisi periyodunda düzeltilmiş IRR = 0,55 (%95 GA: 0,49-0,61) bulunmuştur. Bu periyotta riskin kontrol periyoduna göre düşük çıkması sağlıklı aşıli etkisiyle uyumludur. 1-3. gün risk periyodu için düzeltilmiş IRR hesaplandığında ise = 0,45 (%95GA: 0,36-0,57) bulunmuştur. Diğer bir ifade ile influenza aşısı olmak bu grupta inme riskine karşı aşılama sonrası 1-3. günlerde koruyucudur. Diğer risk periyodları için de aynı analizler yapıldığında ise 60. güne kadar olan tüm risk periyotlarında influenza aşısının inmeye karşı koruyucu olduğu görülmektedir. 60-180. günler arasındaki risk periyotlarında ise bu koruyucu etki görülmemektedir (24).

### 3.4. Olgu merkezli yaklaşım

Başlangıçta aşı etkililiğini değerlendirmek için geliştirilen olgu merkezli (case-centered) yaklaşım aslında bir olgu serisi yöntemidir (25-27). Bu yaklaşım özellikle mevsimsellik gibi zamanla değişen değişkenlere bağlı karıştırıcılığı ele almak için ruhsat sonrası aşı güvenliliği çalışmalarında kendine yer bulmuştur (4,19,25,28-30). Olgu merkezli yaklaşımla ya olgu kontrol tasarımında olduğu gibi advers olay tarihinden geriye doğru ya da kohort tasarımında olduğu gibi aşılama tarihinden ileriye doğru inceleme yapılabilir. Geriye doğru bakıldığında olgularda advers olayın başlangıç tarihi öncesindeki bir risk periyodunda aşılama olmanın genel toplumdaki benzer bireylere göre daha fazla olup olmadığı incelenir (4). Diğer bir ifade ile advers olay görülenlerde, önceden belirlenmiş bir risk periyodunda aşılama olma odds'nin beklenenden daha yüksek olup olmadığı incelenir (19). İleriye doğru bakıldığında ise önceden belirlenmiş aşılama sonrası bir risk periyodunda advers olay gelişmesinin aşılanma genel toplumdaki benzer bireylere göre daha yüksek olasılıkta olup olmadığını inceler (4). Bağımlı değişken her olguda advers olayın risk intervali içinde meydana gelip gelmediğini gösterir. Burada kilit öngördürücü değişken ise her advers olayın başladığı tarihte risk setinin risk periyodu içinde aşılama olma oranıdır. Risk setlerini takvim zamanına demirleyerek, zaman bağımlı değişkenlerden kaynaklanan karıştırıcılık kontrol edilir. Risk setleri başka karıştırıcıları da ele almak için olası karıştırıcılar açısından benzer olan aşılanma kısıtlanabilir (4).

Her olgu için beklenen aşılama oranları hesaplanarak, logaritmaları lojistik regresyon modeline girilir. Regresyon denkleminde olgular arasında risk periyodu içinde gözlenen aşılama olasılığı (P1) ve olgular arasında risk periyodu içinde beklenen aşılama olasılığı (P0) ve bir kesim noktası (B) (intercept) yer almaktadır. OR bu B kullanılarak elde edilir (20). Bireysel düzeydeki değişkenlerin kontrolünün modele eklenerek değil, tabakalandırma ile yapılması ise bu tasarımın analizinde bir kısıtlılıktır (4).

Çocuklarda aşılama ile Bell paralizisi riskini inceleyen bir çalışmada olgu merkezli analiz kullanılmıştır. Kaynak toplum olarak Kuzey California'daki sağlık hizmetleri sistemine kayıtlı 18 yaş üzerindeki bireyler, çalışma grubu olarak ise sistemde kayıtlı olan ve 2001-2006 boyunca Bell paralizisi tanı kodu olan ve paralizinin başlangıcından önceki 1 yıl içinde en az 1 kez aşılama olmuş olanlar alınmıştır. Risk periyodları paralizinin başlangıcından önceki 1-14., 1-28. ve 29-56. günler olarak belirlenmiştir. Beklenen aşılama oranlarının hesaplanması için, her bir olguda Bell paralizisinin geliştiği tarihte o olguya yaş ve cinsiyet açısından benzeyen kaynak toplumdaki bireyleri içeren bir risk seti oluşturulmuştur. Olguların kendilerinin de dahil olduğu bu risk setinde aşılama oranı hesaplanmıştır. Bu oran her bir olgunun risk periyodu içinde beklenen aşılama olasılığıdır. Analizler trivalan influenza aşısı, hepatit B aşısı ve herhangi bir aşı için ayrı ayrı yapılmıştır. Farzedelim ki 5 yaşındaki bir kız çocuğunda 20 Ocak 2006'da Bell paralizisi gelişmiş olsun ve bu çocuk 10 Ocak 2006'da belirli bir aşı ile aşılama olsun. Gözlem periyodu bu olguda paralizi gelişiminden önceki bir yıl, yani 20 Ocak 2005 ile 20 Ocak 2006 tarihleri arası, olmaktadır. Bu olgu için bağımlı değişken, yani gözlenen aşılama durumu, olgu paralizi gelişiminden 10 gün önce, yani 1-14. gün risk periyodu içinde aşılandığı için 1'dir. 'Offset term' olarak modele alınacak olan beklenen aşılama durumu ise kaynak toplumdaki tüm 5 yaşındaki kız çocukları içinde olgunun paralizi geliştiği tarihten önceki 1-14. günde aşılama olmuş olanların oranıdır. Bu çalışmada olguların üçü risk periyodu içinde, 54'ü ise risk periyodu dışında hepatit b aşısı ile aşılama olmuştur. OR lojistik regresyonla 1.3 (%95 GA: 0.4 - 4.5) bulunmuştur (19).

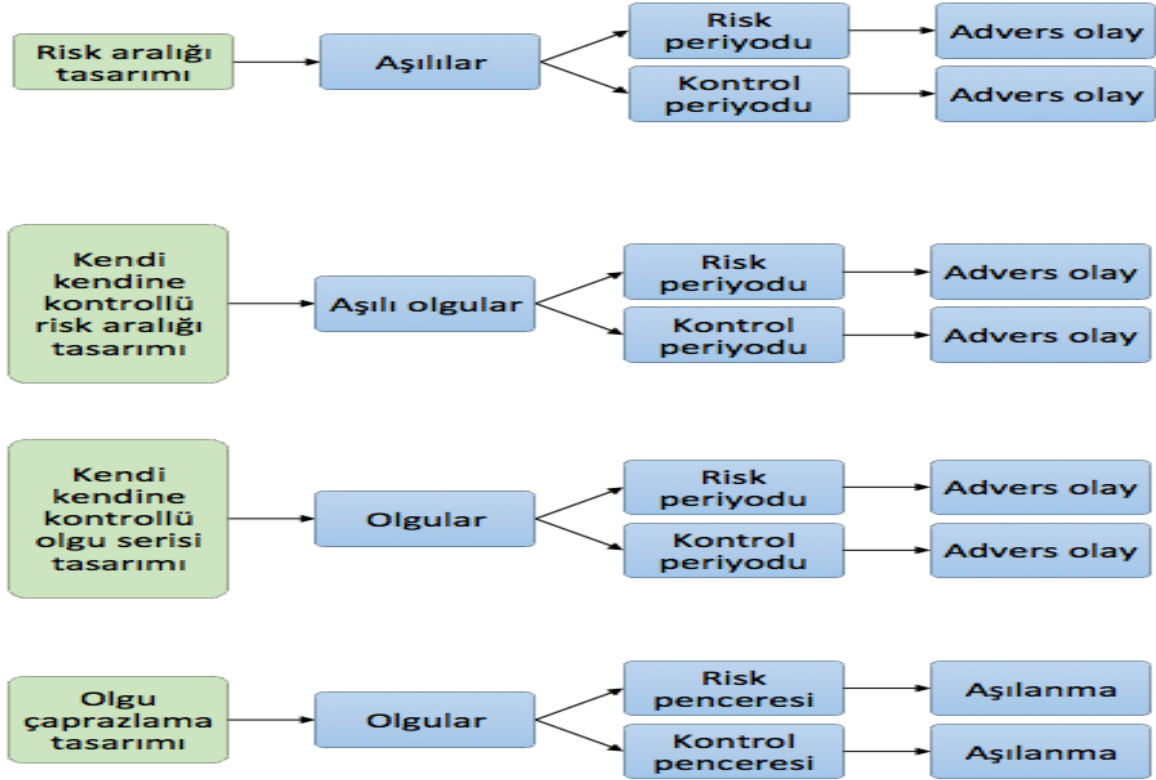
### 3.5. Olgu çaprazlama tasarımı

Olgu çaprazlama (case-crossover) tasarımı geçici maruziyetlerin akut gelişen sağlık sonuçlarına etkisini araştırmak için geliştirilmiştir. Tasarım aşı güvenliliği dışındaki alanlarda da kullanılmaktadır.

Örneğin fiziksel efor, kokain kullanımı, öfke gibi maruziyetlerin miyokard infarktüsü gelişimi üzerine tetikleyici etkisinin incelenmesi için kullanılmıştır (31, 32). Olgu çaprazlama tasarımı eşleştirilmiş olgu kontrol çalışma tasarımına benzemektedir. Olgu çaprazlama tasarımının kohort tasarımından türetilmiş alternatif tasarımlarla karşılaştırmalı şeması Şekil 3'te gösterilmiştir. Her bir olguda advers olay gelişmeden önceki risk ve kontrol pencerelerinde aşılmanın olup olmadığı belirlenir ve risk ve kontrol pencerelerindeki aşılama oranları karşılaştırılarak advers olayın gelişiminde aşılmanın etkisi tahmin edilir (24). Her bir olgu, risk ve kontrol penceresine katkıda bulunur. OR, 'conditional' lojistik regresyonla tahmin edilir (4). Çalışmanın yalnızca olgularla yürütülmesi ve her bir olgu aynı zamanda kendisinin kontrolü olduğu için ayrı bir kontrol grubu gerektirmemesi hem uygulama

hem de etik açıdan tasarıma üstünlük sağlar. Bu ayrıca kendi kendine kontrollü risk aralığı ve kendi kendine kontrollü olgu serisi tasarımında olduğu gibi zamanla değişmeyen bireysel karıştırıcılar için de kontrol sağlar. Eşleştirilmiş olgu kontrol çalışmalarında eksik verilerden kaynaklanan olgu-kontrol çiftlerinin kaybı olasılığı da daha azdır (4,23). Ancak bu tasarımın yanlılık olmadan çıkarım yapabilmesi için tüm periyodlarda altta yatan aşılama olasılıkları benzer olmalıdır. Bu varsayımın kesin şemalara göre uygulanan çocukluk çağı aşıları ve mevsimsel olarak uygulanan aşılar için sağlanması zordur (23).

Olgu çaprazlama tasarımında gözlemler advers olay geliştiğinde biter. Bu nedenle olası bir ters nedenselliğe ait bir yanlılığın önüne geçilmiş olur ancak tamamen önlenemez. Çünkü aşı kontrendikasyonuna bağlı yanlılık halen söz konusu



Şekil 3. Risk aralığı, kendi kendine kontrollü risk aralığı, kendi kendine kontrollü olgu serisi ve olgu çaprazlama tasarımlarının şematik özeti

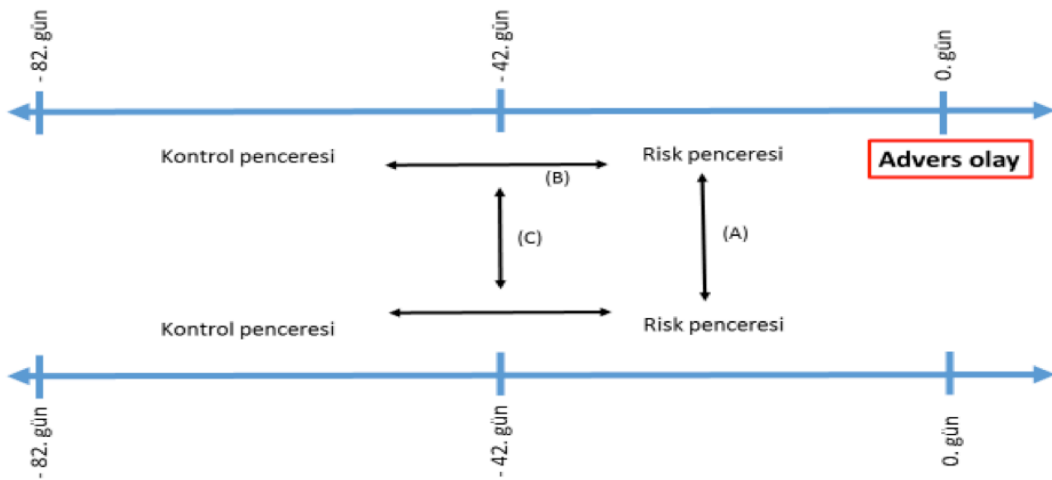
olabilir. Ayrıca bu tasarım maruziyet trendine bağlı yanlılığa da duyarlıdır. Örneğin bir toplumda aşı politikasının değişimine bağlı olarak belirli bir yaş grubu aşılabilir ve bu risk penceresindeki maruziyetin kontrol penceresine göre daha fazla artışına neden olabilir (4).

Aşılama ve multipl sklerozda relaps ilişkisinin incelenmesi için yürütülen bir olgu çaprazlama çalışmasına 1 Ocak 1992 ile 31 Aralık 1997 arasında 'Avrupa multipl skleroz veri tabanı ağı'ndaki relaps olgular alınmıştır. Relaps gelişiminden önceki 2 ay risk penceresi olarak tanımlanmıştır ve relaps gelişiminden önceki 3-4., 5-6., 7-8. ve 9-10. aylar olmak üzere 4 kontrol penceresi tanımlanmıştır. Toplam 10 aylık gözlem periyodunda 643 olgu (relaps) bulunmaktadır. Risk penceresinde herhangi bir aşı ile aşılama oranı %2,3; kontrol periyodlarında ise bu oran 4 kontrol penceresinde sırasıyla %3,0, %2,8, %4,0 ve %3,0 olarak bulunmuştur. Kontrol periyodlarındaki bu oranların ortalaması alınarak kontrol periyodundaki genel aşılama oranı %3,2 olarak belirlenmiştir. Bu hesaplanan oranlar aşılama riski olarak ele alınarak rölatif risk hesaplanmıştır. Buna göre aşılama için rölatif risk =  $\%2,3 / \%3,2 = 0,71$  (%95 GA = 0,40 - 1,26) bulunmuştur (17).

### 3.6. Olgu zaman kontrol tasarımı

Olgu zaman kontrol (case-time-control) tasarımı olgu çaprazlama tasarımının bir uzantısı olarak düşünülebilir (33). Çünkü olgu çaprazlama tasarımına bir 'zaman eşleştirilmiş' kontrol grubu eklenmiştir. Bu kontrol grubu maruziyette zaman trendini kontrol etmeyi sağlar. OR hem olgu grubunda ve hem de kontrol grubunda hesaplanır. Kontrol grubunun OR'si maruziyette zaman trendine bağlı periyod etkisinin bir tahminidir. Olgu grubunun OR'sinin kontrol grubunun OR'sine oranı (OR olgu / OR kontrol) maruziyetin incelenen sonuç üzerine etkisini ortaya koyar (4).

Şekil 4'te aşı güvenliliği için tasarlanmış olgu kontrol, olgu çaprazlama ve olgu zaman kontrol çalışmalarının tasarımı şematik olarak gösterilmiştir. Bir olgu kontrol çalışmasında olgu ve kontrol gruplarında risk penceresindeki aşılama odds'ları karşılaştırılır. Olgu çaprazlama tasarımında ise olgu grubu içinde risk ve kontrol penceresindeki aşılama odds'ları karşılaştırılmaktadır. Olgu zaman kontrol tasarımında ise olgu ve kontrol gruplarında ayrı ayrı risk ve kontrol pencerelerindeki aşılama odds'ları karşılaştırılarak elde edilen OR'lerin oranlanmasıyla risk tahmin edilir (34).



Şekil 4. Olgu zaman kontrol tasarımının şematik gösterimi

Kawai ve arkadaşları maternal influenza aşılmasının fetal yarık damak/dudak üzerine etkisini incelemek için bir olgu zaman kontrol tasarımı oluşturmuşlardır. Kontroller maternal yaş ve tahmini cinsel birleşme tarihine göre olgularla eşleştirileceklerdir. Böylece gestasyonel yaş ve mevsimselliğe bağlı maternal influenza aşılmasındaki zaman trendini kontrol etmiş olacaklardır. Olgular arasında organogenezise karşılık gelen risk penceresindeki aşılama odds'u ile kontrol penceresindeki aşılama odds'u karşılaştırılarak elde edilecek OR ile kontrol grubunda aynı şekilde hesaplanacak olan OR karşılaştırılarak elde edilecek OR riski belirleyecektir. Çalışma grubu yalnızca aşıllardan oluşacaktır (35).

### 3.7. Olgu kapsayıcılık tasarımı

Olgu kapsayıcılık (case-coverage) tasarımı, dış referans kullanan olgu temelli bir yöntemdir. Bu tasarımda advers olay gelişenlerdeki (olgular) aşılama odds'u olguların içinden geldiği toplumun aşılama odds'u ile karşılaştırılır. Aşı etkililiği çalışmalarında 'tarama yöntemi' (screening method) olarak da bilinen tasarımın en önemli özelliği olgu olmayanların bireysel verilerine gerek olmamasıdır (23,36). Bu tasarım tüm toplumun kontrol grubu olduğu bir eşleştirilmemiş olgu kontrol çalışması gibi düşünülebilir, geleneksel olgu kontrol çalışmasının tersine kontroller hem olguları hem de sağlamları içermektedir. Bu tasarımın uygulanabilmesi için toplumdaki aşı kapsayıcılığı verilerinin güvenilir olması gerekir. Rutin toplanan kapsayıcılık verilerinin genellikle karıştırıcıların kontrolüne izin verecek düzeyde toplanmaması da önemli bir kısıtlılıktır (23).

Birleşik Krallık'ta kuzeydoğu Thames bölgesinde yapılan bir çalışmada olgu kapsayıcılık tasarımı KKK aşısı ile otizm arasındaki ilişkiyi incelemek için kullanılmıştır. Bölgede KKK aşısı 1988'de uygulamaya girmiştir. Olgu grubu 1987'den sonra doğan otizm tanılı 389 çocuktan oluşmaktadır. Olguların ikinci doğum günleri itibariyle KKK aşısı olma oranları, her doğum kohortlarındaki KKK aşı kapsayıcılığı 1987 ile 1995 arası dönemde karşılaştırılmıştır. Olgularda ve toplumdaki aşı kapsayıcılığı çok benzer bulunmuştur. Bu bulgu KKK aşısı ile otizm arasındaki ilişki olmadığı

lehinedir (15).

### 3.8. Ekolojik çalışmalar

Bir çalışmada bireysel maruziyetler sınıflandırılmadan grup düzeyindeki veriler kullanılıyorsa o çalışma ekolojik çalışma adını alır. Ekolojik tasarım kullanılarak farklı aşı kapsayıcılığı olan gruplarda advers olayların hızı veya sıklığı karşılaştırılarak aşı güvenliliği ile ilgili soruya yanıt aranabilir. Gruplar, farklı illerde yaşayanlar gibi mekansal olarak ya da aynı toplumun aşı programı öncesi ve sonrası gibi zamansal olarak belirlenebilir. Aşı güvenliliği değerlendirmesi için yürütülecek ekolojik çalışmaların yalnızca olguları içerecek şekilde tasarlanması daha yararlı olabilir. Ancak unutulmamalıdır ki ekolojik çalışmaların en önemli kısıtlılığı grup düzeyinde saptanan ilişkilerin bireysel düzeyde de tekrarlanıp tekrarlanmadığını değerlendirememesidir. Bu nedenle nedensel ilişkinin gösterilmesinde zayıf tasarımlardır (23). Farzedelim ki mevsimsel influenza aşı kapsayıcılığı yüksek olan toplumlarda anemi sıklığı daha yüksek bulunmuş olsun. Bu bulgu mevsimsel influenza aşısı olanların daha fazla anemi olduğunu göstermez. Bu kısıtlılık ekolojik yanılgı (ecologic fallacy) olarak bilinir (23).

Brezilya'nın Salvador şehrinde 16 Ağustos 1997'de hedef nüfus 1-11 yaş arası çocuklar olan, Urabe suşu içeren KKK aşısı ile kitlesel bağışıklama kampanyası başlatılmış ve iki haftada sonlandırılmıştır. Urabe-Mumps suşu kullanılan aşının daha önce aseptik menenjitte ilişkilendirilmiş olması nedeniyle, Mart-Ekim 1997 arasındaki olgularla bir ekolojik çalışma gerçekleştirilmiştir. Olgu sıklıkları, referans periyod olarak alınan aşı kampanyası öncesi 1997 yılının 10-33. epidemiyolojik haftası ile aşı kampanyası sonrası döneme denk gelen 34-43. epidemiyolojik haftalar arasında karşılaştırılmıştır. Referans periyotta toplam 10.403.912 kişi-haftada 29 aseptik menenjit olgusu varken; 34-35. haftada 904,688 kişi-haftada 3 aseptik menenjit olgusu bulunmuştur. Insidans hızı referans periyotta =  $29 / 10.403.912 = 0,278 / 100$  bin kişi-hafta ve 34-35. haftada ise =  $3 / 904.688 = 0,332 / 100$  bin kişi-hafta bulunmuştur. Insidans hızları oranı =  $0,332 / 0,278 = 1,19$  (%95 GA: 0,36-3,91)'dir. Otuz altıncı haftada ise 452.344 kişi-haftada 18 olgu görülmüştür.

Insidans hızı =  $18 / 452.344 = 3,97 / 100$  bin kişi-haftadır. Referans periyotla karşılaştırıldığında rölatif risk =  $3,97 / 0,278 = 14,28$  (%95 GA: 7,93-25,71) bulunmuştur (37).

Bu örnekte olduğu gibi aşı kampanyaları güçlü ekolojik çalışmalar yürütmek için iyi fırsatlardır. Ancak mevsimsellik ve diğer zamanla değişen karıştırıcı etkilerin düzeltilmesindeki kısıtlılık ekolojik tasarımların diğer bir zayıf yönüdür (23).

Sonuç olarak, Ruhsat öncesi dönemde tespit edilememiş nadir advers olaylara ilişkin endişelerin gözlemsel epidemiyolojik çalışma tasarımları ile giderilmesi veya doğrulanması gerekir. Ayrıca ruhsat öncesi belirlenen aşıya bağlı advers etkilerin boyutu da daha doğru ve kesin bir şekilde açıklanmalıdır. Bu

nedenle aşı güvenliliği çalışmalarının aşı programlarıyla eş zamanlı olarak yürütülmesi aşı programlarının ayrılmaz bir parçasıdır. Geleneksel kohort ve olgu kontrol çalışma tasarımları kullanılarak aşı ile advers olay arasında ilişki olup olmadığının gösterilmesinde karşılaşılan bazı zorlukları vardır. Advers olayın nadir görülmesi, aşı kapsayıcılığının yüksek olması ve aşılı ve aşısız grupların karşılaştırılabilir olmasının güçlüğü geleneksel çalışma tasarımlarına alternatif tasarımların geliştirilmesini gerektirmiştir. Aşı güvenliliği çalışmasında cevap aranan soruya ve mevcut veri kaynaklarına göre bu geleneksel ve alternatif tasarımlardan uygun olanın seçilmesi doğru çıkarımlar yapılabilmesi açısından zorunludur. Bu tasarımlar yürütülürken kısıtlılıkları, güçlü yönleri ve varsayımları mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Andrews N. Epidemiological designs for vaccine safety assessment: methods and pitfalls. *Biologicals*, 2012; 40(5): 389-92.
2. Andrews NJ. Statistical assessment of the association between vaccination and rare adverse events post-licensure. *Vaccine*, 2001; 20 (Suppl 1): 49-53.
3. Li R, Stewart B, Weintraub E. Evaluating efficiency and statistical power of self-controlled case series and self-controlled risk interval designs in vaccine safety. *J Biopharm Stat*, 2015; 1-8.
4. Baker MA, Lieu TA, Li L, Hua W, Qiang Y, Kawai AT, et al. A vaccine study design selection framework for the postlicensure rapid immunization safety monitoring program. *Am J Epidemiol*, 2015; 181(8): 608-18.
5. Jefferson T, Price D, Demicheli V, Bianco E; European Research Program for Improved Vaccine Safety Surveillance (EUSAFEVAC) Project. Unintended events following immunization with MMR: a systematic review. *Vaccine*, 2003; 21(25-26) :3954-60.
6. Cecinati V, Principi N, Brescia L, Giordano P, Esposito S. Vaccine administration and the development of immune thrombocytopenic purpura in children. *Hum Vaccin Immunother*, 2013; 09(5): 1158-62.
7. Nordin JD, Kharbanda EO, Vazquez-Benitez G, Lipkind H, Lee GM, Naleway AL. Monovalent H1N1 influenza vaccine safety in pregnant women, risks for acute adverse events. *Vaccine*, 2014; 32(39): 4985-92.
8. Greene SK, Kulldorff M, Yin R, Yih WK, Lieu TA, Weintraub ES, et al. Near real-time vaccine safety surveillance with partially accrued data. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2011; 20(6): 583-90.
9. Wilson K, Hawken S, Kwong JC, Deeks S, Crowcroft NS, Van Walraven C, et al. Adverse events following 12 and 18 month vaccinations: a population-based, self-controlled case series analysis. *PLoS One*, 2011; 6(12): e27897.
10. dos Santos Silva I. *Cancer epidemiology: principles and methods*. International Agency for Research on Cancer. Geneva: World Health Organization, 1999.
11. Gordis L. *Epidemiology (Fifth edition)*. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2009.
12. Glanz JM, McClure DL, Xu S, Hambidge SJ, Lee M, Kolczak MS, et al. Four different study designs to evaluate vaccine safety were equally validated with contrasting limitations. *J Clin Epidemiol*, 2006; 59(8): 808-18.

13. Shui IM, Baggs J, Patel M, Parashar UD, Rett M, Belongia EA, et al. Risk of intussusception following administration of a pentavalent rotavirus vaccine in US infants. *JAMA*. 2012; 307(6): 598-604.
14. Irving SA, Kieke BA, Donahue JG, Mascola MA, Baggs J, DeStefano F, et al. Trivalent inactivated influenza vaccine and spontaneous abortion. *Obstet Gynecol*, 2013; 121(1): 159-65.
15. Taylor B, Lingam R, Simmons A, Stowe J, Miller E, Andrews N. Autism and MMR vaccination in North London; no causal relationship. *Mol Psychiatry*, 2002; 7 (Suppl 2) :7-8.
16. Confavreux C, Suissa S, Saddier P, Bourdès V, Vukusic S; Vaccines in Multiple Sclerosis Study Group. Vaccinations and the risk of relapse in multiple sclerosis. *Vaccines in Multiple Sclerosis Study Group*. *N Engl J Med*, 2001; 344(5): 319-26.
17. France EK, Glanz JM, Xu S, Davis RL, Black SB, Shinefield HR, et al. Safety of the trivalent inactivated influenza vaccine among children: a population-based study. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2004; 158(11): 1031-6.
18. Yih WK, Lieu TA, Kulldorff M, Martin D, McMahon-Walraven CN, Platt R, et al. Intussusception risk after rotavirus vaccination in U.S. infants. *N Engl J Med*, 2014; 370(6): 503-12.
19. Rowhani-Rahbar A, Klein NP, Lewis N, Fireman B, Ray P, Rasgon B, et al. Immunization and Bell's palsy in children: a case-centered analysis. *Am J Epidemiol*, 2012; 175(9): 878-85.
20. Fine PE, Chen RT. Confounding in studies of adverse reactions to vaccines. *Am J Epidemiol*, 1992; 136(2): 121-35.
21. France EK, Glanz J, Xu S, Hambidge S, Yamasaki K, Black SB, et al. Team. Risk of immune thrombocytopenic purpura after measles-mumps-rubella immunization in children. *Pediatrics*, 2008; 121(3): e687-92.
22. Weldelessie YG, Whitaker HJ, Farrington CP. Use of the self-controlled case-series method in vaccine safety studies: review and recommendations for best practice. *Epidemiol Infect*, 2011; 139(12): 1805-17.
23. Farrington CP. Control without separate controls: evaluation of vaccine safety using case-only methods. *Vaccine*, 2004; 22(15-16): 2064-70.
24. Asghar Z, Coupland C, Siriwardena N. Influenza vaccination and risk of stroke: Self-controlled case-series study. *Vaccine*, 2015; 33(41): 5458-63.
25. Qian L, Tseng HF, Sy LS, Jacobsen SJ. Confounder adjustment in vaccine safety studies: comparing three offset terms for case-centered approach. *Vaccine*, 2013; 31(2): 431-5.
26. Fireman B, Lee J, Lewis N, Bembom O, van der Laan M, Baxter R. Influenza vaccination and mortality: differentiating vaccine effects from bias. *Am J Epidemiol*, 2009; 170(5): 650-6.
27. Hekimoğlu CH. Aşı epidemiyolojisi: Aşı etkililiği için epidemiyolojik çalışma tasarımları. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2016; 73(2): 161-74.
28. Klein NP, Fireman B, Yih WK, Lewis E, Kulldorff M, Ray P, Baxter al. Measles-mumps-rubella-varicella combination vaccine and the risk of febrile seizures. *Pediatrics*, 2010; 126(1): e1-8.
29. Tseng HF, Liu A, Sy L, Marcy SM, Fireman B, Weintraub E, et al. Safety of zoster vaccine in adults from a large managed-care cohort: a Vaccine Safety Datalink study. *J Intern Med*, 2012; 271(5): 510-20.
30. Baxter R, Lewis E, Fireman B, DeStefano F, Gee J, Klein NP. Case-centered Analysis of Optic Neuritis After Vaccines. *Clin Infect Dis*, 2016. pii: ciw224.
31. Maclure M. The case-crossover design: a method for studying transient effects on the risk of acute events. *Am J Epidemiol*. 1991; 133(2): 144-53.
32. Suissa S, Delaney JA. The case-crossover study design in pharmacoepidemiology. *Stat Methods Med Res*, 2008; 9(1): 1-13.
33. Suissa S. The case-time-control design. *Epidemiology*, 1995; 6(3): 248-53.
34. Hernández-Díaz S, Hernán MA, Meyer K, Werler MM, Mitchell AA. Case-crossover and case-time-control designs in birth defects epidemiology. *Am J Epidemiol*, 2003 Aug 15; 158(4): 385-91.
35. Kawai A, Li L, Andrade S, Nguyen M, Selvan M, Lin N, et al. Influenza vaccines and birth outcomes. [http://www.mini-sentinel.org/work\\_products/PRISM/Mini-sentinel\\_PRISM\\_Influenza-Vaccines-and-Birth-Outcomes-Protocol.pdf](http://www.mini-sentinel.org/work_products/PRISM/Mini-sentinel_PRISM_Influenza-Vaccines-and-Birth-Outcomes-Protocol.pdf). 25 Şubat 2013. Published February 25, 2013. Erişim 18 Mayıs 2016.
36. Farrington CP. Estimation of vaccine effectiveness using the screening method. *Int J Epidemiol*, 1993; 22(4): 742-6.
37. Dourado I, Cunha S, Teixeira MG, Farrington CP, Melo A, Lucena R, et al. Outbreak of aseptic meningitis associated with mass vaccination with a urabe-containing measles-mumps-rubella vaccine: implications for immunization programs. *Am J Epidemiol*, 2000; 151(5): 524-30.



## TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE



HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

...../...../20...

Makale Türü/Article Type:

(...) Araştırma/Research (..) Derleme/Review (..) Olgu Sunumu/Case Report (..) Editöre Mektup/Letter to Editor

Makale Başlığı/Article Entitled : .....

Sayın Editör,

Yayımlanması dileğiyle Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;

1. Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orjinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Makalenin; derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
3. Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
4. Yayın haklarının Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here, we affirm and warranty as the author(s) of this manuscript submitted to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology that;

1. The article I / We submitted to the Bulletin is original and responsibilities are belong to us ethically and scientifically,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under the evaluation of this bulletin,
3. The article contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights,
4. The article publishing rights belong to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.

(...1) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...2) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...3) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...4) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...5) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

Not / Note : 1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)

2. Formu aşağıdaki adrese faks/posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below by faks or mail or deliver personally

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 E Blok Park Girişi 06100 Sıhhiye-ANKARA-TURKEY

Tel/Phone : +90 312 565 55 80

Faks/Fax : +90 312 565 55 91

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

