



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 80 ■ Sayı/Number 1 ■ Yıl/Year 2023

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

Prof. Dr. Sedat KAYGUSUZ, Genel Müdür (General Director)

### EDİTÖR

EDITOR IN CHIEF

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

### EDİTÖR YARDIMCILARI

DEPUTY EDITORS

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

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

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

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

### YAYIN KURULU

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

### İSTATİSTİK EDİTÖRLERİ

STATISTICAL EDITORS

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

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

### İNGİLİZCE DİL EDİTÖRÜ

ENGLISH LANGUAGE EDITOR

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 :

Mart - 2023 / March - 2023

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç

Anna PAPA, Yunanistan

Aziz SANCAR, ABD

Cristina DOMINGO, Almanya

Daniel MOTLHANKA, Botsvana

Dwight D. BOWMAN, ABD

Isme HUMOLLI, Kosova

Isuf DEDUSHAJ, Kosova

Iva CHRISTOVA, Bulgaristan

Johan LINDH, İsveç

Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail

Manfred WEIDMANN, İngiltere

Paul HEYMAN, Belçika

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba

Sıraç DİLBER, İsveç

Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya

Takashi AKAMATSU, Japonya

Varalakshmi ELANGO, Hindistan

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Alanya

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Ankara

Banu ÇAKIR, Ankara

Banu SANCAK, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Afyonkarahisar

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

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

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

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

## I) AMAÇ VE KAPSAM

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

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

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

## II) YAYIN İLKELERİ

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

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

Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.

## III) TELİF VE LİSANS

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

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

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

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

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

## IV) AÇIK ERİŞİM POLİTİKASI

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

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

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

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

## V) ÜCRET POLİTİKASI

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

## VI) ETİK KURALLAR

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

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

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

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

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

## VII) YAZI DİLİ

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

## VIII) YAZIM KURALLARI

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

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

Yayımlanmak üzere gönderilecek yazılar;

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

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

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

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

a. Yazının başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.

b. Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

Tel : (0312) 565 55 80

Faks : (0312) 565 55 91

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

şirkette bir ilişki yoksa, başvuru yazısında belirtilmelidir.

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

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

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

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

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

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

## 8. Araştırma yazıları;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GenBank/DNA dizi analizi: Gen kalıtım numaraları ve DNA dizileri makale içinde kaynak olarak gösterilmelidir. Konuyla ilgili ayrıntılı bilgi için “National Library of Medicine” adresinde “National Center for Biotechnical Information (NCBI)” bölümüne bakınız.

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

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

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

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

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

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

14. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

15. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

## I) AIM and SCOPE

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

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

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

## II) PUBLISHING POLICY

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

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

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

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

## III) COPYRIGHT and LICENSING

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

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

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

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

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

## IV) OPEN ACCESS POLICY

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

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

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

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

## V) PRICE POLICY

Article submission, evaluation and publication are free.

## VI) ETHICAL RULES

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

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

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

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

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

## VII) LANGUAGE of the JOURNAL

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

## VIII) WRITING RULES

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

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

Articles to be submitted for publication;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 8. Research Articles;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## ETİK İLKELER VE YAYIN POLİTİKASI

### ETİK İLKELER

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

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

### ÇIKAR ÇATIŞMASI POLİTİKASI

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

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

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

### YAYIN POLİTİKASI ve HAKEM DEĞERLENDİRME SÜRECİ

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

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

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

## ETHICAL PRINCIPLES AND PUBLICATION POLICY

### ETHICAL PRINCIPLES

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

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

### CONFLICT OF INTEREST POLICY

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

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

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

### PUBLICATION POLICY and PEER REVIEW PROCESS

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

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 80

Fax : +90 312 565 55 91

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

## YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız.

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

## TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

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

Furthermore, please check.

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne  
[www.turkhijyen.org](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  
A division of the American Chemical Society

Google  
scholar beta

Academic Journals Database  
disseminating  
quality controlled scientific knowledge

EBSCO  
HOST  
Electronic  
Journals  
Service

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

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

TUBITAK  
ULAKBİM

TÜRK MEDLINE

TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

GENAMICS™  
...research from your desktop

medoanet  
Mediterranean Open Access Network

Open  
J-Gate

## İLETİŞİM

## CORRESPONDENCE

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

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

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

Tel: 0312 565 55 80

Faks: 0312 565 55 91

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

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

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



## ■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Bir üniversite hastanesinde COVID-19 tanılı sağlık çalışanlarının antiviral kullanımını etkileyen faktörler  
Factors affecting antiviral use of health workers diagnosed with COVID-19 in a university hospital  
Ayşe SAĞMAK TARTAR, Kevser TUNCER KARA, Serhat UYSAL, Ayhan AKBULUT, Kutbeddin DEMİRDAĞ  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.70104 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 3 - 12 
2. Anti-SARS-CoV-2 antikör taramasında hızlı kaset test sonuçlarının elektrokemilüminesans immünoassay yöntemiyle doğrulanması  
Rapid cassette test results in anti-SARS-CoV-2 antibody screening verification by electrochemiluminescence immunoassay method  
Nazife AKMAN, Zeynep AKIDAĞI, Pelin ÖZMEN, Rukiye YALAP  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.48265 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 13 - 22 
3. Ayaktan başvuran hastaların idrar kültürlerinde üretilen *Escherichia coli* izolatlarında antimikrobiyal direnç oranları: beş yıllık analiz  
Antimicrobial resistance rates in *Escherichia coli* strains isolated in urine cultures of outpatients: five years analysis  
Ayten GÜNDÜZ, Ahmet MANSUR  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.49379 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 23 - 32 
4. Determination of efficacy in inactive Newcastle disease vaccines with an *in-vitro* method as an alternative to *in-vivo* methods  
*In-vivo* yöntemlere alternatif olarak *in-vitro* yöntemle inaktif Newcastle hastalığı aşılarında etkinlik tayini  
Mustafa KARS, Yamaç TEKİNTAŞ, Fethiye ÇÖVEN, Asiye DAKMAN, İsmail ÖZTÜRK, Sabahattin İÇİN, Mine HOŞGÖR LIMONCU  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.84704 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 33 - 42 
5. The effect of skin thickness on vitamin D levels! Where do you measure from?  
Cilt kalınlığının vitamin D seviyesi üzerine etkisi! Peki nereden ölçüm?  
Emel GÜLER, Alper DOĞANCI  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.29805 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 43 - 50 
6. Embelin'in insan meme kanseri MCF-7 ve MDA MB-231 hücre proliferasyonu üzerindeki sitotoksik etkisinin tamoxifen ve docetaxel ile karşılaştırılması  
Comparison of the cytotoxic effect of Embelin with tamoxifen and docetaxel on human breast cancer MCF-7 and MDA MB-231 cell proliferation  
Gülsüm ABUŞOĞLU, Cengiz KOÇAK, Fatma Emel KOÇAK, Bahadır ÖZTÜRK, Hüsamettin VATANSEV  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.87523 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 51 - 62 
7. Polikistik over sendromlu kadınlarda adrenal ve ovarian steroid hormonlarla fenotipik ve klinik özelliklerin ilişkisi  
The relationship of phenotypic and clinical features with adrenal and ovarian steroid hormones in women with polycystic ovarian syndrome  
Seda KILIÇSOY ASLAN, Raziye DESDİCİOĞLU, Gülin Feykan YEĞİN, Ceylan BAL  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.20092 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 63 - 72 
8. *Ficus carica* extract causes cell cycle arrest and induces apoptosis in MG-63 and HT-29 cancer cell lines  
*Ficus carica* ekstraktı, hücre döngüsünün durmasına neden olur ve MG-63 ve HT-29 kanser hücre hatlarında apoptozu indükler  
Tuğba YALÇINKAYA, Leyla Didem KOZACI, Ahmet ÇARHAN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.93357 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 73 - 88 
9. Çalışanın sürdürülebilir performansı (ÇSP) ölçeği: Türkçe geçerlik-güvenirlik çalışması  
Employee sustainable performance (ESP) scale: Turkish validity-reliability study  
Yasin ÇILHOROZ, Gülsen TOPAKTAŞ, Oğuz IŞIK  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.00243 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 89 - 100 
10. Investigation of the presence of Zika, Dengue, Chikungunya, and West Nile virus in *Aedes* type mosquitoes in the Eastern Black Sea area of Turkey  
Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesindeki *Aedes* tipi sivrisineklerde Zika, Dengue, Chikungunya ve Batı Nil virüsü varlığının araştırılması  
Yasemin COŞGUN, Fatma BAYRAKDAR, M. Mustafa AKINER, Burcu GÜRER GİRAY, Berna DEMİRCİ, Hilal BEDİR, Gülay KORUKLUOĞLU, Seher TOPLUOĞLU, Selçuk KILIÇ  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.58235 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 101 - 108 

## ■ Olgu Sunumu / Case Report

11. **Tip 1 diyabetes mellitus tanılı bir olguda rinoserebral mukormikoz**  
**Rhinocerebral mucormycosis in a case diagnosed with type 1 diabetes mellitus**  
Ayşe ALICI, Aytekin FIRTINA, Gülgün YENİŞEHİRLİ, İbrahim ERDİM, Elif AKÇAY  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.70845 (Dil: "Türkçe" - Language: "Turkish")

109 - 116



## ■ Derleme / Review

12. **Antifungal susceptibility testing, reporting and antifungal resistance: current status**  
**Antifungal duyarlılık testleri, raporlama ve antifungal direnç: güncel durum**  
Ali Korhan SİĞİ  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.97957 (Dil: "İngilizce" - Language: "English")

117 - 132









# Bir üniversite hastanesinde COVID-19 tanılı sağlık çalışanlarının antiviral kullanımını etkileyen faktörler

## Factors affecting antiviral use of health workers diagnosed with COVID-19 in a university hospital

Ayşe SAĞMAK TARTAR<sup>1</sup> (ID), Kevser TUNCER KARA<sup>2</sup> (ID), Serhat UYSAL<sup>1</sup> (ID), Ayhan AKBULUT<sup>1</sup> (ID), Kutbeddin DEMİRDAĞ<sup>1</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** 2019 yılında tanımlanan COVID-19, kısa sürede pandemiye dönüşmüştür. Sağlık çalışanları hem hastaları hem de toplumsal temasları sebebiyle risk altındadır. Bu çalışmanın amacı, bir hastanenin COVID-19 tanısı alan çalışanlarının demografik yapılarını, antiviral tedavi kullanımlarını ve etkileyen faktörleri incelemek; ayrıca hastane çalışanları ve ilimizin vaka sayısı eğrilerini karşılaştırmaktır.

**Yöntem:** Çalışmaya, 01.06.2020-28.02.2021 tarihleri arasında COVID-19 geçirmiş olan sağlık çalışanları dahil edilmiştir. Kesitsel, retrospektif bir çalışmadır. Hastalar demografik ve epidemiyolojik açıdan değerlendirilmiş, antiviral ilaç önerilen sağlık çalışanlarında tedavi uyumu irdelenmiştir.

**Bulgular:** 693 sağlık çalışanının 390 (%56,3)'ü erkekti. Yaş ortalaması 33,54±9,41 idi. 140 kişinin (%20,2) kronik hastalığı vardı. Hastalardan 173 kişi (%25,0) sigara kullanıyordu. Bulaş kaynağını 161 kişi (%23,2) hastane olarak belirtti. Tanı anında semptomu olanların sayısı 509 (%73,4) idi ve 116 kişiye (%16,7)

### ABSTRACT

**Objective:** COVID-19 turned into a pandemic in a short time. Healthcare workers are at risk of infection due to their contact with both patients and the society. The aim of this study is to examine the demographic structures of a hospital's employees diagnosed with COVID-19, to examine the use of antiviral treatment and the factors affecting it, and to compare the case number curves of the hospital and the province.

**Methods:** Healthcare workers who had been infected with the COVID-19 virus between 01.06.2020 and 28.02.2021 were included in the study. It is a cross-sectional, retrospective study. The patients were evaluated demographically and epidemiologically, and compliance treatment was examined in healthcare professionals who recommended antiviral drugs.

**Results:** 390 (56.3%) of the 693 healthcare workers were males. Mean age of the patients was 33,54±9,41. 140 (20.2%) of them had chronic diseases. 173 (25%) were cigarette smokers. 161 (23.2%) individuals stated the source of infection as hospital. 509 (73.4%) had

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD., Elazığ  
<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD., Elazığ



**İletişim / Corresponding Author :** Ayşe SAĞMAK TARTAR

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mik. AD., Elazığ - Türkiye

**E-posta / E-mail :** dr.ayse01@gmail.com

**Geliş Tarihi / Received :** 26.01.2022

**Kabul Tarihi / Accepted :** 27.04.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.70104

Sağmak Tartar A, Tuncer Kara K, Uysal S, Akbulut A, Demirdağ K. Bir üniversite hastanesinde COVID-19 tanılı sağlık çalışanlarının antiviral kullanımını etkileyen faktörler. Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(1): 3 - 12

tanı sonrası semptom eklenmişti. En sık görülen semptomlar halsizlik (%48), myalji (%47,5) ve baş ağrısı (%46,9) idi. 693 hastadan 164 kişi (%23,7) antiviral tedavi kullanmadı. Vaka sayılarının aylara göre dağılımı hastane ve il bazında incelendiğinde, benzerlik göstermekteydi. Lojistik regresyon analizinde tanı sırasında semptomu olanlar 1,779 kat, kronik hastalığı olanlar 1,804 kat daha fazla antiviral ilaç kullanmıştı.

**Sonuç:** Toplumda ve sağlık çalışanlarında benzer vaka dağılımının görülmesi kişisel koruyucu ekipman kullanımının etkisi olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, ağır COVID-19 açısından risk faktörleri olan kişilerin antiviral tedaviye uyumunun daha yüksek olduğu görülmüştür. Zaman içinde aşılama çalışmaları ve mutasyonlar nedeniyle COVID-19 klinik seyri ve prognoz değişebilir. Bu sebeple sağlık çalışanlarında sürveyans verileri toplanmalı ve ara analizler ile değerlendirmeler yapılmalıdır. Antiviral tedaviler ile ilgili bilgiler verilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, sağlık çalışanları, favipiravir, pandemi, SARS-CoV-2

symptoms at the time of diagnosis while symptoms occurred later in 116 (16.7%). The most commonly observed symptoms included fatigue (48%), myalgia (47.5%) and headaches (46.9%). Of 693 patients, 164 (23.7%) did not use antiviral treatment. The distribution of the number of cases by months was similar when examined on the basis of hospitals and provinces. In the logistic regression analysis, those with symptoms at the time of diagnosis used antiviral treatment 1.779 times and those with chronic diseases 1.804 times more.

**Conclusion:** The similarity of the case distribution in the society and among healthcare workers supports the effect of the use of personal protection equipment. In our study, it was observed that healthcare workers with risk factors for severe COVID-19 had higher adherence to antiviral treatment. Along with the vaccination activities and mutations, the clinical course and prognosis of the COVID-19 might change in time. Therefore, surveillance data should be collected from healthcare workers and evaluations should be made through interim analyses. Information about antiviral treatments should be given.

**Key Words:** COVID-19, healthcare workers, favipiravir, pandemic, SARS-CoV-2

## GİRİŞ

2019 yılının sonunda Çin'in Vuhan kentinde tanımlanan Covid-19, kısa sürede pandemiye dönüşmüştür (1). Sağlık çalışanları hem hastalarla olan temasları sebebiyle daha fazla risk altındadır, hem de toplum kaynaklı bulaştan etkilenmektedir. Sağlık çalışanları Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS), Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) ve Ebola gibi salgın hastalıklardan da önemli ölçüde etkilenmişlerdir (2). 2003-2015 yılları arasında yaşanan SARS ve MERS salgınlarında, vakaların yaklaşık %25'ini sağlık çalışanları oluşturmuştur

(3). SARS-CoV-2 enfeksiyonu, SARS virüsü ve MERS virüsünün neden olduğu enfeksiyonlara kıyasla daha düşük ölüm oranına sahip olmasına rağmen, uzun kuluçka süresi ve düşük virülansı ile çok sayıda asemptomatik/semptomatik enfeksiyona neden olmuştur. Virüse tekrarlayan maruziyetler daha yüksek SARS-CoV-2 viral yüküne ve daha kötü klinik sonuçlara yol açabileceği göz önüne alındığında, sağlık çalışanlarında klinik özelliklerin ve sonuçların genel popülasyondan farklı olup olmayacağı bilinmemektedir (4,5). Sağlık çalışanlarında COVID-19'un sıklığı ve epidemiyolojisi ile ilgili sınırlı sayıda yayın ve ulusal durum raporu bulunmaktadır.

COVID-19'un klinik spektrumu geniştir, çoğu sağlık çalışanında hastalık hafif belirtilerle seyrederken, ölüm dahil ciddi sonuçlar da bildirilmiştir (6).

Pandeminin başından itibaren çok sayıda antiviral COVID-19 tedavisinde kullanılmıştır. Bu ilaçlardan bir kısmı farklı endikasyonlarda onaylı iken yeniden konumlandırılarak kullanılmıştır. COVID-19 tedavisinde kullanılan ajanların yan etkileri sık tartışılan konuların başında gelmektedir ve gerek etkinlik gerekse yan etki tartışmaları antiviral tedaviye uyumu etkilemektedir.

Gerek aşılama çalışmaları gerekse mutasyonlar nedeniyle COVID-19'un klinik seyri ve prognozu değişebilir. Sağlık çalışanlarında sürveyans verilerini toplamak ve ara analizler ile bu değişimi incelemek topluma göre daha pratiktir. Bu çalışmanın amacı, bir hastanenin COVID-19 tanısı alan çalışanlarının demografik yapılarını, antiviral tedavi kullanımlarını incelemek, ayrıca hastane ve ilin vaka sayısı eğrilerini karşılaştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Araştırmanın Tipi

Kesitsel, retrospektif bir çalışmadır.

### Araştırmanın Yeri ve Katılımcılar

Bu çalışmaya, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde, 01.06.2020-28.02.2021 tarihleri arasında COVID-19 geçirmiş olan sağlık çalışanları dahil edilmiştir. İki doz COVID-19 aşısı olup ikinci dozun üzerinden 14 gün geçen COVID-19 PCR pozitif saptanan sağlık çalışanları çalışma dışı bırakılmıştır. SARS-CoV-2 PCR'ın pozitif olması veya semptomlarla birlikte toraks bilgisayarlı tomografisinde tipik buzlu cam görünümü bulunması halinde COVID-19 tanısı konulmuştur. Tanı konulurken T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Tanı Rehberi esas alınmıştır (7).

### Verilerin Elde Edilişi

COVID-19 tanısı konulan çalışanlarla yüz yüze görüşme yöntemi ile "Sağlık Çalışanı COVID-19 Temas/ Vaka İzlem Formu" Enfeksiyon Kontrol Komitesi

hemşireleri ve enfeksiyon hastalıkları uzmanları tarafından doldurulmuştur. Doldurulan formlar retrospektif olarak incelenerek veriler sağlanmıştır. Çalışmanın yapıldığı tarih aralığında ilimizde aylara göre COVID-19 vaka sayıları Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

### Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonucunda elde edilen veriler SPSS 22.0 programıyla değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde tanımlayıcı özelliklerde kategorik verilerde n (%), ortalama±ss değerleri verilmiştir. Verilerin normal dağılım Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Kategorik değişkenler için ki-kare testi, iki grup arası farklılıkların değerlendirilmesinde Man Whitney U testi kullanılmıştır. Hastane çalışanlarının özelliklerinin antiviral tedavi kullanımına etkilerini incelemek üzere binary lojistik regresyon uygulanmıştır. Binary lojistik regresyonda modelin uyum iyiliği (anlamlılığı, önemi) Omnibus Tests of Model Coefficients ve Hosmer-Lemeshow testleri ile değerlendirilmiştir.  $p < 0,05$  istatistiksel anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

### Etik Kurul İzni ve İzinler

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 16.09.2021, Karar no: 2021/09-20). Sağlık Bakanlığı Bilimsel Araştırma Değerlendirme Komisyonu tarafından uygun bulunmuştur.

## BULGULAR

Hastanede çalışan 2233 personelin yaş ortalaması  $33,63 \pm 8,60$ , 1130'u (%50,6) kadındı. Toplam 2233 çalışanın 693'ünde (%31,0) COVID-19 saptandı. COVID-19 tanısı alanların yaş ortalaması  $33,54 \pm 9,41$  ve 390 kişi (%56,3) erkekti. Hastanede çalışanlar ile COVID-19 tanısı alanların yaşları açısından fark olmadığı tespit edildi ( $p=0,317$ ). COVID-19 tanısı alanlar içinde cinsiyet açısından istatistiksel anlamlı fark saptandı, erkekler kadınlara göre daha fazlaydı ( $p=0,001$ ). COVID-19 tanılı kesin olgu ile

temas öyküsü olan vaka sayısı 105 (%15,2) idi. 46 (%6,6) kişinin il dışı seyahat öyküsü vardı, yurtdışı seyahat öyküsü olan vaka yoktu. 140 (%20,2) vakada kronik hastalık öyküsü mevcuttu. Hastaların 7 (%1,0)'sinde kardiyovasküler hastalık; 16 (%2,7)'sında hipertansiyon; 19 (%5,2)'unda diabetes mellitus; 1 (%0,1)'inde kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) tanısı vardı. Hastalardan 173 (%25,0)'ü sigara kullanıcısıydı, 11 (%1,6)'i geçmişte kullanıp bırakmıştı. 37 hasta (%5,3) serviste, bir (<%0,01) hasta yoğun bakım ünitesinde, 655 hasta (%94,5)

ise ayaktan tedavi görmüş ve mortal seyreden vaka görülmemiştir (Tablo 1). 21 (%0,3) sağlık çalışanı ikinci kez SARS-CoV-2 ile enfekte olmuştur.

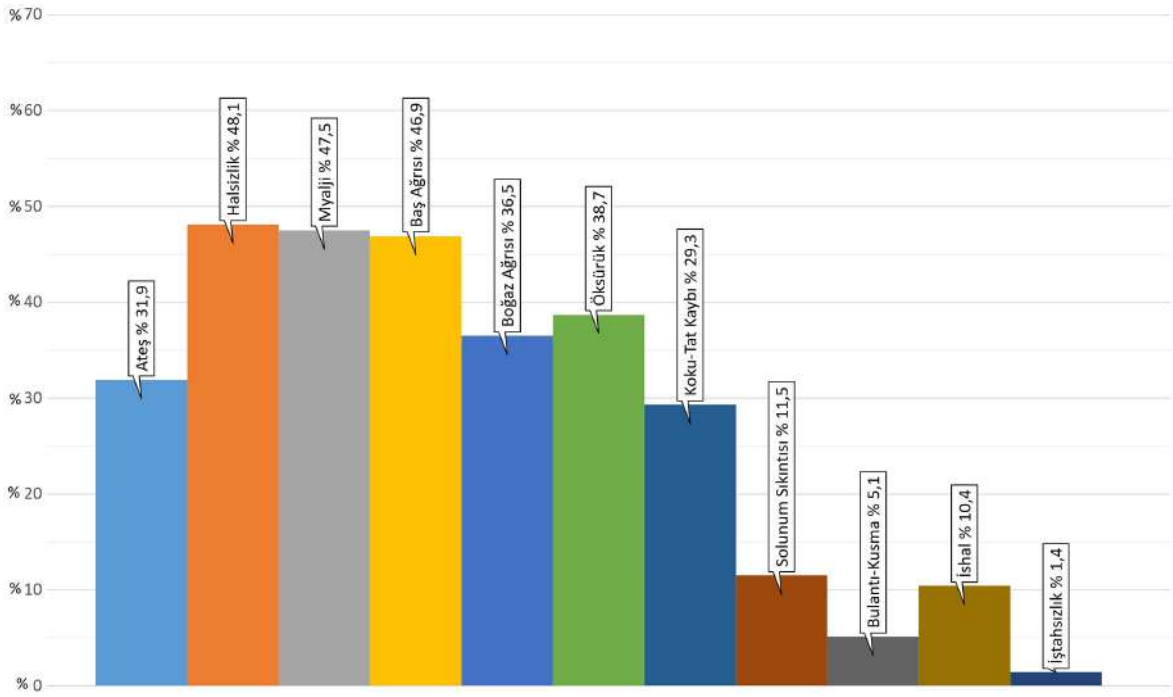
Sağlık çalışanlarında en sık görülen semptomlar halsizlik (%48,1), myalji (%47,5) ve baş ağrısı (%46,9) idi (Şekil1).

Çalışmanın yapıldığı süre içerisinde vaka sayılarının Ağustos-Kasım ayları arasında en fazla olduğu saptandı (p=0,000). Vakaların aylara göre dağılımı Şekil 2'de verilmiştir.

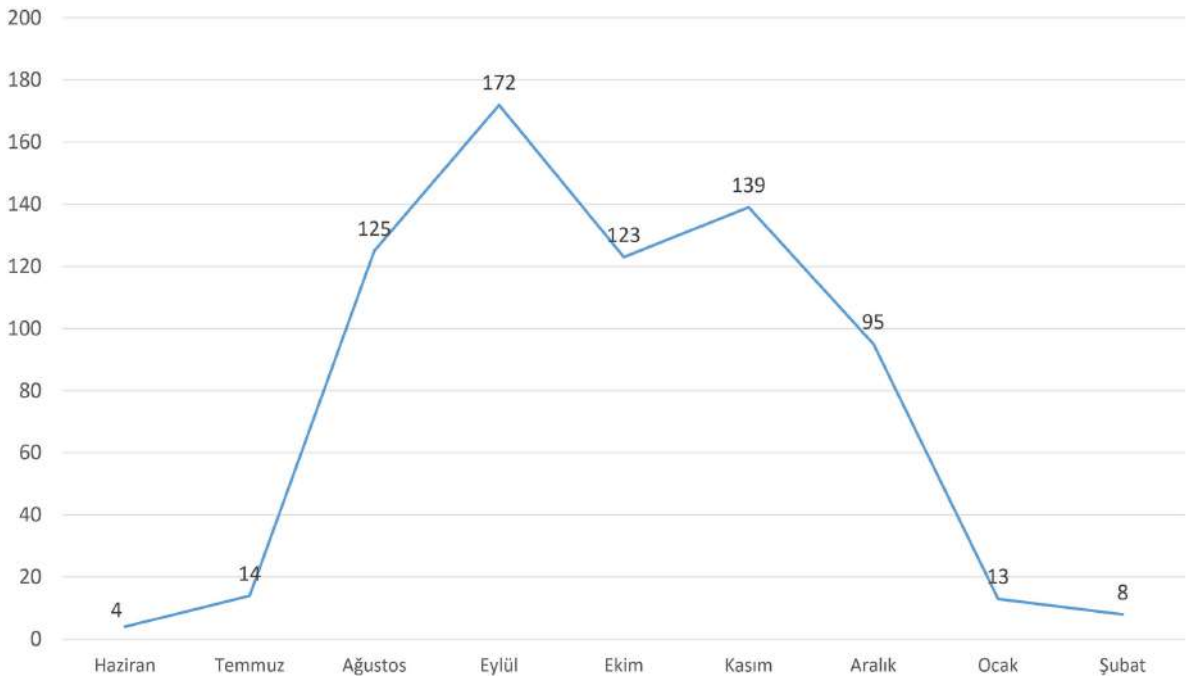
**Tablo 1.** Çalışanların sosyo-demografik özellikleri

		n	%
Cinsiyet	Erkek	390	56,3
	Kadın	303	43,7
Meslek	Hemşire	218	31,5
	Teknisyen	201	29,0
	Hekim	167	24,1
	Temizlik Personeli	59	8,5
	İdari Personel	48	6,9
Kronik Hastalık	Evet	140	20,2
	Hayır	553	79,8
Tanı Sırasında Semptom	Evet	509	73,4
	Hayır	184	26,6
Semptom Eklendi mi	Evet	116	16,7
	Hayır	577	83,3
Tedavi Kullandı mı	Evet	529	76,3
	Hayır	164	23,7
Servis-YBÜ Yatışı	Ayaktan	655	94,5
	Sevis	37	5,5
	YBÜ*	1	0,0**
Bulaş Kaynağı	Hastane	161	23,2
	Hastane Dışı	491	70,9
	Belirsiz	41	5,9

\*YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi, \*\*0,1'in altında bir değer olduğu için 0,0'a yuvarlanmıştır.



Şekil 1. Semptomların görülme sıklığı



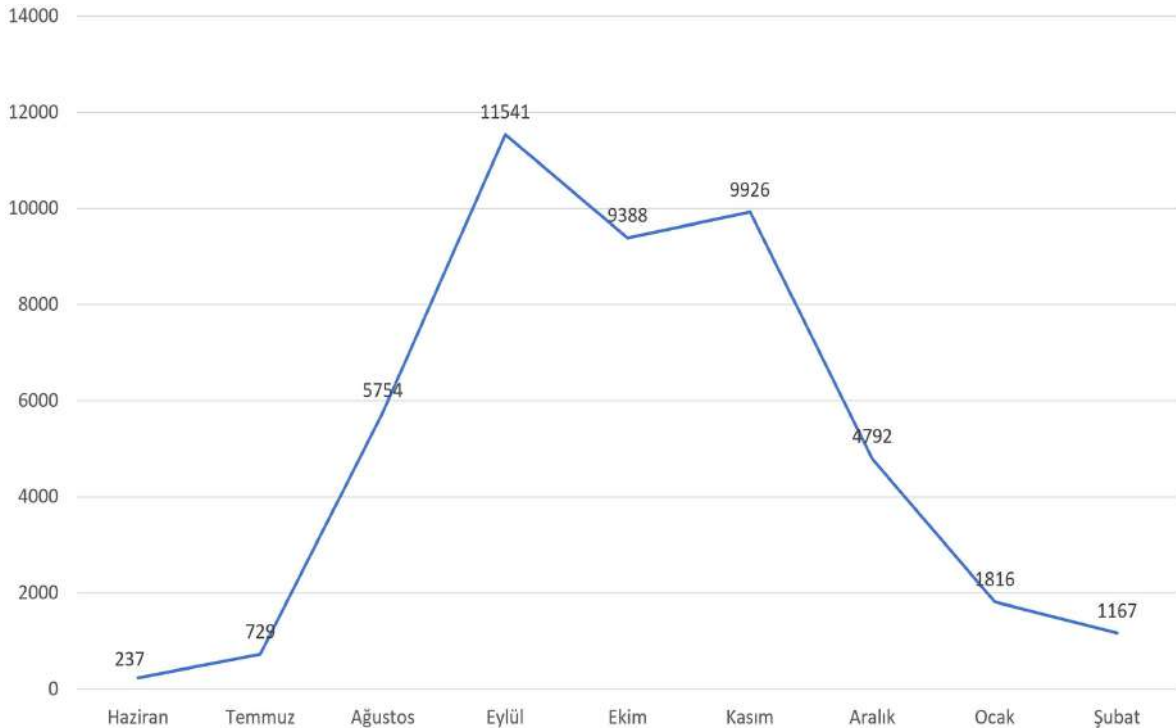
Şekil 2. Hastanemizde Covid-19 pozitif sağlık çalışanlarının aylara göre dağılımı

Çalışma ile aynı süreçte il genelinde görülen vaka sayılarının dağılım trendi Şekil 3'te verilmiştir.

Vakalardan dört kişi (%0,6) temas sonrası proflekside klorokin kullanmıştı. Hastalardan 164 kişinin (%23,7) antiviral tedavi kullanmadığı, 14 (%2) hastaya da gebe/emziren olması sebebiyle antiviral tedavi önerilmediği belirlendi. Antiviral tedavi kullanmama nedenleri; 31 kişi (%4,5) “şikayetlerinin olmaması/az olması”, 11 kişi (%1,6) “ilaçların kendilerine ulaşmaması”, iki kişi (%0,3) “önceden COVID-19 enfeksiyonu geçirmesi nedeniyle”, 45 kişi (%6,5) “vitamin kullanımının yeterli olduğunu düşündüğü için”, 27 kişi (%3,9) “ilaçların yan etkileri nedeniyle” ve 34 kişi (%4,9) ise “herhangi bir sebep olmadığı” idi. Antiviral tedaviyi kullananların yaş ortalaması  $34,1 \pm 9,71$  yıl, kullanmayanların  $31,02 \pm 7,87$  yıl idi ( $p < 0,001$ ). Kronik hastalığı olanlarda %85 ( $p = 0,007$ ) ve tanı sırasında semptomu olanlarda

%79,4 ( $p = 0,002$ ), idari personel %89,6 ve hekimlerde %82,0 ( $p = 0,005$ ), servis ve yoğun bakım ünitesinde takip edilenlerde %94,7 ( $p = 0,006$ ) antiviral tedavi kullanma oranı daha fazla idi (Tablo 2).

Çalışanların özelliklerinin antiviral tedavinin kullanımına etkileri binary lojistik regresyonla incelenmiştir. Omnibus Tests of Model Coefficients  $p < 0,001$  ve Hosmer-Lemeshow  $p = 0,139$  olarak bulunmuş olup modelin veri uyumunun yeterli düzeyde olduğunu göstermiştir. Yaş arttıkça tedavi alma artmıştı ( $p \leq 0,001$ ,  $OR = 1,044$ ). Tanı sırasında semptomu olanların olmayanlara göre 1,779 kat ( $p = 0,006$ ), kronik hastalığı olanların olmayanlara göre 1,804 kat ( $p = 0,037$ ), antiviral tedaviyi aldığı görüldü. Mesleklerin antiviral tedavi alma oranları değerlendirildiğinde; temizlik personeline göre hekimlerin 2,494 kat ( $p = 0,009$ ), hemşirelerin 2,130 kat ( $p = 0,025$ ) tedaviyi aldığı tespit edildi (Tablo 3).



Şekil 3. Covid-19 vakalarının il genelinde aylara göre dağılımı

Tablo 2. COVID-19 tanılı hastane çalışanlarının bazı özelliklerinin önerilen tedaviyi kullanımına göre karşılaştırılması

		Tedavi kullandı mı		p
		Evet n (%)	Hayır n (%)	
Cinsiyet	Erkek	303 (77,7)	87 (22,3)	0,340
	Kadın	226 (74,6)	77 (25,4)	
Kronik hastalık	Evet	119 (85,0)	21 (15,0)	0,007
	Hayır	410 (74,1)	143 (25,9)	
Tanı sırasında semptom	Evet	404 (79,4)	105 (20,6)	0,002
	Hayır	125 (67,9)	59 (32,1)	
Meslek	Hemşire	168 (77,1)	50 (22,9)	0,005
	Hekim	137 (82,0)	30 (18,0)	
	Teknisyen	142 (70,6)	59 (29,4)	
	Temizlik	39 (66,1)	20 (33,9)	
	İdari	43 (89,6)	5 (10,4)	
Takip	Servis-YBÜ*	36 (94,7)	2 (5,3)	0,006
	Ayaktan	493 (75,0)	162 (25,0)	

\*YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

Tablo 3. Çalışanların özelliklerinin önerilen tedavinin kullanımına etkileri

	p	B	OR	%95 GA
Yaş	<0,001	0,043	1,044**	1,021-1,067
Cinsiyet (referans=erkek)	0,369	-0,266	0,767	0,520-1,129
Tanı Sırasında Semptom*	0,006	0,576	1,779	1,209-2,618
Kronik Hastalık*	0,037	0,590	1,804	0,354-0,999
Meslek (referans=TP)	0,010			
Hekim	0,009	0,914	2,494	1,261-4,932
Teknisyen	0,462	0,239	1,270	0,671-2,402
Hemşire	0,025	-0,756	2,130	1,102-4,117
İdari Personel	0,060	1,065	2,901	0,957-8,788

\*Referans değer sorulara verilen "Yok" cevabıdır.

TP: Temizlik Personeli, OR: Odds Ratio, GA: Güven Aralığı

## TARTIŞMA

Bir hastanenin COVID-19 tanısı alan çalışanlarının demografik yapılarını, antiviral tedavi kullanımlarını incelemek, ayrıca hastane ve ilin vaka sayısı eğrilerini karşılaştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada, COVID-19 tanısı alanların yaş ortalaması 33,5 ve %56,3'ünün erkek olduğu görülmüştür. Çalışma ile aynı süreçte incelenen hastane ve bulunduğu il genelinde görülen vaka sayılarının dağılım trendinin benzer olduğu, ayrıca antiviral tedavi alımının yaş arttıkça arttığı, kronik hastalığı olanların, tanı sırasında semptomu olanların antiviral tedaviyi daha fazla aldığı tespit edilmiştir. İtalya ve İspanya'da COVID-19 ile enfekte olan sağlık çalışanlarının oranı sırasıyla %20 ve %12 olarak bildirilmiştir. İngiltere'de 1029 personel üzerinde yapılan bir çalışmada, doğrudan hasta bakan, hasta bakmayan ancak hastane maruziyeti riski daha yüksek olan ve klinik dışı personel olmak üzere üç grupta COVID-19 pozitifliği sırasıyla %15, %16 ve %18 olarak bildirilmiştir (8). COVID-19 ile enfekte sağlık çalışanlarının değerlendirildiği bir metaanalizde sağlık çalışanları arasında SARS-CoV-2 enfeksiyonu prevalansının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (9). Bu fark, sağlık çalışanlarının iş yeri maruziyetlerine atfedilebilir; ancak sadece birkaç çalışma bu popülasyondaki potansiyel enfeksiyon kaynağını analiz ederek hastane kaynaklı enfeksiyona karşı toplum kaynaklı enfeksiyonun etkisini değerlendirmiştir.

Çalışmamızda, sağlık çalışanları arasında SARS-CoV-2 pozitif hemşire sayısının yüksek olması, hemşirelerin genellikle doğrudan hasta bakımı için yatak başında yapılan işler, ilaç uygulaması gibi konularda harcadıkları zamanın daha fazla olması ve herhangi bir komplikasyon durumunda ilk müdahalede bulunan ekibin başında yer alması ile açıklanabilir (9). Yapılan çeşitli çalışmalarda da çalışmamızla uyumlu olarak en fazla hemşirelerin enfekte olduğu görülmektedir (9-12).

COVID-19 tanılı 31.866 sağlık çalışanının analiz edildiği bir çalışmada; 11.772 kişide ek

komorbid durum saptanmıştır. %7 hipertansiyon, %3 kardiyovasküler hastalık, %4 tip 2 diyabet, %3 KOAH olduğu bildirilmiştir (9). Bir başka metaanaliz çalışmasında ise %18 sağlık çalışanında ek komorbidite saptanmıştır. Komorbid durumların dağılımı; %2,5 hipertansiyon, %2,4 kardiyovasküler hastalık, %1,5 diyabet, %2,4 KOAH olarak bildirilmiştir (13). Bu çalışmada, komorbidite oranı diğer çalışmalarla benzer şekildedir.

Semptomatik COVID-19 tanılı sağlık çalışanlarının semptomlarının değerlendirildiği meta-analiz çalışmasında; ateş %57, öksürük %57, halsizlik %48, miyalji %44, baş ağrısı %36, boğaz ağrısı %32, nefes darlığı %22, diyare %14, mide bulantısı %9 ve göğüs ağrısı %8 olarak saptanmıştır (9). Ülkemizden Eren ve ark. (14); yapmış olduğu çalışmada ateş %65, öksürük %54, kas-eklem ağrısı %35 ve diyare %18 oranında saptanmıştır. Yakın tarihte yayınlanan bir başka meta-analiz çalışmasında ise ateş %24,6, öksürük %23,0, halsizlik %22,1, baş ağrısı %15,1, boğaz ağrısı %13,7, diyare %9,8 ve bulantı %11,8 olarak bildirilmiştir (13). Çalışmalardaki semptomların dağılım değişkenliği zaman içindeki mutasyonlar ve enfekte sağlık çalışanlarının COVID-19 aşısı durumunun bildirilmemiş olması nedeniyle olabilir. Bu çalışmaya COVID-19 aşısı yaptırmamış (aşının bulunmadığı dönemde enfekte) veya aşısı yaptırmış olsa bile -yeterli immün yanıtın gelişmemiş olduğu- 2. doz sonrası 14 gün geçmemiş COVID-19 pozitif sağlık çalışanları dahil edilmiştir.

Çalışmamızda, hastaların %5,3'ü serviste, %0,1'i (bir kişi) yoğun bakım ünitesinde, geri kalanı ayaktan tedavi gördü. Bir meta-analiz çalışmasında, COVID-19'lu sağlık çalışanlarının %15'inde hastaneye yatış gerekmiş ve %1'inde ölüm bildirilmiştir. Aynı çalışmada sağlık çalışanları için COVID-19'un sonuçları, genel popülasyonda yapılan çoğu çalışmada bildirilenlere kıyasla belirgin şekilde daha iyi bulunduğu vurgulanmıştır. Bu iyi prognoz sağlık çalışanlarının çalışma çağındaki genç bir popülasyon olmasına bağlanmıştır (13). Başka bir meta analiz çalışmasında ise çalışmamızla benzer şekilde ciddi seyir %5, ölüm ise %0,5 görülmüştür (9). Çalışmamızda, sağlık



çalışanlarında ciddi seyir ve ölüm oranının düşük olması, ülkemizde uzun bir süre COVID-19'un kötü prognozu açısından yüksek riskli sağlık çalışanlarının izinli sayılması ve aktif çalışanların daha genç yaş grubu olması nedeniyle olabilir. Çalışmada saptanan vakaların aylara göre dağılım trendi il bazındaki vaka dağılım trendine benzerlik göstermektedir. Hastane çalışanlarındaki vaka sayısının il vaka sayıları ile benzer şekilde olması sağlık çalışanlarında toplum kaynaklı bulaşların da epidemiyolojik olarak önemini göstermektedir.

Literatürde iki çalışmada yüksek riskli sağlık çalışanları arasında SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önlemek için hidroklorokin ile profilaksinin faydası değerlendirilmiştir. Her iki çalışmada da profilaksinin önemli ölçüde COVID-19 riskini azalttığı gösterilmiştir (15, 16). Çalışmanın yapıldığı tarihlerdeki güncel Sağlık Bakanlığı COVID-19 rehberinde yüksek riskli sağlık çalışanlarında hidroklorokin güçlü kanıtlar olmamakla birlikte önerilmiştir (17). Bu çalışmada, sağlık çalışanlarının yalnızca %0,6'sı hidroklorokin kullanmıştır.

Sağlık çalışanlarında antiviral tedaviye %23,7 gibi bir uyumsuzluk olması, toplumda kullanım oranlarının çok daha düşük olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda ileri yaş, semptomatik olma ve kronik hastalık varlığı COVID-19 için antiviral kullanma oranını artıran durumlar olarak belirlenmiştir. Ağır COVID-19 açısından risk oluşturan durumlar tanımlanmıştır. Bunların başlıcaları yaşlılık,

gebelik, diabetes mellitus, obezite, kronik böbrek yetmezliği, kronik karaciğer hastalığı, hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler hastalıklar, kronik akciğer hastalıklarıdır (18). Çalışmamızda ağır COVID-19 açısından risk faktörleri olan kişilerin antiviral tedaviye uyumunun daha yüksek olması, sağlık çalışanlarının risk faktörleri açısından farkındalığının yüksek olması ile açıklanabilir.

Retrospektif karakterde bir çalışma olması, enfekte sağlık çalışanlarında kişisel koruyucu ekipman uyumunun ve potansiyel enfeksiyon kaynağının analiz edilmemiş olması, yan etkilerin kişilerin beyanının esas alınarak belirtilmesi, antiviral etkinlik ve yan etki ile ilgili kaygıların irdelenmemiş olması çalışmamızın başlıca kısıtlılıklarıdır.

Sonuç olarak, sağlık çalışanları COVID-19 nedeniyle topluma göre yüksek riskli gruptadır. Toplumda ve sağlık çalışanlarında benzer vaka dağılımının görülmüştür. Çalışmada yaş ilerledikçe, kronik hastalığı ve tanı sırasında semptomu olanlarda antiviral tedaviyi kullanma oranının daha yüksek olması dikkat çekicidir. Gerek etkinlik, gerekse yan etki tartışmalarının sağlık çalışanlarında antiviral tedaviye uyumu olumsuz yönde etkilediği düşünülmüştür. Sürveyans ve filyasyon çalışmalarına devam edilerek, tedavi uyumunu etkileyen faktörler değerlendirilmeye devam edilmeli, uyumu arttırmak adına, uyumu düşük olan gruplar hedeflenerek eğitimler verilmelidir.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:16.09.2021 ve Karar No: 2021/09-20).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed*, 2020;91(1):157-60.
2. Elkholy AA, Grant R, Assiri A, Elhakim M, Malik MR, Van Kerkhove MD. MERS-CoV infection among healthcare worker and risk factors for death: retrospective analysis of all laboratory-confirmed cases reported to WHO from 2012 to 2 June 2018. *J Infect Public Health*, 2020;13(3):418-22.
3. Chowell G, Abdirizak F, Lee S, Lee J, Jung E, Nishiura H, et al. Transmission characteristics of MERS and SARS in the healthcare setting: a comparative study. *BMC medicine*, 2015;13(1):1-12.
4. Yu X, Sun S, Shi Y, Wang H, Zhao R, Sheng J. SARS-CoV-2 viral load in sputum correlates with risk of COVID-19 progression. *Crit Care*, 2020;24(1):170.
5. Liu Y, Yan L-M, Wan L, Xiang T-X, Le A, Liu J-M, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*, 2020;20(6):656-7.
6. Pala SÇ, Metintaş S. COVID-19 Pandemisinde sağlık çalışanları. *ESTÜDAM Halk Sağ Derg*, 2020;5(COVID-19 Özel Sayısı):156-68.
7. COVID-19 Rehberi. <https://covid19.saglik.gov.tr/covid-19-rehberi>, Erişim tarihi: 10 Ocak 2022.
8. Hunter E, Price DA, Murphy E, van der Loeff IS, Baker KF, Lendrem D, et al. First experience of COVID-19 screening of health-care workers in England. *The Lancet*, 2020;395(10234):e77-e8.
9. Gómez-Ochoa SA, Franco OH, Rojas LZ, Raguindin PF, Roa-Díaz ZM, Wyssmann BM, et al. COVID-19 in health-care workers: A living systematic review and meta-analysis of prevalence, risk factors, clinical characteristics and outcomes. *Am J Epidemiol*, 2021;190(1):161-75.
10. Felice C, Di Tanna GL, Zanus G, Grossi U. Impact of COVID-19 outbreak on healthcare workers in Italy: results from a national e-survey. *J Community Health*, 2020;45(4):675-83.
11. Tabah A, Ramanan M, Laupland KB, Buetti N, Cortegiani A, Mellinshoff J, et al. Personal protective equipment and intensive care unit healthcare worker safety in the COVID-19 era (PPE-SAFE): An international survey. *J Crit Care*, 2020;59:70-5.
12. Iqbal MR, Chaudhuri A. COVID-19: Results of a national survey of United Kingdom healthcare professionals' perceptions of current management strategy - A crosssectional questionnaire study. *Int J Surg*, 2020;79:156-61.
13. Gholamia M, Fawada I, Shadana S, Rowaieea R, Ghanema H, Khamisb A, et al. COVID-19 and healthcare workers: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*, 2021;104:335-346.
14. Eren E, Çelik İ, Yıldız M, Topaloğlu US, Toker KA, Fırat EA, et al. Evaluation of health care workers with COVID-19. *Klimik Derg*, 2020;33(3):230-4.
15. Bhattacharya R, Chowdhury S, Mukherjee R, Nandi A, Kulshrestha M, Ghosh R, et al. Pre exposure hydroxychloroquine use is associated with reduced COVID19 risk in healthcare workers - a retrospective cohort. *medRxiv*. 2020.
16. Chatterjee P, Anand T, Singh KJ, Rasaily R, Singh R, Das S, et al. Healthcare workers & SARS-CoV-2 infection in India: a case-control investigation in the time of COVID-19. *Indian J Med Res*, 2020;151(5):459-67.
17. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Erişim tarihi: 10 Ocak 2022. Available from: <https://covid19.saglik.gov.tr/covid-19-rehberi>
18. Bartoletti M, Azap O, Barac A, Bussini L, Ergonul O, Krause R, et al. ESCMID COVID-19 living guidelines: drug treatment and clinical management. *Clin Microbiol Infect*, 2022;28(2):222-38.

# Anti-SARS-CoV-2 antikor taramasında hızlı kaset test sonuçlarının elektrokemilüminesans immünoassay yöntemiyle doğrulanması

## Rapid cassette test results in anti-SARS-CoV-2 antibody screening verification by electrochemiluminescence immunoassay method

Nazife AKMAN<sup>1</sup> (ID), Zeynep AKIDAĞI<sup>1</sup> (ID), Pelin ÖZMEN<sup>2</sup> (ID), Rukiye YALAP<sup>3</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** COVID-19 pandemisi nedeniyle ara verilen yüz yüze eğitimin Ekim 2020'de yeniden başlaması, genç yetişkinlerde SARS-CoV-2 enfeksiyon oranlarının hızlı bir artışta olduğu döneme denk gelmiştir. Bu çalışmada, sessiz bulaştırıcılar olarak tanımlanabilecek bulaş zincirinin en büyük halkası olan genç yetişkinlerde 2019 koronavirus hastalığı (COVID-19) seropozitifliğini iki farklı serolojik metotla saptayarak epidemiyolojik veri sağlamak, asemptomatik/hafif belirtili/semptomatik vakaların bulgu-test performansı ilişkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Aralık 2020 - Şubat 2021 tarihleri arasında Kapadokya Üniversitesi ön lisans sağlık programlarında okuyan ve uygulama derslerine yüz yüze katılacak olan öğrencilerle kesitsel bir araştırma yapılmıştır. Katılımcılara, SARS-CoV-2 (şiddetli akut solunum sendromu korona virüs 2) maruziyetine bağlı olarak COVID-19 semptomları ve hastalık öyküleri hakkında bir anket uygulanmıştır. SARS-CoV-2 antikor tayini için katılımcılardan kan örnekleri alınmış ve tek bir lateral

### ABSTRACT

**Objective:** Since the resumption of face-to-face education in October 2020, which was suspended due to the COVID-19 pandemic, coincides with the period when SARS-CoV-2 infection rates in young adults are on the rise. This study focuses on the 2019 corona virus outbreak in young adults, the largest link in the chain of transmission, which can be defined as silent contagious agents. It is aimed to provide epidemiological data by detecting virus disease (COVID-19) seropositivity with two different serological methods, and to evaluate the symptom-test performance relationship of asymptomatic/mild symptom/symptomatic cases.

**Methods:** A cross-sectional study was conducted with students studying at Cappadocia University health programs between December 2020 and February 2021 and who will attend practice courses face-to-face. Participants were surveyed about their COVID-19 symptoms and disease histories based on SARS-CoV-2 exposure. For SARS-CoV-2 antibody detection, blood samples were taken from the participants and investigated with a single lateral

\*Bu çalışma, 3. Viroloji Günleri Kongresi'nde (18-20 Haziran 2021, Ankara, Türkiye) poster bildiri olarak sunulmuştur.

<sup>1</sup>Kapadokya Üniversitesi, Kapadokya Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Nevşehir

<sup>2</sup>Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Nevşehir

<sup>3</sup>Kapadokya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Nevşehir



**İletişim / Corresponding Author :** Nazife AKMAN

Kapadokya Üniversitesi, Ürgüp Yerleşkesi Kavaklıönü Mah., Ahmet Taner Kışlalı Cd. No:4

Ürgüp/Nevşehir - Türkiye E-posta / E-mail : nazife.akman@kapadokya.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 31.12.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 24.02.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.48265

Akman N, Akıdağı Z, Özmen P, Yalap R. Anti-SARS-CoV-2 antikor taramasında hızlı kaset test sonuçlarının elektrokemilüminesans immünoassay yöntemiyle doğrulanması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(1): 13 - 22

flow immunoAssay (LFIA, Novatech, Türkiye) kaset test ile araştırılmıştır. Test sonucu pozitif bulunan örnekler daha sonra SARS-CoV-2 Anti-N IgM+IgG; SARS-CoV-2 Anti-S IgM+IgG; SARS-CoV-2 Anti-RBD IgG; Anti-SARS-CoV-2 kiti (Roche, Almanya) ile elektrokemilüminesans immünoassay (ECLIA) yöntemi kullanılarak yeniden değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Çalışmaya katılan 239 örnekten LFIA yöntemine göre SARS-CoV-2 IgM/IgG sonucu pozitif olan 50 (%20,9) örnek daha sonra ECLIA yöntemi ile tekrar çalışılmıştır. ECLIA sonucuna göre hem nükleokapsid (N), hem de spike (S) antijenine karşı bireylerin %72'si (36/50), RBD antijenine karşı %70'i (35) seropozitif olarak saptanmıştır. ECLIA test sonuçları referans alınarak 239 örneğin çalışılıp 50 örneğin IgM/IgG pozitif bulunduğu kart test kitinin duyarlılığı %64 ve özgüllüğü %93 olarak saptanmıştır. Her iki yöntemle de seropozitif bulunan hastaların %46'sında (n=23) temas öyküsü bildirilirken %30'u (n=15) COVID-19 kliniği göstermiştir. Katılımcıların %54'ü (n=27) PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) testi yaptırmadığını bildirmiş fakat tamamında antikor yanıtının oluştuğu görülmüştür. Seropozitif hastaların ise yalnızca %28'inin (n=14) PCR sonucu pozitif rapor edilmiş olup bunların %4'ü kronik bir hastalığı olduğunu belirtmiştir.

**Sonuç:** Hızlı kaset test ile ECLIA'nın performansının iyi bir uyum derecesine sahip olmadığı ve farklı immunoassay testlerle doğrulamasının yapılmasının epidemiyolojik sürveyans için daha yararlı olacağı düşünülmüştür. Özellikle yeni COVID-19 varyantları bağlamında ve gençleri hedef alan toplu aşılama kampanyalarına ilginin azlığından dolayı gençlerin serolojik durumlarını izlemeye devam etmek önemli olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** SARS-CoV-2, COVID-19, LFIA, ECLIA, seroepidemioloji

flow immunoAssay (LFIA, Novatech, Turkey) cassette test. The samples with positive test result were then SARS-CoV-2 Anti-N IgM+IgG; SARS-CoV-2 Anti-S IgM+IgG; SARS-CoV-2 Anti-RBD IgG; It was re-evaluated using the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) method with the anti-SARS-CoV-2 kit (Roche, Germany).

**Results:** Of the 239 samples participating in the study, 50 (20.9%) samples that were positive for SARS-CoV2 IgM/IgG according to the LFIA method were then studied again with the ECLIA method. According to the ECLIA result, 72% (36/50) of individuals against both nucleocapsid (N) and spike (S) antigens, and 70% (35) against RBD antigen were seropositive. Based on the ECLIA test results, 239 samples were studied and 50 samples were found to be IgM/IgG positive, with a sensitivity of 64% and a specificity of 93%. Contingence history was reported in 46% (n=23) of patients who were seropositive by both methods, while 30% (n=15) showed a COVID-19 clinic. Fifty four percent (n=27) of the participants reported that they did not have a PCR (polymerase chain reaction) test, but antibody response was observed in all of them. Only 28% (n=14) of seropositive patients reported positive PCR results, and 4% of them stated that they had a chronic disease. It will be important to continue to observe the serological status of young people, particularly in the context of new COVID-19 variants and in the low interest in mass vaccination campaigns targeting young people.

**Conclusion:** It is thought that the performance of ECLIA with rapid cassette test does not have a good degree of agreement and confirmation with different immunoassay tests would be more useful for epidemiological surveillance. Especially the new COVID-19 in the context of the variants and targeting youth due to the lack of interest in vaccination campaigns continue to monitor the serological status of young people it will be important.

**Key Words:** SARS-CoV-2, COVID-19, LFIA, ECLIA, seroepidemiology

## GİRİŞ

SARS-CoV-2 tek sarmallı, pozitif polariteli bir RNA virüsüdür ve COVID-19'a neden olur. SARS-CoV-2'nin yüksek bulaşıcılık oranı, çevresel stabilitesi ile yüksek riskli gruplardaki hastalığın ciddiyeti, COVID-19'un pandemik hal almasına yol açmıştır ve Mart 2020'de Dünya Sağlık Örgütü, COVID-19'u pandemi olarak ilan etmiştir (1,2). SARS-CoV-2 bulaşmasını kontrol etmek için en önemli müdahalelerden biri erken tespittir (3).

Dünya Sağlık Örgütü kılavuzlarına göre COVID-19 vakaları; balgam, boğaz sürüntüleri ve alt solunum yolu örneklerinde gerçek zamanlı ters transkripsiyon (RT-PCR) gibi nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) kullanılarak virüs RNA'sının dizilerinin saptanmasıyla doğrulanır (4,5). Hastalığın tanısında altın standart yöntem RT-PCR olup (3), epidemiyolojik surveyans çalışmalarında da tercih edilebilir. Ancak, RT-PCR'ın zaman alıcı, pahalı bir test olması ve deneyimli laboratuvar personeli gerekliliği epidemiyolojik çalışmalarda serolojik testlere daha çok yönelmeye neden olmuştur (5). Numune kalitesinin düşük olması, hastanın asemptomatik olması ya da erken dönemde numune alınmasından dolayı düşük viral yükün bulunması, PCR inhibisyonu gibi sebeplerden RT-PCR ile yalancı negatif sonuçlar ortaya çıkabilir. Hastalarda viral yükün dalgalanmalar göstermesi, RT-PCR testlerinin saptama sınırının altında olduğunda, serolojik tanı çok değerli hale gelir ve NAAT'leri tamamlayıcı olarak kullanılabilir (6,7). Hastalığın geç döneminde (semptomların başlangıcından  $\geq 2$  hafta), özellikle virüs atılımının zamanla azalmasına bağlı RT-PCR yalancı negatifliği durumunda serolojik testler anlamlıdır. Bu nedenle saha taramalarında moleküler yöntemlere kıyasla serolojik testler daha düşük maliyet ve iş yükü ile daha hızlı gerçekleştirilebilir (3,6). Serolojik testler toplumdaki COVID-19 dolaşımının genişliğini anlamak için seroepidemiyolojik çalışmalarda da kullanılabilir (8-10).

Bu çalışmada, Kapadokya Üniversitesi sağlık programlarında öğrenim gören 18-40 yaş arasındaki genç bireylerde SARS-CoV-2 seroprevalansını hızlı tanı testleriyle saptamak aynı zamanda testin performansını ECLIA yöntemiyle doğrulamak amaçlanmıştır.

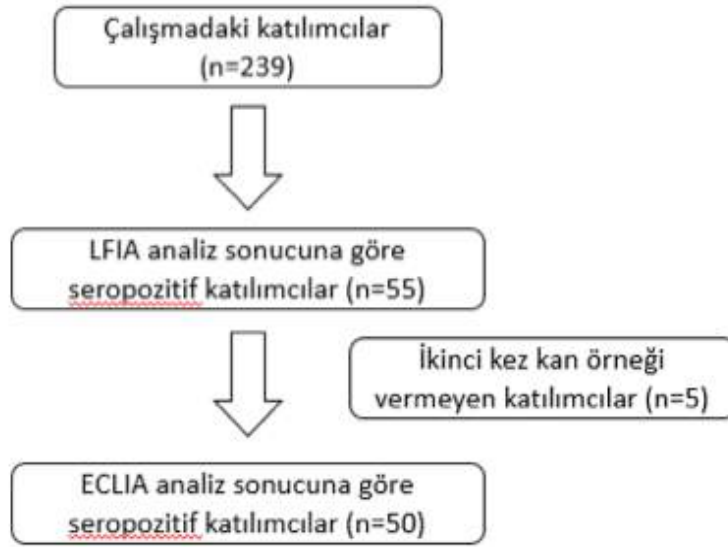
## GEREÇ ve YÖNTEM

### Çalışma Tasarımı ve Örnek Toplama

2020-2021 eğitim-öğretim yılında, Kapadokya Üniversitesi Kapadokya Meslek Yüksekokulunda eğitim gören ve uygulama dersleri için okula gelen 394 ikinci sınıf öğrencisi araştırmanın evrenini oluşturmuştur. Bu çalışmada örnekleme yöntemi kullanılmamış olup çalışmaya katılmayı kabul eden 239 (%62,2) öğrenci çalışmada yer almıştır.

Katılımcılarla, Aralık 2020-Şubat 2021 tarihleri arasında yüz yüze görüşülerek araştırmacılar tarafından hazırlanan sorular ile katılımcıların demografik verileri ve COVID-19 öyküleri araştırıldı.

Her bir katılımcıdan SARS-COV-2 IgG/IgM antikorunu belirlemek için EDTA'lı tüpe 2 ml kan örneği alındı ve test, üretici firma olan lateral flow immuno assay (LFIA, Novatech, Türkiye) önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Bu test sonucu pozitif saptanan kişilerden 5 ml kan örneği daha alınarak, oda sıcaklığında 1100 g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Beş katılımcı ikinci kez kan vermeyi onaylamadığı için çalışma dışı bırakıldı. Alikotlar, 2 ml kırmızı kapaklı kuru tüplere aktarıldı ve hemen -20°C'ye kaldırıldı. Serumlar daha sonra biyogüvenlik nakliye koşulları ile bir dış merkeze gönderildi. Örnekler, Düzen Laboratuvarlar Grubu'nda nükleokapsid proteinini hedef alan antikorların tarandığı Anti-SARS-CoV-2 N (Roche), spike proteinini hedef alan antikorların tarandığı Anti-SARS-CoV-2 S (Roche) ve SARS-CoV-2 Anti-RBD IgG Antikor yanıtı Anti-SARS-CoV-2 kiti (Roche) kullanılarak ECLIA yöntemi ile çalışılmıştır. (Şekil 1).



Şekil 1. Deneysel çalışmanın akış şeması

Bu çalışmanın sonuçları SPSS 21 kullanılarak analiz edilmiştir. Sürekli değişkenlere ait açıklayıcı istatistikler olarak ortalama±standart sapma, kategorik değişkenlere ait açıklayıcı istatistikler ise sayı ve yüzdelerle özetlenmiştir. Verilerin dağılımı Kolmogorow Simirnov testi ile değerlendirilmiş ve verilerin normal dağılmadığı tespit edilmiştir.

#### Etik Kurul İzni ve İzinler

Bu çalışma, Kapadokya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Yayın Etiği Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 29.01.2020, Karar no: 2020.29 ve Tarih: 08.03.20201, Karar no: 2021.51). Sağlık Bakanlığı Bilimsel Araştırma Platformu tarafından da onaylanmıştır (Onay no: 2020-09-20T23\_25\_44).

## BULGULAR

#### Demografik Özellikler

Çalışmaya katılan 239 öğrencinin yaş ortalaması 21,5 (min=18, max=33, standart sapma:3.085) olup %67,7'si (n=162) kadındı. Araştırma yaptığımız dönemde Türkiye'de 14 Ocak 2021 itibarıyla öncelikli olarak sağlık çalışanlarında aşılama başlanmış ancak 40 yaş altı bireyler henüz rutin aşı programı

kapsamına alınmamıştı. Bu nedenle katılımcıların hiçbirinde aşılama öyküsü bulunmamaktadır.

#### Seropozitif bireylerin özellikleri

Kart test yöntemi ile 50 (%20,9) katılımcıda antikor pozitifliği bulunmuştur. Bunların %70'nin (n=35) kadın, %64'nün (n=32) 18-20 yaş arasında ve %58'nin (n=29) İç Anadolu bölgesinde yer alan illerde ikamet ettiği belirlenmiştir (Tablo 1). Çalışma grubunda kart test ile SARS-CoV-2 antikor pozitifliği saptanan katılımcıların %46'sı (23/50) PCR testi yaptırdığını bildirmiştir. Bunların en sık test yaptırdığı zaman aralığı Ekim 2020 olarak belirtilmiştir. PCR testi yaptıran bu 23 katılımcıdan 14'ü pozitif sonuç verildiğini bildirmiş ve en sık yaşadıkları hastalık bulgularının dağılımını halsizlik %92,8 (13/14), tat-koku kaybı %71,4 (10/14) ve eklem ağrısı %71,4 (10/14) olarak ifade etmiştir (Şekil 2). PCR testi pozitif çıkan ve akciğer tomografisi çekilen dört katılımcının ikisi akciğer bulguları taşımakta ve SARS-CoV-2 antikor pozitif çıkan bireylerin %18'i (9/50) evde ilaç tedavisi almıştır (Tablo 1). Çalışma grubunda kart test sonucu pozitif olan bireyler arasında kronik hastalığı olanlar %4 (2/50) olarak tespit edilmiş ve %8'i de (4/50) tanımlanmış bir solunum yolu enfeksiyonu geçirdiğini söylemiştir.

Kart test ile SARS-CoV-2 antikor pozitifliği saptanan ve daha önce PCR testi yaptıran 23 katılımcıdan 9'u negatif sonuç verildiğini bildirmiş ve en sık rastladıkları bulguları halsizlik %55,5 (5/9) ve eklem ağrısı %44,4 (4/9) şeklinde ifade etmiştir (Şekil 2).

Kart test yöntemi ile antikor pozitifliği saptanan 50 hastanın %54'ü (27/50), PCR testi yaptırmadığını

belirtmiş ve yalnızca üçü yakın çevresinde şüpheli temas olduğu için evde izolasyona tabi tutulduğunu bildirmiştir. En sık yaşadıkları hastalık bulgularının dağılımını halsizlik %44,4 (12/27), eklem ağrısı %33,3 (9/27) ve öksürük %29,6 (8/27) oluşturmuştur. Bu bireylerin sadece biri hastalığın tipik belirtisi olan tat ve koku almada azalma hissettiğini söylemiştir (Şekil 2).

**Tablo 1.** Antikor test sonucu pozitif olan bireylerin özellikleri (n=50)

Cinsiyet	Kadın	%70 (n=35)
	Erkek	%30 (n=15)
Yaş	18-20	%64 (n=32)
	21-22	%24 (n=12)
	23 +	%12 (n=6)
Eğitim programları	Ağız ve Diş Sağlığı	%22 (n=11)
	Anestezi	%8 (n=4)
	Beslenme ve Diyetetik	%10 (n=5)
	Diş Protez Teknolojisi	%2 (n=1)
	Fizyoterapi	%12 (n=6)
	İlk ve Acil Yardım	%12 (n=6)
	Odyometri	%2 (n=1)
	Optisyenlik	%2 (n=1)
	Radyoterapi	%4 (n=2)
	Tıbbi Laboratuvar Teknikleri	%6 (n=3)
İkamet ettikleri bölgeler	Tıbbi Görüntüleme Teknikleri	%20 (n=10)
	Akdeniz Bölgesi	%18 (n=9)
	İç Anadolu Bölgesi	%58 (n=29)
	Karadeniz Bölgesi	%6 (n=3)
	Güneydoğu Anadolu Bölgesi	%12 (n=6)
Kronik hastalığınız var mı?	Doğu Anadolu Bölgesi	%6 (n=3)
	Evet	%4 (n=2)
COVID-19 geçirdiniz mi?	Hayır	%96 (n=48)
	Evet	%30 (n=15)
COVID-19 geçirdiniz mi?	Hayır	%70 (n=35)

Tablo 1 (devamı). Antikor test sonucu pozitif olan bireylerin özellikleri (n=50)

Tanımlanmış solunum yolu enfeksiyonu geçirdiniz mi?	Evvet	%8 (n=4)
	Hayır	%92 (n=46)
PCR testi yaptırdınız mı?	Evvet	%46 (n=23)
	Hayır	%54 (n=27)
Ne zaman PCR testi yaptırdınız?*	Ağustos 2020	%2 (n=1)
	Eylül 2020	%4 (n=2)
	Ekim 2020	%16 (n=8)
	Kasım 2020	%10 (n=5)
	Aralık 2020	%4 (n=2)
COVID-19 test sonucunuz nedir?	Pozitif	%28 (n=14)
	Negatif	%18 (n=9)
Akciğer tomografisi yaptırdınız mı?	Evvet	%10 (n=5)
	Hayır	%34 (n=18)
Akciğer tomografisi sonucunuz nedir?	Pozitif	%4 (n=2)
	Negatif	%6 (n=3)
Tedavi şekliniz nasıldı?	Evde ilaç tedavisi	%18 (n=8)
	Sadece evde izolasyon	%14 (n=6)
Karantinaya alındınız mı?	Evvet	%44 (n=22)
	Hayır	%56 (n=28)
Çevrenizde COVID-19 vakası oluştu mu?	Evvet	%66 (n=33)
	Hayır	%34 (n=17)
Şüpheli temasınız oldu mu?	Evvet	%46 (n=23)
	Hayır	%54 (n=27)
Aile bireyi, ev arkadaşı gibi aynı evi paylaştığınız kişilerin şüpheli teması oldu mu?	Evvet	%46 (n=23)
	Hayır	%54 (n=27)

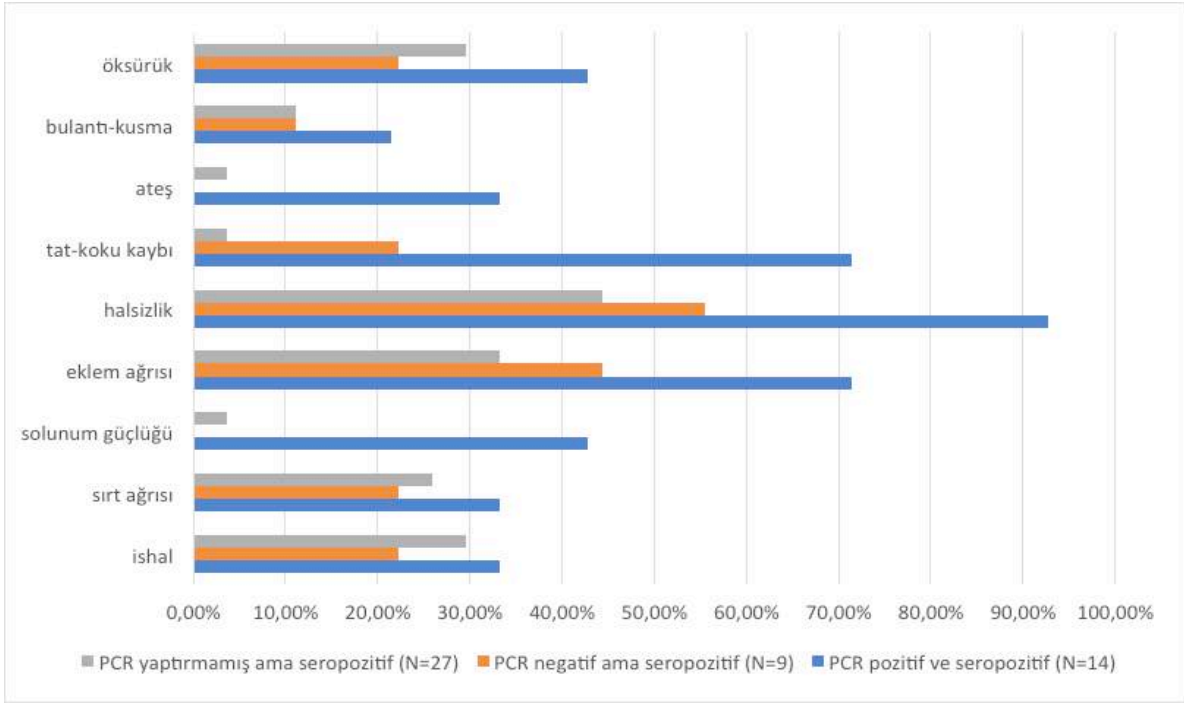
\*Test yaptırdığı tarihi hatırlayan katılımcıların sayısı ve yüzdesidir

### ECLIA Yöntemi ile Anti-SARS-CoV-2 IgM, IgG, Anti-RBD IgG Tespiti

Çalışmada; kart test yöntemine göre SARS-CoV2 IgM/IgG sonucu pozitif olan 50 katılımcıya pozitifliğin doğrulanması amacıyla ECLIA yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemle katılımcılarda nükleokapsid (N), spike (S) ve RBD antijenlerine karşı antikor yanıtı araştırılmıştır. Anti-N ve Anti-S pozitifliği 36 katılımcıda, Anti-RBD pozitifliği 35 katılımcıda tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan LFIA kitinin (Novatech, Türkiye) duyarlılığı %92 ve özgüllüğü %97,89; hedef antijenleri ise SARS-CoV2 nükleokapsit (N) ve spike proteini (S) kullanılmıştır. Duyarlılığı %98,8 (%95 CI: %98,1-%99,3) ve özgüllüğü %100 (%95 CI: %99,7-100) olarak bildirilen (Roche GmbH, 2021); Elecsys Anti SARS-CoV2 testi sonuçları referans alınarak 239 örnek çalışılmış 50 örneğin IgM/ IgG pozitif bulunduğu kart test kitinin duyarlılığı %64 ve özgüllüğü %93 olarak saptanmıştır.





Şekil 2. SARS-CoV-2 antikor pozitif bulunan katılımcıların COVID-19 bulguları\*

\*Katılımcılar birden fazla bulgu seçebilmişlerdir.

## TARTIŞMA

Serolojik testler, COVID-19'un insandan insana yayılımını kontrol altına almak için yararlı bir araç olabilir (11). Asemptomatik veya hafif semptomlar gösteren bireylerin olduğu popülasyona ait gerçek enfeksiyon oranları maskelenebileceği için serolojik testlerin kullanılması esastır (12). Çalışmamızda, asemptomatik öğrencilerde SARS-CoV-2 enfeksiyonu prevalansını tahmin etmek için serolojik testler yapılmıştır. Sonuçlarımız, bireylerin %11,29'unun (27/239) semptom göstermediği için test yaptırmadığını fakat antikor pozitifliğine sahip olduğunu göstermiştir ve bulgularımız pek çok araştırma ile uyumlu olarak SARS-CoV-2 testi pozitif çıkan çok sayıda kişinin hiçbir semptom göstermediğini doğrulamıştır (13-16). Bu durumun toplumdaki sessiz bulaştırıcıların oranı ve hastalığın bulaşındaki rolleri hakkında farkındalık yaratması gerektiği kanısına varılmıştır.

Çalışmaya başlanılan tarihte ülkemizde günlük vaka sayısının 30 bin civarı olması ve yüz yüze eğitim için okula gelen öğrencilerde asemptomatik, hafif/ geçici, semptomatik enfeksiyonların olabilmesi, hastalığı geçirmiş bireylerin saptanması gibi nedenlerle SARS-CoV-2 antikorları araştırılmış ve %20,9 (50/239) oranında antikor pozitifliği tespit edilmiştir (17). Bu durumun günlük vaka sayısına baktığımızda olası olduğu düşünülmüştür. Aynı şekilde katılımcıların neredeyse yarısının hastaneye başvurarak test yaptırdıkları tarihlerin güz aylarında olduğu görülmüştür (Tablo 1).

Üniversite öğrencileri arasında ülkemize ait SARS-CoV-2 antikor prevalansına ilişkin veriler sınırlıdır. Çünkü ülkemizdeki pek çok üniversitede eğitim, 11 Mart 2020 tarihinden itibaren uzaktan olacak şekilde sürmüştür. Bununla birlikte çalışmamızdaki örneklerin yükselen bir antikor titresi ile erken enfeksiyonu, azalan antikor üretimi ile önceki enfeksiyonu veya başka bir virüsle çapraz reaktiviteyi temsil edebileceği

düşünüldüğünde bireylerin kişisel koruyucu ekipmanlara karşı tutumu oldukça önemli yer tutmaktadır.

Mayıs 2020'de Los Angeles'ta üniversite öğrencileri üzerinde yapılan bir seroprevalans çalışması, o zamanki toplum seroprevalansına benzer şekilde sadece %4,0'lık antikor pozitifliği oranı bulmuştur. Düşük seroprevalans, muhtemelen Mart 2020'de fiziki olarak üniversite kampüsünün kapatılmasıyla açıklanmaktadır (18). İngiltere'de 2.905 üniversite öğrencisi ile SARS-CoV-2 seroprevalansının araştırıldığı başka bir çalışmada, antikor pozitifliği %17,8 (%95CI, 16,5-19,3) olarak bildirilmiştir (19).

Pandemi sürecinde birçok insan grip benzeri semptomlarla hastanelere başvurmuştur. Olası pozitiflik durumunda kendini izole etmeye yönelik tavsiyelere rehberlik etmek ve hastalığın daha fazla yayılmasını önlemek için COVID-19'u en çok öngören semptomların kombinasyonu belirlenmiştir (20). Çalışmamızdaki tüm seropozitif katılımcılarda tat ve koku kaybını %26 (13/50), sırt ağrısını %28 (14/50) oranında tespit edilmiştir (Şekil 2).

Bu çalışmada, epidemiyolojik sürveyans çalışmalarında kalabalık kitlelere daha hızlı ulaşmak için başvurulabilen hızlı kaset test sonuçlarını, başka bir immunoassay testle doğrularken aynı zamanda daha etkin hedef moleküllerin dahil edilmesiyle bu testlerin daha duyarlı sonuçlar ortaya çıkarabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle spike ve nükleokapsid antijenlerinin yanısıra RBD molekülüne karşı gelişen antikor yanıtı da araştırılmıştır. Anti SARS-CoV-2 S, N ve RBD IgG antikor yanıtları ECLIA yöntemi ile sırasıyla (S ve N aynı şekilde) %72 ve %70 olarak saptanmıştır. Her üç antijene karşı gelişen antikor yanıtları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ancak; RBD'ye karşı gelişen antikorların kristal yapılarının araştırıldığı bir çalışmada, bu antikorların ACE2 reseptörüne bağlanmayı inhibe ederek, viral girişi bloke ettiği ve diğer koronavirüslerle çapraz reaksiyon vermediği bu nedenle türlere özgü bir yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (21). Nötralizan antikorların RBD proteinine karşı gelişmesi anti-RBD antikorlarının tanısal değerini ortaya koymaktadır. LFIA testinde araştırılan S ve N

antijenlerine karşı gelişen antikor yanıtının yanı sıra RBD molekülünde dahil edildiği kitlerin dizayn edilmesi bu testlerin performansını arttırabilir.

Çalışmamızda; duyarlılığı %92, özgüllüğü %97,89 olduğu bildirilen bir kart test yöntemini kullanarak SARS-CoV-2 IgG ve IgM antikorları taranmıştır. Bulgularımıza göre ilgili testin duyarlılığını %64 ve özgüllüğünü %93 olarak saptanmıştır. Çalışmalarında antikor taraması yapan Nicol ve ark. (22) CLIA (kemilüminesans immün assay), ELISA (enzym linked immuno sorbent assay), kart test yöntemlerini kıyaslamışlar ve çalışmamız gibi diğer yöntemlere göre kart testin duyarlılığını daha düşük, özgüllüğünü benzer bulmuşlardır. Bu sonuçlara göre kart testlerde çapraz reaksiyon olma olasılığı muhtemel sonuçlar arasındadır. Roche anti-SARS-CoV-2 testini değerlendiren Lau ve ark. (23) çalışmalarında; kitin minimum çapraz reaktivite ile mükemmel performans gösterdiğini bildirmişlerdir. Merrill ve ark. (24) araştırmalarında, Roche anti-SARS-CoV-2 testinin duyarlılığını %98,9 bulmuşlardır. Bu varyasyonda hedef antijenlerdeki (nükleokapsid ve spike protein) ve immünoassay formatındaki (sandviç ve indirekt) farklılıkların etkili olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızın en önemli kısıtlılığı, sadece LFIA pozitif örneklerin doğrulanması yoluna gidilmesiydi. Örneklerin tamamının ECLIA ile antikor yanıtı yönünden taranması; kaset testlerde sık rastlanılan prozone etkisinden doğacak yalancı negatif sonuçları yakalayabilir ve bu sonuçlar test performansını etkileyebilirdi. Ancak çalışmamızda, kaset test sonucu pozitif çıkan katılımcıların örnekleri ECLIA ile çalışılmış olup çalışmanın örneklemini daraltmıştır.

Araştırmanın bir diğer sınırlılığı, kolayda örnekleme stratejisinin benimsenmesidir. Test kitlerine erişimin uzaması, mevcut eğitim-öğretim yılı içerisinde daha fazla sayıda katılımcıya ulaşmayı engellemiştir. Bu nedenlerle örneklem daha geniş öğrenci popülasyonunu tam olarak temsil edememiştir. Tüm bunlara rağmen Şubat 2021'deki bulgularımız, sonbahar döneminde artan vaka oranlarına rağmen öğrencilerin büyük bir bölümünün enfeksiyona karşı kendilerini koruyabildiğini göstermektedir. Ayrıca, virüsün yayılmasını durdurmak,

üniversitelerde eğitimin başlamasına paralel olarak yurtlarda olabilecek büyük salgınları önlemek için şüpheli vakaların erken tespiti, izolasyonu ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin hızlı uygulanması ile halk sağlığı adımı attığımızı düşünüyoruz.

Sağlık çalışanlarının COVID-19 seropozitiflik oranlarının toplum prevalansına göre yüksek olduğunu bildiren birçok çalışma mevcuttur (25). Katılımcı grubun sağlık stajyerlerinden oluşması ve bu grupların seroepidemiolojik envanterinin çıkarılması, nozokomiyal enfeksiyon risk yönetiminde değerli bir yaklaşımdır.

Çalışmamızda, genç bireyler arasında asemptomatik

olarak hastalığı geçirenlerin semptomatik bireylere göre çoğunlukta bulunması, genç bireylerin COVID-19 hastalığının yayılmasında önemli bir rezervuar olduğunu göstermektedir. Bu nedenle özellikle aşı karşıtı tutumlar sergileyen veya aşı kararsızlığı yaşayan genç bireylerin aşılama yönünde kazanılması toplum sağlığının iyileştirilmesi adına büyük önem arz etmektedir.

Son olarak, hızlı antikor testlerinin analitik performansları kohort gruplarının özelliklerine, numunenin alınış zamanına ve kullanılan hedef viral antijenlerin yapısına bağlı olarak değişse de başka bir serolojik yöntem ile doğrulanması; salgın yönetimi ve izleminde doğru adımlar atılmasına olanak sağlayacaktır.

## TEŞEKKÜR

Katkılarından dolayı Kapadokya Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Proje Başkanlığı'na ve Düzen Laboratuvarlar Grubu'na teşekkür ederiz.

## FİNANSAL DESTEK

Bu çalışma, Kapadokya Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Proje Başkanlığı (BAPB) tarafından KÜN.2020-BAGP-003 ve KÜN.2021-BAPG-009 numaralı projeler olarak desteklenmiştir.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Kapadokya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Yayın Etiği Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 29.01.2020, Karar no: 2020.29 ve Tarih: 08.03.20201, Karar no: 2021.51).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Espejo AP, Akgun Y, Al Mana AF, Tjendra Y, Millan NC, Gomez-Fernandez C, et al. Review of current advances in serologic testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol*, 2020;154(3):293-304.
2. Kubina R, Dziedzic A. Molecular and serological tests for COVID-19 a comparative review of SARS-CoV-2 coronavirus laboratory and point-of-care diagnostics. *Diagnostics*, 2020;10(6):434.

3. Lee CYP, Lin RT, Renia L, Ng LF. Serological approaches for COVID-19: epidemiologic perspective on surveillance and control. *Front Immunol*, 2020;11:879.
4. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. Geneva: World Health Organization. 2020.
5. Vengesai A, Midzi H, Kasambala M, Mutandadzi H, Mduluzi-Jokonya TL, Rusakaniko S, et al. A systematic and meta-analysis review on the diagnostic accuracy of antibodies in the serological diagnosis of COVID-19. *Syst Rev*, 2021;10(1):1-23.
6. Wolff F, Dahma H, Duterme C, Van den Wijngaert S, Vandenberg O, Cotton F, et al. Monitoring antibody response following SARS-CoV-2 infection: diagnostic efficiency of 4 automated immunoassays. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2020;98(3):115140.
7. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*, 2020;20(5):565-74.
8. Lassaunière R, Frische A, Harboe ZB, Nielsen AC, Fomsgaard A, Krogfelt KA, et al. Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. *MedRxiv*, 2020.
9. GeurtsvanKessel CH, Okba NM, Igloi Z, Bogers S, Embregts CW, Laksono BM, et al. An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment. *Nat Commun*, 2020;11(1):1-5.
10. Rastawicki W, Rokosz-Chudziak N. Characteristics and assessment of the usefulness of serological tests in the diagnostic of infections caused by coronavirus SARS-CoV-2 on the basis of available manufacturer's data and literature review. *Przegl Epidemiol*, 2020;74(1):49-68.
11. Toulis P. Estimation of COVID-19 prevalence from serology tests: a partial identification approach. *J Econom*, 2021;220(1):193-213.
12. Infantino M, Damiani A, Gobbi FL, Grossi V, Lari B, Macchia D, et al. Serological assays for SARS-CoV-2 infectious disease: benefits, limitations and perspectives. *Isr Med Assoc J*, 2020;22:203-10.
13. Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, Kimball A, James A, Jacobs JR, et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med*, 2020;382:2081-90.
14. Li R, Pei S, Chen B, Song Y, Zhang T, Yang W, et al. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science*, 2020;368:489-93.
15. Gudbjartsson DF, Helgason A, Jonsson H, Magnusson OT, Melsted P, Norddahl GL, et al. Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic population. *N Engl J Med*, 2020;14.
16. Sutton D, Fuchs K, D'Alton M, Goffman D. Universal screening for SARS-CoV-2 in women admitted for delivery. *N Engl J Med*, 2020;382:2163-4.
17. TC. Sağlık Bakanlığı COVID-19 Bilgilendirme Platformu. <https://covid19.saglik.gov.tr/TR-66935/genel-koronavirus-tablosu.html>, Erişim Tarihi:19 Temmuz 2021.
18. Tilley K, Ayyavazyan V, Martinez L, Nanda N, Kawaguchi ES, O'Gorman M, et al. A cross-sectional study examining the seroprevalence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibodies in a university student population, 2020;67(6):763-8.
19. Vusirikala A, Whitaker H, Jones S, Tessier E, Borrow R, Linley E, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in university students: cross-sectional study, December 2020, England. *J Infect*, 2021;83(1):104-11.
20. Rossman H, Keshet A, Shilo S, Gavrieli A, Bauman T, Cohen O, et al. A framework for identifying regional outbreak and spread of COVID-19 from one-minute population-wide surveys. *Nat Med*, 2020;26(5):634-8.
21. Ju B, Zhang Q, Ge X, Wang R, Yu J, Shan S, et al. Potent human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Biorxiv*, 2020;10(2020.03):21-990770.
22. Nicol T, Lefeuvre C, Serri O, Pivert A, Joubaud F, Dubée V, et al. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J Clin Virol*, 2020;129; 104511.
23. Lau CS, Hoo SP, Yew SF, Ong SK, Lum LT, Heng PY, et al. Evaluation of an electrochemiluminescent SARS-CoV-2 antibody assay. *J Appl Lab Med*, 2020;5(6):1313-23.
24. Merrill AE, Jackson JB, Ehlers A, Voss D, Krasowski MD. Head-to-head 316 comparison of two SARS-CoV-2 serology assays. *J Appl Lab Med*, 2020; 1;5(6):1351-7.
25. Varona JF, Madurga R, Peñalver F, Abarca E, Almirall C, Cruz M, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in over 6000 healthcare workers in Spain. *Int J Epidemiol*, 2021;50(2),400-9.

# Ayaktan başvuran hastaların idrar kültürlerinde üretilen *Escherichia coli* izolatlarında antimikrobiyal direnç oranları: beş yıllık analiz

## Antimicrobial resistance rates in *Escherichia coli* strains isolated in urine cultures of outpatients: five years analysis

Ayten GÜNDÜZ<sup>1</sup> (ID), Ahmet MANSUR<sup>1</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** *Escherichia coli* (*E. coli*), dünya çapında bakteriyel enfeksiyonların en yaygın patojenidir ve üriner sistem enfeksiyonlarının (ÜSE) %80 kadarından sorumludur. Son yıllarda *E. coli*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyallere karşı direnç tüm dünyada artmakta olup tedavi başarısızlığını ve tedavi maliyetlerindeki artışı önlemek için direnç oranlarının sürekli olarak izlenmesi ve ampirik tedavi önerilerinin güncellenmesi gerekmektedir.

**Yöntem:** Bu çalışmada, 2015-2019 yılları arasında Malatya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına tüm polikliniklerden gönderilen idrar kültürü örneklerinde üreyen *E. coli* suşlarının antimikrobiyal direnç oranları retrospektif olarak incelenmiştir. Anlamli sayıda üremesi olan plaklardaki bakterilerin identifikasyonu ve antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT) için konvansiyonel yöntemler ve Vitek 2 Compact otomatize sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanılmıştır. ADT sonuçları Antibiyotik duyarlılık testleri üzerinde Avrupa Komitesi (EUCAST) kılavuzlarına göre duyarlı ve dirençli olarak belirlenmiştir.

### ABSTRACT

**Objective:** *Escherichia coli* (*E. coli*) is the most common pathogen of bacterial infections worldwide and is responsible for 80% of urinary tract infections (UTIs). In recent years, resistance to antimicrobials used in the treatment of infections caused by *E. coli* has been increasing all over the world, and it is necessary to constantly monitor resistance rates and update empirical treatment recommendations in order to prevent treatment failure and increase in treatment costs.

**Methods:** In this study, antimicrobial resistance rates of *E. coli* strains grown in urine culture samples sent from all polyclinics to Malatya Training and Research Hospital Microbiology laboratory between 2015-2019 were retrospectively investigated. Conventional methods and Vitek 2 Compact automated system (BioMérieux, France) were used for the identification of bacteria in plaques with significant growth and for antimicrobial susceptibility testing (AST). AST results were determined as sensitive and resistant according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines.

<sup>1</sup>Malatya Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Malatya



İletişim / Corresponding Author : Ayten GÜNDÜZ

Malatya Turgut Özal Üni.Tıp Fak. EAH. Tıbbi Mik. Lab. Özalper Mah.Turgut Özal Bulvarı  
No:4 Malatya - Türkiye E-posta / E-mail : aytegrunduz@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 16.03.2022  
Kabul Tarihi / Accepted : 07.06.2022

DOI ID : 10.55051/TurkHijyen.2023.49379

Gündüz A, Mansur A. Ayaktan başvuran hastaların idrar kültürlerinde üretilen *Escherichia coli* izolatlarında antimikrobiyal direnç oranları: beş yıllık analiz  
Türk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(1): 23 - 32

**Bulgular:** Beş yıllık sürede poliklinik hastalarının idrar kültürlerinin %14,8 (22636/153006)'inde anlamlı üreme tespit edilerek tanımlama ve ADT'leri çalışılmıştır. Tanımlanan etkenlerin %68,3 (15475/22636)'ünü *E. coli* oluşturmuştur. Direnç oranlarının en yüksek olduğu antimikrobiyal ilaçlar sırasıyla ampisilin (%65,2), amoksisilin/klavulanat (%38,5), trimetoprim/sulfametoksazol (%36,3), sefaleksim (%35) ve sefuroksim (%31,3) olarak tespit edilmiştir. En az direnç oranları sırasıyla; karbapenemlere (%0,6-2,1), fosfomisine (%3,6), nitrofurantoin (%5,8) ve amikasine (%7,5) karşı bulunmuştur. Kinolon direnç oranları levofloksasine %16,7 ve siprofloksasine %19,1 ve norfloksasine %21,9 olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği [Infectious Diseases Society of America (IDSA)] rehberinde ÜSE tedavisinde ilk seçenek olarak trimetoprim/sulfametoksazol, alternatif olarak da kinolonlar tavsiye edilmektedir. Ayrıca uluslararası tedavi rehberleri, komplikasyonsuz alt ÜSE'lerin ampirik tedavisinde direnç oranları %20'den yüksek antimikrobisidlerin kullanımını önermemektedir. Çalışmamızda; levofloksasin, siprofloksasin ve norfloksasin direnç oranları birbirine yakın olup ampirik tedavi için uygun görünmektedir, ancak trimetoprim/sulfametoksazol direnç oranı yüksek görülmüştür (%36,3). Toplum kökenli hasta idrar örneklerinden beş yıllık sürede izole edilen *E. coli* izolatlarında saptadığımız %26,1'lik GSBL (genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz) oranıyla birlikte, direnç oranları yüksek ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, trimetoprim/sulfametoksazol ve sefalosporinlerin ampirik tedavi için uygun olmadığını düşünmekteyiz. Çalışmamızdaki sonuçlara dayanarak fosfomisin tek doz oral kullanım avantajı, yüksek hasta uyumu ve düşük yan etki profili ile ayaktan hastalarda ampirik tedavi için ilk seçilecek ilaç olduğunu ve özellikle nonkomplike ÜSE'lerin ampirik tedavisinde nitrofurantoinin alternatif olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobiyal direnç, *Escherichia coli*, GSBL

**Results:** It was detected significant growth in 14.8% (22636/153006) of urine cultures of outpatients over a five-year period, and identification and ASTs were studied. *E. coli* constituted 68.3% (15475/22636) of the identified factors. The antimicrobial drugs with the highest resistance rates were ampicillin (65.2%), amoxicillin/clavulanate (38.5%), trimethoprim/sulfamethoxazole (36.3%), cephalexin (35%) and cefuroxime (31.3%) respectively. The least resistance rates were found against carbapenems (0.6-2.1%), fosfomycin (3.6%), nitrofurantoin (5.8%) and amikacin (7.5%), respectively. Quinolone resistance rates were found to be 16.7% for levofloxacin, 19.1% for ciprofloxacin and 21.9% for norfloxacin.

**Conclusion:** In the guideline of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), trimethoprim/sulfamethoxazole is recommended as the first choice in the treatment of UTI, and quinolones are recommended as an alternative. In addition, international treatment guidelines do not recommend the use of antimicrobials with resistance rates higher than 20% in the empirical treatment of uncomplicated lower UTIs. In our study, the resistance rates of levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin were close to each other and seemed appropriate for empirical treatment, but the rate of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance was high (36.3%). It is thought that ampicillin, amoxicillin, amoxicillin/clavulanate, trimethoprim/sulfamethoxazole and cephalosporins with high resistance rates are not suitable for empirical treatment, with an ESBL (extended spectrum  $\beta$ -lactamase) rate of 26.1% in *E. coli* isolates isolated from community-acquired patient urine samples over a five-year period. Based on the results of our study, it is thought that fosfomycin is the first drug of choice for empirical treatment in outpatients with its advantage of single-dose oral use, high patient compliance and low side-effect profile, and nitrofurantoin is an alternative especially in the empirical treatment of non-complicated UTIs.

**Key Words:** Antimicrobial resistance, *Escherichia coli*, ESBL

## GİRİŞ

*E. coli*, dünya çapında bakteriyel enfeksiyonlarının yaygın patojenidir ve üriner sistem enfeksiyonlarının (ÜSE) yaklaşık %80'inden sorumludur (1, 2). Son yıllarda *E. coli*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyallere karşı direnç tüm dünyada artmaktadır. Toplum kaynaklı ÜSE'lerde, beta-laktam grubu antibiyotiklerin ve geniş spektrumlu sefalosporinlerin uygunsuz kullanımı GSBL üreten *E. coli* suşlarında artışa yol açmaktadır (3,4). Bu durumda oluşan tedavi başarısızlığını ve tedavi maliyetlerindeki artışı önlemek için direnç oranlarının sürekli olarak izlenmesi ve ampirik tedavi önerilerinin güncellenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda, beş yıllık süreçte hastanemiz polikliniklerine ayaktan başvuran hastaların idrar kültürlerinden izole edilen *E. coli* suşlarının antimikrobiyallere direnç oranları araştırılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

2015-2019 yılları arasında Malatya Eğitim Araştırma Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarına tüm polikliniklerden gönderilen idrar kültürü örneklerinde üreyen *E. coli* suşlarının antimikrobiyal direnç oranları retrospektif olarak incelenmiştir. İdrar örnekleri %5 koyun kanlı agar (KKA) ve Eosin Methylene Blue (EMB) agar besiyerlerine ekilerek 35°C'de 16-48 saat inkübe edilmiştir. Üremesi olan plaklardan koloni sayısı  $\geq 10^5$  kob/mL olanlar işleme alınmıştır. Bakterilerin tanımlanmasını ve ADT için konvansiyonel yöntemler ve Vitek 2 Compact otomatize sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanılmıştır. ADT sonuçları EUCAST klavuzlarına göre duyarlı ve dirençli olarak belirlenmiştir (5). Orta duyarlı suşlar istatistiksel olarak dirençli kabul edilmiştir. İzolatların GSBL üretimini tespit için otomatize sistem ve/veya seftazidim ve seftazidim/klavulanat kombine disk yöntemi çalışılmıştır. Kombine disk

yönteminde klavulanat içeren disk ile  $\geq 5$  mm zon çapı tespit edilen suşlar GSBL pozitif olarak kabul edilmiştir (6).

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 17 (SPSS Incorporated, Chicago) programında ki-kare yöntemi ile değerlendirilmiş olup,  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bu çalışma, Malatya Turgut Özal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiş (Tarih: 06.02.2022 ve Karar No: 2022/22) Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak yapılmıştır.

## BULGULAR

Beş yıllık sürede poliklinik hastalarının idrar kültürlerinin %14,8 (22636/153006)'inde anlamlı üreme tespit edilerek tanımlama ve ADT'leri çalışılmıştır. Tanımlanan etkenlerin %68,3 (15475/22636)'ünü *E. coli* oluşturmuştur. *E. coli* suşlarının %73,4 (11359/15475)'ü kadın hasta örneklerinden, %26,6,4 (4116/15475)'sı erkek hasta örneklerinden izole edilmiştir ( $p < 0,001$ ). Yaş ortalaması 25,2 (0-104) olup, suşlar en sık pediatri (%36,9) ve üroloji (%22,6) polikliniklerinden gönderilen örneklerden izole edilmiştir. *E. coli* izolatlarının polikliniklere göre dağılım yüzdeleri Tablo 1'de verilmiştir.

Kombine disk testi veya otomatize sistem ile GSBL tespit edilen suş oranı %26,1 (3625/13892) olarak bulunmuştur. Direnç oranlarının en yüksek olduğu antimikrobiyal ilaç ampisilin (%65,2) olup, diğerleri sırasıyla; amoksisilin/klavulanat (%38,5) ve trimetoprim/sulfametoksazol (%36,3), sefaleksim (%35) ve sefuroksim (%31,3) olarak tespit edilmiştir. En az direnç oranları sırasıyla; karbapenemlere (%0,6-2,1), fosfomisine (%3,6), nitrofurantoine (%5,8) ve amikasine (%7,5) karşı bulunmuştur. İzolatların antimikrobiyal direnç oranları Tablo 2' de sunulmuştur.

Tablo 1. Suşların gönderildikleri polikliniklere göre dağılımı

Poliklinik	%
Pediyatri	36,9
Üroloji	22,6
Acil	19,9
Enfeksiyon Hastalıkları	7,0
İç Hastalıkları	6,0
Kadın Hastalıkları ve Doğum	3,8
Nefroloji	1,2
Diğer	2,6
<b>Toplam</b>	<b>100,0</b>

Tablo 2. *E. coli* izolatlarının antimikrobiyallere direnç oranları

Antimikrobiyal	Dirençli izolat / çalışılan izolat	Direnç (%)
Ampisilin	8725/13385	65,2
Amoksisilin/klavulanat	4971/12913	38,5
Piperasilin/tazobaktam	1317/7028	18,7
Sefaleksim	3115/8899	35,0
Sefuroksim	4290/13696	31,3
Sefksim	3723/12439	29,9
Sefotaksim	2117/7695	27,5
Seftazidim	2702/10151	26,6
Sefepim	2396/11399	21,0
Ertapenem	244/11459	2,1
İmipenem	72/10906	0,7
Meropenem	30/5087	0,6
Norfloksasin	2505/11457	21,9
Siprofloksasin	749/3915	19,1
Levofloksasin	167/1002	16,7
Amikasin	983/13104	7,5
Gentamisin	2311/14205	16,3
Trimetoprim/sulfametoksazol	5212/14340	36,3
Nitrofurantoin	829/14197	5,8
Fosfomisin	406/10709	3,8



Ampisiline direnç oranı diğer tüm antimikrobiyallere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Piperasilin/tazobaktam direnci amoksisilin/klavulanata göre düşük olduğu belirlenmiştir ( $p<0,001$ ). Sefepim sefalosporinler arasında direnç oranı en düşük olarak tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ).

Karbapenemlerden meropenem ile imipenem arasında anlamlı direnç farkı olmayıp ( $p:0,602$ ), ertapenem ile aralarındaki direnç farkı anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Ertapenem dâhil karbapenemlerin diğer tüm antimikrobiyallere göre direnç oranları düşük olduğu belirlenmiştir

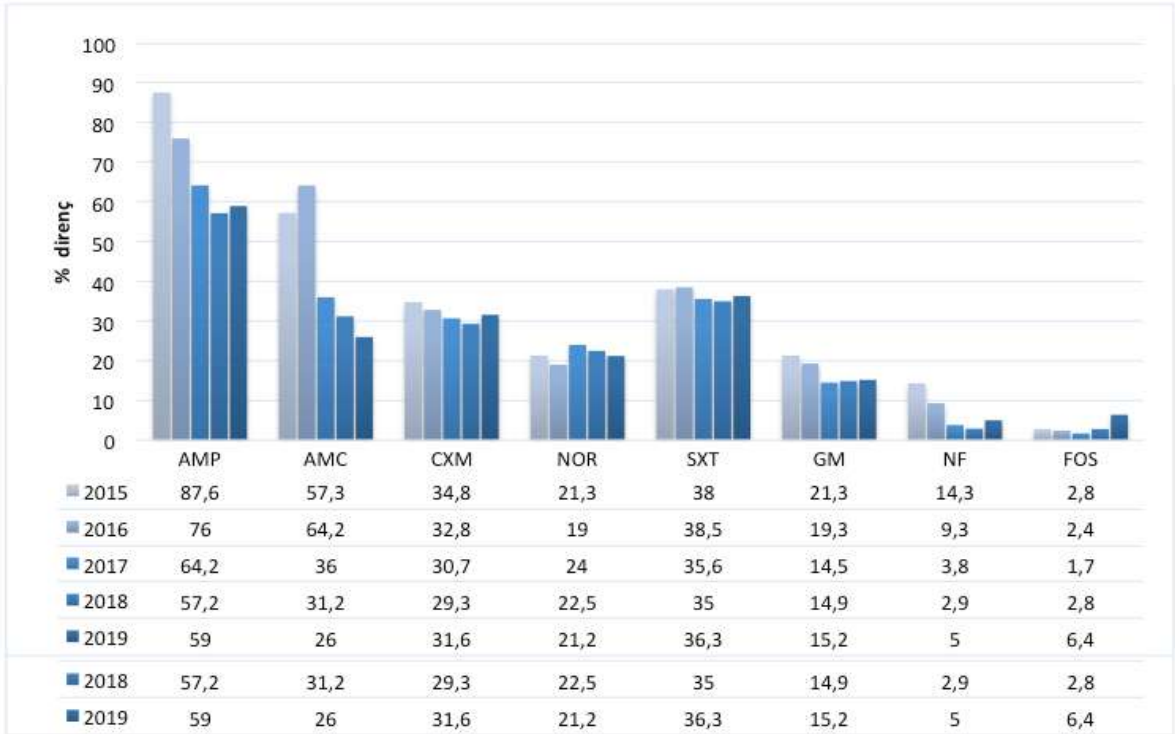
( $p<0,001$ ).

Levofloksasin direnci siprofloksasin ( $p:0,074$ ) ve norfloksasin ( $p<0,001$ ) direnç oranlarından düşük görülmüştür.

Amikasin direnci gentamisin direncinden düşük olduğu belirlenmiştir ( $p<0,001$ ).

Karbapenemlerden sonra direnç oranı en düşük antimikrobiyaller olan fosfomisin (%3,6) ile nitrofurantoin (%5,8) arasındaki direnç oranı farkı anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ).

Ayaktan hastalara ampirik tedavide sıklıkla tercih edilen antimikrobiyallerin yıllara göre direnç oranlarının değişimi Tablo 3 ve Şekil 1' de verilmiştir.



Şekil 1. Yıllara göre *E. coli* izolatlarının sık kullanılan antimikrobiyallere direnç oranları (%)

AMP: Ampisilin, AMC: Amoksisilin/Klavulanat, CXM: Sefuroksim, NOR: Norfloksasin, SXT: Trimetoprim/Sulfametoksazol, GM: Gentamisin, NF: Nitrofurantoin, FOS: Fosfomisin

Tablo 3. Yıllara göre *E. coli* izolatlarının sık kullanılan antimikrobiyallere direnç oranları (n/N)

Antimikrobiyal	2015	2016	2017	2018	2019
Ampisilin (AMP)	1501/1713	1040/1368	2001/3119	1888/3301	2295/3884
Amoksisilin/Klavulanat (AMC)	983/1713	884/1376	1014/2811	1100/3201	990/3812
Sefuroksim (CXM)	597/1713	433/1320	947/3081	1083/3695	1230/3887
Norfloksasin (NOR)	281/1317	223/1174	626/2647	579/2574	796/3745
Trimetoprim/Sulfametoksazol (SXT)	651/1711	750/1948	1113/3125	1286/3668	1412/3888
Gentamisin (GM)	364/1712	377/1948	431/2971	550/3691	589/3883
Nitrofurantoin (NF)	235/1643	175/1890	119/3115	107/3695	193/3854
Fosfomisin (FOS)	3/106	21/860	46/2711	89/3178	247/3854

## TARTIŞMA

Hastane polikliniklere başvuran ÜSE hastalarına genellikle idrar kültürü istenmeden veya kültür sonuçları beklenmeden hastanın yakınmaları ve biyokimyasal idrar analizi sonuçlarına göre antimikrobiyal ilaç başlanmaktadır. İdeal ampirik antimikrobiyal tedavi için muhtemel etkenler ve duyarlı oldukları antimikrobiyaller dikkatle izlenmelidir (7). *E. coli* toplum kökenli ve hastane kaynaklı ÜSE etkenleri arasında en yaygın bakteriyel patojendir. Bu nedenle özellikle toplum kökenli ÜSE'lerde *E. coli* için güncel antimikrobiyal duyarlılık profili göz önüne alınarak başlanacak bir ampirik tedavinin başarı şansı çok yüksektir.

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de üropatojen *E. coli* suşlarının neden olduğu ÜSE'lerde tedavide kullanılan antimikrobiyallere karşı direnç artışı görülmektedir. Direnç oranları antimikrobiyal kullanım sıklığı ve politikalarındaki farklılıklar nedeniyle bölgeler arasında değişmektedir (2-4, 8, 9).

Çalışmamızda, ampisilin ve amoksisilin/klavulanat için 2015 ile 2019 yıllarında direnç oranları farkı son derece belirgindir. Ancak bu farkın en önemli nedeni antibiyogram plaklarında disklerin 2015-2016 yıllarında CLSI (Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü) kriterlerine göre yorumlanmış olmasıdır. Sonraki yıllarda aynı içerikli diskler (AMP 10 µg ve AMC 20/10 µg) EUCAST kriterlerindeki daha düşük zon çapı değerlerine göre yorumlanmaya başlayınca direnç oranlarında belirgin düşme olmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda direnç oranı %50' nin üzerinde olup ampisilin ve amoksisilin ampirik tedavide önerilmemektedir (7, 10-14).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda amoksisilin/klavulanat direnç oranı da %39-47,4 arasında bildirilmiştir (8, 13, 15, 16). Çalışmamızdaki beş yıllık süreçte ortalama amoksisilin/klavulanat direnci %38,5 olup, bahsedilen yorumlama kriterleri dikkate alınarak incelendiğinde 2019 yılında %26'ya dek düştüğü görülmektedir. Oral kullanımı nedeniyle ÜSE ampirik tedavisinde önceki yıllarda

sık reçete edilen bu antimikrobiyale olan ilgi yüksek direnç oranları nedeniyle son yıllarda azaldığından direnç düşme eğiliminde olabilir. Ancak uluslararası tedavi rehberleri, komplikasyonsuz alt ÜSE'lerin ampirik tedavisinde direnç oranları %20'den yüksek antimikrobiyallerin kullanımını önermemektedir (17). Çalışmamızdaki diğer beta laktam/beta laktamaz kombinasyonu olan piperasilin/tazobaktam (TZP) direnç oranı benzer çalışmalarda gibi daha düşük (%18,7) bulunmuştur (8, 10, 18-20). Son yıllarda klinisyen ve laboratuvar uzmanları tarafından GSBL üreten Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda ilk tercih edilen karbapenemlere karşı direnç gelişimini önlemek için, karbapenemler yerine TZP kullanımına yönelik çalışmalar giderek önem kazanmaktadır (21). GSBL pozitif bakterilerin neden olduğu ÜSE'lerde TZP'nin etkinliğini değerlendiren çalışmalar, bu ilacın etkili bir tedavi seçeneği olabileceğini bildirmişlerdir (22).

Çalışmamızda, sefalosporinlerin direnç oranı %21-35 arasında olup en düşük direnç oranı sefepime aittir. GSBL oranı ise %26,1 olarak bulunmuştur ki; bu yüksek GSBL oranı nedeniyle sefalosporinlere direnç oranları da yüksektir. Ayaktan hastaların ampirik tedavisinde oral kullanımı nedeniyle sıklıkla tercih edilebilen sefuroksim (%31,3) ve sefiksim (%29,9) için direnç oranları kabul edilebilir seviyenin üzerindedir (17). Sefuroksimin yıllara göre direnç oranları incelendiğinde 2016'dan 2019'a doğru dirençte büyük bir değişim gözlenmemiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda; GSBL üreten suş oranlarına bağlı olarak sefalosporin direnç oranları değişmekle beraber genel olarak ampirik tedavideki beklentileri karşılamaktan uzaktır (8-13, 15, 16, 19, 20).

Karbapenemlere direnç oranı tüm çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da en düşük olarak bulunmuştur. Ancak karbapenemlerin kullanımına kültür antibiyogram testi sonucunda GSBL pozitif

ve alternatif antimikrobiyallere dirençli suşlar için başvurulması bu düşük direnç oranlarının korunması açısından çok önemlidir (3, 4, 6, 7, 21, 23).

Çalışmamızda aminoglikozidlerin direnç oranları düşük olup, özellikle amikasin (%7,5) kombinasyon tedavileri için uygun bulunmuştur.

Kinolonlar ve SXT oral kullanım kolaylığı nedeniyle yetişkin hastalarda ampirik tedavide en sık kullanılan antimikrobiyal ilaçlar arasındadır. IDSA rehberinde, ÜSE tedavisinde ilk seçenek olarak SXT önerilmekte, bu antimikrobiyal ajana %10'un üzerinde direnç görülen bölgelerde ise alternatif olarak kinolonlar önerilmektedir (7). Çalışmamızda ,levofloksasin (%16,7), siprofloksasin (%19,1) ve norfloksasin (%21,9) direnç oranları birbirine yakın olup ampirik tedavi için uygun görünmektedir, ancak SXT direnç oranı yüksek bulunmuştur (%36,3) (17).

Son yıllarda GSBL pozitif *E. coli* izolatlarıyla oluşan enfeksiyonlar artmakta olup, oral tedavi seçeneklerinden kinolonlara ve SXT'ye dirençte de artış söz konusudur. IDSA rehberinde oral kullanım kolaylığı ile komplike olmayan ÜSE tedavisinde düşük direnç oranlarına sahip nitrofurantoin ve fosfomisin önerilmektedir (7). 2000-2012 yılları arasında, 14 Afrika ülkesini kapsayan çok merkezli çalışmada, fosfomisin direnç oranı %0-2 arasında saptanmıştır (24). Ülkemizde, üropatojen *E. coli* suşlarında fosfomisin direnç oranlarının incelendiği az sayıda suşlar ile yapılan çalışmalarda veriler Pullukçu ve ark. (25) tarafından analiz edilerek, toplam 6439 izolat için ortalama direnç %1,9 olarak bildirilmiştir (25). Çalışmamızda 10709 izolat için direnç oranı %3,8 olarak bulunmuş ve 2019 yılında direnç oranının arttığı (%6,4) saptanmıştır. Düşük direnç oranlarına sahip ve tek doz oral kullanım avantajı nedeniyle fosfomisinin son zamanlarda ampirik tedavide daha çok tercih ediliyor olması bu direnç artışının nedeni olabilir. Ancak yine de %6,4 direnç oranı karbapenemler hariç tüm diğer

antimikrobiyaller ile kıyaslandığında ampirik tedavi için çok uygundur.

*E. coli* suşlarında nitrofurantoin direnci için ülkemizde yapılan çalışmalardan Duran ve ark. (8) (%7,6), Soydan ve ark. (23) (%12), Alpay ve ark. (26) (%14) direnç oranlarını bildirmişlerdir. Aytaç ve ark.'nın (9) 11594 izolat ile yaptıkları çalışmada; %3,3 direnç oranı bildirilmiştir. Çalışmamızda, 14197 izolat için nitrofurantoin direnç oranı %5,8 olarak saptanmış olup üropatojen *E. coli* izolatları için fosfomisinden sonra en düşük direnç oranına sahip oral antimikrobiyaldir.

Sonuç olarak toplum kökenli hasta idrar örneklerinden beş yıllık sürede izole edilen *E. coli* izolatlarında saptadığımız %26,1'lik GSBL oranıyla birlikte, direnç oranları yüksek ampisilin,

amoksisilin, AMC, SXT ve sefalosporinlerin ampirik tedavi için uygun olmadığını düşünmekteyiz. Çalışmamızdaki sonuçlara dayanarak karbapenemlerden sonra sırasıyla fosfomisin, nitrofurantoin, amikasin, levofloksasin ve TZP en etkili antimikrobiyallerdir. Fosfomisinin tek doz oral kullanım avantajı, yüksek hasta uyumu ve düşük yan etki profili ile ayaktan hastalarda ampirik tedavi için ilk seçilecek ilaç olduğunu ve özellikle nonkomplike ÜSE'lerin ampirik tedavisinde nitrofurantoinin alternatif olduğunu düşünmekteyiz. Ancak tüm enfeksiyonların tedavisinde en doğru yaklaşımın mümkün olduğunca kültür ve antibiyotik duyarlılık testi sonucuna uygun antimikrobiyal ilaç kullanımı olduğu unutulmamalıdır.

### ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Malatya Turgut Özal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:06.02.2022 ve Karar No: 2022/22).

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Salyers A, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. Trends Microbiol., 2004; 12(9): 412-6.
2. Auer S, Wojna A, Hell M. Oral treatment options for ambulatory patients with urinary tract infections caused by extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother., 2010; 54(9): 4006-8.
3. Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century : characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. 2001; 14(4): 933-51.
4. Turner PJ. Extended-Spectrum β-Lactamases. 2005; 41(4): 273-5.
5. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. <http://www.eucast.org>.
6. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. 31th Ed. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2021.
7. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. Clin Infect Dis, 2011; 52(5): 103-20.
8. Duran H, Çeken N, Atik TK. Antibiotic resistance rates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urine culture: a four-year analysis. Ankem Derg, 2020;34(2):41-7.
9. Aytaç Ö, Mumcuoğlu İ, Aksoy A, Çetin F, Aksu N. Erişkin hastalarda toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının yıllara göre değişimi (2010-2014). Türk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(4): 273-80.
10. Aktar GS, Ayaydın Z, Onur AR, Vural DG, Temiz H. İdrar örneklerinden izole edilen *Escherichia Coli* suşlarının çeşitli antimikrobilyallere direnç oranı. Kocaeli Med J, 2018; 7; 1:8-13.
11. Coşkun USS, Coşkun G. Bir devlet hastanesinde poliklinik hastalarına ait idrar örneklerinden izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif *Escherichia coli* suşlarının prevalans ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Kocatepe Tıp Derg, 2015; 16(1): 25-30.
12. İstanbullu Tosun A, Demirci M, Yılmaz M, Şen H, Sirekbasan L, Gözüm Şaylan E, ve ark. İdrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella Pneumoniae* suşlarının antimikrobiyal direnç oranları. Ankem Derg, 2016;30(1):1-6.
13. Kuru C, Çakmaklıoğulları EK. Karabük ili ve çevresinde idrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Online Türk Sağ Bil Derg, 2020; 5(1): 23-30.
14. Aşgın N, Çakmaklıoğulları EK. In-vitro antibiotic resistance profile of *E. coli* strains isolated from community-acquired paediatric urinary tract infections in Karabük Province. J Contemp Med, 2017;7(3): 241-5.
15. Teker B, Sever N, Garashova D. Yaş ve cinsiyetin üriner sistem enfeksiyonu etkeni *Escherichia coli* kökenlerindeki antibiyotik direncine etkisi. Online Türk Sağ Bil Derg, 2021; 6(2): 300-9, 2021.
16. Avcıoğlu F, Behçet M. Evaluation of resistance rates of *Escherichia coli* isolates of urinary tract infection to various antibiotics. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2020; no. January, 2020;50(3):172-7.
17. Warren JW. Practice guidelines for the treatment of uncomplicated cystitis. Curr Urol Rep, 2001; 2(4):326-9.
18. Çelikkbilek N, Gözalan A, Özdem B, Kırca F, Açıkgöz ZC. Ayaktan başvuran hastaların idrar kültürlerinde üretilen enterobacteriaceae izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi: yedi yıllık izlem sonuçları. Mikrobiyol Bul, 2015; 49(2): 259-65.

19. Çalışkan E, Dede A, Altınöz Aytaç A, Biten Güven G, Kaş E. Ayaktan başvuran hastalarda üriner sistem enfeksiyonuna neden olan *Escherichia Coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranlarının ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının değerlendirilmesi. *Ankem Derg*, 2015; 29(2):47-53.
20. Temoçin F, Köse H. Poliklinik hastalarının idrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretim oranları ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Ankem Derg*, 2018; 32(3): 79-86.
21. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect Dis*, 2013; 19(2):141-160.
22. Aydemir Ö, Terzi HA, Köroğlu M, Altındış M. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında piperasilin/tazobaktam invitro etkinliği. *Online Türk Sağ Bil Derg*, 2019; 4(2): 118-27.
23. Alpay Y, Yavuz MT, Aslan T, Büyükgengin B. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif *Escherichia coli* ile oluşan komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde oral antibiyotikler karbapenemlere alternatif olabilir mi? *Ankem Dergisi*, 2017; 31(3): 85-91, 2017.
24. Tansarli GS, Athanasiou S, Falagas ME. Evaluation of antimicrobial susceptibility of enterobacteriaceae causing urinary tract infections in Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013; 57(8): 3628-39.
25. Pullukçu H, Aydemir Ş, Taşbakan MI, Sipahi OR, Çilli Halı F, Tünger A. Is there a rise in resistance rates to fosfomycin and other commonly used antibiotics in *Escherichia coli* -mediated urinary tract infections? A perspective for 2004 - 2011. *Turk J Med Sci*, (2013); 43: 537-41.
26. Soydan S, Karadağ G, Çalışkan E, Kale E. Üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* kökenlerinde fosfomisin, nitrofurantoin ve siprofloksasin duyarlılığının in vitro olarak değerlendirilmesi. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob* 2015;4:3.

# Determination of efficacy in inactive Newcastle disease vaccines with an *in-vitro* method as an alternative to *in-vivo* methods

## *In-vivo* yöntemlere alternatif olarak *in-vitro* yöntemle inaktif Newcastle hastalığı aşılarında etkinlik tayini

Mustafa KARS<sup>1</sup> (ID), Yamaç TEKİNTAŞ<sup>2</sup> (ID), Fethiye ÇÖVEN<sup>3</sup> (ID), Asiye DAKMAN<sup>4</sup> (ID), İsmail ÖZTÜRK<sup>2</sup> (ID), Sabahattin İÇİN<sup>1</sup> (ID), Mine HOŞGÖR LİMONCU<sup>5</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** In this study, applicability of an *in-vitro* ELISA method, which reduces or eliminates the need for animal trials in establishing the efficacy of inactive Newcastle disease vaccines was investigated.

**Methods:** For this purpose, the efficacy of nine (9) inactivated Newcastle disease vaccines and two non-Newcastle related vaccines (negative controls) were evaluated by *in-vivo* and *in-vitro* methods. As *in-vivo* tests, vaccines were applied to the Specific Pathogen Free (SPF) chicks and antibody response was determined via hemagglutination inhibition test. As *in-vitro*, antigen amount in vaccines were calculated with a sandwich ELISA test based on the determination of hemagglutinin and neuraminidase levels developed for inactive Newcastle vaccines. Relative potency values of vaccines were calculated by using the parallel line analysis method with Combistats statistical analysis software program by using optical density results obtained from ELISA test.

**Results:** Hemagglutination inhibition test results were found to be between 2<sup>3,3</sup> and 2<sup>6,1</sup>; immunization/

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, inaktif, Newcastle hastalığı aşılarının etkinliğini belirlemede hayvan denemelerine olan ihtiyacı azaltan veya ortadan kaldıran *in-vitro* bir ELISA yönteminin uygulanabilirliği araştırılmıştır.

**Yöntem:** Bu amaçla, dokuz (9) inaktif Newcastle hastalığı aşısının ve iki Newcastle ile ilişkili olmayan aşının (negatif kontroller) etkinliği *in vivo* ve *in-vitro* yöntemlerle değerlendirilmiştir. *In vivo* testler olarak Spesifik Patojensiz (SPF) civcivlere aşılar uygulanmıştır ve hemagglütinasyon inhibisyon testi ile antikor yanıtı belirlenmiştir. *In vitro* olarak, aşılardaki antijen miktarı, inaktif Newcastle aşıları için geliştirilen hemagglutinin ve nöraminidaz seviyelerinin belirlenmesine dayanan bir sandviç ELISA testi ile hesaplanmıştır. Aşıların nisbi potens değerleri, ELISA testinden elde edilen optik yoğunluk sonuçları kullanılarak Combistats istatistiksel analiz yazılımı programı ile paralel çizgi analiz yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

**Bulgular:** Hemagglütinasyon inhibisyon testi sonuçları 2<sup>3,3</sup> ile 2<sup>6,1</sup> arasında bulunmuş; bağışıklama / meydan

<sup>1</sup>İzmir/Bornova Veterinary Control Institute, Veterinary Biological Products Control Department, İzmir

<sup>2</sup>İzmir Katip Celebi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, İzmir, Turkey

<sup>3</sup>İzmir/Bornova Veterinary Control Institute, Poultry Diseases Diagnosis Laboratory, İzmir, Turkey

<sup>4</sup>Veterinary Control Central Research Institute, Poultry Diseases Diagnosis Laboratory, Ankara, Turkey

<sup>5</sup>Ege University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, İzmir, Turkey



İletişim / Corresponding Author : Mine HOŞGÖR LİMONCU

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Bornova/İzmir - Türkiye

E-posta / E-mail : minehosgorlimoncu@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received : 17.08.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 28.03.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.84704

Kars M, Tekintaş Y, Çöven F, Dakman A, Öztürk İ, İçin S, Hoşgör Limoncu M. Determination of efficacy in inactive Newcastle disease vaccines with an *in-vitro* method as an alternative to *in-vivo* methods. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 80(1): 33 - 42

challenge results ranged between 56 and 136 PD<sub>50</sub> and ELISA test results were between 6,02 and 98,23 antigen units. A correlation was found between the ELISA test and *in-vivo* methods. Sensitivity and specificity were found to be %89, %100 respectively.

**Conclusion:** In our study according to these results, we have demonstrated the ability of ELISA method to give similar results on the same samples, its compatibility with the standard procedure and its applicability under laboratory conditions.

**Key Words:** *In-vivo*, *in-vitro*, Newcastle disease, relative potency, vaccine

okuma sonuçları 56 ve 136 PD<sub>50</sub> arasında değişirken, ELISA test sonuçları 6,02 ve 98,23 antijen birimleri arasında olduğu görülmüştür. ELISA testi ile *in vivo* yöntemler arasında bir korelasyon belirlenmiştir. Duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %89 ve %100 olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** Bu sonuçlara göre, laboratuvar şartlarında ELISA metodunun uygulanabilirliği, standart prosedüre olan uyumu ve aynı örnekler üzerinde benzer sonuçlar verebilme yeteneği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *İn-vivo*, *in-vitro*, Newcastle hastalığı, relatif potens, aşı

## INTRODUCTION

Newcastle disease (ND) is a highly contagious viral disease that can be seen in domestic and wild bird species (1). Although there are clinically asymptomatic cases, the disease usually presents with symptoms of the digestive, respiratory and nervous system and rapidly progresses to a fatal stage (5). It is one of the most important poultry diseases in the world, with its high morbidity and mortality, which rates up to 100% (5). This enveloped, single-stranded RNA virus is endemic in many parts of the world and also can cause outbreaks in domestic poultry. There is no effective antiviral for the treatment of Newcastle disease (20). Therefore biosecurity and hygiene measures and vaccination practices should be carried out in harmony since the disease can infect different domestic and wild birds which also can asymptotically carry the virus and contribute to the spreading (4).

Every year, hundreds of batches of inactivated ND monovalent or combined vaccines are used. Unlike pharmaceuticals, each batch is considered unique as they are derived from living organisms. Manufacturers and competent authorities should check each batch to ensure product consistency, safety, and efficacy (15). One of the most important features that determine the test method is the type of vaccine. In general, *in-vitro* titration tests and colony counting determine the efficacy of live vaccines. However, in inactive vaccines' efficacy is determined by *in-vivo* methods such as immunization-challenge, toxin neutralization, and immunization-serology tests (18). However, ethical concerns about animal welfare, it is encouraged to reduce the number of animals used in, or use alternative *in-vitro* methods (11, 13, 18, 22).

In this study, applicability of an *in-vitro* ELISA method, which reduces or eliminates the need for animal trials in establishing the efficacy of inactive Newcastle Disease Vaccines was investigated.



## MATERIAL and METHOD

### Vaccines

In the study, nine oil-emulsion inactivated vaccines from different companies containing different lentogenic ND virus strains. Oil-emulsion inactivated

vaccines of reovirus and *Avibacterium paragallinarum* were included to detect possible false reactions. The efficiency of the vaccines was evaluated by *in-vivo* immunization-serology, immunization-challenge test and *in-vitro* antigen ELISA. The contents of the vaccines used are shown in Table 1.

**Table 1.** Vaccines and their ingredients

Vaccine No:	Vaccine strain	Vaccine type	Inactivation agent
#1	Lasota strain	Combined	Formaldehyde
#2	VH strain	Monovalent	Formaldehyde
#3	Clone 30 strain	Combined	Formaldehyde
#4	Lasota strain	Combined	Formaldehyde
#5	Lasota strain	Combined	Formaldehyde
#6	Ulster 2C	Monovalent	Formaldehyde
#7	Lasota strain	Combined	$\beta$ -propiolactane
#8	Lasota strain	Monovalent	Ethylene-imine
#9	Lasota strain	Combined	Formaldehyde
#10	Reovirus strain	Multivalent	Formaldehyde
#11	<i>Avibacterium paragallinarum</i> serotype A, B, C	Multivalent	Formaldehyde

### Immunization-serology test

For each vaccine sample, 10 chicks that were 21-28 days old and obtained from the SPF flock were used. At least five chicks were left unvaccinated as a control group. One-fiftieth of the vaccine dose was given by intramuscular injection (IM) to 10 SPF chicks in each group with micro injectors. Seventeen-twenty-one days after vaccination, at least 1 ml of blood was taken from each chick and the sera were separated. Serum samples were kept at 56 °C for 30 minutes to inactivate the complement and stored at -20 °C. Antibody titers were calculated by hemagglutination (HA) and hemagglutination inhibition (HI) tests as specified in World Organization for Animal Health (OIE), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines

for Terrestrial Animals Section 3.3.14 (21). The effectiveness criterion of vaccines was determined as HI titers 4.0 log<sub>2</sub> and above in the vaccinated group and 2.0 log<sub>2</sub> and below in the unvaccinated group.

### Immunization-challenge test

In the test, the protective dose (PD<sub>50</sub>) of the vaccines was calculated based on the survival rates of the SPF chicks after immunization. The experiments were done with the recommendations of the European Pharmacopoeia monograph No. 0870 (21). Test groups include 20 chicks that were 21-28 days old and obtained from the SPF flock. The chicks were vaccinated intramuscularly at varying rates (1/12.5, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200) of the vaccine dose. Ten chicks were left as the control group. After 17-21 days

of vaccination, all groups, including the control group, were intramuscularly epruvated with velogenic AA-1 (Herts 33/56) containing 6 log<sub>10</sub> ELD<sub>50</sub> / dose and placed in the isolator. Chicks that survived without showing Newcastle disease symptoms were identified in all groups for 14 days after the application and protective dose (PD<sub>50</sub>) was calculated according to the Reed and Muench method (23). For the control of validity of the test, all animals in the control group must have died within six days after epruvation.

#### Extraction Process of Vaccines and ELISA

For including the vaccines in the ELISA test, the antigen must first be released to the water phase by the degradation of the emulsion. For this purpose, 8 ml of isopropyl myristate (IPM) and 2 ml of vaccine were mixed in a 15 ml tube. The suspension then vortexed for 1 minute. Following, the mixture was centrifuged for 10 minutes at 2500 rpm at 8 °C by using a cooled centrifuge. Then the liquid part (oil + IPM) remaining in the upper part of the tube was removed by pipetting (8). The double-antibody sandwich (DAS) ELISA was used to determine the potency of inactive ND vaccines, based on measuring the HN protein's amount of the AA-1 serotype. The relative potency of the vaccine samples was determined as the antigen unit (AU) by comparing the reference antigen (6AU/vial) with known HN protein content (7). In ELISA experiments, ND virus HN protein-specific MoAb antibody was used for coating, Horse radish peroxidase (HRPO) conjugated ND virus HN specific MoAb was used as the detection antibody. The results of the ELISA experiments were analyzed with the current version of the Combistats Statistical Analysis Software Program provided by EDQM. The OD values of the samples and the reference antigen were converted into logarithmic values using the parallel line analysis method, the relative potency (AU/ml).

#### Comparison of the methods

The relationship between immunization-serology, immunization-challenge, and ELISA results was evaluated using Minitab Statistical Program. The

coefficient of variation (% CV) between OD values of samples and % CV for the relative potency values obtained from six replicates of six samples on different days was calculated. The sensitivity, specificity, and relative accuracy rate of the ELISA were calculated based on *in-vivo* test results (10).

## RESULTS

### Hemagglutination Inhibition Test Findings

According to the HI test results of chicks used in the control of ND vaccines. Five of nine ND vaccines produced 2<sup>4</sup> or fewer antibody responses, and four produced antibody responses above this value. Two vaccines that do not contain ND virus components did not produce any response as in the control chicks. Results were summarized in Table 2.

### Immunization-Challenge Test Findings

When the vaccine series that revealed an antibody response at an average level of 2<sup>3,3</sup>, 2<sup>3,4</sup>, 2<sup>3,3</sup>, 2<sup>3,5</sup>, and 2<sup>3,9</sup> (below 2<sup>4</sup>) according to the results of HI test performed for each vaccine were evaluated for the chick number that survived after the immunization-challenge test, they exhibited 56, 60, 70, 75, and 71 PD<sub>50</sub> protection level, respectively. When the remaining four vaccine samples were taken into the HI test, an average of 2<sup>4,1</sup>, 2<sup>4,8</sup>, 2<sup>4,4</sup>, and 2<sup>6,1</sup> antibody responses were obtained, and in these vaccine series, protection at the level of 100, 108, 100, and 136 PD<sub>50</sub> values was determined, respectively. A significant correlation was observed when HI levels and PD<sub>50</sub> values were compared with each other ( $r^2 = 0.95$ ) and the results were found statistically significant ( $p < 0.001$ ). All unvaccinated chicks died by the 4th day of the experiments (Table 2).

### ELISA Findings

The relative potency values of vaccines containing ND components, found between 6.02 and 98.23 AU/dose. The relative potency of the two vaccines, which were the negative control, was found as 0.19 and 0.34 AU/dose. The correlation ( $r^2 = 0.93$ ) was

found between the ELISA test and the Immunization-challenge test ( $p < 0.001$ ). In addition, when all data were analyzed, a significant relationship was found

between the ELISA and *in vivo* methods with the %89 sensitivity and %100 spesificity. The ELISA test results of all vaccines studied are given in Table 2.

Table 2. Test results of vaccines

Vaccine No:	HI test results		PD <sub>50</sub> /dose results		ELISA
	Vaccinated	Control	Result	Acceptance Limit	
#1	2 <sup>3,3</sup>	0	56	50	6,02
#2	2 <sup>3,4</sup>	0	60	50	8,93
#3	2 <sup>3,3</sup>	0	70	50	8,55
#4	2 <sup>3,5</sup>	0	75	50	10,33
#5	2 <sup>3,9</sup>	0	71	50	12,01
#6	2 <sup>4,1</sup>	0	100	50	36,91
#7	2 <sup>4,8</sup>	0	108	50	75,67
#8	2 <sup>4,4</sup>	0	100	50	36,75
#9	2 <sup>6,1</sup>	0	136	50	98,23
#10	0	0	-	-	0,19
#11	0	0	-	-	0,34

## DISCUSSION

Although challenge practices directed at determining potency in inactive ND vaccines clearly demonstrate the effects of all vaccine components (adjuvants, emulsifying agents) on the immune system, the time from the initiation to the termination of the test takes approximately two months, a large number

of (min.70) SPF chicks are used and evaluation of test results is based on observation of disease symptoms and survival levels in animals. The alternative ELISA test is based on calculating the relative potency by directly comparing the amount of antigen in inactive ND vaccines with a reference antigen without any immunization. In our study, the compatibility between *in-vivo* and *in-vitro* test methods used to evaluate

the effectiveness of vaccines was investigated. Five of the nine ND vaccines which were subjected to the *in-vivo* immunization-serology protocol, gave a serologic response which was 2<sup>4</sup> or below. When these afore-mentioned vaccines were tested through immunization-challenge; they were all found have a value above 50 PD50. There are a lot of studies in which serologic response to vaccination is similarly evaluated, it is significant that the serological response level in which protection does not occur is below 2<sup>2</sup>. it was found out that none of the vaccines gave a response below 2<sup>3</sup>, only a certain group of vaccines gave results below 2<sup>4</sup> which is the limit set by the European Pharmacopoeia, and even these vaccines were found to provide protection over 50 PD50. In the monograph 0870 of European Pharmacopoeia, it is required to conduct immunization-challenge to decide the efficacy of the inactivated ND vaccine when serological tests do not yield the necessary antibody titers (21). The vaccines with HI titers between 2<sup>3</sup> and 2<sup>4</sup> obtained in our study met the Pharmacopoeia acceptance criteria of 50 PD50, it was thought that values below 2<sup>4</sup> could be due to the difficulties in vaccine administration. As administration doses contained very low vaccine doses such as a 1/50 ratio, vaccine delivery was possibly curtailed. In our study, a significant correlation was observed when HI levels and PD50 values were compared with each other ( $r^2 = 0.95$ ) and the results were found to be statistically significant ( $p < 0.001$ ). There are studies with similar results to our results in *in-vivo* tests performed to determine the effectiveness of ND vaccines (2, 14, 24).

The double antibody sandwich ELISA test, which constitutes the *in-vitro* part of our study, is based on the HN antigen in the vaccine conjugating with the specific monoclonal antibody and the measurement of the relative potency after the antigen antibody complex is compared with a reference sample with known antigen amount, without the need for immunization and challenge in SPF chicks. It has been reported that similar vaccine series, products containing virus or bacterial subunits as well as

microbial cultures can be used as reference products (17). RP values were calculated with parallel line analysis method using Combistats software 5.0 program using OD values obtained in the ELISA test of ND vaccines and they were between 6.02 AU / dose and 98.23AU / dose. In a previous report the minimum amount of antigen that vaccines should have in order to be able to use the ELISA method in potency testing of inactivated ND vaccines was found to be 7 AU/dose (7). When this study was taken into consideration, all ND vaccines except one, had sufficient antigen amount. In our study, eight of nine ND vaccines were above 7 AU, and only one vaccine with a value of 6 AU remained below the limit even though it was very close and had sufficient PD50 results. In our study, a significant correlation ( $r^2 = 0.93$ ) was found between the ELISA test and the immunization-challenge test ( $p < 0.001$ ). There are studies in which the efficacy of inactivated Newcastle disease vaccines is investigated by comparing *in-vitro* and *in-vivo* tests (serological and challenge), and the results obtained from our study are similar to the results of the researchers (6, 19). It was thought that the relatively insufficient relative potency value of 6 AU in one vaccine may be due to the inactivation agent (formaldehyde) or due to the failure in separating the oil phase from the water phase during the extraction process, causing the oil phase to have a masking effect even though the antigen amount is sufficient. In a study on inactivation agent (formaldehyde), it was emphasized that in vaccines using formaldehyde, less antigen was detected compared to  $\beta$  propiolactone and this was due to the mechanism of action of the inactivation agent (16). In another study, it was reported that insufficient AU amounts could be detected due to the inability to completely separate the oil phase from the water phase during the extraction process or the masking with the oil phase even though the amount of antigen was sufficient (3).

In our study, when we included a bacterial and a viral vaccine without the ND component into the ELISA test, RP was found at a much lower level (0.19

AU / dose and 0.34 AU / dose) than the detection limit of 7AU / dose, and with these results, the specificity of the test was verified. Maas et al. (19) reported that six different vaccines could be classified into insufficient, low and high antigen containing groups. PD50 results of vaccines with high antigen content were at maximum level, and the detection of different ND strain vaccines by the same MoAb was the most important outcome. In our study, vaccines containing different strains such as Lasota, Ulster and Clone30 were evaluated, and it was observed that all vaccine series produced sufficient RP response except for one vaccine sample, and vaccines with high RP had high PD50 and HI results. In the validation study carried out for ND vaccines, It was stated that the threshold antigen level to be used in determining the potency of vaccine series was calculated to be 7 AU / dose, this antigen level did not cause any false positive results in *in-vitro* measurements performed by the laboratories, and there were only a limited number of false negative results. With this validation study, the researchers revealed that vaccines with high PD50 also have high antigen unit (AU) values and they reported that this alternative method for antigen quantification can be included in the European Pharmacopoeia (7). In our study, while a limited number of false negative results (only in one sample) were obtained as a result of the ELISA test, there were no false positive results, and the specificity, sensitivity and relative accuracy rates were found to be high. In accordance with the validation study, it has been revealed that vaccines with high protective dose (PD50) have high antigen unit (AU) values.

It was suggested by EDQM that the control antigen which is the biological reference, should be determined by each laboratory that will use the ELISA

test, and that the values obtained through repetitive studies should not be greater than the value determined during the method validation by 70% to 140%. In our study, the mean value of the control antigen was determined to be 3.2 AU /vial, and the alarm limit was 4.48 AU and 2.24 AU. When 18 results for the control antigen were evaluated, the lowest and highest values were 2.31 AU and 4.13 AU, respectively and therefore they were not out of the alarm limits.

For the validation of ELISA test method in our laboratory; six vaccines chosen from 11 different vaccine samples were studied repeatedly at different times along with the reference antigen. It was observed that the intra-analysis variation evaluated in the reproducibility study was less than 10%, excluding the variation coefficients of 13.87% and 14.25% seen in two vaccine samples. It was thought that plate wells going dry, pipetting errors and splashing between the wells could play a role in the intra-assay variation taking values above 10%. The coefficients of variation between the relative potency values of the vaccine samples that were analyzed on different days to form the reproducibility data were found to be less than 15% in all studies. These results seem to be compatible with the criterion that within-assay variation should not exceed 10% and inter-assay variation should not exceed 15% in ELISA studies (9).

In our study according to these results, we have demonstrated the ability of ELISA method to give similar results on the same samples, its compatibility with the standard procedure and its applicability under laboratory conditions. As a result, reliable test results may be obtained in a short time with the alternative ELISA method, which can be applied within the framework of the 3R approach without requiring the use of animals.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was produced from the Ph.D. thesis conducted in the Pharmaceutical Microbiology Program of Ege University Institute of Health Sciences (Acceptance date: 12.06.2019).

## FINANCIAL SUPPORT

This study was supported by Ege University Scientific Research Projects Commission with project number 16/ECZ/008. General Directorate of Agricultural Research and Policies (TAGEM) also supported this project with the number TAGEM/HSGYAD/A/18/A5/P2/715.

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* The study was approved by the İzmir/Bornova Veterinary Control Institute Ethics Committee (Date: 26.04.2017 and Number: 71705440-170-2605 ).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Alexander DJ, Gough RE. Newcastle disease and other avian paramyxovirus infections. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougal LR and Swayne DE eds. *Disease of Poultry*. Ames: Iowa State University Press, Ames 2003: 63-87.
2. Allan WH, Lancaster JE, Toth B. Newcastle disease vaccine: their production and use. FAO/UNO, Rome, 1978; 57-62.
3. Aly SE, Hussein HA, Abdel-Baky MH et al. Assessment of in vitro potency of inactivated Newcastle disease oil adjuvanted vaccines using hemagglutination test and blocking ELISA. *Vet World*, 2018; 11(9): 1222-8.
4. Bello MB, Yusoff K, Ideris A et al. Diagnostic and vaccination approaches for Newcastle disease virus in poultry : the current and emerging perspectives. *Biomed Res Int*, 2018; 7278459.
5. Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J Vet Diagn Investig*, 2011; 23(4): 637-56.
6. Claassen I, Maas R, Daas A et al. Feasibility Study to Evaluate the Correlation Between Results of a Candidate In Vitro Assay and Established In Vivo Assays For Potency Determination of Newcastle Disease Vaccines. *Pharmaeuro Bio*, 2003; 1: 53-66.
7. Claassen I, Maas R, Oei H et al. Validation study to evaluate the reproducibility of a candidate in vitro potency assay of Newcastle diseases vaccines and to establish the suitability of a candidate biological reference preparation. *Pharmeuropa Bio*, 2004; 1: 1-15.
8. Claassen I. Case study of development, validation, and acceptance of a non-animal method for assessing veterinary vaccine potency. *Procedia Vaccinol*, 2011; 5: 175-83.
9. Crowther JR . The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol*, 2000: 149:III-IV, 1-413
10. Duygu DY, Udoh AU. Validation of Microbiological Testing Methods. *Trak Univ J Nat Sci*, 2017; 18(1): 65-9.
11. European pharmacopoeia. Monograph 01/2007:20701. 9th ed. Strassbourg, France: European Department for the Quality of Medicines Within the Council of Europe; 2017.
12. European pharmacopoeia. Monograph 01/2007:0870. 9th ed. Strassbourg, France: European Department for the Quality of Medicines Within the Council of Europe; 2017.
13. European pharmacopoeia. Monograph 01/2017:50214. 9th ed. Strassbourg, France: European Department for the Quality of Medicines Within the Council of Europe; 2017.
14. Goddard RD, Nicholas RAJ, Luff PR. Serology-based potency test for inactivated Newcastle disease vaccines. *Vaccine*, 1988; 6(6): 530-2.
15. Hendriksen CFM. Replacement reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement, *Expert Rev Vaccines*, 2009; 8(3): 1-10.
16. Jagt HJ, Bekkers ML, Bommel SA et al. The influence of the inactivating agent on the antigen content of inactivated Newcastle disease vaccines assessed by the in vitro potency test. *Biologicals*, 2010; 38(1): 128-34.
17. Karli SA, Rippke BE. Using software to estimate relative potency united states department of agriculture center for veterinary biologics standard operating policy/procedure. *CVBSOP 0102.03 2015*; 1-8.
18. Kumar S, Sing MP, Bharti VK et al. Quality control of vaccines-A journey from classical approach to 3Rs. *Microbiol Curr Res*, 2018; 2(3): 45-61.
19. Maas RA, Winter MPM, Venema S et al. Antigen quantification as in vitro alternative for potency testing of inactivated viral poultry vaccines. 2000; *Vet Q*, 22(4): 223-7.

20. Miller PJ, Koch G. 2013. Newcastle disease, p 89-138. In Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V (ed), *Diseases of poultry*, 13th ed Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
21. OIE: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees, in *Biological Standards Commission*. Paris, World Organization of Animal Health, 2012, vol 1, part 2, Chapter 3.3.14, 1-22.
22. OIE: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees, in *Biological Standards Commission*. Paris, World Organization of Animal Health, 2012, vol 1, part 2, Chapter 2.3.4, 1-12.
23. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*, 2016; 5(2): 85-6.
24. Zekic-Stosic M, Ratajac R, Lazic S et al. Potency test of commercially available inactivated Newcastle disease vaccines in Serbia. *Vet Arh*, 2014; 7(2): 111-21.



# The effect of skin thickness on vitamin D levels! Where do you measure from?

## Cilt kalınlığının vitamin D seviyesi üzerine etkisi! Peki nereden ölçüm?

Emel GÜLER<sup>1</sup> (ID), Alper DOĞANCI<sup>2</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** Vitamin D is a steroid hormone, about 80-90% of which is produced by the skin. On the other hand, its deficiency is very common and its treatment is of great importance due to its multisystem effects. In addition to factors affecting vitamin D levels such as skin color, sunscreen used, geographical location, and obesity, there are also studies related to the effect of skin thickness. It was aimed to determine the effect of skin thickness and subcutaneous adipose tissue measurements on vitamin D results in the areas where there is the most contact with the sunlight in our body, in the study.

**Methods:** A total of 116 (71 female, 45 male) volunteers were included in the study. The results of vitamin D in the last month, demographic data, height, and weight were recorded. Skin thickness and subcutaneous adipose tissue measurements performed by ultrasound were recorded from the forehead, cheek, hand dorsum, umbilicus, and trochanter major regions.

**Results:** The exposure time to the sun ( $r=0.637$ ,  $p<0.001$ ), the statistically significant difference between the results of the trochanter major subcutaneous adipose tissue ( $r=0.347$ ,  $p<0.001$ ) and subcutaneous adipose

### ÖZET

**Amaç:** Vitamin D yaklaşık %80-90'ı ciltten üretilen bir steroid hormondur. Eksikliği ise çok sık görülmekte ve multisistemik etkileri nedeni ile tedavisi büyük önem taşımaktadır. Cilt rengi, kullanılan güneş kremi, coğrafi konum, obezite gibi vitamin D seviyesini etkileyen faktörler yanında cilt kalınlığının etkisi ile ilgili de çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızdaki amacımız; vücudumuzda güneş ışınları ile temasın en fazla olduğu bölgelerde, cilt kalınlıklarının ve subkutan yağ dokusu ölçümlerinin vitamin D sonuçlarına etkisini belirlemektir.

**Yöntem:** Çalışmaya toplam 116 (71 kadın, 45 erkek) gönüllü dahil edildi. Son 1 ay içerisindeki serum vitamin D sonuçları, demografik verileri, boy ve kiloları kayıt edildi. Ultrason ile yapılan cilt kalınlığı ve subkutan yağ doku ölçümleri alın, yanak, el dorsum, umbilikus ve trochanter majör bölgelerinden yapılarak kayıt edildi.

**Bulgular:** Güneşe maruziyet süresi ( $r=0,637$ ,  $p<0,001$ ), trochanter majör subkutan yağ dokusu ( $r=0,347$ ,  $p<0,001$ ) ve umbilikal bölgenin subkutan yağ dokusu ( $r=0,022$ ,  $p=0,020$ ) ve el dorsum cilt kalınlığı

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Medicine, Department of Physical Therapy and Rehabilitation, Division of Algology, Sivas

<sup>2</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Medicine, Department of Physical Therapy and Rehabilitation, Division of Rheumatology, Sivas



İletişim / Corresponding Author : Emel GÜLER

Sivas Cumhuriyet Üni. Tıp Fak., Fizik Tedavi ve Rehab. AD., Algoloji BD., Merkez Sivas - Türkiye  
E-posta / E-mail : dremelguler@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 21.06.2022  
Kabul Tarihi / Accepted : 30.09.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.29805

Güler E, Doğanç A. The effect of skin thickness on vitamin D levels! Where do you measure from?  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(1): 43 - 50

tissue of the umbilical region ( $r= 0.022$ ,  $p=0.020$ ), hand dorsum skin thickness ( $r= 0.242$ ,  $p=0.010$ ) and vitamin D level ( $p<0.05$ ). Statistically, a significant difference was found between the umbilicus skin thickness and vitamin D level ( $r=0.087$ ,  $p<0.001$ ).

**Conclusion:** The question of “whether vitamin D deficiency is pandemic?” is sought worldwide, and the reasons for deficiency are still being studied. The literature on skin thickness has a limited number of studies evaluated by objective data. In particular, the thickness of the hand dorsum skin, and the effect of regional obesity on vitamin D in our study, which reveals the importance of exposure time to sunlight, are remarkable. However, to demonstrate the effects of skin thickness, many areas of our body need to be evaluated.

**Key Words:** Skin thickness, vitamin D, ultrasound evaluation

( $r=0,242$ ,  $p=0,010$ ) sonuçları ile vitamin D seviyesi arasında istatistiki anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ). Umbilikus cilt kalınlığı ile vitamin D seviyesi arasında istatistiki anlamlı fark bulundu ( $r=0,087$ ,  $p<0,001$ ).

**Sonuç:** Dünya çapında, “vitamin D eksikliğinin sebebi pandemi mi?” sorusuna cevap aranırken, eksiklik nedenleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Cilt kalınlığı ile ilgili literatürde, objektif verilerle değerlendirme yapılan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Özellikle el dorsum deri kalınlığı, güneş ışığına maruziyet süresinin önemini ortaya çıkaran çalışmamızda, bölgesel obezitenin vitamin D seviyesi üzerine etkisi dikkat çekicidir. Ancak özellikle cilt kalınlığının etkilerini gösterebilmek için vücudumuzda birçok bölgenin değerlendirildiği çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Cilt kalınlığı, vitamin D, ultrason değerlendirmesi

## INTRODUCTION

Why vitamin D? Vitamin D is a steroid hormone that is known to affect many systems in our body. In clinical practice, especially as physicians dealing with the musculoskeletal system, many factors are blamed for the causes of this vitamin deficiency, which is associated with chronic pain and which we have started treating (1, 2).

Vitamin D, which is a prohormone, has two main sources. The endogenous source is produced from the skin after exposure to sunlight, and the exogenous source is a diet supplement. Its main source is that ultraviolet B in the sunlight is absorbed by 7-dehydrocholesterol in both epidermal keratinocytes and plasma membranes of dermal fibroblasts, into previtamin D<sub>3</sub>, then 1,25-dihydroxycholecalciferol vitamin D<sub>3</sub> (calcitriol), which is an active form in our body. An estimated 80-90% of it is due to skin

synthesis by sunlight activation, while the rest is provided through supplements or food (3, 4).

This is where the importance of skin in vitamin synthesis occurs. It can also be sorted between skin type, body mass index, gender, vitamin D receptor polymorphism, the latitude of the area experienced, season, use of sunscreen, and other factors affecting vitamin D level (5).

The style of dressing has an important role in them. Clothing choices can cause a decrease in the amount of exposure to sunlight and, as a result, a lack of vitamin D. Considering the cultural, belief structure of our society and the effects of the current geographical region on lifestyle, it becomes important where the measurement of skin thickness should be done in terms of vitamin D synthesis (6).

In studies where the relationship with obesity and vitamin D is assessed as one of the other risk factors, it is stated that the increase in fat tissue affects the

vitamin D synthesis in a negative way, and that there is a reverse ratio between the body mass index and the vitamin D level (7).

In this study, we aim to determine the relationship of exposure time to the sunlight, skin thickness in areas where there is most contact with the sunlight, and subcutaneous adipose tissue measurements with the current vitamin D results and to find the answer to the question of where the effect of skin thickness, which is very few in the literature, on the vitamin level.

## MATERIAL and METHOD

This observational study was conducted in a third-line university hospital. 116 volunteers were included in the study. Demographic data, height, and weight of the volunteers were recorded. BMI (body mass index) values were then calculated by dividing the weight by the square of the height. As criteria for inclusion in the study; it was that they were aged 18-80 years and the level of vitamin D in the blood was evaluated within the last one month before the skin ultrasound assessment. The exclusion criteria were to have liver, kidney disease, skin pigmentation, or any skin disease that would affect vitamin D production by affecting the level of keratinocyte, an intestinal disease that would affect vitamin D absorption, and vitamin D supplement in the last three months. The normal range was defined as 30 to 100 ng/ml, insufficient as 20 to 30 ng/ml, deficient as <20 ng/ml, and toxic level as higher than 100 ng/ml (8). The volunteers were divided into three groups according to vitamin D level. Vitamin D levels were classified as group I for those with 30-100 ng/ml, group II for those with 20-30 ng/ml, and group III for those with <20 ng/ml. The study protocol as volunteers of the skin, subcutaneous fat tissue thickness and the thickness measurements, the percent area (1 cm above the glabella), the cheek region (zygomatic bone), back of the hand (dorsi) (the middle point of the metacarpal bones), and 2 cm lateral of umbilicus and the trochanter

major through 5-12 MHz linear ultrasound (US) probe (voluson medical systems) according to individuals by adjusting the frequency and depth were measured. Skin (epidermis and dermis), and subcutaneous adipose tissue (distance between dermis and muscle) thickness measurements in the short axis view were performed with the ultrasound device found in our clinic. Vitamin D levels of 25 (OH) were noted from medical records that were looked at in the serum in the last one month. Vitamin D levels were taken in the fall, winter, and spring.

Data normality was assessed with the Shapiro Wilks test, histograms, and q-q plots. The Student's t test and Mann Whitney U test were used to compare the differences between continuous variables. Correlations among the variables including age, BMI, duration of exposure to sunlight, 25(OH)D levels, regional skin thickness and adipose tissue thickness were analyzed by using Pearson or Spearman correlation analysis.  $p < 0.05$  was considered as statistically significant. Analyses were conducted using SPSS version 22.

All participants were informed about the study procedure and those who agreed to participate were evaluated further. The study was approved by the Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 23.11.2021 and Number: 2021-11/01).

## RESULTS

A total of 116 patients, 71 male, and 45 female were included in the study. The mean age of the volunteers was  $43.49 \pm 11.93$ , the duration of sun exposure was  $53.23 \pm 59.09$  minutes and the BMI was  $25.95 \pm 3.02$  kg/m<sup>2</sup>. Vitamin D levels were  $16.52 \pm 11.79$  ng/ml. The volunteers were divided into three groups according to vitamin D level. The demographic data of all groups and the averages of BMI, duration of exposure to sunlight, and vitamin D levels are given in Table 1. There was a statistically significant difference between decrease in vitamin D levels and

reduction in exposure to sunlight duration ( $r=0.637$ ,  $p<0.001$ ). There was no statistically significant difference between age, BMI, and vitamin D level ( $p>0.05$ ). Demographic data, duration of sunlight exposure, vitamin D level and mean BMI data are shown in Table 1.

The average forehead skin thickness of all

volunteers was  $1.15 \pm 0.26$  mm, adipose tissue  $0.11 \pm 0.06$  mm, cheek skin  $1.15 \pm 0.32$  mm, adipose tissue  $0.42 \pm 0.23$  mm, hand dorsum skin  $1.04 \pm 0.20$  mm, subcutane adipose tissue  $0.07 \pm 0.03$  mm, umbilicus skin  $2.25 \pm 0.51$  mm, adipose tissue  $2.85 \pm 1.34$  cm, the trochanter major skin was  $2.00 \pm 0.47$  mm, the adipose tissue was  $2.30 \pm 5.68$  cm. Subcutaneous

**Table 1.** Demographic data, duration of sunlight exposure, vitamin D level, and mean BMI data

	Group I n=14 (%12.1)	Group II n=22 (%19)	Group III n=80 (%69)
Gender (W/M)	9/5	11/11	51/29
Age	40.93± 12.39	47.00± 11.55	42.97± 11.90
BMI kg/m <sup>2</sup>	25.76± 2.74	26.30± 3.11	25.89± 3.07
Duration of sun exposure (min)	180.00± 80.27	35.23± 16.44	36.00± 22.80
Vitamin D level ng/ml	41.29± 13.30	22.27± 2.96	10.61± 4.19

W; woman, M; man BMI; body mass index, min; minute, mean± standart deviation

**Table 2.** Statistical data of skin and adipose tissue thickness measurement results

	Group I n=14 (%12.1)	Group II n=22 (%19)	Group III n=80 (%69)	P
Forehead skin thickness (mm)	1.00 (0.20)	1.20 (0.60)	1.10 (0.40)	0.120
Subcutaneous adipose tissue of the forehead (mm)	0.10 (0.08)	0.08 (0.11)	0.08 (0.08)	0.371
Cheek skin thickness (mm)	0.95 (0.20)	0.90 (0.50)	1.10 (0.50)	0.220
Subcutaneous adipose tissue of the cheek (mm)	0.49 (0.29)	0.40 (0.46)	0.38 (0.23)	0.332
Hand dorsum skin thickness (mm)	0.90 (0.00)	1.10 (0.30)	1.00 (0.20)	0.010
Subcutaneous adipose tissue of the dorsum of the hand (mm)	0.06 (0.02)	0.07 (0.04)	0.06 (0.05)	0.100
Umbilicus skin thickness (mm)	2.60 (0.40)	2.40 (1.05)	2.20 (0.48)	<0.001
Subcutaneous adipose tissue of Umbilicus (cm)	2.07 (5.50)	3.28 (3.07)	2.95 (1.28)	0.020
Trochanter major skin thickness (mm)	1.85 (0.65)	2.10 (0.80)	1.90 (0.80)	0.471
Subcutaneous adipose tissue of Trochanter major (cm)	1.56 (4.85)	2.28 (4.18)	2.43 (9.55)	<0.001

Data were presented as median (interquartil range),  $p<0.05$  significant

adipose tissue statistically significant difference between the skin thickness of the hand dorsum and the level of vitamin D ( $r=0.242$ ). A statistically significant difference was found between the increase in umbilicus adipose tissue ( $r=0.022$ ) and the increase in trochanter major adipose tissue ( $r= 0.347$ ) and vitamin D deficiency. A statistically significant difference was found between the umbilicus skin thickness and vitamin D level ( $r=0.087$ ). The statistical data of skin and fat tissue thicknesses and relation with vitamin D level are given in Table 2.

## DISCUSSION

Due to the multi-systemic effects of vitamin D in our body, the deficiency of vitamin D remains an important health problem worldwide, and the question of why the endogenous source is insufficient and what can be done in prophylactic treatment is still being investigated. Skin thickness is listed among these factors, but when we look at the work done, we find conflicting results. One of the connective tissue diseases in which skin thickness is most affected is Scleroderma. In this disease, skin thickness measurement was performed manually in a study that included 38 scleroderma and 38 healthy controls from studies conducted with vitamin D levels, and no statistically significant correlation was found with vitamin D levels (9). In a review in which 40 studies were evaluated, different results were explained regarding the relationship between skin involvement and vitamin D level, but the modified Rodnan skin scoring, which is manually checked, was used in the evaluation of skin thickness (10). Skin and ultrasound studies were done by dermatologists and using high frequency ultrasound, but mostly used in the evaluation and follow-up of skin diseases. No study included scleroderma (11).

There are limited studies in the normal population where the effects of skin thickness on vitamin level are evaluated. According to Ata, et al. (6) in a study conducted by 116 volunteers, the effect on skin

thickness and vitamin D levels was investigated. Skin thickness measurements from various parts of the body were found statistically significant between the decrease in the forearm and tibia anterior skin thickness and the lack of vitamins and explained this by the increased exposure to sunlight in these areas. In another study, where the thickness of the hand dorsum skin curve is evaluated with a special device, they found it associated with vitamin D deficiency and an increase in skin thickness (12). In our study, in addition to the umbilicus and trochanter region, we measured the skin thickness of hand dorsum, cheek, and forehead, considering the clothing style and the weather conditions in the geography. We found statistically significant differences between the thickness of the hand dorsum and umbilicus skin and the vitamin D deficiency. The increase in skin thickness in the umbilicus area, which is not affected by the sunlight, has a weak positive relationship with the decrease in vitamin D level, while it is negatively associated with the dorsum of the hand, Ata et al. (6) was correlated with the study data.

Exposure of more than 40% of the skin to sunlight for about 20 minutes is important for the prevention of vitamin D deficiency (13). Many studies have shown that exposure to sunlight has an increasing effect on the level of vitamin D (14, 15). In our study, similar to the studies in the literature, we found that the increase in the duration of exposure to sunlight and the increase in vitamin D levels were statistically significant in the positive direction.

It has been shown that there is a decrease in endogenous vitamin production with increasing age (16). The skin synthesis of vitamin D in elderly people is compromised by many factors, including decreased exposure to sunlight due to reduced mobility and physiological atrophy, and decreased synthesis performance of aging skin (17). However, in our study, there was no statistically significant difference between age and vitamin D levels, and the average age in our study corresponded to the middle age group on the age scale determined by the world health organization.

In studies emphasizing the negative effect of body mass index on vitamin D, volumetric dilution, an increase in fat tissue storage because it is a fat-soluble vitamin, and a decrease in sun exposure as a result of obesity leading to reduced physical activity was listed as the reasons (18). In a study that included 31 obese and 20 normal weight individuals, it was shown that patients with obesity had lower vitamin D levels, which normalized after significant weight loss, as a result of pre-post vitamin D measurements following weight loss and included in a diet program (19). The another study in which adolescent was evaluated in 136 obese and 60 normal-weight, vitamin D deficiency was found to be significantly higher in obese children. In addition, decelerated physical activity, decreased sunlight exposure, and increased time spent with technological devices are listed among the reasons (20). In the study of Ata et al. (6), no significant relationship was found between BMI and vitamin D level, but they found statistical significance between the increase in subcutaneous adipose tissue and decrease in vitamin D level as a result of ultrasound measurement made from the trochanter region. It has been interpreted that regional obesity will cause this (6). In our study, we could not find a significant difference between vitamin D level and BMI, but we found statistical significance between the increase in subcutaneous fat tissue in the umbilical and trochanteric regions and the decrease in vitamin D levels. This result supported the result of Ata et al.

(6). In our study, the significant effect of the skin and subcutaneous adipose tissue thickness in various parts of the body of vitamin D levels in healthy volunteers contributes to the limited number of literature data available. At the same time, it has been shown that more comprehensive studies are needed.

In conclusion, vitamin D deficiency is reported in about a third of the world's population (21). At the same time, the answer to the question of whether the lack of this vitamin is a pandemic is being sought (22, 23). There are still many studies on the causes of vitamin D deficiency, which also plays an important role in immunomodulating, cardioprotective, and fighting cancer, and the effect on many other systems has been proven. The importance of multifaceted evaluation such as skin color, clothing style, and geographical region effects is emphasized persistently in its treatment. The effects of clothing style and obesity on vitamin D synthesis have been emphasized in many studies. However, in our study, the effect of skin thickness in closed areas of the body on vitamin D level and the lack of BMI effect, raises questions in the direction of investigating different mechanisms in endogenous production. In our study, it is emphasized that skin thickness has an effect, but more studies are needed to answer the question of how much and to be included in this ranking.

The limitations of the study were that the number of evaluated volunteers was small and the ultrasound device used was not high resolution.

#### ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* The study was approved by the Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 23.11.2021 and Number: 2021-11/01).

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Wu Z, Malihi Z, Stewart AW, Lawes CM, Scragg R. The association between vitamin d concentration and pain: a systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutr*, 2018;21(11):2022-37.
2. Altun İG, Barut BÖ, Bulut A, Padir N, Inan R. The relationship between pain and vitamin d in Parkinson's disease. *South Clin Istanbul Eurasia*, 2021;32(4).
3. Yılmaz SK, Ayaz A. Does vitamin d affects components of the metabolic syndrome? *Turkish Bull Hyg Exp Biol*. 2015;72(2):143-54.
4. Joh HK, Hwang SS, Cho B, Lim CS, Jung SE. Effect of sun exposure versus oral vitamin D supplementation on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in young adults: a randomized clinical trial. *Clin Nutr*, 2020;39(3):727-36.
5. Pereira-Santos M, Costa PdF, Assis Ad, Santos CdS, Santos Dd. Obesity and vitamin d deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2015;16(4):341-9.
6. Ata AM, Kara M, Kara Ö, Kaymak B, Akıncı A, Özçakar L. Ultrasonographic measurements of the skin, fat and muscle in vitamin d deficiency. *Int J Clin Prac*, 2020;74(6):e13494.
7. Karampela I, Sakelliou A, Vallianou N, Christodoulatos GS, Magkos F, Dalamaga M. Vitamin D and obesity: current evidence and controversies. *Curr Obes Rep*, 2021;10(2):162-80.
8. Lotfollahi L, Ossareh S, Neyestani TR. Evaluation of 25-hydroxy vitamin d and 1, 25-dihydroxy vitamin d levels in maintenance hemodialysis patients. *Iran J Kidney Dis*, 2021;1(1):31-7.
9. Gupta S, Mahajan VK, Yadav RS, Mehta KS, Bhushan S, Chauhan PS, et al. Evaluation of serum vitamin d levels in patients with systemic sclerosis and healthy controls: results of a pilot study. *Indian Dermatol Online J*, 2018; 9(4): 250-5.
10. Diaconu A-D, Ostafie I, Ceasovschiu A, Şorodoc V, Lionte C, Ancuța C, et al. Role of vitamin d in systemic sclerosis: a systematic literature review. *J Immunol Res*, 2021;2021:9782994.
11. Bhatta AK, Keyal U, Liu Y. Application of high frequency ultrasound in dermatology. *Discov Med*, 2018;26(145):237-42.
12. Need AG, Morris HA, Horowitz M, Nordin C. Effects of skin thickness, age, body fat, and sunlight on serum 25-hydroxy vitamin d. *Am J Clin Nutr*, 1993;58(6):882-5.
13. Naeem Z. Vitamin d deficiency-an ignored epidemic. *Int J Health Sci (Qassim)*, 2010;4(1):V-VI.
14. Wacker M, Holick MF. Sunlight and vitamin d: a global perspective for health. *Derm-Endocrinol*, 2013;5(1):51-108.
15. Alia E, Kerr PE. Vitamin d: skin, sunshine, and beyond. *Clin Dermatol*, 2021;39(5):840-6.
16. Remelli F, Vitali A, Zurlo A, Volpato S. Vitamin d deficiency and sarcopenia in older persons. *Nutrients*, 2019;11(12):2861.
17. Boettger SF, Angersbach B, Klimek CN, Wanderley ALM, Shaibekov A, Sieske L, et al. Prevalence and predictors of vitamin d-deficiency in frail older hospitalized patients. *BMC Geriatr*, 2018;18(1):1-6.
18. Bilezikian JP, Formenti AM, Adler RA, Binkley N, Bouillon R, Lazaretti-Castro M, et al. Vitamin d: dosing, levels, form, and route of administration: does one approach fit all? *Rev Endocr Metab Disord*, 2021; 22(4):1201-8.
19. Buscemi S, Buscemi C, Corleo D, De Pergola G, Caldarella R, Meli F, et al. Obesity and circulating levels of vitamin d before and after weight loss induced by a very low-calorie ketogenic diet. *Nutrients*, 2021;13(6):1829.

20. Shulhai A-M, Pavlyshyn H, Shulhai O, Furdela V. The association between vitamin d deficiency and metabolic syndrome in Ukrainian adolescents with overweight and obesity. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, 2022; 27(2):113-20.
21. Sizar O, Khare S, Goyal A, Bansal P, Givler A. Vitamin d deficiency. *StatPearls* [Internet]: StatPearls Publishing; 2021.
22. Kweder H, Eidi H. Vitamin d deficiency in elderly: risk factors and drugs impact on vitamin d status. *Avicenna J Med* , 2018;8(04):139-46.
23. Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z, Gonzalez-Gross M, Valtueña J, De Henauw S, et al. Vitamin d deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr*, 2016;103(4):1033-44.



# Embelin'in insan meme kanseri MCF-7 ve MDA MB-231 hücre proliferasyonu üzerindeki sitotoksik etkisinin tamoksifen ve docetaxel ile karşılaştırılması

## Comparison of the cytotoxic effect of Embelin with tamoxifen and docetaxel on human breast cancer MCF-7 and MDA MB-231 cell proliferation

Gülsüm ABUŞOĞLU<sup>1</sup> (ID), Cengiz KOÇAK<sup>2</sup> (ID), Fatma Emel KOÇAK<sup>3</sup> (ID), Bahadır ÖZTÜRK<sup>4</sup> (ID), Hüsamettin VATANSEV<sup>4</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** Meme kanseri son yıllarda hızla gelişen tanı ve tedavi stratejilerine rağmen kadınlarda en sık görülen kanser türü olup kansere bağlı ölüm sebebidir. Embelin, güçlü bir XIAP inhibitörü ve antiöstrojenik etkileri olan bir bileşiktir. Çalışmamızda, hormon reseptör negatif (MDA-MB-231) ve pozitif (MCF-7) olmak üzere iki farklı insan kaynaklı meme kanseri hücre hattında, etkilerini farklı hücre yolaklarla gösteren Embelin'in antitümöral etkinliklerini, halen meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olan tamoksifen ve docetaxel'in etkileri ile karşılaştırarak araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Embelin'in etkilerini hücre düzeyde göstermek için, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi (xCELLigence) ile sitotoksikite analizleri ve IC<sub>50</sub> hesaplamaları yapılmıştır. Bundan sonraki diğer tüm çalışmalar için hücreler Embelin'in sitotoksikite analizlerinde belirlenen IC<sub>50</sub> dozuyla muamele edilmiş ve histopatolojik ve immünohistokimyasal (Ki-67, Bax, Bcl-2, Cyclin D1) analizleri gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** Hücre sitotoksikite analizleri sonucunda,

### ABSTRACT

**Objective:** Despite the rapidly developing diagnosis and treatment strategies in recent years, breast cancer is the most common type of cancer in women and is the cause of cancer-related death. Embelin is a potent XIAP inhibitor and a compound with antiestrogenic effects. In our study, we aimed to investigate the antitumoral activities of Embelin, which shows its effects through different cellular pathways, in two different human breast cancer cell lines, hormone receptor negative (MDA-MB-231) and positive (MCF-7) and we compared the effects of Embelin with tamoxifen and docetaxel, which are currently widely used in the treatment of breast cancer.

**Methods:** To demonstrate the effects of Embelin at the cellular level, cytotoxicity analyzes and IC<sub>50</sub> calculations were performed with a real-time cell electronic detection system (xCELLigence). For all subsequent studies, cells were treated with the IC<sub>50</sub> dose of Embelin which determined in cytotoxicity assays and histopathological and immunohistochemical (Ki-67, Bax, Bcl-2, Cyclin D1) analyzes were performed.

**Results:** As a result of cell cytotoxicity analyzes,

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Konya

<sup>2</sup>Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Bölümü, Uşak

<sup>3</sup>Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Kütahya

<sup>4</sup>Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Konya



**İletişim / Corresponding Author :** Gülsüm ABUŞOĞLU

Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Selçuklu, Konya - Türkiye

**E-posta / E-mail :** tekinglsm@gmail.com

**Geliş Tarihi / Received :** 15.09.2021

**Kabul Tarihi / Accepted :** 13.01.2022

Embelin'in, doz ve zaman bağımlı olmak üzere, her iki kanser hücre tipinde antiproliferatif etki gösterdiği gözlenmiştir. Embelin uygulanan hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiklerinden,  $IC_{50}$  değerleri MCF-7 için  $63 \mu M$  ve MDA-MB-231 için  $64 \mu M$  olarak hesaplanmıştır. Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Ki-67 ile boyanmış olan preparatların incelenmesi sonucunda, Embelin uygulanan kanser hücrelerinde, hücre sayısının ve Ki-67 proliferasyon indeksinin azaldığı ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur. Embelin'in hücre siklusu üzerine olan etkilerini analiz etmek amacıyla, Cyclin D1 ile boyanan preparatları incelediğimizde, her iki bileşiğin de hücre siklusunun S1 fazı için gerekli olan Cyclin D1 düzeylerini azalttığı ( $p < 0,05$ ) görülmüştür. Embelin'in apoptotik yollar üzerine olan etkisini görmek için, proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2 ile boyanmış olan preparatlar incelenmiştir. Buna göre, Bax ekspresyon düzeyi artarken ( $p < 0,05$ ), Bcl-2 ekspresyon düzeyi azalmıştır ( $p < 0,05$ ).

**Sonuç:** Genel olarak Embelin'in, her iki meme kanser hücre tipinde de, doz ve zamana bağlı olmak üzere kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, özellikle hormon reseptörü negatif MDA MB-231 hücrelerinde hem Tamoxifen hem de Docetaxel ile kıyaslandığında Embelinin, istatistiksel olarak moleküler düzeyde daha etkin olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Özellikle de hormon reseptör negatif olan meme kanserinde daha etkili olduğu sonucuna varılarak Embelin, ileride meme kanser tedavisinde alternatif yeni bir antitümöral ajan olabilir. Bu çalışmanın sonuçları gelecekteki *in vivo* çalışmalara yol gösterici olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri, docetaxel, embelin, tamoksifen

it was observed that Embelin had an antiproliferative effect in both cancer cell types in a dose and time dependent manner.  $IC_{50}$  values were calculated as  $63 \mu M$  for MCF-7 and  $64 \mu M$  for MDA-MB-231 from the proliferation curve graphs of Embelin exposed cells. As a result of the examination of the preparations stained with Hematoksilin-Eosin (H&E) and Ki-67, it was found that the cell number and Ki-67 proliferation index decreased ( $p < 0.05$ ) in cancer cells treated with Embelin. In order to analyze the effects of Embelin on the cell cycle, when we examined the preparations stained with Cyclin D1, it was observed that embelin decreased the Cyclin D1 levels required for the S1 phase of the cell cycle ( $p < 0.05$ ). In order to see the effect of Embelin on apoptotic pathways, preparations stained with proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2 were examined. Accordingly, while Bax expression level increased ( $p < 0.05$ ), Bcl-2 expression level decreased ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** In general, Embelin inhibits cancer cell proliferation in both breast cancer cell types, depending on dose and time. We found that Embelin was statistically more effective at the molecular level when compared to both Tamoxifen and Docetaxel, especially in hormone receptor-negative MDA MB-231 cells. By concluding that it is more effective especially in hormone receptor-negative breast cancer, Embelin may be an alternative new antitumoral agent in the treatment of breast cancer in the future. The results of this study may guide for *in vivo* studies in future.

**Key Words:** Breast cancer, docetaxel, embelin, tamoxifen

## GİRİŞ

Pek çok risk faktörüne sahip meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve tedavi modalitesindeki gelişmelere rağmen meme kanserinin genel sağ kalım oranı düşüktür (1). Meme kanseri insidansında her ne kadar yaşla beraber bir artış

olsa da (2), Batı ülkelerinde ve Ortadoğu bölgesinde özellikle genç kadınlarda da meme kanseri görülme sıklığı artmıştır (3,4). Meme kanseri morbidite ve mortalitesindeki bu artışın nedenlerinden birisi, muhtemelen kanser hücrelerinin çoğalmasına neden olan ve geleneksel kemoterapiye direnç kazandıran birçok agresif molekülün olması olabilir

(5, 6). Bu nedenle, meme kanserinde terapötik olarak hedeflenebilen ve aktif olan bazı moleküllere gereksinim vardır.

Meme kanserleri, hormon reseptör pozitif ve negatif olmak üzere hücre yüzeyinde yer alan östrojen ve progesteron reseptör düzeylerine göre sınıflandırılmaktadır (7). Buna göre hormon reseptör pozitif tümörler, tamoksifen ve aromataz inhibitörleri gibi anti-östrojenlerle genel olarak tedaviye iyi yanıt vermekte ve bu nedenle hormon reseptör pozitifliği iyi prognozla ilişkilendirilmektedir. Böylece östrojen reseptör (ER) antagonistleri ile yapılan terapilerde genel anlamda başarı elde edilmektedir (8). Progesteron reseptörü (PR), ER ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) patolojik olarak az ekspresyonu ile karakterize olan üçlü negatif meme kanseri (TNBC) (9), yüksek metastaz potansiyeline sahip olup, standart tedavilere direnç göstermekte ve teşhis edilen vakaların yaklaşık %15-20'sini kapsamaktadır (10).

Meme kanseri, esasen kemoterapiye duyarlı bir tümör olup, metastatik hastalıkta şifa sağlanamasa bile, kemoterapi ve eğer hormon reseptörleri pozitif ise, tamoksifen veya aromataz inhibitörü ilaçlarla uzun süreli yaşam sağlanabilmektedir. Tamoksifenin yanı sıra rutin tedavi protokolüne göre en sık kullanılan kemoterapötikler antrasiklin grubu (doksorubisin) ve taksan grubu (paklitaksel ve dosetaksel) ilaçlardır.

Apoptotik mekanizmaların disfonksiyonuyla, transforme hücrelerin hayatta kalma süresinin uzaması ve bu hücrelerin proliferasyonuna yol açması, kanserin en bariz özelliğidir (11). Apoptoza direnç, çok sayıda kanser türünde yaygındır ve tedavi direncinde çok önemli bir faktördür. Dolayısıyla apoptotik yollar kanser tedavisi için hedef haline gelmiştir. (12). Apoptozis inhibitör proteinler (IAP), kaspaz aktivasyonunu ve programlanmış hücre ölümünü düzenleyen majör protein ailelerinden biridir. XIAP, bilinen en güçlü kaspaz inhibitörü olup, özellikle de kaspaz 3, 7, 9 üzerinde etkili olduğu görülmüştür (13). Hemen hemen tüm doku ve hücre tiplerinde eksprese edilen fakat normal dokulara göre, tümör hücrelerinde daha fazla eksprese edilen XIAP, kanser hücrelerinin

direnç kabiliyeti kazanmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, XIAP'yi hedeflemeye yönelik çalışmalara eğilim artmış olup, şu anda temel tedavilere karşı direncin üstesinden gelmeye yardımcı olmak için XIAP inhibitörleri geliştirilmektedir (14). XIAP özellikle Orta Doğu bölgesinde meme kanseri ve diğer kanserlerde umut verici bir terapötik moleküler hedef olarak bulunmuştur (15).

Spesifik XIAP inhibitörü olan ve kimyasal yapısı koenzim Q10 (ubikininon)'e benzeyen Embelin (2,5-dihidroksi-3-undesil-1,4-benzokininon), Embelia ribes bitkisinden elde edilen, hücre geçirgen özellikli bir benzokininon derivatıdır (16). Yapılan çalışmalarda, Embelin'in, proapoptotik etkileri ile birlikte, güçlü anti-östrojenik ve zayıf progestasyonel aktiviteye sahip olduğu ve hatta güçlü bir kontraseptif etkisi olduğu gösterilmiştir (17-19). Çeşitli onkogenik faktörler, inflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve protein kinazların da aracılık ettiği Embelin'in antikanser aktivitesi, lösemi, prostat, meme, mide ve beyin glioma gibi farklı kanser hücre hatlarında incelenmiştir (20-24). Ayrıca Embelinin, anti-inflamatuvar, analjezik, antidiyabetik ve antioksidan gibi farklı biyolojik etkilerinin olduğu da söylenmektedir. (12).

Kanser gibi görülme sıklığı gittikçe artan ve tedavi şansı erken tanıya bağlı olan hastalık türleri ile ilgili olarak, toplumun sağlık beklentilerinin karşılanabilmesi için, bu alanda yapılan çalışmaların hız kazanması ve elde edilen bilimsel verilerin hızlı biçimde ürüne dönüştürülebilmesi gerekmektedir. Günümüzde hastaya ve hastalıklara yaklaşımda en önemli amaç, en erken dönemde, mümkünse patolojik değişim henüz tek hücre düzeyindeyken tanı koyabilmek ve tedaviye başlayabilmektir. Bu, ancak *in vitro* yöntemlerin etkinliğini arttırmakla mümkün olacaktır.

Bu çalışmanın amacı, hormon sensitif MCF-7 (ER ve progesteron reseptör pozitif) ve hormon non-sensitif MDA MB-231 (ER ve progesteron reseptör negatif) insan kaynaklı meme kanseri hücre hatlarında, Embelin'in moleküler düzeydeki antiproliferatif etkilerini, meme kanserinin rutin tedavi protokolünde yer alan ve kullanılan Tamoksifen ve Docetaxel'in moleküler

düzeydeki etkileri ile sitolojik, morfolojik ve sitotoksik olarak karşılaştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Kimyasalların hazırlanması

Tamoksifen ile Embelin 1000 µmol/L, Docetaxel ise 1000 nmol/L olacak şekilde %0,1'lik DMSO'da çözülerek 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilmiş ve -40°C'de stoklanmıştır. İlaçların diğer dozları hazırlanan bu stoklardan dilüsyon yapılarak ayarlanmıştır.

### Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan ilaçların meme kanseri hücreleri proliferasyonundaki etkilerinin gözlemlenmesi açısından ATCC den temin edilen insan meme kanseri hücre serisi olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, nemlendirilmiş, %5 CO<sub>2</sub>'e sahip ve 37°C'lik atmosferde, %10 fetal bovin serum (FBS) ve %1 penisilin streptomisin glutamin (PSG) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi yerinde kültüre edilmiştir. Hücreler %70-80 konflüent olduğunda, tripsin-EDTA ile kaldırılıp 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda besi yerine alınarak pasajlanmıştır.

### Embelin, tamoksifen ve docetaxel'in hücre proliferasyonuna etkilerinin belirlenmesi

Her iki hücre hattı için de önceden, 16 kuyulu e-platelerin (mikroelektrot içeren özel hücre kültürü kapları) her bir kuyusuna 100'er µl DMEM eklenip, DMEM'in yarım saat kuyulara yerleşmesi beklenilmiştir. Ardından hücre sayımı yapılarak her bir kuyucukta MCF-7 için  $1 \times 10^3$  ve MDA MB-231 için  $1,5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde e-plate'lere, kuyucuk başına 100'er µl hücre ekimi yapılmıştır. 24 saat sonra hücreler Embelin (12,5-100 µM), Tamoksifen (12,5-100 µM) ve Docetaxel'in (12,5-100 nM) farklı dozlarıyla muamele edilerek, hücre proliferasyonundaki değişiklikler, mikroelektrot içeren özel hücre kültürü kaplarında, inkübatör içindeki xCELLigence (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) cihazı ile gözlemlenmiştir.

### Sitolojik ve immünositokimyasal analizler: hücre bloklarının hazırlanması

Hücre blokları, her bir ilaç için, her bir ilacın belirlenen IC50 dozu ile muamele edilmiş hücrelerden hazırlanmıştır. Hücreler, enzimatik işlem uygulanmaksızın, steril bir kazıyıcı ile kaldırılmış ve supernatant atılmıştır. Hücreler %90 etil alkol ve %10 nötral tamponlanmış formalin ile oda sıcaklığında 30 dakika tespit edilmiş ve steril dibi konik eppendorf tüplere transfer edilmiştir. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve tüplerin dibindeki pellet, sitoblok kiti (Shandon Cytoblock Cell Block Preparation System, Thermo Fisher Scientific Inc., Cheshire, UK) kullanılarak kasetler içerisine bloklanmıştır. Kasetler, oda sıcaklığında 12 saat %10 nötral formalinde bekletilerek tespit edilmiş ve daha sonra hücre blokları parafine gömülmüştür.

### Histolojik ve immunohistokimyasal boyama işlemleri

Formalinde fikse edilmiş ve parafine gömülmüş olan hücre bloklarının, 4 µm kalınlığında yarı-otomatik rotary mikrotom (Leica RM2245, Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, USA) ile kesitleri alınmıştır. Kesitler, H&E ile otomatik side stainer ve coverslipper (Tissue-Tek Prisma/Film, Sakura Finetek Inc., CA, USA) kullanılarak boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir (Olympus BX51, Tokyo, Japan). Immunohistokimyasal boyama işlemleri için de otomatik slide staining sistem (Roche Ventana BenchMark GX, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) kullanılarak, Ki-67 (rabbit monoclonal primary antibody, clone 30-9, Roche), Bcl-2 (rabbit monoclonal primary antibody, clone SP66, Roche), Cyclin-D1 (rabbit monoclonal primary antibody, clone SP4-R, Roche) ve Bax (rabbit polyclonal primary antibody, Dako) immün boyamaları yapılmıştır. Herhangi bir ilaçla muamele edilmemiş hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. H&E ile boyanmış kesitler ışık mikroskopunda incelenmiştir (Olympus BX51). Rastgele seçilmiş 10 sahadan H&E ile boyanmış hücrelerin sayımı yapılarak ortalamaları alınmıştır. Ki-67, Bcl-2, Bax ve Cyclin-D1 boyamaları

ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir (Olympus BX51). Rastgele seçilmiş alanlardan her 100 hücrede pozitif boyanmış hücreler sayılarak pozitif boyanan hücre yüzdeleri hesaplanmıştır.

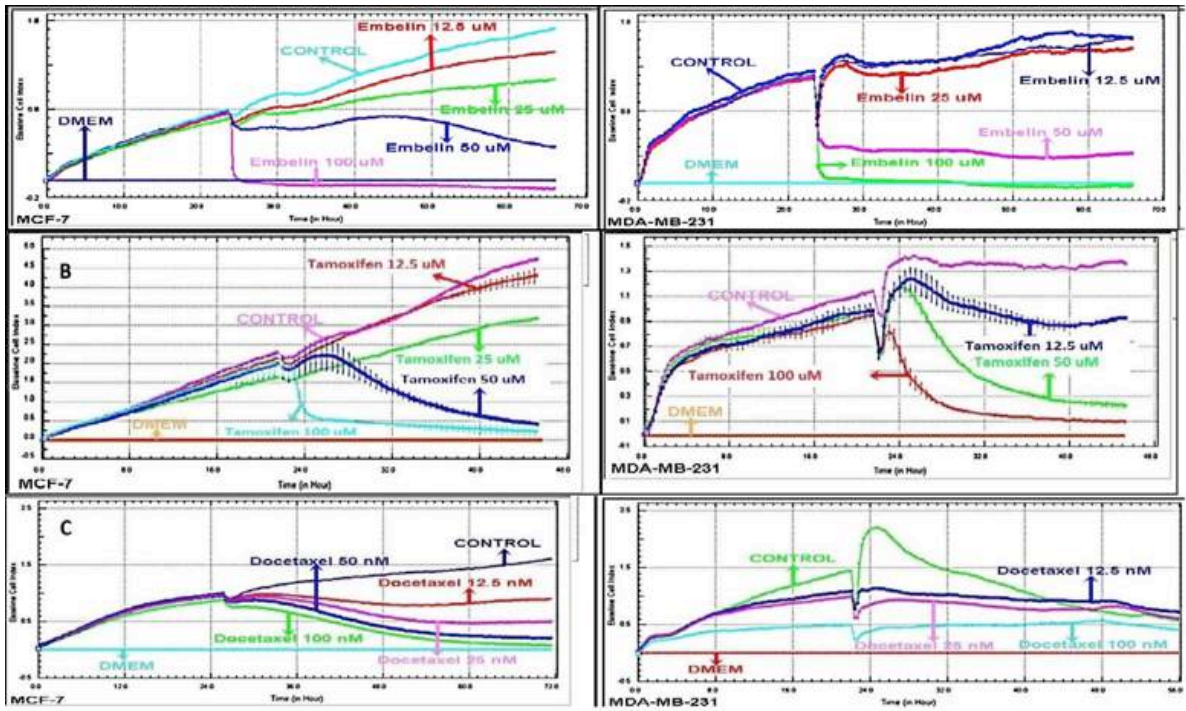
### İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler GraphPad Prism version 6.05 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) programı ile yapılmıştır. Histopatolojik ve immünohistokimyasal skorlama değerlerinin karşılaştırılması ki-kare testi ile yapılmıştır. 0,05'den küçük olan P değerleri, anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR

### Embelin, Docetaxel ve Tamoksifen'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkileri

Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna doz ve zaman bağımlı etkisi, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle analiz edilmiştir. Embelin, Tamoksifen ve Docetaxel'in, kontrol ile karşılaştırıldığında; hücreleri doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği görülmüş olup (Şekil 1), IC<sub>50</sub> dozları Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Embelin, Tamoksifen ve Docetaxelin MCF-7 ve MDA MB-231 hücrelerine doz ve zaman bağımlı etkileri

Tablo 1. Embelin, Docetaxel ve Tamoksifenin MCF-7 ve MDA MB-231 hücreleri için hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri

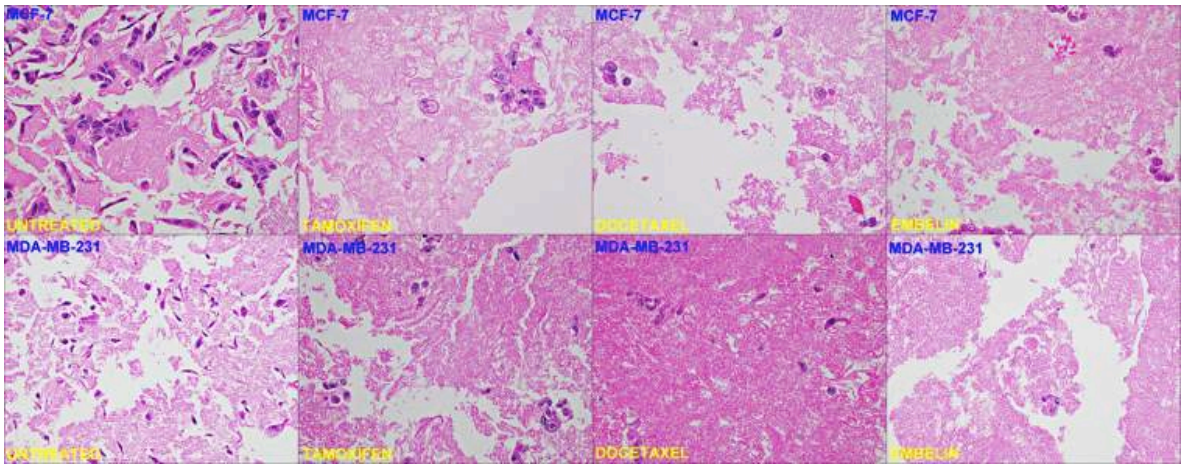
	MCF-7	MDA-MB-231
Embelin (IC <sub>50</sub> )( µM)	63	64
Tamoksifen (IC <sub>50</sub> )( µM)	40	50
Docetaxel (IC <sub>50</sub> )( nM)	43	32

IC<sub>50</sub>: hücrelerin %50'sini inhibe eden inhibitör (ilaç) konsantrasyonu, µM: mikromolar, nM: nanomolar

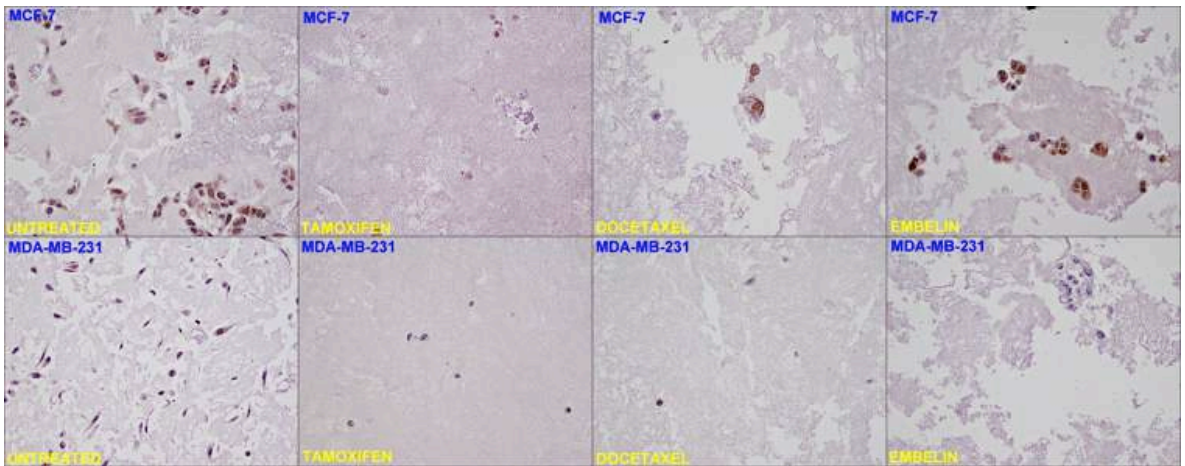
### Histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak boyanmış hücre bloklarının değerlendirilmesi

Her iki hücre hattı için histopatolojik skorlar, hem ilaçla muamele edilmiş hem de ilaçla muamele edilmemiş meme kanseri hücreleri için Tablo 2'de gösterilmiştir. H&E, Bax, Bcl-2, Bax/Bcl-2, Ki-67 ve Cyclin-D1 skorlama değerlerine göre, ilaçla muamele edilmemiş hücreler ile Docetaxel, Tamoxifen ve Embelin ile muamele edilmiş hücreler arasında

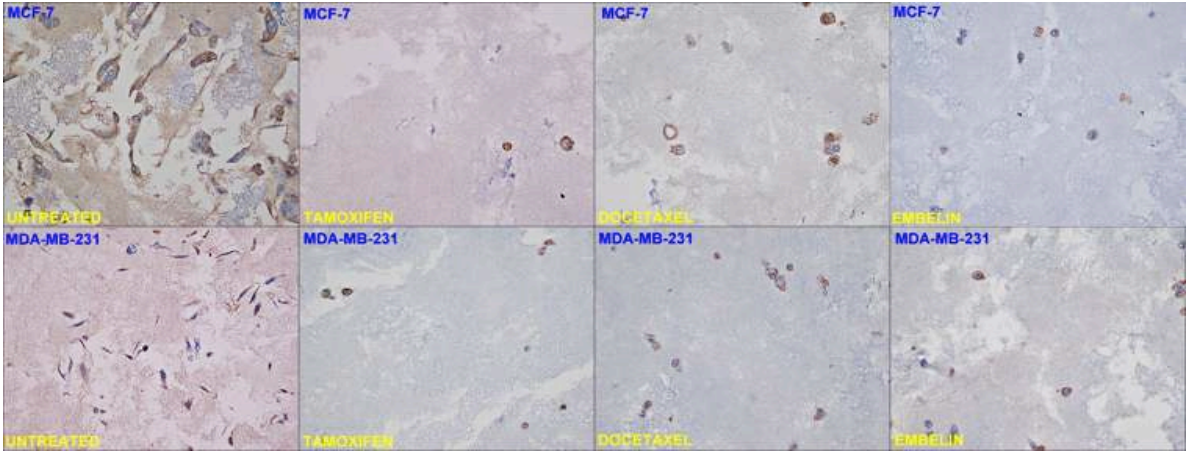
istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Histopatolojik ve immünohistokimyasal skorlama değerleri için sadece Tamoxifen, Docetaxel ve Embelin ile muamele edilmiş hücreler kendi aralarında karşılaştırıldığında; H&E (Şekil 2), Bax (Şekil 3), Bcl-2 (Şekil 4), Cyclin-D1 (Şekil 5), Ki-67 (Şekil 6) ve Bax/Bcl-2 skorlama değerleri arasında istatistiksel olarak farklılıklar olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).



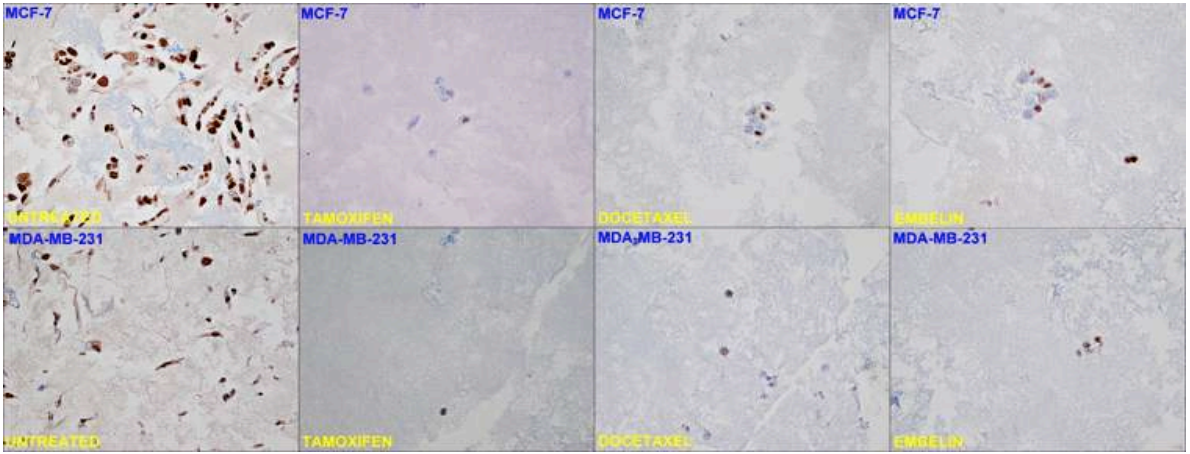
Şekil 2. Kontrol, Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin için H&E ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (H&E x 400)



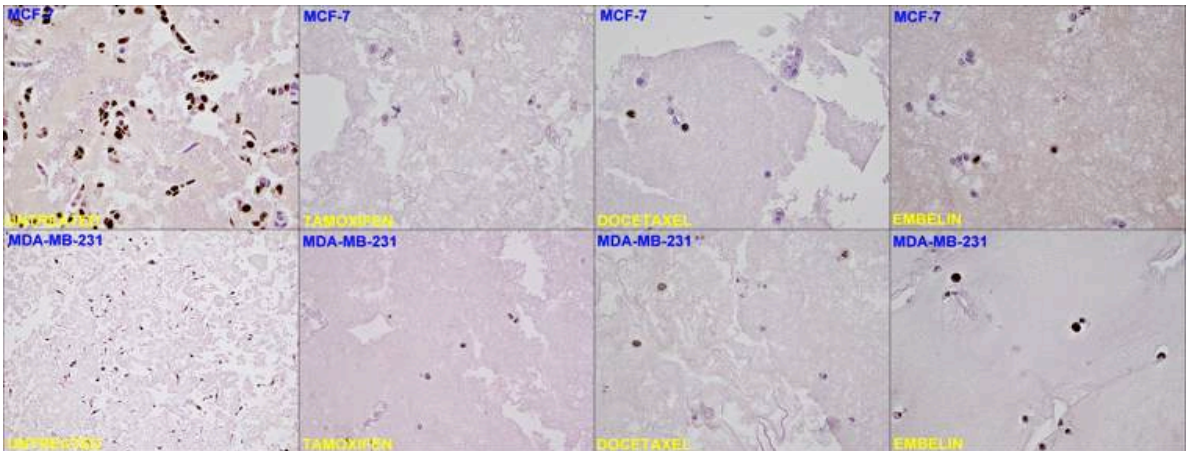
Şekil 3. Kontrol, Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin için BAX ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (BAX x 400).



Şekil 4. Kontrol, Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin için Bcl-2 ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (Bcl-2 x 400).



Şekil 5. Kontrol, Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin için Cyclin D1 ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (Cyclin D1 x 400).



Şekil 6. Kontrol, Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin için Ki-67 ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (Ki-67 x 400)

### Embelin, Docetaxel ve Tamoksifen'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoza etkileri

Docetaxel, Tamoksifen ve Embelin'in MCF-7 ve MDA MB-231 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisi için antiapoptotik Bcl-2 ve proapoptotik Bax analizleri yapılmış olup, ilaçlarla muamele edilen ve muamele edilmeyen hücreler arasındaki farkları

veren skor değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Ayrıca apoptoz skorlama değerleri için sadece Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin ile tedavi edilen hücreleri kendi aralarında karşılaştırdığımızda (Tablo 2); Bcl-2, Bax, Bax/Bcl-2, skorlama değerleri, hücreler arasında da yine önemli farklılıklar göstermiştir ( $p < 0,05$ ).

**Tablo 2.** Kontrol hücre blokları ile Embelin, Tamoksifen ve Docetaxel uygulanan hücre bloklarında H&E, Ki-67, Bcl-2, Bax, cyclin-D1 ve Bax/Bcl-2 oranı patolojik skorlama değerlerinin karşılaştırılması

MCF-7	Kontrol	Embelin	Docetaxel	Tamoksifen	$\chi^2$	p
H&E (n)	77	20	35	16	63,08	< 0.001
Ki-67 (%)	84	30	50	23	47,97	< 0.001
Bcl-2 (%)	79	35	55	32	28,15	< 0.001
Bax (%)	30	75	59	80	24,95	< 0.001
Bax/Bcl-2	0,38	2,14	1,07	2,50	187,00	< 0.001
Cyclin-D1 (%)	80	25	55	21	50,85	< 0.001
MDA-MB-231	Kontrol	Embelin	Docetaxel	Tamoksifen	$\chi^2$	p
H&E (n)	85	10	24	43	78,74	< 0.001
Ki-67 (%)	98	15	20	47	96,40	< 0.001
Bcl-2 (%)	85	25	35	59	42,20	< 0.001
Bax (%)	10	85	68	34	69,09	< 0.001
Bax/Bcl-2	0,12	3,40	1,94	0,58	434,04	< 0.001
Cyclin-D1 (%)	90	15	30	58	67,91	< 0.001

Bcl-2: B-cell lymphoma 2, Bax: Bcl-2-associated X protein. Patolojik skorlama değerleri ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır. 0,05'den küçük olan P değerleri ( $p < 0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### TARTIŞMA

Stratejik olarak hedeflenen kanser tedavileri, hücre büyümesi ve hücre ölüm yolları ile ilişkili mekanizmaları araştırmaya odaklanmıştır (25-28). Doğal bir benzokinon olan Embelin, *in vitro* olarak pek çok kanser türünde mitokondriye bağımlı apoptozu indükleyerek antiproliferatif özelliğini sergilemiştir. Mitokondriden salınan faktörlerle mitokondriyal yol,

anti-apoptotik ( XIAP, Mcl-1, Bcl-xL ve Bcl-2) ve pro-apoptotik (Smac, Bak, Bid ve Bax) dahil olmak üzere Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir ve sitokrom c'nin mitokondriden salınması ile kaspaz-9, sitokrom c ve apoptotik proteaz aktive edici faktörden oluşan kompleksin oluşmasına neden olan içsel ölüm uyarıları tarafından aktive edilir. XIAP hem kaspaz-9 hem de kaspaz-3'ü inhibe ederek kanser hücrelerinde apoptozun baskılanmasına yol açar (12). Daha önce



yapılan çalışmalarda, Embelin'in XIAP'nin güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (29, 30). Embelin'in sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkileri prostat kanseri, insan kolon kanseri, pankreatik kanseri, multipl myeloma, glioma, mesane kanseri gibi farklı türdeki kanser hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (21, 23, 31-34).

Literatürde, Embelin'in meme kanser hücrelerindeki etkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Li ve ark. (35) yaptığı bir çalışmada, Embelin'in MCF-7 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücre siklusunu G2/M fazında bloke ederek apoptosisi indüklediği gösterilmiştir. Çalışmamızda da, benzer olarak Embelin'in hücre siklusunun G1 fazı için gerekli olan cyclin D1 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Aynı çalışmada, bizim çalışmamız ile benzer olarak, Embelin'in Bax ekspresyonunu artırdığı, Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada, Embelin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatlarında doza ve zamana bağımlı olarak, antiproliferatif ve apoptotik etki gösterdiği bildirilmiştir (22). Çalışmada, bizim çalışmamızla benzer olarak, Embelin'in Bcl-2 ekspresyonunu baskıladığı, kaspaz-3 aktivasyonunu artırdığı belirlenmiştir. Ek olarak, araştırmacılar, bizim çalışmamızda da olduğu gibi Embelin'in MDA-MB-231 hücreleri üzerinde, MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisine göre daha efektif olduğunu bildirmişlerdir. Lee ve ark. (36) yaptıkları bir çalışmada, Embelin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinde invazyon ve migrasyonu tetikleyen spesifik protein analizleri yaparak, Embelinin antiproliferatif etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmanın sitotoksikite ve apoptoz sonuçları çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olup, hücre proliferasyon analizi metodu ve apoptoz sebep olan protein analizleri farklıdır. Ayrıca kendi çalışmamızda; Embelinin tüm bu moleküler etkileri, rutin tedavi protokolünde yer alan Tamoksifen ve Docetaxelin etkileri ile kıyaslanmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada;, Embelin, matrix metalloproteinaz

(MMP-2), MMP-9, vasküler endotelial growth faktör (VEGF), TNF- $\alpha$  converting enzim aktivasyonlarını inhibe ederek antiproliferatif ve antimetastatik etki bulunmuştur (37). Ayrıca bu çalışmalardan farklı olarak Embelinle muamele edilen MCF-7 hücreleri ile IL-1 $\beta$  ile uyarılan mezenkimal kök hücrelerinin ortak kültürü, meme kanseri hücrelerinde etkin bir şekilde apoptozu indüklemiş olup, Embelin ve IL-1 $\beta$  ile uyarılan kök hücrelerin birleşik etkilerinden dolayı meme kanseri tedavisi için yeni bir terapötik strateji sağlayabileceğini öne sürmüşlerdir (38). Yani bu çalışmada; sinerjistik bir etki mekanizmasıyla Embelin ve IL-1 $\beta$  birlikte meme kanseri tedavisinde yeni ve farklı bir terapi protokolüne öncülük etmektedirler. Tamoksifen ve Embelin'in etkilerinin karşılaştırılmalı olarak incelendiği diğer bir çalışmada, Embelin'in MCF-7 kanser hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonu inhibe ettiği, Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak, P53, kaspaz-3 ve 9 ekspresyonunu artırarak apoptotik etki gösterdiği bulunmuştur (39). Çalışmanın proliferasyon ve apoptoz analizleri sonuçları kendi çalışma sonuçlarımızla benzer olmakla beraber, bazı farklılıklar göstermiştir. Bu farklılıklardan en barizi, adı geçen çalışmada Embelinin MCF-7 hücrelerindeki moleküler düzeydeki etkileri Tamoksifenin moleküler düzeydeki etkilerine göre daha etkin olmasıdır. Bizim çalışmamızda ise Embelin ve Tamoksifenin MCF-7 hücrelerindeki hem antiproliferatif hem proapoptotik etkileri istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermemiştir. Çalışmamızın diğer bir kısmında yer alan MDA-MB-231 hücrelerinde ise bunun aksi bir şekilde, hem proliferasyon hem de apoptoz açısından, Embelin Tamoksifene göre istatistiksel olarak daha etkindir. MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinin kullanıldığı başka bir çalışmada, Embelin'in, G1 fazında hücre siklusunu inhibe ettiği, Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak ve P53 ekspresyonunu artırarak apoptotik etki gösterdiği ve normal hücreler üzerinde çok az toksik etkisi olduğu belirlenmiştir (40).

Çalışmamızın asıl amacı, hormon sensitif MCF-7 ve hormon sensitif olmayan MDA-MB-231 iki farklı

insan kaynaklı meme kanser hücre hattında, XIAP inhibitörü Embelin'in etkileri araştırılarak Embelin'in moleküler düzeydeki etkilerini, meme kanser tedavisinde halen yaygın olarak kullanılmakta olan Tamoksifen ve Docetaxel'in moleküler düzeydeki etkileri ile kıyaslanmasıdır. Embelin'in etkilerini ortaya çıkarmak için gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi ile hücre kültürü, hücre sitotoksitesite analizi, histopatolojik ve immünohistokimyasal analizlerden yararlanılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda, genel olarak Embelin'in, her iki meme kanser hücre tipinde de, doz ve zamana bağlı olmak üzere kanser hücre proliferasyonu inhibe ettiğini, özellikle MDA MB-231 hücrelerinde Ki-67 proliferasyon indeksi, cyclin D1 düzeyi ve Bcl-2 ekspresyonunu hem Tamoksifen hem de Docetaxel'e göre azaltarak hücre siklusunu inhibe ettiğini, aynı şekilde Bax/Bcl-2 oranını da her iki ilaçla kıyasladığımızda daha da artırarak apoptozisi indüklediğini ortaya çıkarılmıştır. Böylece, apoptozun hem mitokondriyal hem de dışsal yollarını inhibe edebilen bir antiapoptotik protein olan XIAP'ın, meme kanseri hücrelerinde terapötik duyarlılıkta

anahtar bir rol oynama rolü olabileceğini bildirmiş olmaktadır. MCF-7 hücrelerinde ise Embelin doz ve zaman bağımlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe etmesine rağmen moleküler düzeydeki etkileri her iki ilaçla kıyaslandığında, özellikle Docetaxel'e göre daha efektif olduğu fakat Tamoksifenle istatistiksel olarak aynı etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla Embelin'in MDA-MB-231 hücreleri üzerinde, MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisine göre daha efektif olduğunu söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, tümör hücreleri invazyon ve metastaz yapabilmek için çoklu hayatta kalma yolları kullanır. Buna göre, çoklu hücrel ve redoks yollarını baskılayabilen Embelin gibi ajanlar, kanserin önlenmesi ve tedavisi için güçlü bir potansiyele sahip olabilir. Embelin'in meme kanser hücrelerinde antitümöral etkinliğini gösterdiğimiz bu *in vitro* çalışma, ileride yapılacak olan *in vivo* ve klinik faz çalışmalarına destek ve yol gösterici olabilir. Embelin, ileride özellikle triple negatif olarak sınıflandırılan ve tedavi seçeneği son derece sınırlı olan daha agresif meme kanser türünün tedavisinde, yeni antikanser ajanlar olarak kullanıma girebilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Dumlupınar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2014-69 proje numarasıyla desteklenmiştir.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 2013;63(1):11-30.
2. Elomrani F, Zine M, Afif M, L'Annaz S, Ouziane I, Mrabti H, et al. Management of early breast cancer in older women: from screening to treatment. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2015;7:165-71.
3. Leclère B, Molinié F, Trétarre B, Stracci F, Daubisse-Marliac L, Colonna M. Trends in incidence of breast cancer among women under 40 in seven European countries: a GRELL cooperative study. *Cancer Epidemiol*, 2013;37(5):544-9.
4. Al Tamimi DM, Shawarby MA, Ahmed A, Hassan AK, AlOdaini AA. Protein expression profile and prevalence pattern of the molecular classes of breast cancer--a Saudi population based study. *BMC Cancer*, 2010;10:223.
5. Sayed-Ahmed MM, Hafez MM, Al-Shabanah OA, Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Al-Yahya AA, et al. Increased expression of biological markers as potential therapeutic targets in Saudi women with triple-negative breast cancer. *Tumori*, 2013;99(4):545-54.
6. Colak D, Nofal A, Albakheet A, Nirmal M, Jeprel H, Eldali A, et al. Age-specific gene expression signatures for breast tumors and cross-species conserved potential cancer progression markers in young women. *PLoS One*, 2013;8(5):e63204.
7. Pehlivanoğlu S, Aydın Acar Ç. PAK4 promotes invasive potential of MCF-7 cells in PKC-dependent manner through downregulation of E-Cadherin. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2020; 77(1): 107 - 116.
8. Oh DS, Troester MA, Usary J, Hu Z, He X, Fan C, et al. Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *J Clin Oncol*, 2006;24(11):1656-64.
9. Aysola K, Desai A, Welch C, Xu J, Qin Y, Reddy V, et al. Triple negative breast cancer - an overview. *Hereditary Genet*, 2013;2013(Suppl 2).
10. Siraj AK, Pratheeshkumar P, Parvathareddy SK, Divya SP, Al-Dayel F, Tulbah A, et al. Overexpression of PARP is an independent prognostic marker for poor survival in Middle Eastern breast cancer and its inhibition can be enhanced with embelin co-treatment. *Oncotarget*, 2018;9(99):37319-32.
11. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001;411(6835):342-8.
12. Ko JH, Lee SG, Yang WM, Um JY, Sethi G, Mishra S, et al. The application of Embelin for cancer prevention and therapy. *Molecules*, 2018; 23: 621.
13. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 2007;12(9):1543-68.
14. Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ. Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ*, 2006;13(2):179-88.
15. Hussain AR, Siraj AK, Ahmed M, Bu R, Pratheeshkumar P, Alrashed AM, et al. XIAP over-expression is an independent poor prognostic marker in Middle Eastern breast cancer and can be targeted to induce efficient apoptosis. *BMC Cancer*, 2017;17(1):640.
16. Coyle R, Slattery K, Ennis L, O'Sullivan M J, Zisterer DM. The XIAP inhibitor embelin sensitises malignant rhabdoid tumour cells to TRAIL treatment via enhanced activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Int J Oncol*, 2019;55(1):191-202.
17. Githui EK, Makawiti DW, Midiwo JO. Changes in the concentrations of testosterone, luteinising hormone and progesterone associated with administration of embelin. *Contraception*, 1991;44(3):311-7.
18. Wango EO. Anti-fertility effects of embelin in female Sprague-Dawley rats may be due to suppression of ovarian function. *Acta Biol Hung*, 2005;56(1-2):1-9.
19. Johri RK, Pahwa GS, Sharma SC, Zutshi U. Determination of estrogenic/antiestrogenic potential of antifertility substances using rat uterine peroxidase assay. *Contraception*, 1991;44(5):549-57.
20. Hu R, Yang Y, Liu Z, Jiang H, Zhu K, Li J, et al. The XIAP inhibitor Embelin enhances TRAIL-induced apoptosis in human leukemia cells by DR4 and DR5 upregulation. *Tumour Biol*, 2015;36(2):769-77.
21. Park N, Baek HS, Chun YJ. Embelin-induced apoptosis of human prostate cancer cells is mediated through modulation of akt and  $\beta$ -catenin signaling. *PLoS One*, 2015;10(8):e0134760.

22. Shah P, Djisam R, Damulira H, Aganze A, Danquah M. Embelin inhibits proliferation, induces apoptosis and alters gene expression profiles in breast cancer cells. *Pharmacol Rep*, 2016;68(3):638-44.
23. Wang A, Zhang B, Zhang J, Wu W, Wu W. Embelin-induced brain glioma cell apoptosis and cell cycle arrest via the mitochondrial pathway. *Oncol Rep*, 2013;29(6):2473-8.
24. Wang DG, Sun YB, Ye F, Li W, Kharbuja P, Gao L, et al. Anti-tumor activity of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibitor embelin in gastric cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 2014;386(1-2):143-52.
25. Shanmugam MK, Kannaiyan R, Sethi G. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer. *Nutr Cancer*, 2011;63(2):161-73.
26. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, 2007;131(5):966-79.
27. Hsieh YS, Yang SF, Sethi G, Hu DN. Natural bioactives in cancer treatment and prevention. *Biomed Res Int*, 2015;2015:182835.
28. Bishayee A, Sethi G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. *Semin Cancer Biol*, 2016;40-41:1-3.
29. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Embelin, an inhibitor of X chromosome-linked inhibitor-of-apoptosis protein, blocks nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) signaling pathway leading to suppression of NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene products. *Mol Pharmacol*, 2007;71(1):209-19.
30. Nikolovska-Coleska Z, Xu L, Hu Z, Tomita Y, Li P, Roller PP, et al. Discovery of embelin as a cell-permeable, small-molecular weight inhibitor of XIAP through structure-based computational screening of a traditional herbal medicine three-dimensional structure database. *J Med Chem*, 2004;47(10):2430-40.
31. Dai Y, Qiao L, Chan KW, Yang M, Ye J, Ma J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to the inhibitory effects of Embelin on colon carcinogenesis. *Cancer Res*, 2009;69(11):4776-83.
32. Peng M, Huang B, Zhang Q, Fu S, Wang D, Cheng X, et al. Embelin inhibits pancreatic cancer progression by directly inducing cancer cell apoptosis and indirectly restricting IL-6 associated inflammatory and immune suppressive cells. *Cancer Lett*, 2014;354(2):407-16.
33. Heo JY, Kim HJ, Kim SM, Park KR, Park SY, Kim SW, et al. Embelin suppresses STAT3 signaling, proliferation, and survival of multiple myeloma via the protein tyrosine phosphatase PTEN. *Cancer Lett*, 2011;308(1):71-80.
34. Fu X, Pang X, Qi H, Chen S, Li Y, Tan W. XIAP inhibitor Embelin inhibits bladder cancer survival and invasion in vitro. *Clin Transl Oncol*, 2016;18(3):277-82.
35. Li Y, Li D, Yuan S, Wang Z, Tang F, Nie R, et al. Embelin-induced MCF-7 breast cancer cell apoptosis and blockade of MCF-7 cells in the G2/M phase via the mitochondrial pathway. *Oncol Lett*, 2013;5(3):1005-9.
36. Lee H, Ko JH, Baek SH, Nam D, Lee SG, Lee J, et al. Embelin inhibits invasion and migration of mda-mb-231 breast cancer cells by suppression of cxc chemokine receptor 4, matrix metalloproteinases-9/2, and epithelial-mesenchymal transition. *Phyther Res*, 2016;30(6):1021-32.
37. Dhanjal JK, Nigam N, Sharma S, Chaudhary A, Kaul SC, Grover A, et al. Embelin inhibits TNF- $\alpha$  converting enzyme and cancer cell metastasis: molecular dynamics and experimental evidence. *BMC Cancer*, 2014;14:775.
38. Liang YH, Wu JM, Teng JW, Hung E, Wang HS. Embelin downregulated cFLIP in breast cancer cell lines facilitate anti-tumor effect of IL-18-stimulated human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Sci Rep*, 2021;11:14720.
39. Sumalatha KR, Abiramasundari G, Chetan GK, Divya T, Sudhandiran G, Sreepriya M. XIAP inhibitor and antiestrogen embelin abrogates metastasis and augments apoptosis in estrogen receptor positive human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Mol Biol Rep*, 2014;41(2):935-46.
40. Nigam N, Grover A, Goyal S, Katiyar SP, Bhargava P, Wang PC, et al. Targeting mortalin by embelin causes activation of tumor suppressor p53 and deactivation of metastatic signaling in human breast cancer cells. *PLoS One*, 2015;10(9):e0138192.

## Polikistik over sendromlu kadınlarda adrenal ve ovaryan steroid hormonlarla fenotipik ve klinik özelliklerin ilişkisi

### The relationship of phenotypic and clinical features with adrenal and ovarian steroid hormones in women with polycystic ovarian syndrome

Seda KILIÇSOY ASLAN<sup>1</sup> (ID), Raziye DESDİCİOĞLU<sup>2</sup> (ID), Gülin Feykan YEĞİN<sup>3</sup> (ID), Ceylan BAL<sup>4</sup> (ID)

#### ÖZET

**Amaç:** Bu araştırmanın amacı; polikistik over sendromlu (PKOS) kadınlarda klinik ve fenotipik özellikler ile plazma steroid hormon seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

**Yöntem:** Rotterdam kriterlerine göre PKOS tanısı alan, yaşları 18-39 arasında 50 gönüllü kadın çalışmamıza dahil edilmiştir. Hastalar vücut kütle indeksine göre, adet düzensizliği olup olmaması ve hirsutismus olup olmamasına göre gruplara ayrılmıştır. Hirsutismusu değerlendirmek için modifiye Ferriman Gallway skoru kullanılmıştır. Menstrüel siklusun 2-5. günleri arasında 8-10 saatlik açlığı takiben alınan plazma örneklerinden likit kromatografi ardışık kitle spektrofotometri (LC-MS/MS) yöntemi ile steroid hormon düzeyleri çalışılmıştır.

**Bulgular:** Hasta grubumuzda fazla kilolu-obez olan hastaların serbest testosteron seviyesinin, normal kilolu hastalara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ( $p=0,037$ ). Adet düzensizliği olan hastaların DHT, androstenedion ve total testosteron seviyelerinin adetleri düzenli olan kadınlardan daha yüksek olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu görülmüştür (sırasıyla,  $p=0,021$   $p=0,010$   $p=0,049$ ). PKOS tanısı almış hastalardan hirsutismusu olmayan

#### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to evaluate the relationship between phenotypic features and ovarian and adrenal steroid hormones in women with polycystic ovary syndrome.

**Methods:** Fifty volunteer women aged 18-39 who were diagnosed with PCOS according to Rotterdam criteria, were included in our study. The patients were divided into groups according to their body mass index, whether they had menstrual disorders and whether they had hirsutism. The modified Ferriman Gallway score was used to evaluate hirsutism. Ovarian and adrenal steroid hormones, lipid profiles and levels were studied from plasma samples taken after fasting 8-10 hours at the menstrual cycle day is 2-5. Steroid hormones were analyzed by liquid chromatography sequential mass spectrophotometry (LC-MS / MS) method.

**Results:** We found that the level of free Testosterone in overweight-obese patients were higher than in normal weight patients and this is statistically significant ( $p=0.037$ ). Women with menstrual disorders, DHT, androstenedione and total testosterone levels were higher in women with regular menses, and this

<sup>1</sup>Sağlık Bakanlığı, Sorgun Devlet Hastanesi, Yozgat

<sup>2</sup>Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD., Ankara

<sup>3</sup>Sağlık Bakanlığı, Ankara Şehir Hastanesi, Ankara

<sup>4</sup>Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD., Ankara



İletişim / Corresponding Author : Raziye DESDİCİOĞLU

Ankara Şehir Hastanesi Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 26.12.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 09.03.2022

kadınlarda androsteron seviyelerinin hirsutismusu olan kadınlara göre anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ( $p=0,024$ ).

**Sonuç:** Plazma steroid düzeylerini ölçmede en duyarlı yöntemlerden biri olarak kabul edilen LC-MS/MS yönteminin kullanıldığı bu araştırmada; PKOS tanılı kadınlarda vücut kitle indeksi yüksek olan grupta serbest testosteron düzeyi yüksek saptanmıştır. Hirsutismusu olan ve olmayan kadınların androjen düzeyleri arasında farklılık saptanmamıştır. PKOS'lu kadınlarda hirsutismus bulgularının laboratuvar bulguları ile anlamlı ilişkisinin olmadığı gösterilmesi, klinik hiperandrojenizmin plazma androjen düzeyleri dışında genetik, enzimatik ve reseptör düzeyindeki farklılıklar gibi pek çok faktörün etkileşimi sonucunda ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır. Menstrüel düzensizliği olan kadınlarda androjen parametrelerinden bir kısmının yüksek olması folikülogenez üzerine hormonal mikroçevrenin etkisi ile açıklanabilir. Adet düzensizliği olan PKOS tanılı kadınlarda androjen düzeylerinin değerlendirilmesi bu anlamda faydalı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Hirsutismus, LC-MS/MS, obezite, PKOS, steroid hormonlar

difference is significant (respectively,  $p=0.021$   $p=0.010$   $p=0.049$ ). Androsterone levels of women diagnosed with PCOS were significantly higher in women without hirsutism than in women with hirsutism ( $p=0.024$ ).

**Conclusion:** Methods for measuring plasma steroid levels, which is accepted as one of the most sensitive LC-MS/MS method was used in this study, women with PCOS revealed high levels of free testosterone in the group with high body mass index. There was no difference between the androgen levels women with and without hirsutism. The fact that the symptoms of hirsutism in women with PCOS do not have a significant relationship with laboratory findings is due to the fact that clinical hyperandrogenism occurs as a result of the interaction of many factors, such as genetic, enzymatic and receptor level differences, except for plasma androgen levels. The high level of some of the androgen parameters in women with menstrual disorders can be explained by the influence of the hormonal microenvironment on folliculogenesis.

**Key Words:** Hirsutismus, LC-MS/MS, obesity, PCOS, steroid hormones

## GİRİŞ

PKOS; üreme çağındaki kadınlarda, kronik oligo-anovülasyon, polikistik over morfolojisi, androjen hormonların artışı veya hiperandrojenizmin klinik bulguları ile karakterize, endokrin ve metabolik bir hastalıktır. İlk olarak 1935 yılında Stein-Leventhal tarafından polikistik overlere bağlı gelişen amenore ve androjen fazlalığı olarak tanımlanmıştır (1). Toplumda üreme çağındaki kadın popülasyonda sıklığı %6-10 arasındadır (2). Tanı koymak için farklı sağlık otoritelerinin farklı tanımlamaları vardır. En sık kullanılan tanı kriterleri Rotterdam'da 2003 yılında düzenlenen toplantıda kabul gören hiperandrojenizm ve kronik anovülasyona yol açan diğer hastalıklar

dışlandıktan sonra PKOS tanısının aşağıdaki üç kriterden ikisinin sağlanmasıdır. Bunlar 1. Oligo-anovülasyon, 2. Klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları, 3. Ultrasonografide polikistik over morfolojisi- tek overde 12 ve üzerinde 2-9 mm kist ve/veya over volümünün 10 ml den fazla olması (1, 3).

PKOS patogenezi net aydınlatılmamış olup birkaç teori ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Gonadotropin sentez ve salınım bozuklukları, androjen metabolizmasında bozulma, genetik faktörler ve insülin direncinin iç içe olduğu karmaşık etyopatolojik mekanizmalar öne sürülmektedir (4-9). Gonadotropin metabolizmasındaki bozulmalar GnRH salınım pulsasyonunun artması şeklindedir. Bu durum LH salınımının dolayısıyla da teka hücrelerinden androjen

salınımının artmasına sebep olur. İnsülin direnci ve eşlik eden obezite, PKOS'ta androjen fazlalığının patogeneğinde hem doğrudan hem de dolaylı rol oynar (1). Hiperandrojenizm PKOS patofizyolojisinde temel bir unsur olarak karşımıza çıkar. PKOS tanısı alan kadınlarda günlük ortalama androjen ve östrojen üretimi artmıştır. Bu durum kliniğe erkek tipi kıllanma, adet düzensizliği, glikoz metabolizmasında bozulma gibi endokrinolojik ve metabolik bulgular olarak yansır. Her ne kadar PKOS'ta androjen fazlalığının ana kaynağı overler olarak düşünülse de, PKOS hastalarında aşırı adrenal androjen seviyeleri ve adrenal disfonksiyon da gözlenmiştir (10). Over kaynaklı temel androjen testosteron, adrenal kaynaklı androjenler DHEA ve DHEAS'tır. PKOS'ta bu hormonların yanısıra over ve adrenal androjenler için prohormon olan androstenedion düzeylerinin arttığı da bilinmektedir (10). Klinik hiperandrojenizm PKOS'lu kadınların %70-80'inde hirsutismus olarak karşımıza çıkmaktadır (11, 12). Akne, erkek tipi kellik, kilo alımı menstruel düzensizlikler hiperandrojenizmin diğer klinik yansımalarıdır (13). Hiperandrojenizm bulguları kadınların çoğunda hafif olup sadece kozmetik tedavi gerektirirken, bazı durumlarda şiddetli semptomlara neden olarak daha kapsamlı müdahale gerektirmektedir. PKOS'ta klinik hiperandrojenizm şiddeti ile biyokimyasal bulgular her zaman uyum göstermemektedir. Ayrıca hirsutismus olan kadınlarda hangi androjenin klinik ile daha ilişkili olduğu da net değildir (14). Gerek androjen hormon düzeylerini çalışan yöntemlerin zor standardizasyonları, performansları gerekse periferde dönüşüm ve reseptör duyarlılıklarının kişisel farklılık göstermesi PKOS'ta laboratuvar kullanımını kısıtlasa da özellikle hirsutismus skoru yüksek olan kadınlarda androjenlerin değerlendirilmesi önerilmektedir (15). Özellikle total ve serbest testosteron ile beraber androstenedion (A4) ölçülmesi PKOS'ta hiperandrojenizm ve metabolik risklerin değerlendirilmesinde önemli olduğu vurgulanmaktadır (16-21). Araştırmamızda hastaların fenotipik özellikleri ile steroid hormon düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılması planlanmıştır.

olup, hormonların analizinde Likit kromatografi tandem mass spektrofotometri (LC-MS/MS) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem steroid hormon ölçümünde immünassay yöntemlere göre yüksek spesifite ve sensitivite oranına sahip olması açısından günümüzde altın standart olarak tanımlanmaktadır (22). Özellikle testosteron ve androstenedion düzeylerinin ölçümünde birçok büyük merkezde LC-MS/MS yöntemi tercih edilmektedir (23-25). Klinik klavuzlarda da androjen düzeylerinin değerlendirilmesinde mutlaka geçerli ve güvenli bir yöntem kullanılması önerilmektedir (15). Bu çalışmanın amacı; PKOS tanısı olan kadınların farklı klinik özelliklerine göre LC-MS/MS yöntemi ile çalışılan steroid hormon düzeyleri arasında fark olup olmadığını araştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız, gönüllü olup Rotterdam kriterlerine göre PKOS tanısı alan kadınlarda, fenotipik ve klinik özelliklerin adrenal ve ovaryan steroidlerle ilişkisini araştırmak amacıyla prospektif bir çalışma olarak tasarlanmıştır. Çalışmaya katılan tüm gönüllülere aydınlatılmış onam formu okutularak, imzaları ve onamları alınmıştır. Çalışmaya katılan gruplar 1 Kasım 2019 - 31 Ocak 2020 tarihleri arasında, jinekoloji polikliniklerine başvuran hastalar arasından Rotterdam 2003 kriterlerine göre PKOS tanısı alan 18-40 yaş arası 50 gönüllü kadın dahil edilmiştir. Son üç ayda herhangi bir hormonal ilaç kullanan hastalar araştırmaya dahil edilmemiştir. Tüyenme şikayeti olanlarda Ferriman-Gallwey (Ferr-Gall) skoru 8 ve üzerinde olan kadınlar hirsutik kabul edilmiştir. Her kadının demografik özellikleri, menstrüel ve genel jinekolojik öyküsü, vücut kütle indeksi (VKİ), Ferr-Gall skorları kaydedilmiştir.

Kan örnekleri düzenli siklusları olan kadınlarda siklusun 2-5. günleri oligo-amenoreik hastalarda progesteron çekilme kanamasının 2-5. günleri arasında alınmıştır. Steroid hormon analizi LC-MS/MS yöntemi ile yapılmıştır. Plazma örnekleri bir gecelik açlık sonrası, antekübital venden EDTA içeren tüplere alınarak toplanmıştır. Örnekler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj

edilip, elde edilen plazma analiz yapılarına kadar -20 °C derecede bekletilmiştir. Steroid hormon analizi için AB Sciex marka 4500 model LC-MS/MS cihazı (Foster City, CA) ve Eureka marka (Chiaravalle, Italy) Steroid hormon kiti kullanılmıştır. Bu kit beş seviye kalibratör ve üç seviye kontrol içermektedir. İnternal standart olarak testosteron-d3, aldosterone -d7, kortizol-d4 çalışılmıştır. Analitik kolon C18 (50x2.1 mm,1.8 µm) kullanılmıştır. Tüm kalibratörler ve kontrol numuneleri depolama sıcaklıklarında tutulmuş ve numuneler kullanım talimatlarına uygun olarak analiz edilmiştir.

Tüm istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences versiyon 25.0.0; SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) programı ile yapılmıştır. Normal dağılım gösteren sayısal veriler tablolarda ortalama ± standart sapma olarak gösterilirken normal dağılmayan veriler ortanca (minimum-maximum) şeklinde ifade edilmiştir. Kategorik veriler ise n (sayı) ve yüzdelere (%) verilmiştir. Çalışmada; verilerin normal dağılım varsayımına uyup uymadığı ilk önce Kolmogorov-Smirnov Testi ile incelenmiş daha sonrasında da çarpıklık ve basıklık katsayılarına bakarak belirlenmiş olup verilerin normal dağılıma sahip olmadığı saptanmıştır. Normal dağılım gösteren değişkenlerin iki grup karşılaştırmalarında t test, normal dağılım göstermeyen değişkenlerin iki grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanılırken üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis H testi kullanılmıştır. Daha sonra PKOS tanısı almış hastaların fenotipik özellikleri incelenmiştir. Son olarak değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman Korelasyon testi ile uygulanmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar istatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

Bu çalışma, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ile yapılmıştır (Tarih: 09.10.2019 ve Karar No: 26379996/114).

## BULGULAR

Çalışmamıza katılan PKOS tanısı almış hastaların fenotipik özellikleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Araştırmamıza katılan kadınların yaş aralığı 18-39 arasında olduğu görülmüştür. Klinik özelliklerine göre hastalar fazla kilolu-obez, menstrüel düzensizlik ve hirsutismus olup olmama durumlarına göre kendi içlerinde gruplandırılmıştır. Kadınlardan fazla kilolu ve obez olanların sayısı 21, adet düzensizliği bulgusu ile gelenlerin sayısı 27 ve Ferr-Gall skoru 8 ve üzerinde olanların sayısı 31 olarak belirlenmiştir. Araştırmamızdaki kadınların tümüne ait steroid hormon düzeyleri Tablo 2’de gösterilmiştir. PKOS tanısı almış kadınların VKİ’ne göre normal kilolu kabul edilen kadınlar ile fazla kilolu-obez kadınlar arasında yapılan karşılaştırmada, fazla kilolu-obez olan hastaların serbest testosteron seviyesi normal kilolu hastalara göre daha yüksek ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer hormonların plazma düzeyleri iki grup arasında farklılık göstermemiştir. Adet düzensizliği olan grupta DHT,1,4 delta androstenedion ve toplam testosteron seviyesi diğer hastalara göre daha yüksekti ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Araştırma grubumuzdaki PKOS tanısı almış kadınlarda hirsutismus olmayanlarda androsteron seviyelerinin hirsutismus olan kadınlara göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 5).

**Tablo 1.** Kadınların demografik özelliklerinin ve antropometrik ölçümlerinin tanımlayıcı analizi

Değişken (n=50)	Min-Max
Yaş	18-39
VKİ	16,56-42,24
FERR-GALL skoru	1-29

VKİ; Vücut Kütle indeksi, FERR-GALL: FERRİMAN -GALLWEY



Tablo 2. Araştırma grubundaki tüm kadınların steroid hormon düzeyleri

Değişken (n=50)	Ortanca (ÇAG)	Min-Max
Pregnanolon( ng/dL)	87,10 (69,55)	11,67-298,71
Kortikosteron (ng/dL)	213,55 (208,67)	15,55-930,12
11 Deoksikortikosteron (ng/dL)	5,31 (13,76)	0,73-99,85
Androsteron (µg/L)	2,66 (14,03)	0,22-99,85
Estron (pg/mL)	73,10 (97,16)	2,49-582,93
17-OH Pregnenolon (ng/dL)	133,09 (96,14)	5,89-434,17
DHT (pg/mL)	110,06 (78,83)	18,91-392,10
DHEA (ng/mL)	10,34 (32,14)	0,82-211,43
Aldosteron (ng/dL)	12,70 (18,18)	0,61-99,85
Androstenedion (ng/dL)	114,63(68,05)	11,48-346,74
17 OH Progesteron (ng/dL)	55,29 (34,25)	7,43-169,14
DHEAS (µg/L)	256,46 (142,07)	53,37-962,44
Serbest Testosteron (pg/mL)	2,33 (0,91)	0,94-4,59
Total Testosteron (ng/dL)	36,99 (11,76)	11,00-71,32

ÇAG; Çeyrekler Arası Genişlik, DHT; Dihidro testosteron, DHEA; Dehidroepiandrosteron, DHEAS; Dehidroepiandrosteron sülfat

Tablo 3. PKOS tanısı almış hastaların VKİ ile steroid hormon bulgularının karşılaştırılması<sup>a</sup>

Değişken	Normal Kilolu (VKİ<25) (n=29)	Fazla Kilolu-obezi (VKİ≥25) (n=21)	P
	Ortanca (ÇAG)	Ortanca (ÇAG)	
Pregnanolon (ng/dL)	72,16 (103,34)	60,80 (77,41)	0,101
Kortikosteron (ng/dL)	153,90 (244,07)	112,17 (195,05)	0,517
11 Deoksikortikosteron (ng/dL)	3,86 (2,75)	2,75 (2,07)	0,058
Androsteron (µg/L)	0,61(0,29)	0,54 (0,47)	0,746
Estron (pg/mL)	38,06(52,94)	39,60 (63,57)	0,937
17-OH Pregnenolon (ng/dL)	103,10(165,89)	105,79 (99,76)	0,149
DHT (pg/mL)	81,63(109,38)	111,08 (105,19)	0,562
DHEA (ng/mL)	3,87(3,88)	2,75 (3,24)	0,376
Aldosteron (ng/dL)	9,41 (11,65)	6,26 (8,48)	0,101
Androstenedion (ng/dL)	101,83 (85,11)	109,50 (87,63)	0,350
17 OH Progesteron (ng/dL)	52,23 (17,49)	52,18 (34,09)	0,415
DHEAS (µg/L)	254,90 (96,60)	257,30 (127,92)	0,673
Serbest Testosteron (pg/mL)	1,88(0,85)	2,11 (1,19)	<b>0,037</b>
Total Testosteron (ng/dL)	35,85 (12,95)	34,00 (21,48)	0,852

<sup>a</sup> Mann-Whitney U

ÇAG: Çeyrekler Arası Genişlik, DHT: Dihidro testosteron, DHEA: Dehidroepiandrosteron, DHEAS: Dehidroepiandrosteron sülfat

Tablo 4. Adet düzensizliği olan ve olmayan grupta hormon düzeylerinin karşılaştırılması<sup>a</sup>

Değişken	Adet düzensizliği olan (n=27)	Adet düzensizliği olmayan (n=23)	p
	Ortanca (ÇAG)	Ortanca (ÇAG)	
Pregnanolon (ng/dL)	82,33 (108,55)	47,67 (63,86)	0,397
Kortikosteron (ng/dL)	153,90 (208,89)	108,71 (246,93)	0,992
11 Deoksikortikosteron (ng/dL)	3,07 (2,62)	3,09 (3,02)	0,697
Androsteron (µg/L)	0,61 (0,33)	0,54 (0,40)	0,419
Estron (pg/mL)	44,40 (81,09)	36,76 (33,84)	0,823
17-OH Pregnenolon (ng/dL)	112,60 (123,64)	99,54 (156,27)	0,454
DHT (pg/mL)	116,00 (113,96)	56,89 (72,41)	<b>0,021</b>
DHEA (ng/mL)	2,90 (6,62)	2,90 (2,56)	0,448
Aldosteron (ng/dL)	7,75 (6,94)	9,41 (16,52)	0,946
Androstenedion (ng/dL)	123,90 (85,62)	80,00 (63,73)	<b>0,010</b>
17OH Progesteron (ng/dL)	53,90 (21,10)	50,10 (31,80)	0,063
DHEAS (µg/L)	257,30 (150,72)	253,67 (108,03)	0,527
Serbest Testosteron (pg/mL)	2,08 (1,33)	1,89 (0,71)	0,224
Total Testosteron (ng/dL)	39,00 (14,60)	32,50 (15,70)	<b>0,049</b>

<sup>a</sup> Mann-Whitney U testi ÇAG: Çeyrekler Arası Genişlik, DHT: Dihidro testosteron, DHEA: Dehidroepiandrosteron, DHEAS: Dehidroepiandrosteron sülfat

Tablo 5. Hirsutizm olan ve olmayan grupta hormon düzeylerinin karşılaştırılması<sup>a</sup>

Değişken	Hirsutizm Olmayan (FERR-GAL<8) (n=19)	Hirsutizm Olan (FERR-GAL≥8) (n=31)	p
	Ortanca (ÇAG)	Ortanca (ÇAG)	
Pregnanolon (ng/dL)	80,70 (104,78)	57,10 (77,69)	0,870
Kortikosteron (ng/dL)	217,78 (123,06)	99,85 (236,46)	0,161
11 Deoksikortikosteron (ng/dL)	3,86 (2,76)	3,07 (2,71)	0,173
Androsteron (µg/L)	0,75 (0,61)	0,55 (0,35)	<b>0,024</b>
Estron (pg/mL)	30,75 (94,65)	44,40 (56,40)	0,177
17-OH Pregnenolon (ng/dL)	140,18 (155,62)	99,85 (123,89)	0,230
DHT (pg/mL)	82,49 (127,61)	92,86 (102,94)	0,810
DHEA (ng/mL)	4,01 (7,09)	2,90 (3,63)	0,631
Aldosteron (ng/dL)	8,90 (11,06)	7,75 (11,30)	0,472
Androstenedion (ng/dL)	103,60 (88,86)	101,83 (88,55)	0,487
17 OH Progesteron (ng/dL)	53,89 (14,95)	51,67 (31,35)	0,398
DHEAS (µg/L)	286,91 (101,36)	253,67 (125,09)	0,071
Serbest Testosteron (pg/mL)	1,93 (0,53)	2,00 (1,05)	0,733
Total Testosteron (ng/dL)	34,70 (25,70)	35,32 (14,95)	0,705

<sup>a</sup> Mann-Whitney U testi

ÇAG: Çeyrekler Arası Genişlik, DHT: Dihidro testosteron, DHEA: Dehidroepiandrosteron, DHEAS: Dehidroepiandrosteron sülfat

## TARTIŞMA

PKOS etyolojisi tam olarak aydınlatılamamış, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen multifaktöriyel bir hastalıktır. PKOS etyopatogenezine bakıldığında steroidogenez bozuklukları ilgili çalışmaların net bir veri içermediği görülmektedir. Tanı aşamasında da laboratuvar parametrelerinin kullanımı sınırlıdır. Çalışmamızda androjenleri değerlendirmede altın standart olarak kabul edilen yöntem olan LC-MS/MS yöntemi ile çalışılan steroid hormon düzeyleri ile hastaların klinik durumları arasındaki ilişkiyi araştırılmıştır. Bu yöntem ile plazma androjenlerinin diğer yöntemlere göre daha düşük olduğu bildirilmiş olup yöntem özel laboratuvar alt ve üst limit tanımlamaları net değildir.

Çalışmamızda, en belirgin klinik ve steroid hormon ilişkisi adet düzensizliği olan grup ile olmayan grup arasında görülmüştür. Ayrıca fazla kilolu ve obez grupta serbest testosteron düzeyi diğer gruba göre yüksek bulunmuş olup obezlerde azalmış SHBG düzeyi ile açıklanabilir (26). Obez PKOS hastaları ile normal kilolu PKOS hastalarının steroid hormon profilinin araştırıldığı Deng ve ark. (27) yaptığı çalışmada; normal kilolu PKOS hastaları daha yüksek DHEAS, 17-hidroksi pregnanolon, 17-hidroksiprogesteron, estron düzeyine sahipken, daha düşük serbest testosteron düzeyleri görülmüştür.

Kadın dolaşımındaki majör androjenler DHEAS, DHEA, androstenedion, testosteron ve DHT'dir. DHEAS, DHEA ve Androstenedion nerdeyse hiç aktivitesi olmayan prohormonlar olarak düşünülebilir. Androjenik etki oluşturmaları için testosterona dönüşmeleri gerekir. Adet döngüsü üzerine androjenlerin etkisi bazı çalışmalarda araştırılmıştır. Foliküler gelişim sırasında östrojen sentezi için substrat sağlamanın yanı sıra, hem androjen fazlalığı hem de androjen eksikliği foliküler gelişimdeki anormalliklerle ilişkili olduğundan uygun androjen dengesinin sağlanması önemlidir (1). Ayrıca bazı veriler foliküler atrezinin önlenmesinde ve folikül büyümesinin desteklenmesinde androjenlerin rolünü

düşündürmektedir (5).

Çalışmamızda, adet düzensizliği olan grupta LC-MS/MS yöntemi ile DHT, androstenedion ve total testosteron seviyesinin adet düzensizliği olmayan kadınlara göre yüksek olduğunun gösterilmesi folikül gelişim basamaklarında da androjen metabolizmasının önemli olabileceğini düşündürmektedir. Hiperandrojenizmin klinik bulgusu olarak hirsutismus, erkek tipi kellik ve akne gibi bulgular kabul edilmekte olup menstrüel düzensizlik ile androjen hormon ilişkisi günlük pratikte sık kullanılmamaktadır. Oysa PKOS tanısı alan kadınların oligo-amenore kliniği ile başvurma oranları oldukça yüksektir. Polikliniklere oligomenore ile başvuran üreme çağındaki kadınların %90'ı ileri incelemelerde PKOS tanısı almaktadır (28). Adet düzensizliği ön planda olan PKOS'lu hiperandrojenizm klinik bulguları eşlik etmese veya belirgin olmasa bile androjenlerin değerlendirilmesi tanısal gücü artırabilir. Adrenal androjenler (DHEA, DHEAS, androstenedion) PKOS'lu kadınlarda artmaktadır. Bu androjenler ancak periferde testosterona dönüşerek PKOS da gözlenen hiperandrojenizm bulgularına yol açmaktadırlar (29). Çalışmamızda, hirsutismusu olan PKOS'larda adrenal androjen düzeylerinin istatistiksel olarak farklılık göstermemesi androjen etkilerinin plazma düzeyinden bağımsız olması ile açıklanabilir. Androsteron, testosteron ve DHT'nin metabolitidir. Çalışmamızda, hirsutismusu olmayan PKOS'larda hirsutismusu olan PKOS'lara göre daha yüksek saptanması literatür bilgilerimizle çakışmamaktadır. Lokal androjen seviyesi, androjen reseptör durumu, kıl foliküllerinin androjene duyarlılığı ve 5 alfa redüktaz aktivitesinin ortak etkileri ile hirsutismus meydana gelir. Dolayısıyla hirsutismus durumu ve şiddeti androjen seviyesi ile korele değildir. Bazı yüksek androjen seviyelerine sahip kadınlarda hirsutismus olmadan alopesi veya akne görülebilir. Irk ve etnik gruplar arasında her bir deri ünitesinin içerdiği kıl folikülü sayısı değişir (29). Çalışmamızda kullanılan LC-MS/MS yönteminin steroid hormon düzeylerinin değerlendirmede son yıllarda altın standart olarak kabul edildiği

göz önüne alınırsa; klinik hiperandrojenizmde laboratuvar yöntemlerinin tanıda katkısının halen sınırlı olduğu ifade edilebilir. Bunun yanısıra aynı grup içinde menstrüel düzensizlikleri belirgin olan kadınlarda belli başlı androjen düzeylerinin yüksek tespit edilmiş olması yöntemin kıymeti açısından önemlidir. Çalışmamızın araştırma maliyeti nedeni ile PKOS grubu kendi arasında gruplandırılmış, ayrıca bir kontrol grubuna ait çalışma yapılamamıştır. Yöntem tüm 14 hormonu bir arada çalışan bir ticari kite dayanması nedeni ile steroid hormon sentez yolağındaki birçok hormon çalışılmış fakat hepsi klinik anlamda bilgi vermediği için tartışmaya dahil edilmemiştir. Araştırmamıza katılan hasta sayısının az olması hastaları PKOS alt fenotiplerine ayırarak değerlendirememize engel olmuştur. Ayrıca kontrol grubumuzun olmaması ve hastaları kendi klinik özellikleri içinde karşılaştırmamız da çalışmamızın kısıtlılıklarındandır.

Sonuç olarak; PKOS etyopatogenezi hakkında çeşitli hipotezler olup etyopatogeneze yönelik araştırmalar devam etmektedir. Nedene yönelik tedavi yapılamadığı için PKOS'lu kadınlara için günümüzde semptom ve bulgulara yönelik tedavi uygulanmaktadır. Bu çalışmamızda PKOS'lu hastalarda

VKİ, hirsutismus, adet düzensizliği durumuna göre steroid hormon profilini değerlendirerek tanısal araştırmalara katkıda bulunmak amaçlanmıştır. Araştırmamızın sonuçlarına göre adet düzensizliği kliniği ön planda olan kadınlarda da tıpkı hirsutismus bulgusu olan kadınlardaki gibi androjen düzeylerinin değerlendirilmesi önemli olabilir. Kilolu kadınlarda androjenlerin serbest fraksiyonlarının yüksek olması beklenen bir durum olup; çalışmamızda, PKOS'lu kadınlarda kilo verilmesi durumunda hiperandrojenizmde biyokimyasal marker olan serbest testosteron ve DHEAS düzeylerini azaltabileceğini ve semptomların hafiflemesine katkıda bulunacağı düşünülebilir. Günlük pratikte de kilo verilmesi ve yaşam tarzı değişiklikleri PKOS yönetiminde ilk seçenektir. Ayrıca klinik olarak saptanan hirsutismus şiddetinin laboratuvar bulgularıyla korelasyon göstermediğinin tespit edilmiş olması kılınma durumunu etkileyen androjen hormon düzeyi dışındaki faktörlere yönelik araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir. Bu araştırmanın sonucunda LC MS-MS yöntemi ile PKOS'lu kadınların kendi içinde androjen düzeyleri en yüksek tespit edildiği grup menstrüel düzensizlikleri olan grup olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 09.10.2019 ve Karar No: 26379996/114).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*, 2010;25(2):544-51.
2. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004;89(6):2745-9.
3. Stein IF. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol*, 1935;29:181-91.
4. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013;98(12):4565-92.
5. González F. Inflammation in polycystic ovary syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction. *Steroids*, 2012;77(4):300-5.
6. Legro RS. Obesity and PCOS: implications for diagnosis and treatment. *Semin Reprod Med*, 2012;30(6):496-506.
7. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited. *Endocr Rev*, 2016;37(5):467-520.
8. Coviello AD, Sam S, Legro RS, Dunaif A. High prevalence of metabolic syndrome in first-degree male relatives of women with polycystic ovary syndrome is related to high rates of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009;94(11):4361-6.
9. Crosignani P, Nicolosi A. Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. *Hum Reprod Update*, 2001;7(1):3-7.
10. Yildiz BO, Azziz R. The adrenal and polycystic ovary syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*, 2007;8(4):331-42.
11. Ehrmann DA, Rosenfield RL, Barnes RB, Brigell DF, Sheikh Z. Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. *N Engl J Med*, 1992;327(3):157-62.
12. Azziz R, Carmina E, Sawaya ME. Idiopathic hirsutism. *Endocr Rev*, 2000;21(4):347-62.
13. Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol*, 2011;7(4):219-31.
14. Escobar-Morreale H, Carmina E, Dewailly D, Gambineri A, Kelestimur F, Moghetti P, et al. Epidemiology, diagnosis and management of hirsutism: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update*, 2012;18(2):146-70.
15. Martin KA, Anderson RR, Chang RJ, Ehrmann DA, Lobo RA, Murad MH, et al. Evaluation and treatment of hirsutism in premenopausal women: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018;103(4):1233-57.
16. Carmina E, Guastella E, Longo RA. Advances in the diagnosis and treatment of PCOS. *Curr Pharm Des*, 2016;22(36):5508-14.
17. Barth JH, Field HP, Yasmin E, Balen AH. Defining hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome: measurement of testosterone and androstenedione by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and analysis by receiver operator characteristic plots. *Eur J Endocrinol*, 2010;162(3):611.
18. Stener-Victorin E, Holm G, Labrie F, Nilsson L, Janson PO, Ohlsson C. Are there any sensitive and specific sex steroid markers for polycystic ovary syndrome? *J Clin Endocrinol Metab*, 2010;95(2):810-9.
19. Janse F, Eijkemans MJ, Goverde AJ, Lentjes EG, Hoek A, Lambalk CB, et al. Assessment of androgen concentration in women: liquid chromatography-tandem mass spectrometry and extraction RIA show comparable results. *Eur J Endocrinol*, 2011;165(6):925-33.

20. Keefe CC, Goldman MM, Zhang K, Clarke N, Reitz RE, Welt CK. Simultaneous measurement of thirteen steroid hormones in women with polycystic ovary syndrome and control women using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *PLoS One*, 2014;9(4):e93805.
21. Keevil BG. How do we measure hyperandrogenemia in patients with PCOS? *J Clin Endocrinol Metab*, 2014;99(3):777-9.
22. Salameh WA, Redor-Goldman MM, Clarke NJ, Mathur R, Azziz R, Reitz RE. Specificity and predictive value of circulating testosterone assessed by tandem mass spectrometry for the diagnosis of polycystic ovary syndrome by the National Institutes of Health 1990 criteria. *Fertil Steril*, 2014;101(4):1135-41. e2.
23. Tosi F, Fiers T, Kaufman J-M, Dall'Alda M, Moretta R, Giagulli VA, et al. Implications of androgen assay accuracy in the phenotyping of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016;101(2):610-8.
24. Owen LJ, Wu FC, Büttler RM, Keevil BG. A direct assay for the routine measurement of testosterone, androstenedione, dihydrotestosterone and dehydroepiandrosterone by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem*, 2016;53(5):580-7.
25. Fanelli F, Gambineri A, Belluomo I, Repaci A, Di Lallo VD, Di Dalmazi G, et al. Androgen profiling by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in healthy normal-weight ovulatory and anovulatory late adolescent and young women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013;98(7):3058-67.
26. Karakas SE. New biomarkers for diagnosis and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Chim Acta*, 2017;471:248-53.
27. Deng Y, Zhang Y, Li S, Zhou W, Ye L, Wang L, et al. Steroid hormone profiling in obese and nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Sci Rep*, 2017;7(1):1-9.
28. Hart R, Hickey M, Franks S. Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004;18(5):671-83.
29. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2004;81(1):19-25.

## *Ficus carica* extract causes cell cycle arrest and induces apoptosis in MG-63 and HT-29 cancer cell lines

*Ficus carica* ekstraktı, hücre döngüsünün durmasına neden olur ve MG-63 ve HT-29 kanser hücre hatlarında apoptozu indükler

Tuğba YALÇINKAYA<sup>1</sup> (ID), Leyla Didem KOZACI<sup>2</sup> (ID), Ahmet ÇARHAN<sup>1</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** *Ficus carica* (Fig) is a leafy tree of Moraceae, which is used in local traditional medicine to treat various diseases. Recent studies revealed an impressive anti-cancer efficiency of *F. carica* extracts in different types of cancer cells. This study aimed to investigate the anti-cancer effects of *F. carica* extract on colon cancer cell line HT-29 and bone cancer cell line MG-63.

**Methods:** The human colon cancer cell line HT-29 and bone cancer cell line MG-63 were used to investigate the effects of *F. carica* extract. The effects of *F. carica* on cell viability were evaluated using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] assay. Complementary analyses for evaluating membrane integrity and toxicity were performed by estimating LDH (lactate dehydrogenase) assay. Mechanisms of cell death were analyzed using Muse™ Annexin-V and TUNEL assays. Cell-cycle distribution was examined using flow cytometry analysis.

**Results:** The results demonstrated that *F. carica* extract caused a significant decrease in cell viability in cancer cells in a dose-and time-dependent fashion, but

### ÖZET

**Amaç:** *Ficus carica* (Fig), geleneksel tıpta çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılan yapraklı bir Moraceae ağacıdır. Son araştırmalar, farklı kanser hücrelerinde *F. carica* özlerinin etkileyici bir anti-kanser etkinliğini ortaya çıkardı. Bu çalışma, *F. carica* ekstraktının kolon kanseri hücre hattı HT-29 ve kemik kanseri hücre hattı MG-63 üzerindeki anti-kanser etkilerini araştırmayı amaçladı.

**Yöntem:** *F. carica* ekstraktının etkilerini araştırmak için insan kolon kanseri hücre hattı HT-29 ve kemik kanseri hücre hattı MG-63 kullanıldı. *F. carica*'nın hücre canlılığı üzerindeki etkileri, MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür] metodu kullanılarak değerlendirildi. LDH (laktat dehidrogenaz) metodu ile membran bütünlüğünü ve toksisiteyi değerlendirmek için tamamlayıcı analizler yapıldı. Hücre ölümü mekanizmaları, Muse™ Annexin-V ve TUNEL testleri kullanılarak analiz edildi. Hücre döngüsü dağılımı, akış sitometri analizi kullanılarak incelendi.

**Bulgular:** Elde edilen sonuçlar, *F. carica* ekstraktının kanser hücrelerinde doza ve zamana bağlı bir şekilde hücre canlılığında önemli bir azalmaya neden olduğunu

<sup>1</sup>Ankara Yıldırım Beyazıt University, Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Yıldırım Beyazıt University, Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Ahmet ÇARHAN

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : acarhan@ybu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 03.10.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 24.02.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.93357

Yalçinkaya T, Kozacı LD, Çarhan A. *Ficus carica* extract causes cell cycle arrest and induces apoptosis in MG-63 and HT-29 cancer cell lines  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(1): 73 - 88

not in the healthy cell line. According to MTT analysis, the optimal activity of *F. carica* in MG-63 and HT-29 cell lines was determined in 48 h at 1:100 dilution and 24 h at 1:10 dilution, respectively. In addition, the cell viability did not drop below 50% in the hFOB 1.19 cell line at any dose and time interval, indicating that *F. carica* was not cytotoxic to normal cells. The LDH activity in culture media showed that *F. carica* had cytotoxic effects on cancer cell lines. A significant increase in LDH activity in the cultured media through the loss of membrane integrity during apoptosis pathways was observed in cancer cells, whereas the extract did not have a cytotoxic effect in the control cell line. According to HPLC analysis, *F. carica* used in this study contained  $8.17063 \times 10^{-1}$  mg/L protocatechuic acid. Cell cycle analysis showed that the *F. carica* extract did not affect the MG-63 cell line, but caused an arrest at the S phase in HT-29 cells. In TUNEL assay, fluorescent staining was detected in cancer cell lines that underwent apoptosis, while there was no staining in control cells. The Annexin-V and Dead Cell Assay confirmed apoptosis in both cancer cell lines.

**Conclusion:** *F. carica* was found to have anti-cancer effects on both colon and bone cancer cell lines. While *F. carica* extract can activate different types of cell death in cancer cell lines, it did not cause any cytotoxic effects on healthy cells. A possible mechanism for the anti-cancer activity of *F. carica* is through induction of apoptosis as observed in the colon cancer cell line HT-29 and bone cancer cell line MG-63.

**Key Words:** Anti-cancer, apoptosis, cell death, HT-29, colon cancer, *F. carica* extract, MG-63, osteosarcoma

göstermektedir. MTT analizine göre *F. carica*'nın MG-63 ve HT-29 hücre hatlarında optimal aktivitesi sırasıyla 48 saatte 1:100 dilüsyonda ve 24 saatte 1:10 dilüsyonda belirlendi. Ayrıca hücre canlılığı, hFOB 1.19 hücre hattında herhangi bir doz ve zaman aralığında %50'nin altına düşmedi, bu da *F. carica*'nın normal hücreler için sitotoksik olmadığını gösterir. LDH aktivitesi, *F. carica*'nın kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri olduğunu gösterdi. Apoptoz sırasında kanser hücrelerinde membran bütünlüğünün kaybı yoluyla LDH aktivitesinde önemli bir artış gözlenirken, ekstrakt kontrol hücre hattında sitotoksik bir etkiye sahip değildi. HPLC analizine göre bu çalışmada kullanılan *F. carica*'nın,  $8.17063 \times 10^{-1}$  mg/L protocatechuic asit içerdiği tespit edildi. Hücre döngüsü analizi, *F. carica* ekstraktının MG-63 hücre hattını etkilemediğini, ancak HT-29 hücrelerinde S fazında bir durmaya neden olduğunu gösterdi. TUNEL testinde, kontrol hücrelerinde floresan boyanma olmazken, apoptoz geçiren kanser hücre hatlarında floresan boyama tespit edildi. Annexin-V ve Dead Cell Assay, her iki kanser hücre hattında da apoptozu doğruladı.

**Sonuç:** *F. carica*'nın hem kolon hem de kemik kanseri hücre hatları üzerinde anti-kanser etkileri olduğu bulundu. *F. carica* ekstraktı, kanser hücre dizilerinde farklı hücre ölümlerini aktive edebilirken, sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye neden olmadı. *F. carica*'nın anti-kanser aktivitesi için olası bir mekanizma, kolon kanseri hücre hattı HT-29 ve kemik kanseri hücre hattı MG-63'te gözlemlendiği gibi apoptozun indüklenmesidir.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-kanser, apoptoz, hücre ölümü, HT-29, kolon kanseri, *F. carica* ekstraktı, MG-63, osteosarkom

## INTRODUCTION

*F. carica* (Fig) is a leafy tree of Moraceae and is considered as one of the oldest fruits alongside with apples and grapes (1). *F. carica* products are widely

used as food and medicine in the Middle East (2). Fruit, root and leaves are used in traditional medicine to treat various conditions such as gastrointestinal, respiratory and cardiovascular disorders (3). Although the anti-cancer effect has been shown in various



cancer cell lines as in breast, colon and liver cancers, no study on osteosarcoma has been identified yet.

According to 2018 data of the American Cancer Research Institute, colon cancer is the third most common cancer in men and the second most common cancer in women. It is also estimated that over 1.8 million new cases of colon cancer and 881,000 deaths occurred in 2018 (4). Similarly, osteosarcoma (OS) represents the most common bone cancer (incidence: 0.3 per 100 000 per year) and the incidence is higher in adolescents (4). Risk factors for OS include previous radiation treatments causing germline abnormalities such as Paget's disease, Li-Fraumeni, Werner syndrome, Rothmund-Thomson syndrome, Bloom syndrome, and hereditary retinoblastoma (5). The two most common inherited syndromes linked with colorectal cancers are familial adenomatous polyposis (FAP) and hereditary non-polyposis colo-rectal cancer (HNPCC). Lynch, Turcot and Peutz-Jeghers Syndroms may also induce colorectal cancer (6).

In this study we focused upon the effect of *F. carica* extract to observe its efficacy as anti-cancer agent on bone and colon cancer cell lines. To elaborate our study further, we analyzed the cell survival, cytotoxicity, apoptosis, cell cycle progression of these two lines after challenging them with the extracts subjected to this study.

Resistance to chemotherapy drugs and poor clinical outcome is a common encountered problem in approximately 50% of cancer patients (7,8). In addition, high-dose chemotherapy causes various side effects and tumor recurrence (8). Therefore, it is necessary to develop prognostic markers and therapeutic targets in osteosarcoma in order to improve treatment approaches (9).

Medicinal plants have been the subject of therapeutic purposes past to present. According to the data of the WHO, 80% of the human population have been estimated to prefer treatments based on herbal medicines rather than synthetic medicines (10). Current treatment options based on synthetic drugs/ chemotherapy offer limited therapeutic success in

cancer, as they have toxic effects, are expensive and change the functioning of the cell signaling pathways (10,11). Natural compounds, such as phytochemicals, minerals, and vitamins have emerged as promising candidates to reduce cancer burden (11).

In this study, *F. carica* extract was investigated for anti-cancer effects in terms of cytotoxicity, membrane and DNA fragmentation change, cell cycle, cell death pathways in two cancer cell lines: osteosarcoma cancer cell line (MG-63), colon cancer cell line (HT -29).

Limited information has been obtained in the literature regarding the effect of *F. carica* on apoptotic induction on cancer cell lines. In our study, it is aimed to obtain a prediction about the effect of *F. carica* apoptotic induction and cell cycle by detecting biochemical and morphological changes in order to determine the apoptotic processes of the cancer cell line.

## MATERIAL and METHOD

### Preparation of plant extract

*F. carica* extract (cas no: 90028-74-3) was commercially available from Nante Kimya (Istanbul, Turkey). The starting amount for the fractionation process is 50 ml. To prepare the aqueous fraction, it was extracted using solvents of varying polarity such as hexane, dichloromethane, methanol, ethanol, water, respectively. The extract was subjected to evaporation under nitrogen at 70°C (FMS/SuperVap 6 Concentrators). Solvents were added at a ratio of 1:20 and sonicated in an ultrasonic bath (Bandelin Electronic/Sonorex Digital 10 P). The separation funnel and the phase formed in the upper part were separated. The remainder was subjected to evaporation under 70°C nitrogen. Finally, the ultra-pure water was added to the dried extract to obtain *F. carica* aqueous fraction (12). After fractionation, the aqueous fraction of 3330 mg/ml *F. carica* extract was obtained as the main stock.

### HPLC-DAD Analysis

Protocatechuic acid (Sigma Aldrich, Germany) in *F. carica* extract was determined by HPLC method by Tezcan et al. (12). Aqueous fractions were subjected to HPLC analysis using Agilent Technologies/1200 Infinity. Reverse phase analytical HPLC experiments were performed on a Thermo Fisher Scientific 5  $\mu$ M C18 column (250  $\times$  4.6mm). A variable wavelength ultraviolet visible detector was set at 235 nm. The mobile phase consisted of 1% formic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The standard acid was prepared as 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 100 ppm. The flow rate was maintained column, at a rate of 5 mL/min at 25 °C.

### Cell Culture

Osteosarcoma cancer cell line (MG-63), colon cancer cell line (HT-29) and human bone cell line (hFOB 1.19, control cell line) were purchased from The American Type Culture Collection (ATCC, US). MG-63 cells, HT-29 cells and hFOB 1.19 cells were cultured in MEM (Sigma Aldrich, Germany), McCoy's 5A (Sigma Aldrich, Germany) and DMEM/F12 (Sigma Aldrich, Germany), respectively. Media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin and cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

### Cell Viability and Cytotoxicity Analyses

#### MTT Assay

The cells were seeded at 5.000 cells/well in a 96 well plates and incubated in media with various concentrations of *F. carica* extract for 24 h, 48 h, or 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The effect of *F. carica* on cell viability was assessed by MTT assay (Biotium, USA). The plates were read at 490 nm using a microplate reader (Neales/MB-530). All experiments were repeated three times at each timepoint. IC<sub>50</sub> values of *F. carica* (IC<sub>50</sub>; inhibition value of 50% cellular proliferation) for each cell line were determined.

$$\text{Inhibition} = \frac{\text{absofcontrol} - \text{absofsample}}{\text{absofcontrol}} \times 100$$

### Cytotoxicity Assay

The cells were seeded in a 96 well plate at a density of 25,000 cells/mL and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The cells were treated with five serial dilutions (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) of *F. carica* extract. Cytotoxicity assays were performed using Cytotoxicity Assay Kit (Sigma Aldrich, Germany) and NYZ Bradford Reagent (NYZTECH, Portugal). LDH assay measuring total LDH activity was carried out at three timepoints, 24 h, 48 h and 72 h. The plates were read at 595 nm using a microplate reader (Thermo Fisher Scientific/Varioskan Flash 3001). The enzyme activity was determined as the amount of enzyme/unit protein.

### Cell Cycle Analyses, TUNEL and Apoptosis Assays

#### Cell-cycle Analysis

Cell cycle distribution in cells treated with different concentrations of extract was evaluated for washed with cold PBS and fixed in 70% ethanol at +4 °C for 30 minutes. Following, the cells were resuspended in ice cold PBS containing %1 BSA and 50 $\mu$ L RNase incubated at 37 °C for 20 minutes, and then stained with a propidium iodide (PI) solution 37 °C for 20 minutes. Cell cycle were analyzed by flow cytometry (NovoCyte Flow Cytometer Systems 1-3 Lasers) (13).

#### TUNEL Assay

The cells were seeded in a chamber slides (Isolab, Germany) at a density of 4000 cells/cm<sup>2</sup>. Apoptosis was detected by the TUNEL method using the ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit (Merck Milipore, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were left for 15 seconds by applying 1 mL of PBS per well and washed 2 times. 200 $\mu$ L of 100% methanol was added per well and incubated at -20 °C for 15 minutes. Methanol was removed from the wells. 1 mL of PBS was applied and left for 15 seconds then

washed 2 times. 1 mL of PBS containing 0.2% Triton X-100 was added and incubated at room temperature for 30 minutes. Cells were washed 2 times with 1 mL of PBS. Cells were incubated with 100  $\mu$ L Equation Buffer for 5 minutes at room temperature. 50 $\mu$ L of Tunnel Reaction Buffer + 1 $\mu$ L of enzyme was added. 3. well Tunnel Reaction Buffer was added, no enzyme added. It was incubated at 37 °C for 80 minutes in a humid and dark environment. The cells were washed 3 times with 0.1% Triton X-100 + 5 mg / mL BSA + PBS. After each solution was added, it was left at room temperature for 5 minutes. After washing, the excitation wavelength was examined under fluorescence microscopy at 450-500 nm and scanning wavelength at 515-565 nm (Euromex/Oxion Inverso, Holland).

#### Annexin-V and Dead Cell Assay

After completing the incubation period, the extent of apoptosis was investigated using Muse™ Annexin-V & Dead Cell Kit (Merck Milipore, USA) with Muse cell analyzer. The assay utilizes annexin V to detect phosphatidylserine on the external membrane of apoptotic cells. Cells at a starting density of  $1 \times 10^6$  cells were seeded onto regular plates and treated of *F. carica*. The cells were harvested, and 100  $\mu$ L of cell suspension was added to 100  $\mu$ L of the Muse™ An-nexin V & Dead Cell reagent. After 20 minutes of incubation at room temperature in the dark, the samples were analyzed according to the manufacturer's protocol.

Using designated programming on the cell analyzer, the number of live, dead, early and late apoptotic cells were determined. Total apoptosis was calculated by combining the number of cells from late and early apoptosis quadrants of the histograms.

#### Statistical Analyses

All experimental data are presented as mean  $\pm$  SD of at least two independent experiments for in vitro studies. For statistical analysis and calculations, IBM SPSS Statistics 25.0 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp), ANOVA (ANalysis Of VAriance), Mann Whitney U test, and comparisons in the number of repetitions Wallis test and MS-Excel 2016 program were used for figures. All p values  $<0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

#### Active Compounds was present in *Ficus carica* extract

The water fraction from *F. carica* extract was prepared using polar solvents. The presence and amount of protocatechuic acid, a phenolic compound for *Ficus carica* extract, were determined with HPLC (12). The *F. carica* extract HPLC chromatogram is shown in Figure 2. In the HPLC diagram, *F. carica* extract appeared to be  $8.17063 \times 10^{-1}$  mg/L in the water fraction.

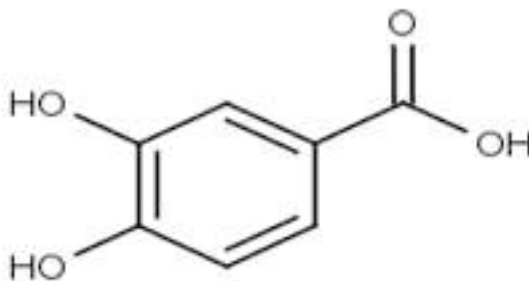
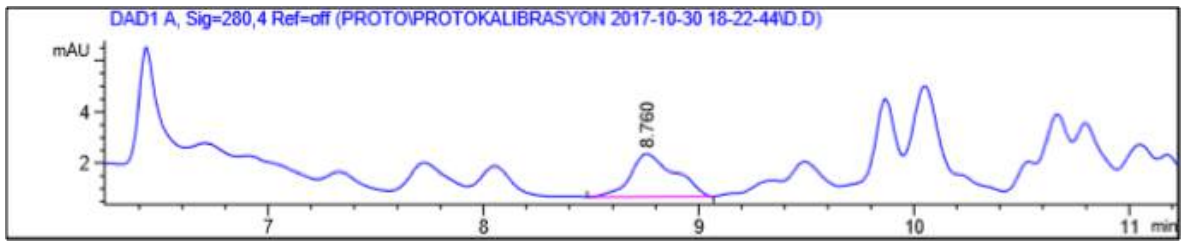


Figure 1. The chemical structure of the protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid)

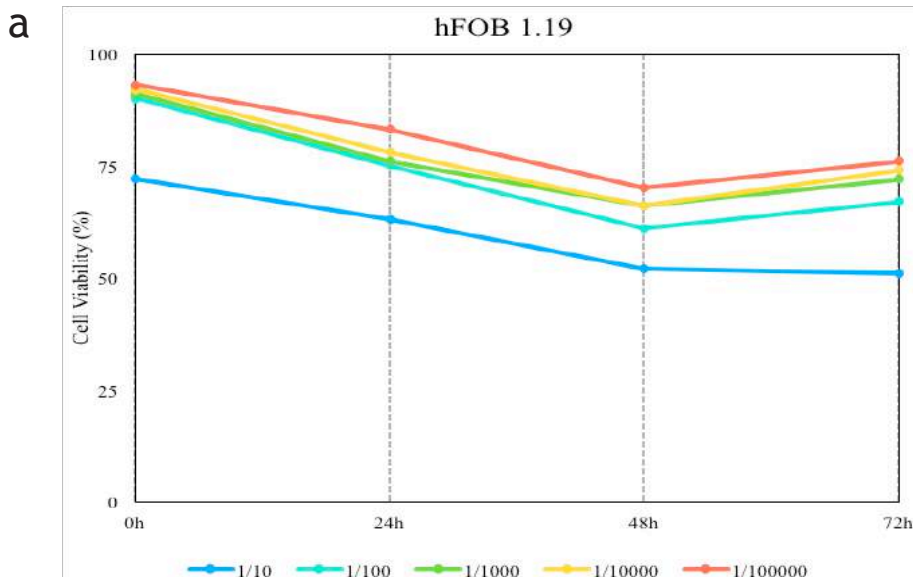


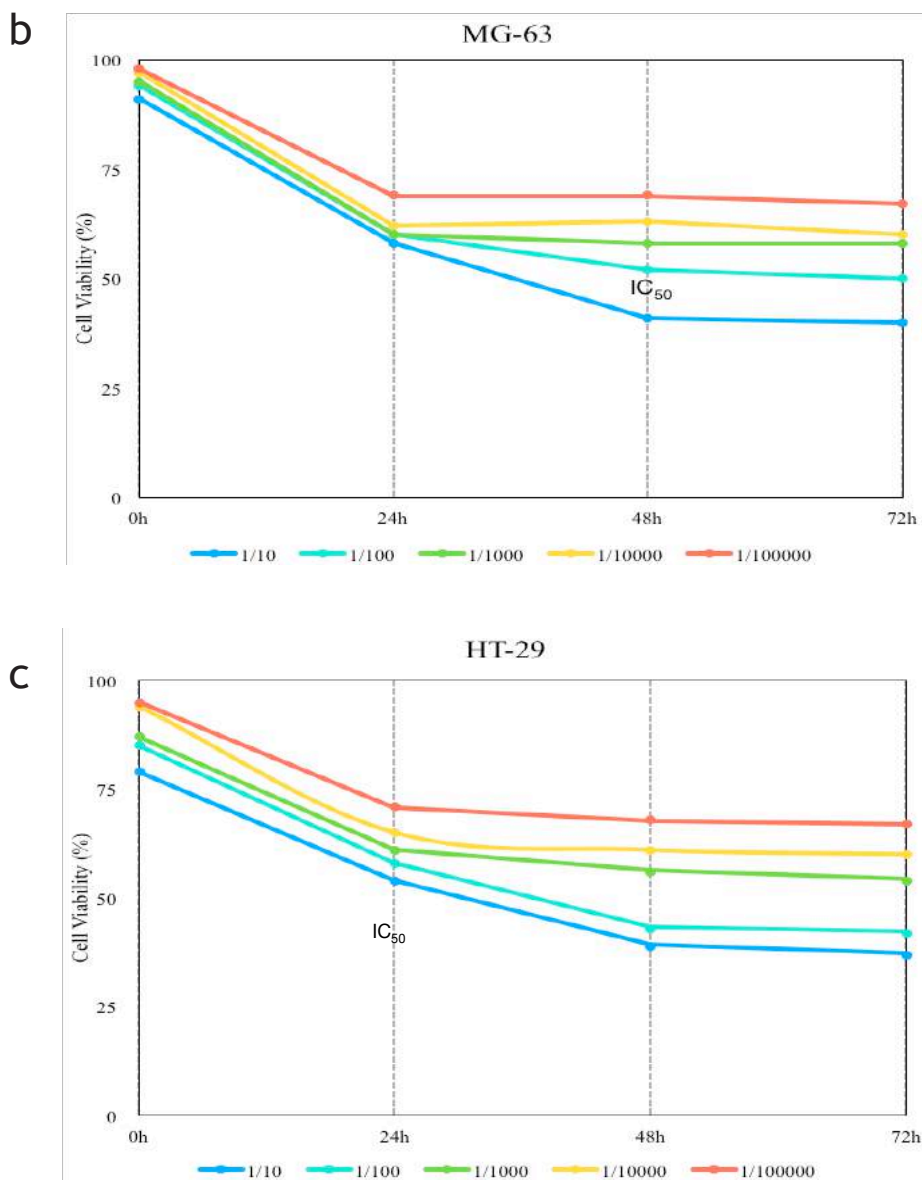
**Figure 2.** A representative of HPLC chromatogram of *F. carica* in extract. HPLC chromatogram of water fraction of *F. carica* in extract at 280 nm. Peak at 8,760 min. corresponding to protocatechuic acid. The first peak in the chromatographic analysis image is due to solvents in the HPLC mobile phase. However, it does not have a negative effect on the peak formed by the reference material

Treatment with extract of *F. carica* inhibited cellular proliferation of MG-63 and HT-29 cells, but not hFOB 1.19 cells

To investigate the anticancer effects of *F. carica* extracts, the inhibitory effect of MG-63, HT-29 and hFOB 1.19 was evaluated using MTT after 24-72 hour exposure of 3330 mg/ml *F. carica* at varying dilutions (prepared from the original stock). The time and dose were determined as the inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) when 50% of the cells were dead. MTT analysis showed that *F. carica* extract treatment decreased the proliferation level in cancer cell lines MG-63 and HT-29 in a dose- and time-dependent manner (Figure

3b and 3c).  $IC_{50}$  could not be determined since the decrease in proliferation level for hFOB 1.19 cell line at any dose and time point as it was not below 50%. Although this finding suggests that *F. carica* does not have a negative effect on proliferation for the healthy cell line, future studies may need to confirm this (Figure 3a). The  $IC_{50}$  dose, time interval and proliferation percentage in MTT assay is as follow for MG-63 and HT-29 cell lines; 1:100 concentration at 48th hour, 52%, 1:10 concentration at 24th hour, 54%, respectively. The study was designed according to  $IC_{50}$  determined by MTT assay for each cell line.





**Figure 3.** Cell proliferation analysis results of *Ficus carica* extract.

MTT assay was performed after treatment with *F. carica* extract for (a) hFOB 1.19, (b) MG-63 and (c) HT-29. The cells were seeded into 5000 cells/well in 96-well plates and were subjected to different concentrations over different incubation periods. All experiments were repeated in triplicates for each time-point.  $IC_{50}$  is the inhibition value of 50% cellular proliferation.

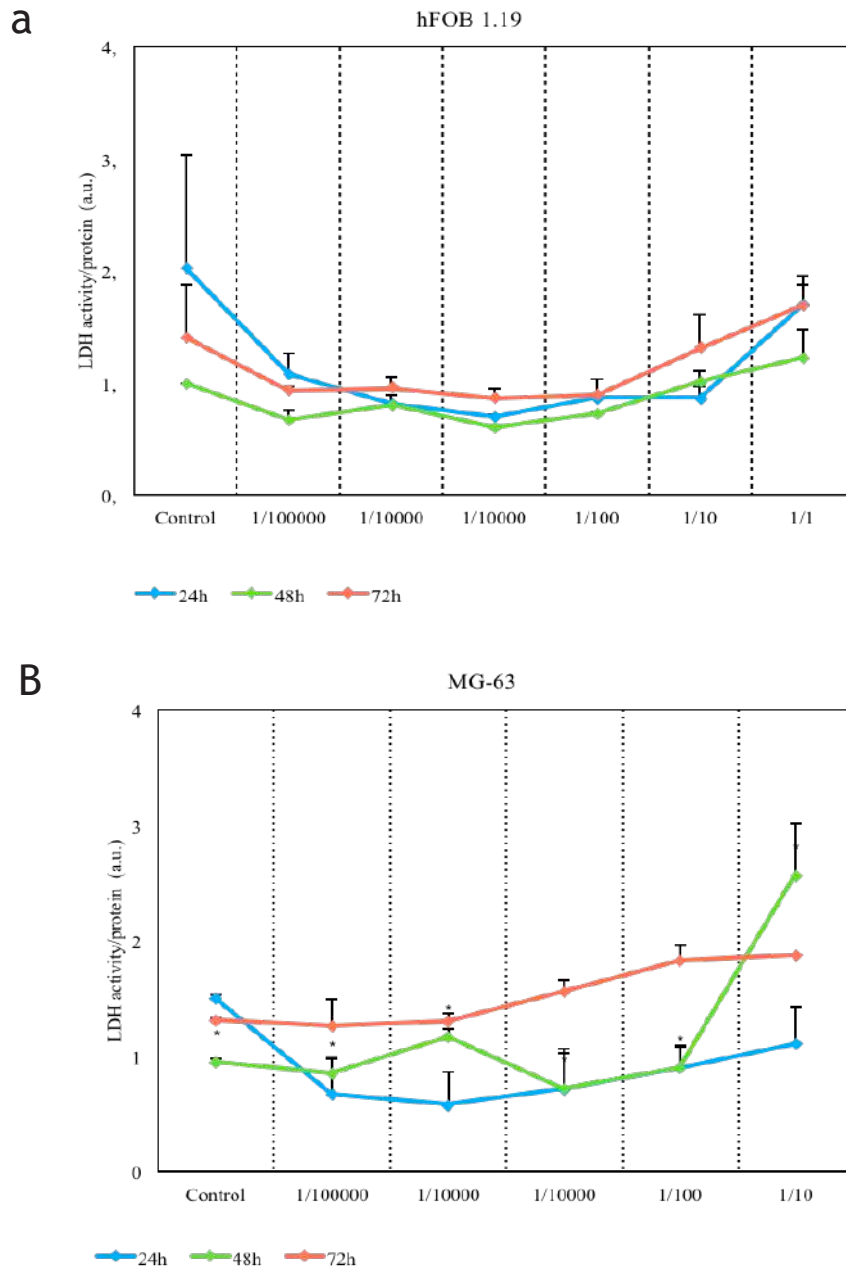
LDH assay showed the cytotoxicity of the *F. carica* extract against MG-63 and HT-29

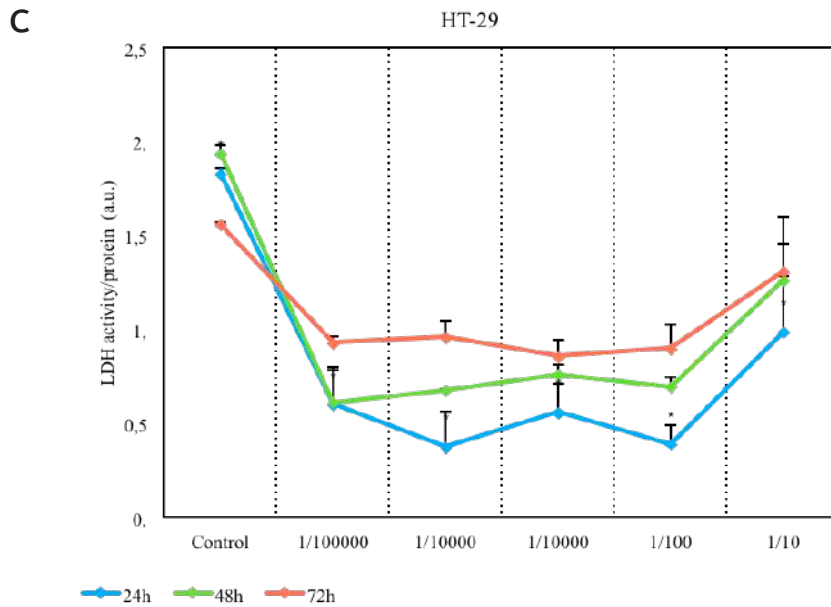
LDH activity was determined using the LDH method and Bradford experiment as the amount of enzyme per unit protein. The extract was applied at the same time points and doses to correlate with the MTT assay

results. LDH / Bradford analysis showed a decrease in LDH activity in cancer cells in a time and dose dependent manner which has a linear correlation with proliferation data. This linear decrease in the amount of LDH supported the MTT experiment results as the number of cells decreased (Figure 4a, 4b and 4c). With

increasing time and dose, LDH activity increased and toxic effect emerged, strengthening the idea that the cell's membrane structures were disrupted and the cell went into death. The results show that *F. carica* has a cytotoxic effect on cancer cell lines and there is

a significant increase in LDH release into the culture medium through loss of membrane integrity during apoptosis. Thus, it was confirmed that *F. carica* was cytotoxic for cancer cells and result of LDH test was agreement with the finding of MTT result.

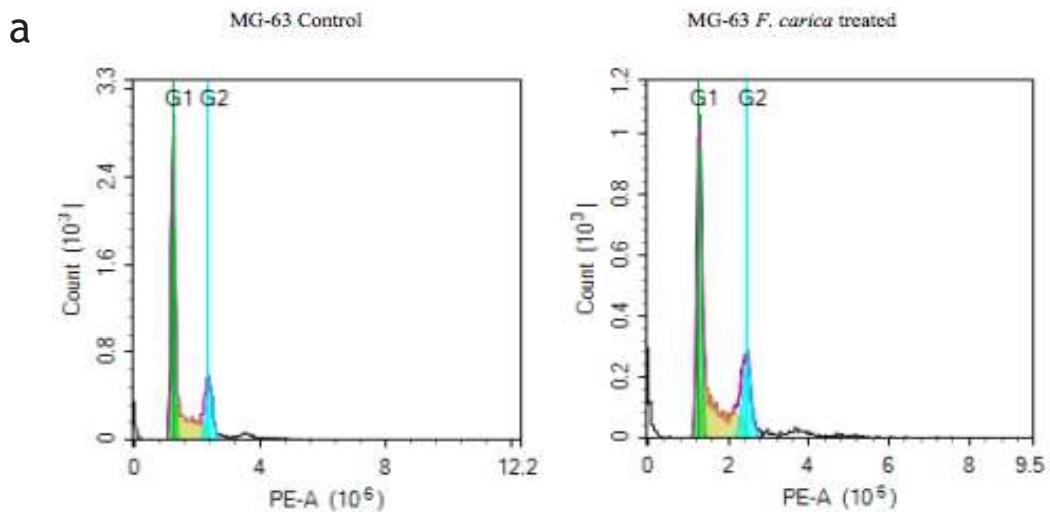


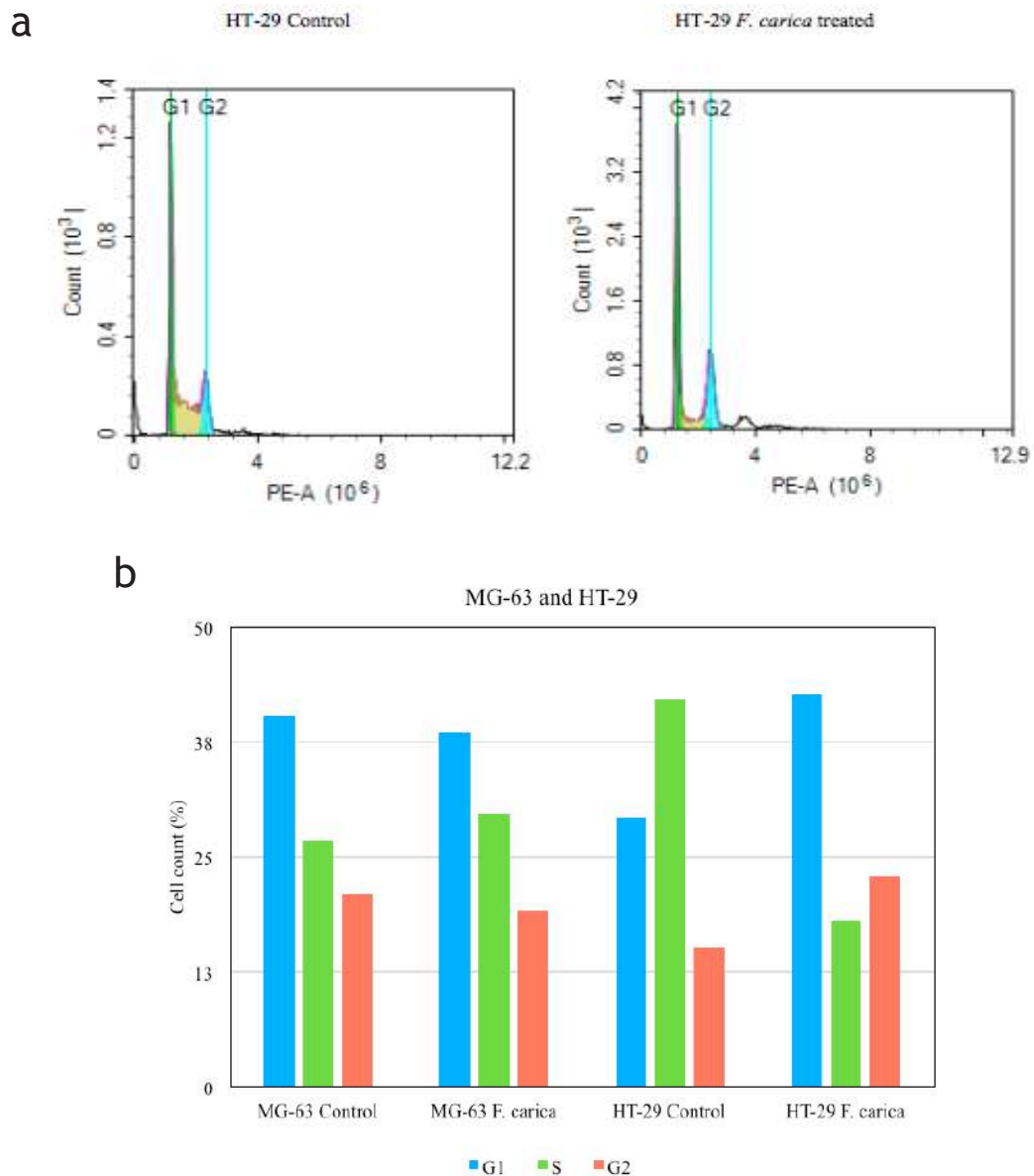


**Figure 4.** LDH assay showed the cytotoxicity of the *F. carica* extract against MG-63 and HT-29. (a) hFOB 1.19, (b) MG-63 and (c) HT-29 cells were treated with extract of *F. carica* at different concentrations over different incubation period. Cytotoxicity analysis of treatment cells evaluated LDH/Bradford assays. The experiments were performed in triplicate and expressed as mean± SD values. \*Their values are different from the control groups (p <0.05).

*F. carica* extract did not arrest the cell cycle of cells  
 To clarify how *F. carica* inhibits the proliferation of cancer cells, the effect of the extract on the cell cycle was examined by flow cytometry method. As shown in Figures 5a and 5b, there was no difference

in percentage of cells at the G2 / M, S, and G0 / G1 stages between the *F. carica* treated and non-treated cells in MG-63. In HT-29, although an arrest in the S phase was detected (p<0.007).





**Figure 5.** (a) Cells were incubated with *F. carica* extract according to  $IC_{50}$  dose and time, stained with propidium iodide, and cell number in different phases of the cell cycle analyzed by flow cytometry. (b) Cell percentages of MG-63 and HT-29 relative to control cell line.

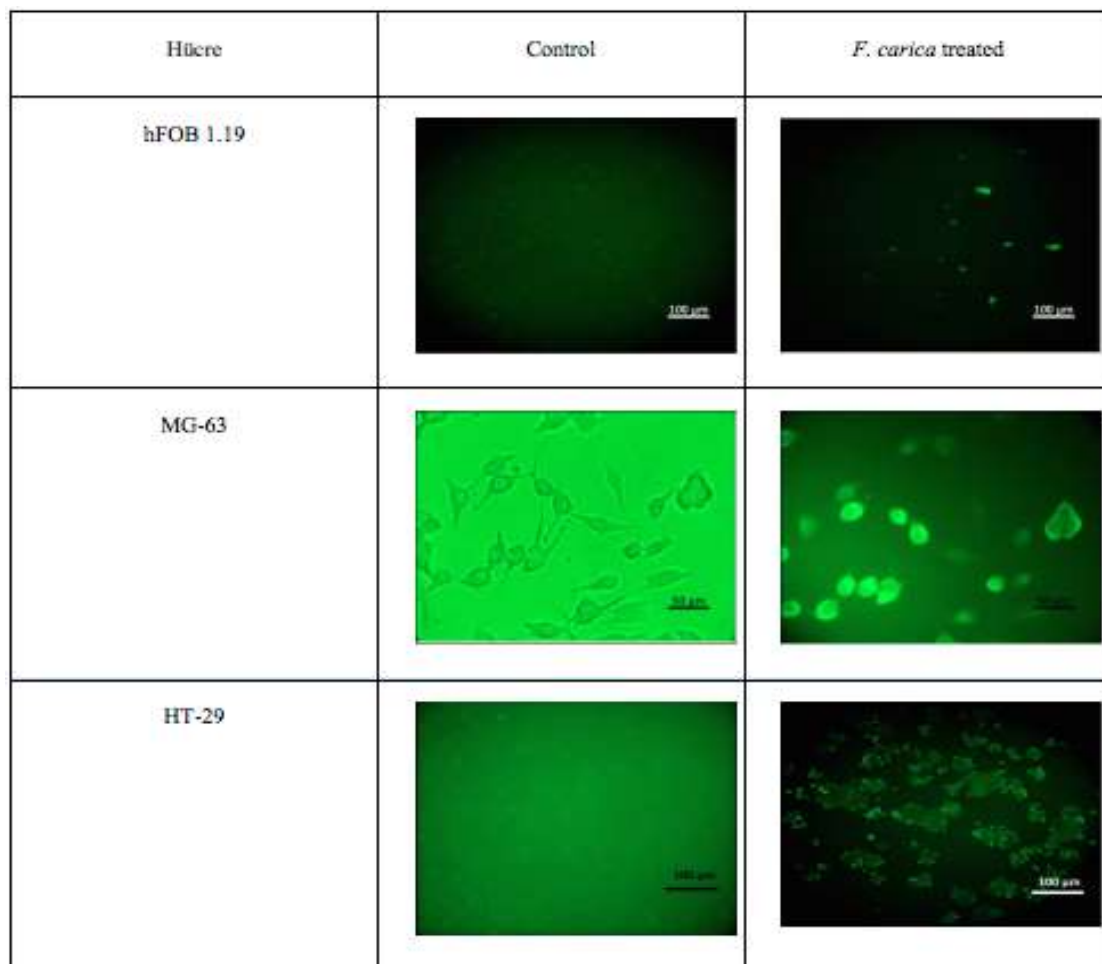
\*Their values are different from the control groups ( $p < 0.05$ ).

*F. carica* extracts induced apoptosis in MG-63 and HT-29 cell lines but in normal hFOB1.19 cells

In order to detect DNA fragmentation and loss of mitochondrial membrane, cells treated with *F. carica*

extract were fluorescence stained by TUNEL assay. Increased fluorescence signal is present in MG-63 and HT-29, but not in hFOB1.19 (Figure 6).





**Figure 6.** Microscopic detection of apoptosis using the TUNEL test in cells untreated and treated with *F. carica* extract.

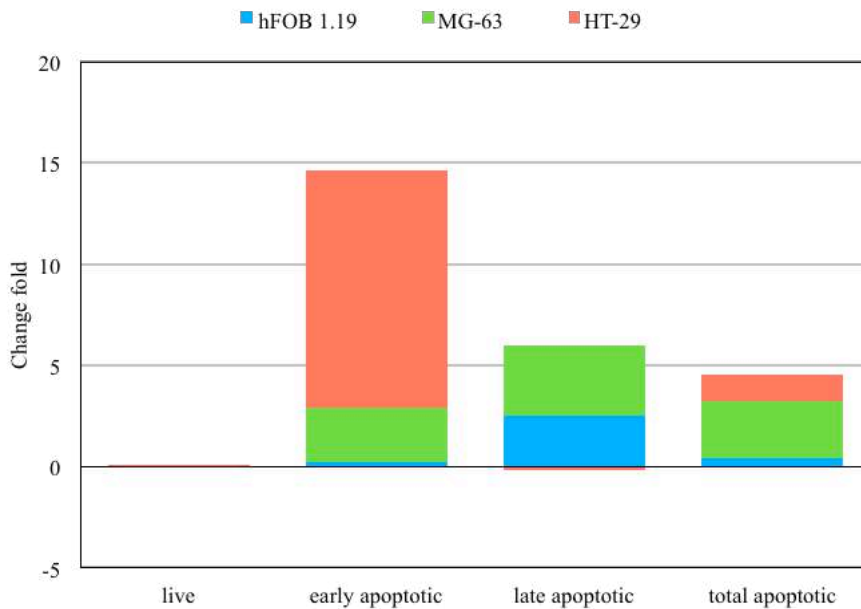
TUNEL assay was performed after *F. carica* was administered according to the  $IC_{50}$  dose and time for hFOB 1.19, MG-63 and HT-29. Cells were seeded on chamber slides at a density of 4000 cells/cm<sup>2</sup>. Excitation wavelength was studied under fluorescence microscopy at 450-500nm and scanning wavelength at 515-565nm. magnificant science cular 10x (hFOB 1.19-HT-29), 20x (MG-63).

The formation of apoptosis was further confirmed using the Annexin-V and Dead Cell Assay

Apoptotic analysis of control and cancer cell lines was carried out by evaluating early stage, total apoptosis and late apoptosis. A significant reduction in cell survival was observed in both MG-63 and HT-29 cancer cell lines. However, the HT-29 cell line was observed to undergo mainly early-stage apoptosis, while late-stage apoptosis was observed in the MG-63 cell line. Interestingly, no significant change was observed in the hFOB 1.1.9 cell population in terms

of dead cell analysis. The effects of *F. carica* extract on the growth of two cancer cell lines are shown in Figure 7.

The dramatic reduction in the number of viable cells in MG-63 and HT-29 cancer cell lines compared to normal cells was determined by the fold change. While a three-fold increase in early and total apoptosis were detected in MG-63 cells, the increase in early and total apoptosis for HT-29 cells is 12 and 1.5 folds, respectively. Mortality rate in MG-63 cell line was 40% higher than control cell lines ( $p < 0.03$ ).



**Figure 7.** Determination of percentage of the apoptotic cells by Muse™ Annexin-V&Dead Cell Kit on the Muse cell analyzer. Annexin-V analysis was performed at a starting density of  $1 \times 10^6$  cells were seeded onto regular plates. After treated with extract of *F. carica* was administered according to the  $IC_{50}$  dose and time for hFOB 1.19, MG-63 and HT-29. The bar graph shows the distribution of viable, early apoptotic, late apoptotic and total apoptotic cells by calculating the fold change of cells treated and untreated with *F. carica*.

The  $IC_{50}$  dose and time interval were determined with MTT assay was accepted as the treatment protocol for the further analyses in the study. According to MTT analysis, the optimal activity of *F. carica* in MG-63 and HT-29 cell lines was determined in 48 h at 1: 100 dilution and 24 h at 1:10 dilution, respectively. In addition, the cell viability did not drop below 50% in the hFOB 1.19 cell line at any dose and time interval, indicating that *F. carica* was not cytotoxic to normal cells.

## DISCUSSION

In cancer treatment, it is a necessity to develop new therapeutic approaches to reduce drug costs, prevent high toxicity, and resistance to multiple drug combinations (14). Although studies have been conducted on the cytotoxic effects of *F. carica* extract on MCF7, HepG2, U2OS, MDA-MB-231 and T98G, U-138MG and U-87MG cell lines, its mechanism of action on cancer cell lines has not yet been fully explained (12, 15-17). Therefore, the anti-cancer potential of *F. carica* extract encouraged us to study its cytotoxic and apoptotic effects on the bone cancer cell line MG-63 and the colon cancer cell line HT-29.

Within the scope of the study, for the characterization of protocathecuic acid, the

first standardization was carried out by HPLC method. According to HPLC analysis, *F. carica* used in this study contained  $8.17063 \times 10^{-1}$  mg/L protocathecuic acid which has been identified as an anti-cancer agent on various cancer cell lines (22). Thus, we think that protocathecuic acid may be partially responsible for the apoptosis inducing property of *F. carica* on MG-63 and HT-29 cells.

To analyze the potential anti-cancer activity of *F. carica* in 2 different cancer cell lines together with healthy cell line, we first evaluated the cytotoxic effect(s) of *F. carica* on MG-63, HT-29 and hFOB 1.19 cell lines using MTT assay. According to MTT analysis, optimal activity of *F. carica* in MG-63 and HT-29 cell lines was determined at 1:100 (33.3 mg/mL) dilution in 48 hours and 1:10 (333 mg/mL) dilution

in 24 hours, respectively. MTT assay showed that the two different cancer cell lines have different time points and dose. There is no study for  $IC_{50}$  level for MG-63 using *F. carica*, so far. There is only one study performed in HT-29, the  $IC_{50}$  level was found 261  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in whole fruit extract (23). On the other hand,  $IC_{50}$  dose in other cell lines which is not subjected to this study using whole *F. carica* extract was determined 13.4 mg/ml in Huh7it (24), 2.42 mg/mL in A549, 0.65 mg/mL in MCF-7, 36.02 mg/mL in HepG2 (25).

In addition, cell viability did not lead to decrease below 50% at any dose and time points in the hFOB 1.19 cell line. Future studies are needed to elucidate whether the difference in  $IC_{50}$  dose among cancer cell lines in previous studies is related to the origin of cell (MG-63 is bone originated, HT-29 is epithelial tissue). In the later stages of the study, *F. carica* was applied to the cells according to the determined  $IC_{50}$  doses and time points. A previous study has shown that the intrinsic cell death pathway by *F. carica* can be triggered as mitochondrial cytochrome C migrates into the cytoplasm (26). This situation has revealed that the necessity of clarifying the mechanism by which cell death pathways are activated.

An earlier study has shown that LDH leakage occurs only when cell death-related reactive oxygen species responsible for mitochondria damage. On the contrary, the MTT assay shows inhibition of cell growth at lower anti-tumor agent concentrations than the LDH assay. That is, the reduction of MTT results in cell death (27). In order to analyze better cytotoxicity in this respect, we measured the LDH activity of the MG-63, HT-29 and hFOB 1.19 cell lines.

The LDH analysis is a test for determining the cytotoxicity of an anticancer agent on cancer cells by measuring the level of lactate dehydrogenase. LDH, a cytoplasmic enzyme found in all cells is a marker for cell membrane damage, apoptosis or necrosis (28). When the cells are exposed to toxic substances, the membrane structure is disrupted and LDH leaks out of the cells. Thus, the activity of intracellular enzymes released as a result of membrane change

can be measured quantitatively with the LDH method (29). Bradford assay is used to measure the amount of released protein. In our study, the amount of enzyme per unit protein was determined. *F. carica* extract was applied at three different time points and in five different doses. Similar results provided as in MTT assay, LDH level was found low due to decreasing living cell numbers. LDH/Bradford ratio in all cells increased in direct proportion with dose and time compared to control cells, even though the increase in hFOB 1.19 relative to cancer cells was very small. The increase in enzyme activity for MG-63 is more aggressive. Since this linear increase in the amount of LDH was in parallel to the MTT result, this strengthened the idea that the cell's membrane structure was disrupted and the cell went into death. So far, there is no published data other than this study on lactate dehydrogenase enzyme activity in *F. carica* anticancer studies. These results showed that *F. carica* has a cytotoxic effect on cancer cell lines.

Insensitivity to growth inhibitors is one of the hallmarks of cancer survival strategy (26). This situation leads to the regulation of the cell cycle in cancer development. Flow cytometry method used for cell cycle analysis provides us quantitative measurement of fluorescence intensity. There is evidence that the *F. carica* inhibits the cell cycle during S phase in breast cancer cell line MDA-MB-231 (17). When MG-63 cells exposed to *F. carica*, there was no change in at any cell cycle stage. However, an arrest was determined in S phase for HT-29 cell line. Although this data strengthens the hypothesis that *F. carica* affects signals that inhibit/control the growth of tumor cells, additional studies are needed to confirm the findings.

Morphological manifestations of apoptosis are membrane blebbing (early stage), cell shrinkage, chromatin condensation and nucleosomal DNA fragmentation (late stage), formation of small vesicles and apoptotic bodies. In particular, the phosphatidylserine flip-flop from the plasma membrane to the outside of the cell is the signal detected by macrophages surrounding apoptotic cells

(18-21). In this study, we applied TUNEL method to observe the release of phosphatidyl-serine from the cell membrane into the cytoplasm and the Annexin V experiment to observe nuclear disintegration.

The TUNEL method has been used extensively over the past two decades to evaluate cell death in tissues. In fact, most dead cells stain positive for TUNEL since most programmed cell deaths cause double strand breaks (30). It has been proven that *F. carica* extract causes DNA fragmentation in the brain tumor cell line GBM (15). Within the scope of our study, TUNEL method was applied to demonstrate DNA fragmentation in control and cancer cell lines to determine whether it would have the same effect or not. As a result of the TUNEL study, fluorescent staining and apoptotic morphology was detected in cancer cell lines with apoptosis, but no staining was observed in control cells. TUNEL positivity is found in apoptotic cells, but contrary to popular belief, TUNEL positivity is not limited to apoptosis, regulated necrosis cells are also TUNEL positive (31). From this point of view, additional methods are required to elucidate the effect of *F. carica* on cell death mechanism for cancer cells.

Therefore, we further confirmed apoptosis using Annexin-V and the Dead Cell Assay. Apoptosis marker, annexin V can bind the membrane phospholipids which are released after the loss of membrane integrity (30). Apoptotic analysis in control and cancer cell lines was performed by evaluating early stage and total apoptosis since they may also show late stage necrotic apoptosis. When compared, we detected that cancer cell lines HT-29 underwent higher apoptosis in the early period, while the cell death ratio in MG-63 was higher in the late stage, raising the question of which death pathways were activated

in the cells. In addition to, these results support the view that *F. carica* induced apoptosis in anti-cancer studies on the liver cancer cell line Huh7it (24).

This study indicated that *F. carica* leads HT-29 and MG-63 cells to apoptosis, with the formation of DNA breaks, reduction of mitochondrial activity, loss of cell membrane and Annexin V release, and causes cytotoxicity and cell cycle arrest. On the other hand, during the process of cell death, multiple mechanisms can be triggered reciprocally to cause several types of cell death to occur simultaneously. While there are multiple signaling pathways that control different types of cell death, these pathways can concurrently be linked, activated, and operated in parallel. Therefore, additional laboratory studies are needed to elucidate the anti-cancer activity of *F. carica*. Also, in the light of previous studies, protocatechuic acid may be partially responsible for the ability of *F. carica* to induce apoptosis in cancer cells. Furthermore, in future studies, providing the data obtained by detailed examination of all components in the *F. carica* extract; we will focus on other prospective candidate molecules.

In conclusion, this study demonstrates the anticancer effects of *F. carica* extract on MG-63 bone and HT-29 colon cancer cell lines. The data showed that while *F. carica* did not have a cytotoxic effect in normal cells, it had a cytotoxic effect in cancer cells, activated cell death pathways, arrested the cell cycle, impaired membrane integrity and caused DNA breaks. As a result, this study demonstrated the anticancer effect of *F. carica* on MG-63 and HT-29 cells and thus could be a potential resource for developing anti-cancer medicine and shed light on future research. More detailed studies are needed on cell death pathways using *F. carica* extract.

## ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Segal Environment Laboratory (Ankara, Turkey) and Mevlana Karakaya at Environment Reference Laboratory (Ankara, Turkey) for supporting us in HPLC analysis. We are indebted to Ms. Yasemin Gurel, Mr. Tamer Kahraman and Mr. Murat Akyurek for their expert technical help.

## FUNDING

The materials and reagents necessary for this research were acquired with the support of Ankara Yildirim Beyazit University (Ankara, Turkey) through the BAP4169 grant

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* This study does not require Ethics Committee Approval.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Barolo MI, Ruiz Mostacero N, López SN. *Ficus carica* L. (Moraceae): an ancient source of food and health. *Food Chem*, 2014;164:119-27.
2. Rubnov S, Kashman Y, Rabinowitz R, Schlesinger M, Mechoulam R. Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: isolation and structure elucidation. *J Nat Prod*, 2001;64(7):993-6.
3. Badgujar SB, Patel VV, Bandivdekar AH, Mahajan RT. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: a review. *Pharm Biol*, 2014;52(11):1487-503.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018;68(6):394-424.
5. Fuchs B, Pritchard DJ. Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*, 2002;(397):40-52.
6. Byers T, Levin B, Rothenberger D, Dodd GD, Smith RA. American Cancer Society guidelines for screening and surveillance for early detection of colorectal polyps and cancer: update 1997. American Cancer Society Detection and Treatment Advisory Group on Colorectal Cancer. *CA Cancer J Clin*, 1997;May-Jun;47(3):154-60.
7. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*, 2013;13(10):714-26.
8. Wang Z, Xu H, He M, Wu H, Zhu Y, Su Z. The association of glutathione S-transferase polymorphisms in patients with osteosarcoma: evidence from a meta-analysis. *Eur J Cancer Care*, (Engl). 2015;24(3):417-24.
9. Palmi G, Marini F, Brandi ML. What Is New in the miRNA World Regarding Osteosarcoma and Chondrosarcoma? *Molecules*, 2017;22(3):417.

10. Rahman N, Dhadi SR, Deshpande A, Ramakrishna W. Rice callus suspension culture inhibits growth of cell lines of multiple cancer types and induces apoptosis in lung cancer cell line. *BMC Complement Altern Med*, 2016;16(1):427.
11. Panda AK, Chakraborty D, Sarkar I, Khan T, Sa G. New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *J Exp Pharmacol*, 2017; 9:31-45.
12. Tezcan G, Tunca B, Bekar A, Yalcin M, Sahin S, Budak F, et al. *Ficus carica* latex prevents invasion through induction of let-7d expression in GBM cell lines. *Cell Mol Neurobiol*, 2015;35(2):175-87.
13. Cecchini MJ, Amiri M, Dick FA. Analysis of cell cycle position in mammalian cells. *J Vis Exp*, 2012;(59):3491.
14. Waziri PM, Abdullah R, Yeap SK, Omar AR, Kassim NK. Clausenidin induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer. *BMC Complement Altern Med*, 2016;16:256.
15. Jing L, Zhang YM, Luo JG, Kong LY. Tirucallane-type triterpenoids from the fruit of *Ficus carica* and their cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull*, 2015;63(3):237-43.
16. Tian J, Zhang Y, Yang X, Rui K, Tang X, Ma J, et al. *Ficus carica* polysaccharides promote the maturation and function of dendritic cells. *Int J Mol Sci*, 2014;15(7):12469-79.
17. Zhang Y, Wan Y, Huo B, Li B, Jin Y, Hu X. Extracts and components of *Ficus carica* leaves suppress survival, cell cycle, and migration of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *Onco Targets Ther*, 2018;11:4377-86.
18. Mohammadinejad R, Moosavi MA, Tavakol S, Vardar DÖ, Hosseini A, Rahmati M, et al. Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. *Autophagy*, 2019;15(1):4-33.
19. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 2018;25(3):486- 541.
20. Chen Q, Kang J, Fu C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduct Target Ther*, 2018;3:18.
21. Ou L, Lin S, Song B, Liu J, Lai R, Shao L. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *Int J Nanomedicine*, 2017;12:6633- 46.
22. Xie Z, Guo Z, Wang Y, Lei J, Yu J. Protocatechuic acid inhibits the growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. *Phytother Res*, 2018;32(11):2256-63.
23. Soltana H, Pinon A, Limami Y, Zaid Y, Khalki L, Zaid N, et al. Antitumoral activity of *Ficus carica* L. on colorectal cancer cell lines. *Cell Mol Biol*, 2019 Jul 31;65(6):6-11.
24. Purnamasari R, Winarni D, Permanasari AA, Agustina E, Hayaza S, Darmanto W. Anticancer activity of methanol extract of *Ficus carica* leaves and fruits against proliferation, apoptosis, and necrosis in huh7it cells. *Cancer Inform*, 2019; 19;18:1176935119842576.
25. Yang-Min M, Xi-Ai L, Hong-Chi Z, Rui L. *J Agric Food Chem*, 2016 64 (19), 3789-90.
26. Waziri PM, Abdullah R, Yeap SK, Omar AR, Kassim Nk, Malami I, et al. Clausenidin induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer. *BMC Complement Altern Med*, 2016;16:256.
27. Ramos-Bueno RP, Romero-González R, González-Fernández MJ, Guil-Guerrero JL. Phytochemical composition and in vitro anti-tumour activities of selected tomato varieties. *J Sci Food Agric*, 2017 Jan;97(2):488-96.
28. Cummings BS, Wills LP, Schnellmann RG. Measurement of cell death in Mammalian cells. *Curr Protoc Pharmacol*, 2012; Chapter 12:Unit12.8.
29. Okur O, Aksoy A. In vitro cytotoxicity tests. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 2017; 6 (1): 112-8.
30. Gules O, Eren U. Methods used in determination of Apoptosis. *YYD. Vet Fac J*, 2008(2):73-8.
31. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol*, 2014;25(12):2689-701.

## Çalışanın sürdürülebilir performansı (ÇSP) ölçeği: Türkçe geçerlik-güvenirlik çalışması

### Employee sustainable performance (ESP) scale: Turkish validity-reliability study

Yasin ÇILHOROZ<sup>1</sup> (ID), Gülsen TOPAKTAŞ<sup>2</sup> (ID), Oğuz IŞIK<sup>3</sup> (ID)

#### ÖZET

**Amaç:** Çalışanın sürdürülebilir performansı, çalışanların yaşamları boyunca çalışır ve üretken olmalarını ifade eden ideal bir durumdur. Hedef, örgütün gelecekteki çalışma ihtiyaçlarının karşılanmasıdır. Bu çalışmada çalışanın sürdürülebilir performansı (ÇSP) ölçeğinin Türkçe'ye uyarlanarak geçerlik ve güvenilirliğinin yapılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmanın verilerine ulaşmak için Ji ve diğerleri tarafından geliştirilen Çalışanın Sürdürülebilir Performansı (ÇSP) Ölçeği kullanılmıştır. Orijinal ölçek 10 ifadeli ve tek faktörlüdür. Çalışmanın geçerlik ve güvenilirlik analizleri için Ankara'daki bir eğitim araştırma hastanesinde çalışan toplam 316 sağlık çalışanı örnekleme dâhil edilmiştir. Kullanılan anket sağlık çalışanlarına yüz yüze uygulanmıştır. Çalışma kapsamında ilk olarak dil geçerliği sağlanmıştır. Ardından, yapı geçerliği için açıklayıcı faktör analizi (AFA) ve doğrulayıcı faktör analizi (DFA) gerçekleştirilmiştir. Son olarak, güvenilirlik analizi için içsel tutarlılık testi yapılmıştır.

**Bulgular:** Gerçekleştirilen analiz sonucunda, İngilizce dilindeki orijinal ölçeğin Türkçe dil geçerliği

#### ABSTRACT

**Objective:** Employee sustainable performance is an ideal state of employees to work and be productive throughout their lives. The goal is to meet the future working needs of the organization. In this study, it was aimed to make its validity and reliability of the Employee Sustainable Performance (ESP) scale by adapting it to Turkish.

**Methods:** The Employee Sustainable Performance (ESP) Scale developed by Ji et al. was used to reach the data of the study. The original scale has 10 items and one factor. For the validity and reliability analyzes of the study, a total of 316 health workers working in a training and research hospital operating in Ankara were included in the sample. The questionnaire used was applied face to face to health workers. Within the scope of the study, first of all, language validity was ensured. Then, exploratory factor analysis (EFA) and confirmatory factor analysis (CFA) were performed for construct validity. Finally, internal consistency test was performed for reliability analysis.

**Results:** As a result of the analysis, the Turkish language validity of the original scale in English was

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Sağlık Yönetimi Bölümü, Ankara

<sup>2</sup>Sağlık Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Eğitim ve Sertifikasyon Daire Başkanlığı, Ankara

<sup>3</sup>Hacettepe Üniversitesi, İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Sağlık Yönetimi Bölümü, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Gülsen TOPAKTAŞ

Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Gen. Müd. Eğitim ve Sertifikasyon Dai. Bşk., Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 27.01.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 15.03.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.00243

Çilhoroz Y, Topaktaş G, Işık O. Çalışanın sürdürülebilir performansı (ÇSP) ölçeği: Türkçe geçerlik-güvenirlik çalışması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(1): 89 - 100

sağlanmıştır. Sonra, AFA gerçekleştirilerek Kaiser-Meyer-Olkin değerinin 0,94 ile normal aralıkta ve Barlett Küresellik Testi anlamlı ( $X^2= 3039,130$ ,  $df = 45$ ,  $p<0,05$ ) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, temel bileşenler analizi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen AFA sonuçlarına göre ÇSP ölçeğinde yer alan toplam 10 ifade tek faktör altında toplanmıştır. Bu tek faktör toplam varyansın %71,81'ini açıklamıştır. Ardından, DFA gerçekleştirilerek uyum indekslerinin tümünün kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu tespit edilmiştir. Böylece ÇSP ölçeğinin geçerli olduğu ortaya konulmuştur. Son olarak, ölçeğin güvenilirliği için Cronbach's Alpha katsayısı 0,956 hesaplanarak ölçeğin yüksek düzeyde güvenilir olduğu bulunmuştur.

**Sonuç:** Örgütlerde sürdürülebilir stratejilerin belirlenmesinde insan kaynakları önemli rol oynamaktadır. Sürdürülebilir performansın gerçekleştirilmesinin çalışanların kalite ve motivasyonunu artırmada önemli bir etken olacağı söylenebilir. Bu bağlamda, geçerli ve güvenilir bulunan ÇSP ölçeği kullanılarak çalışanların sürdürülebilir performansı uygun şekilde ölçülüp yönetilebilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Çalışan, sürdürülebilirlik, performans, çalışanın sürdürülebilir performansı

ensured. Afterwards, Then, EFA was performed and the Kaiser-Meyer-Olkin value was found to be within the normal range with 0.94 and the Barlett Test of Sphericity was significant ( $X^2= 3039.130$ ,  $df = 45$ ,  $p<0.05$ ). In addition, according to the results of EFA performed using principal component analysis method, a total of 10 expressions in the ESP scale were grouped under a single factor. This single factor explains 71.81% of the total variance. Then, CFA was performed and it was determined that all of the fit indices were within acceptable limits. Thus, it has been demonstrated that the ESP scale is valid. Finally, Cronbach's alpha coefficient was calculated as 0.956 for the reliability of the scale, and the scale was found to be highly reliable.

**Conclusion:** Human resources play an important role in determining sustainable strategies in organizations. It can be said that the realization of sustainable performance will be an important factor in increasing the quality and motivation of the employees. In this context, the sustainable performance of the employees will be measured and managed appropriately by using the valid and reliable ESP scale.

**Key Words:** Employee, sustainability, performance, employee sustainable performance

## GİRİŞ

İş performansına ilişkin araştırmaların pazarlama (1), yönetim (2) ve psikoloji (3) alanlarında zengin bir geçmişi vardır. Zablah ve ark. (4); iş performansını, iş rolüyle ilgili beklentiler göz önüne alındığında, bir çalışanın örgütsel etkinliğe ne ölçüde katkıda bulunduğu olarak tanımlamaktadır.

İlk defa Katz ve Kahn (5), iş performansını görev performansı ve bağlamsal performans olarak iki gruba ayırmıştır. Bunu takiben, iş performansının çeşitli

boyutlarıyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Görev performansı, organizasyonun işleyişine katkıda bulunan faaliyetlerin etkinliği olarak tanımlanmaktadır. Görev performansından farklı olarak, iş performansının önemli bir unsuru olan ve ilişkisel performans olarak da adlandırılan bağlamsal performans ise, görev faaliyetleri ve süreçleri için katalizör görevi gören sosyal ve kültürel bağlamları şekillendirerek örgütsel etkinliğe katkıda bulunmak olarak ifade edilmektedir (6). İş performansı, insan kaynakları yönetiminde nihai kriter olarak



kabul edilmektedir. Bu bakımdan iş performansının değerlendirilmesi ve analizi, personel seçimi, ücret ve ödüller veya eğitim gibi farklı örgütsel süreçler için hayati öneme sahiptir (7).

Örgütsel süreçlerde, özellikle proje yönetiminde, çalışanın iş performansı ile bağlantılı olarak sürdürülebilirliğe odaklanma eğilimi göz önünde bulundurulduğunda çalışanın sürdürülebilir performansı kavramı ortaya atılmıştır. Çalışanın sürdürülebilir performansı, bir çalışanın hem kendi hem de organizasyonunun sürdürülebilir gelişimine katkısını ifade etmektedir (6).

Sürdürülebilir performansın oluşturulması hem çalışanların hem de çalıştıkları kuruluşların sürdürülebilirliğini sağlamanın önemli bir yolu olduğu düşünülmektedir. Unilever, Huawei, Lenovo gibi birçok tanınmış işletme uzun vadeli hedeflere ulaşmak için çalışan performansını ve stratejilerini iyileştirme çabalarına “sürdürülebilirliği” entegre etmektedir. Bu nedenle, sürdürülebilir performans, uygulama alanında büyük ölçüde desteklenmektedir (8).

“Çalışan” ve “Sürdürülebilir performans” anahtar kelimeleri kullanılarak Türkçe literatür incelendiğinde; kurumsal anlamda sürdürülebilir performans konusunun incelenmesine rağmen (9-11), çalışanın sürdürülebilir performansı konusunun işlendiği çalışmalara rastlanılmamıştır (12,13). Bu bağlamda, bu çalışmada Çalışanın Sürdürülebilir Performansı (ÇSP) ölçeğinin Türkçe’ye uyarlanarak geçerlik-güvenirliliğinin yapılması amaçlanmıştır.

## KAVRAMSAL ÇERÇEVE

Sürdürülebilir kalkınma kavramına atıfta bulunularak açıklanan “sürdürülebilirlik” kavramı konusunda en yaygın kullanılan tanım Dünya Çevre ve Kalkınma Örgütü (World Commission on Environment and Development) tarafından 1987 yılında yapılmıştır. Buna göre; “sürdürülebilir kalkınma, gelecek nesillerin kendi ihtiyaçlarını karşılama yeteneğinden ödün vermeden bugünün ihtiyaçlarını karşılayan kalkınma” şeklinde ifade edilmektedir (14). Sürdürülebilirlik, sistemlerin ve süreçlerin gelişme, büyüme, bakım

ve dayanma kapasitesine atıfta bulunan ekolojiden türetilen bir kavramdır (15). Sürdürülebilirlik, doğal kaynakları verimli bir şekilde koruma, kullanma ve geri dönüştürme çabası olarak da tanımlanabilir (16). Günümüzün sürdürülebilirlik anlayışı ise, orijinal dar kapsamının çok ötesine geçmiş ve özellikle örgütsel yönetim alanında olmak üzere birçok disiplinin ve araştırma alanının içine girmiştir (8). Dolayısıyla, sürdürülebilirlik örgütlere uzun vadeli büyüme ve gelişme fırsatları, finansal uygulanabilirlik ve rekabet avantajları sağladığı için örgütlerin başlıca ilgi alanı haline gelmeye başlamıştır (17,18). Bununla birlikte, tüm paydaşların geniş bir fikir birliği ve ortak çabalarını gerektirdiğinden, sürdürülebilir iş operasyonlarını geliştirmek ve sürdürmek zorlu bir hedef olabilir (19).

Performans kavramı, herhangi bir işin/görevin gereği olarak daha önceden belirlenen standartlara uyan davranışların sergilenmesi ve hedeflere ulaşma derecesi olarak tanımlanabilmektedir (20). Örgütlerin sürdürülebilirlik, rekabet avantajı vb. üstünlük sağlayabilmeleri için örgütsel hedeflerine ulaşmaları gerekmektedir. Dolayısıyla, hedeflere ulaşma sürecinde yüksek performans ortaya koyan çalışanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışanlar yüksek performans göstererek kendisinden beklenenleri gerektiği gibi yerine getirip, başarılı olacaklar; bu sayede daha iyi bir kariyer, daha yüksek gelir seviyesi vb. sonuçlara ulaşabileceklerdir (21).

Son 20 yılda, uzun vadede hem örgütlerin hem de çalışanların performansını artırmak için sürdürülebilirliği oluşturmaya yönelik artan bir ilgi bulunmaktadır. “Sürdürülebilirlik” ve “performans” artık yaygın olarak kullanılan terimler haline gelmiştir. Ancak akademik literatürde bu iki konu nadiren birlikte incelenmektedir (8). Ayrıca, daha önce yapılan çalışmalar; belirli bir örgüt için sürdürülebilirliğin ne anlama geldiğini ve bir örgütün genel performansının sürdürülebilirliğini geliştirmek için mevcut programların ve girişimlerin nasıl kullanılabileceğini belirlemek amacıyla kavramsal bir değerlendirme çerçevesi oluşturmuştur (22). Ancak, bireysel düzeyde, yani çalıştıkları kuruluşlardan

ziyade çalışanlar için sürdürülebilir performansın değeri genellikle göz ardı edilmekte ve hatta ihmal edilmektedir (6).

Zamanla popüler hale gelen bir konu olan çalışanın sürdürülebilir performansı; sürdürülebilir görev performansı ve ilişki sürdürülebilir performansı olarak ikiye ayrılmaktadır. Sürdürülebilir görev performansı, çalışanların görevlerini yerine getirerek kendi sürdürülebilir gelişimlerini ne ölçüde başardıklarını ifade etmektedir. İlişkisel sürdürülebilir performans ise, çalışanların örgüt kültürünü teşvik etmede organizasyonların sürdürülebilir gelişimine ne ölçüde katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır (6).

Çalışanın sürdürülebilir performansı hakkında sınırlı sayıda uygulamalı ve ampirik araştırma bulunmaktadır. Uygulama literatüründe sürdürülebilir performans, çoğunlukla bir çalışanın hem şimdiki hem de gelecekteki ideal çalışma durumunu tanımlamak için kullanılmıştır. Bunun dışında, bazı insan kaynakları yönetimi eğitmenleri Dünya Çevre ve Kalkınma Örgütü tanımından yola çıkarak sürdürülebilir kalkınma tanımını sürdürülebilir çalışan performansını içerecek şekilde genişletmişlerdir. Yani, “gelecekteki çalışma ihtiyaçlarını karşılamak için gelecekteki performanstan ödün vermeden performansın mevcut çalışma ihtiyaçlarını karşılayabileceği ideal bir çalışma durumu” olarak ifade edilmiştir (14).

Sürdürülebilir performans konusundaki gözlemsel araştırmalar göz önüne alındığında, şimdiye kadar bu alanda çok az teori ve model geliştirilmiştir (16). Bunlardan ilki, Spreitzer ve ark. (23) ile Porath ve ark. (24) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda ortaya koyulmuştur. Bu çalışmalarda, işyerinde gelişmeye odaklanırken, çalışanın işyerinde sürdürülebilir performansına benzer bir kavram ortaya koyulmuştur. Gelişmek (thriving at work), öğrenme (yüksek performansla yol açması muhtemel olan) ve enerjilik içeren olumlu bir psikolojik durum olarak tanımlanmaktadır. Gelişen insanların akranlarından daha iyi genel performans ve çok daha az tükenmişlik sergilediklerini gösteren kanıtlarla birlikte, gelişme kavramı çalışanların sürdürülebilir performansını

tanımlamada önemli bir rol oynamaktadır. Gelişen çalışanların örgüte daha bağlı ve işlerinden daha memnun oldukları, daha az devamsızlık yaptıkları ve daha az sağlık hizmeti kullandıkları belirtilmektedir. Bu da sağlık hizmetlerinde tasarruf ve örgüt için daha az zaman kaybı anlamına gelmektedir (24,25). Ayrıca, sürdürülebilir performans konusunda yüksek puanlara sahip çalışanlar, yalnızca daha yüksek bir refah düzeyine sahip olmakla ve akranlarından daha üretken olmakla kalmaz, aynı zamanda kuruluşlar ve kendileri için ortak, sürdürülebilir bir gelecek yaratmaya da katılmaktadırlar. Onlar sprinter değil maraton koşucusudur (25).

Diğer teori ise iş yerinde canlılık (vitality at work) kavramına dayanmaktadır. Bazı araştırmacılar, çalışan canlılığının çalışanın sürdürülebilir performansının çok önemli bir yönü olduğunu öne sürmektedirler (16,26,27). Dorenbosch'un (26), çalışanın sürdürülebilir performansı kavramının bir boyutu olarak çalışan canlılığının altında yatan varsayımlardan bazılarını test etmek için yaptığı bir çalışmada, kavramı kaynakların korunması (conservation of resources) teorisine dayandırarak zaman içinde çalışanın sürdürülebilir performansının zaman kısıtlamaları, enerji kısıtlamaları ve yeterlilik kısıtlamaları nedeniyle zarar görebileceğini belirtmiştir. Dolayısıyla çalışanların, kendilerine yüksek kaynak seviyeleri sunan durumlarda daha yüksek seviyelerde sürdürülebilir iş performansı sergilemeleri söz konusu olacaktır.

Farklı teori ve modeller yoluyla açıklanan çalışanların sürdürülebilir performansı işletmeler tarafından titizlikle incelenmesi gereken bir yönetsel araçtır. İşletmeler tarafından sürdürülebilir stratejilerin belirlenmesi, değer yaratma süreçlerinde insan kaynaklarının oynadığı rolün önemini artırarak, farklı örgütsel işlevlerin dâhil edilmesini gerektirmektedir. Bu doğrultuda, sürdürülebilir performansın gerçekleştirilmesinin çalışanların kalite ve motivasyonunu artırmada temel bir unsur olduğu vurgulanmaktadır (28).

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Ji ve diğerleri (8) tarafından geliştirilen Employee Sustainable Performance [(Çalışanın Sürdürülebilir Performansı (ÇSP)] ölçeğinin Türkçe'ye uyarlanarak geçerlik-güvenirliliğinin yapılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın evrenini Ankara'daki bir eğitim ve araştırma hastanesinde çalışan 1644 sağlık personeli oluşturmaktadır. Tüm personele ulaşmanın zorluğunun yanı sıra zaman ve maliyet göz önünde bulundurularak örneklem seçilmesine karar verilmiştir. Araştırmanın örnekleme basit rastgele örnekleme yöntemiyle seçilmiştir. Bu yöntemde evrendeki her birimin örnekleme seçilme olasılığı eşittir (29).

Örneklem büyüklüğünün belirlenmesinde evreni bilinen örneklem büyüklüğü yöntemi kullanılmıştır. Buna yönelik formül ve açıklamalar aşağıda sunulmuştur.

$$Nt^2pq$$

$$n = \frac{Nt^2pq}{d^2(N-1) + t^2pq}$$

$$d^2(N-1) + t^2pq$$

**N= Evrendeki birey sayısı**

**n= Örnekleme alınacak birey sayısı**

**p= İncelenen olayın görülüş sıklığı (olasılığı)**

**q= İncelenen olayın görülmeyiş sıklığı (1-p)**

**t= Belirli serbestlik derecesi ve yanılma düzeyinde t tablosundaki teorik değer**

**d= Olayın görülüş sıklığına göre yapılmak istenen ± sapma**

Buna göre, örneklem büyüklüğü %95 güven düzeyinde ( $\alpha = 0,05$ ) 312 olarak belirlenmiştir. Ancak, dağıtılan anketlerin geri dönüş oranının düşük olma ihtimali göz önüne alınarak örneklem sayısının %10 fazlası olan 344 anket sağlık çalışanlarına dağıtılmıştır.

Dağıtılan anketlerden 316'sı geri toplanmıştır. Dolayısıyla anketlerin geri dönüş oranı %91,86 olarak gerçekleşmiştir.

Bu çalışmada, Çalışanın Sürdürülebilir Performansı Ölçeği (ÇSP)'nin Türkçe'ye uyarlanarak geçerlik ve güvenirliliğinin yapılması için Ji ve ark. (8) tarafından geliştirilen ve geçerli ve güvenilir bulunan Employee Sustainable Performance (E-SuPer) ölçeğinin yer aldığı 25 soruluk bir anket formu kullanılmıştır. Anket formu iki bölümden oluşmaktadır. 1. Bölüm çalışanlara ait sosyo-demografik özelliklerin (15 soru) yer aldığı sorulardan; 2. Bölüm ÇSP ölçeğine ilişkin sorulardan (10 soru) oluşmaktadır.

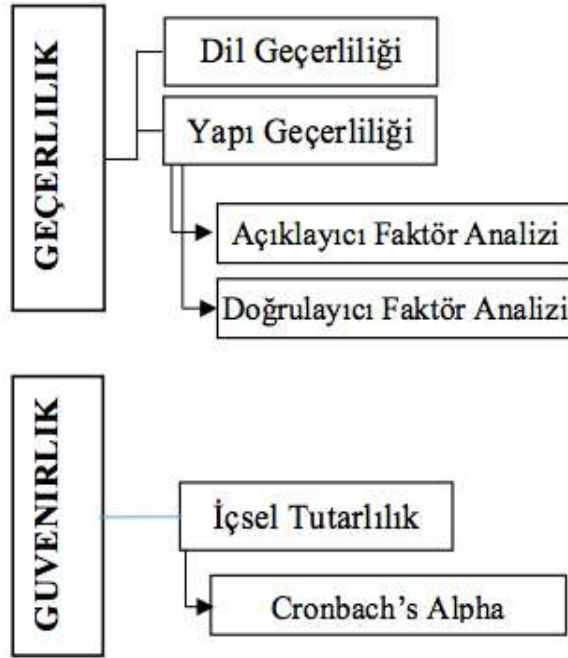
ÇSP orijinal ölçeği, 10 maddeden oluşup beşli likert tipinde hazırlanmıştır. Ölçek maddeleri 1=kesinlikle katılmıyorum, 2= katılmıyorum, 3= kararsızım, 4= katılıyorum ve 5= kesinlikle katılıyorum şeklinde belirlenmiştir. Ölçeğe geçerlik için dil geçerliği, açıklayıcı ve doğrulayıcı faktör analizleri uygulanmıştır. Güvenirlik için Cronbach's Alpha değerine bakılmıştır. Orijinal ölçeğe ilişkin geçerlik-güvenirlik analizi sonuçları bulgular bölümünde bu çalışmanın sonuçlarıyla birlikte sunulmuştur.

Anket formu çalışmaya katılmayı kabul eden sağlık çalışanlarına yüzü yüze uygulanmıştır.

Çalışma kapsamında araştırma amacına uygun olarak geçerlilik ve güvenirlilik analizleri yapılmıştır. Geçerlilik analizi kapsamında sırasıyla dil geçerliliği sonrasında açıklayıcı faktör analizi (AFA) ve doğrulayıcı faktör analizi (DFA) kullanılarak yapı geçerliliği test edilmiştir. Ölçeğin güvenirliliğini test etmek için ise Cronbach's Alpha değeri hesaplanmıştır. Ölçeğin geçerlilik ve güvenirlilik analizine ilişkin oluşturulan model Şekil 1'de sunulmuştur.

Verilerin analizinde SPSS 22.0 ve SPSS Amos 22.0 istatistiksel paket programlarından yararlanılmıştır.

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Etik Komisyonu izni ile yapılmıştır (Tarih: 21.12.2022 ve Karar No: E-35853172-050.06-00002580432).



Şekil 1. Ölçeğe İlişkin Analiz Modeli

## BULGULAR

### Tanımlayıcı Bulgular

Araştırmaya katılan sağlık çalışanlarının büyük çoğunluğunun (%70,6) kadın, %65,8'inin evli ve %35,1'inin 22-30 yaş aralığında olduğu bulunmuştur. Ayrıca %53,2'sinin lisans mezunu olduğu görülen katılımcıların %83,5'inin orta gelir grubunda olduğu bulunmuştur. %56,3'ünü hemşire/ebe grubunun oluşturduğu katılımcıların %19,6'sı sağlık teknisyen/teknikeri ve %17,7'sini hekimler oluşturmaktadır. Katılımcıların %74,4'ünün mesleğini isteyerek seçtiği, yarısına yakınının (%44,0) mesleğinin kendisine kısmen uygun olduğu ve %63,6'sına mesleğinin kişisel gelişimine katkı sağladığı görüşünde olduğu bulunmuştur.

### Geçerlik Analizine İlişkin Bulgular

#### Dil Geçerliliği

Dil geçerliliğini sağlamak adına ölçeğin İngilizce dilindeki orijinali, İngilizce konusunda yetkin 3 (üç)

akademisyen tarafından birbirinden bağımsız olarak Türkçeye çevrilmiştir. Ardından, alanında uzman bir öğretim üyesinin fikirleri dikkate alınarak ölçekte yer alan her bir maddeyi en iyi açıklayan ifadeler belirlenmiş ve Türkçe dilindeki ankete ulaşılmıştır. Daha sonra, Türkçeye çevrilen bu anket profesyonel yeminli bir tercüman tarafından tekrar İngilizceye çevrilmiş (back translation) ve sonra İngilizce orijinali ile karşılaştırılmıştır. İfadeler birbirine oldukça benzer bulunmuştur. Bu sayede ölçeğe son hali verilmiştir.

#### Yapı Geçerliliği

Yapı geçerliliği (construct validity), doğrudan ölçülemeyen bir özelliği ölçen bir ölçeğin bu özelliği ölçme derecesi olarak ifade edilmektedir. Yapı geçerliliğini belirlemek için kullanılan farklı yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan ilki, grup farklılıklarından yararlanmaktır. Bu gruplar, geçerliliği ölçülecek ölçek açısından aralarında fark olacağı düşünülen gruplardır. Diğer yöntem, ilgili ölçek ile aynı yapıyı ölçmeyi amaçlayan dış bir ölçeğin korelasyonları

hesaplanarak uygulanmaktadır. Sonucusu ise, literatürde yapı geçerliğini test etmek için sıkça kullanılan faktör analizidir. Faktör analizi sonucunda, ilgili yapıdaki yüksek ilişkili maddelerin aynı faktör altında toplanması beklenmektedir (30).

Çalışma kapsamında yapı geçerliğini test etmek için ilk olarak AFA gerçekleştirilmiştir. AFA, bir veri setinde bulunan değişkenlerin ilişkileri kullanılarak daha az sayıda faktör oluşturmayı amaçlayan bir yöntemdir (31). AFA uygulayabilmek veri sayısının ölçekteki madde sayısının en az beş katı olması gerekmektedir (32). ÇSP ölçeğinin madde sayısının 10 ve ulaşılan veri sayısının ise 312 olması bu şartın sağlandığını göstermiştir.

AFA yapılabilmesi için bir diğer koşul ise

Kaiser-Meyer-Olkin örneklem yeterlik ölçümünün kabul edilebilir sınırlar ( $>0,50$ ) içinde olması ve Barlett Küresellik Testinin anlamlı ( $p<0,05$ ) olması gerekmektedir (33).

Tablo 1’de görüldüğü üzere, Kaiser-Meyer-Olkin değeri 0,94 ile normal aralıkta ve Barlett Küresellik Testi anlamlı görülmüştür. ( $X^2= 3039,130$ ,  $df = 45$ ,  $p<0,05$ ). Ayrıca, temel bileşenler analizi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen AFA sonuçlarına göre, ÇSP ölçeğinde yer alan toplam 10 ifade tek faktör altında toplanmıştır. Bu tek faktör toplam varyansın %71,81’ini açıklamıştır. ÇSP ölçeğinin ifadelerine ilişkin faktör yükleri 0,722 ile 0,895 arasında değişmiştir (Tablo 1). Faktör yüklerinin 0,30 ve üzerinde olması yeterli kabul edilmiştir (34).

**Tablo 1.** ÇSP ölçeği açıklayıcı faktör analizi sonuçları

No	İfadeler	Faktör Yükleri
M1	Tüm kariyerim boyunca, işimin hedeflerine sürekli olarak ulaşacağım.	0,757
M2	Tüm kariyerim boyunca, iş performansına yönelik gerekli kriterleri daima karşılayacağım.	0,879
M3	Tüm kariyerim boyunca, işimle ilgili tüm görevlerde sürekli olarak uzmanlık sergileyeceğim.	0,831
M4	Tüm kariyerim boyunca, görevlerimi benden beklendiği gibi yerine getirerek işimin tümünde sürekli olarak iyi performans göstereceğim.	0,881
M5	Tüm kariyerim boyunca, işimin tüm gereklerini sürekli olarak yerine getireceğim.	0,875
M6	Tüm kariyerim boyunca, işimin tüm alanlarında daima yetkin olacağım.	0,885
M7	Tüm kariyerim boyunca, çoğu durumda daima verilenden daha fazla sorumluluğu yöneteceğim.	0,722
M8	Tüm kariyerim boyunca, işimin hedeflerine ulaşmak için sürdürülebilir bir şekilde işimi iyi organize edip planlayacağım.	0,895
M9	Tüm kariyerim boyunca, işimin son teslim tarihlerini geçirmemek için sürdürülebilir bir şekilde işimi iyi organize edip planlayacağım.	0,878
M10	Tüm kariyerim boyunca, işime daima uygun olacağım.	0,853
<b>Kaiser-Meyer-Olkin</b>		<b>0,942</b>
<b>Barlett Küresellik Testi Ki Kare</b>		<b>3039,13</b>
<b>df</b>		<b>45</b>
<b>p</b>		<b>0,001</b>
<b>Açıklanan Varyans</b>		<b>71,808</b>

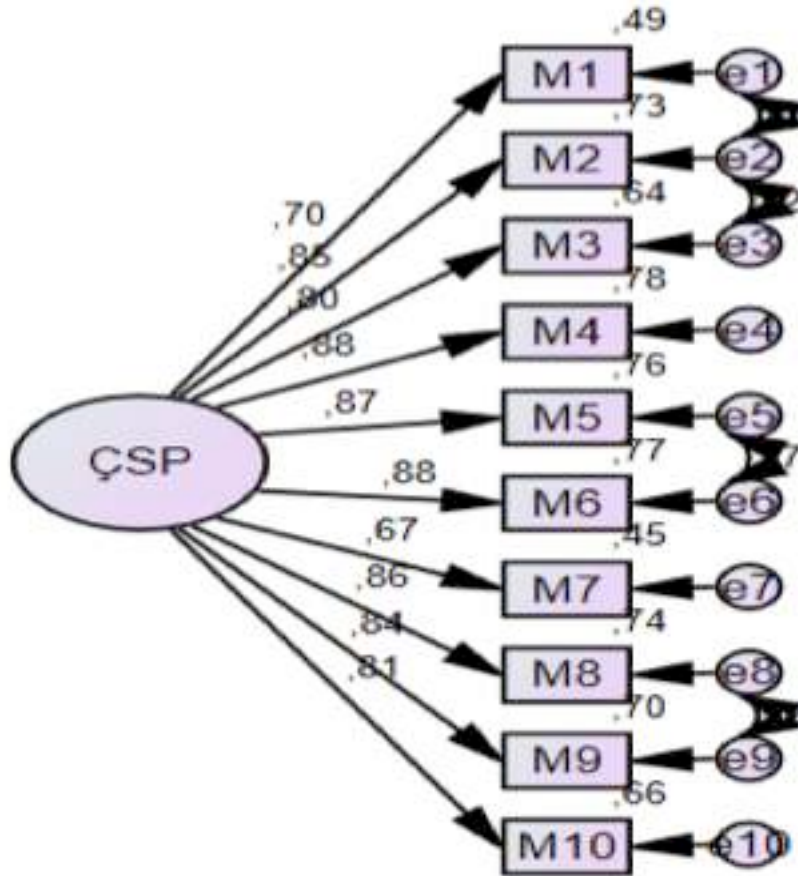
ÇSP ölçeği orijinal ölçek olan Ji ve ark. (8) tarafından yapılan çalışmayla uyumlu olduğu görülmüştür. Orijinal ölçeğin açıklayıcı faktör analizi (AFA) kapsamında 10 maddesinin faktör yapısı, hem Bartlett küresellik testi ( $X^2 = 1126,27$ ,  $p < 0,001$ ) hem de KMO testi (0,90) ile analiz edilerek korelasyon matrisinin faktörlenebilir olduğu ( $>0,60$ ) belirlenmiştir. Maddeler toplam varyansın %58,10'unu açıklamıştır. Faktör yükleri ise, 0,60 ile 0,85 arasında değişmektedir.

ÇSP ölçeğinin yapı geçerliğini test etmek için ikinci aşamada DFA gerçekleştirilmiştir. DFA, AFA sonucunda belirlenen faktörlerin, önceden belirlenen faktör yapılarına uygunluğunu test etmek için gerçekleştirilen bir faktör analizi türüdür (31).

Analiz sonucunda oluşan ilk yapısal eşitlik modelinde RMSEA indeksi kabul edilebilir sınırların dışında kaldığı için modele değişim endeksleri (modification indices) uygulanmıştır. Şekil 2'de sunulan model değişim uygulanan versiyonu gösterilmiştir.

Şekil 2 ve Tablo 2 incelendiğinde, tek faktörlü ÇSP ölçeğinin iyi seviyede uyum gösterdiği bulunmuştur. Orijinal ölçeğin doğrulayıcı faktör analizi (DFA) sonuçları ise,  $X^2 = 77,35$ ,  $df = 34$ ,  $p < 0,001$ ;  $X^2/df = 2,28$ ; RMSEA= 0,09 (90% CI = 0,06-0,12); NNFI = 0,90; CFI = 0,93; AGFI = 0,86. şeklinde belirlenmiştir.

Dolayısıyla, AFA ve DFA birlikte değerlendirildiğinde ÇSP ölçeğinin geçerli olduğu ifade edilebilir.



Şekil 2. ÇSP Ölçeği Doğrulayıcı Faktör Analizi Sonuçları

Tablo 2. ÇSP ölçeği doğrulayıcı faktör analizi uyum indeksleri

Uyum İndeksleri	İndeks Değerleri	Kabul Edilebilir Değerler <sup>(35-37)</sup>
$\chi^2/Sd$	2,67	$\leq 5$
p	0,000	<0,05
RMSEA	0,073	0,05-0,08
GFI	0,957	>0,90
AGFI	0,913	>0,90
CFI	0,985	>0,90
TLI	0,975	>0,90
RMR	0,020	<0,08
IFI	0,985	>0,90

### Güvenirlilik Analizi Sonuçları

İçsel tutarlılık güvenirliliğini test etmek için Spearman-Brown katsayısı, Kuder-Richardson 20 ve 21 katsayıları, korelasyon katsayıları, faktör analizi ve en sık olarak Cronbach Alpha katsayısı kullanılmaktadır (30). ÇSP ölçeğinin güvenirliliğini test etmek için Cronbach's Alpha katsayısı kullanılmıştır. Yapılan analizi sonucunda 10 ifadeli ve tek faktörlü ÇSP ölçeğinin Cronbach's Alpha güvenirlilik katsayısı (r) 0,956 olarak hesaplanmıştır. Orijinal ölçeğin Cronbach's Alpha katsayısının ise 0,90 olduğu belirlenmiştir. Cronbach's Alpha katsayısının en az 0,70 olması gerektiği (30) dikkate alındığında, ÇSP ölçeğinin oldukça güvenilir olduğu belirtilebilir.

### TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacına uygun olarak ilk aşamada orijinali İngilizce dilinde olan ölçek Türkçe diline uygun hale getirilmiştir. İkinci aşamada, ÇSP ölçeğinin yapı geçerliği test edilmiştir. Bu anlamda ilk olarak ölçeğe SPSS 22.0 programı kullanılarak AFA uygulanmıştır. Analiz sonucunda ÇSP ölçeğinin orijinal ölçek gibi 10 ifadeli ve tek faktör altında toplandığı belirlenmiştir. Yapı geçerliğinin ikinci adımında ÇSP

ölçeğine DFA uygulanmıştır. DFA'da yer alan uyum indeks değerlerinin tümünün kabul edilebilir sınırlar içinde yer aldığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, ÇSP ölçeğinin hem dil hem de yapı olarak geçerliğinin olduğu ifade edilebilir.

ÇSP ölçeğinin geçerlik analizi sonrasında ölçeğe güvenirlilik testi uygulanmıştır. Bu bağlamda, Cronbach's Alpha katsayısı kullanılmıştır. Analiz sonucunda, 10 ifadeli ve tek faktörlü ölçeğin yüksek düzeyde güvenilir olduğu görülmüştür.

Gerçekleştirilen geçerlik ve güvenirlilik analizi sonucunda ÇSP ölçeğinin geçerli ve güvenilir olduğu söylenebilir. Ayrıca, Ji ve ark. (8) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla oldukça yakın sonuçlara ulaşılmıştır.

Çalışan sürdürülebilir performansı, hem kısa hem de uzun vadeli kariyer açısından iş performansına ve çalışan refahına odaklanan kavramlar üzerine daha önce yapılan çalışmalardaki (16, 24, 26) değerlendirmeler sonucunda gelişmektedir. Çalışanın sürdürülebilir performansı, hem yüksek düzeyde çalışan performansı hem de yüksek düzeyde çalışan refahı ile ilişkilidir (16). Bu nedene, bu kavram hem çalışan hem de organizasyon için faydalı olacak yüksek çalışan performansının uzun vadeli

sürdürülebilirliğine odaklanmaktadır (8).

Bu çalışmanın birtakım güçlü yönleri ve sınırlılıkları bulunmaktadır. Güçlü yönleri arasında, çalışmanın yapıldığı tarihte Türkçe literatürde çalışanın sürdürülebilir performansını ölçmek için kullanılan bir ölçek olmadığı ve bu anlamda ilk olma özelliği taşımasının önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca ölçekte yer alan ifadelerin regresyon ağırlıkları (faktör yükleri) 0,70 ve üzerinde çıkmıştır. Bu durum ölçeğin yapı geçerliğinin gücünü ortaya koyan bir diğer unsur olarak dikkat çekmektedir.

Çalışmanın sınırlılıkları arasında ise;

- Çalışmanın tek bir sağlık kurumunda ve tek bir örnekleme yapılması,

- Oluşturulan ilk DFA modelinin uyum indeksleri tam anlamıyla referans değerlerde olmadığından değişim endeksleri kullanılması yer almaktadır. Çalışmanın sonuçları değerlendirilirken bu durumlar dikkate alınmalıdır.

Sonuç olarak bu çalışma sayesinde ÇSP ölçeği hem tek başına ampirik olarak incelemek için kullanılacak bir ölçek olacak hem de gelecekteki çalışmalarda çalışanın sürdürülebilir performansı ile ilişkili yeni görüşler ve fikirler sunarak insan kaynakları yönetimi, örgütsel psikoloji ve iş alanında yapılacak diğer benzer çalışmalar için yeni ufuklar açılacaktır.

## ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Etik Komisyonu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 21.12.2012 ve Karar No: E-35853172-050.06-00002580432).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.



## KAYNAKLAR

1. Cano CR, Carrillat FA, Jaramillo, F. A meta-analysis of the relationship between market orientation and business performance: evidence from five continents. *International J Mark Res*, 2004; 21: 179-200.
2. Barrick MR, Mount MK. The big five personality dimensions and job performance: a meta-analysis. *Pers Psychol*, 1991; 44: 1-26.
3. Judge TA, Thoresen CJ, Bono JE, Patton GK. The job satisfaction-job performance relationship: a qualitative and quantitative review. *Psychol Bull*, 2001; 127: 376.
4. Zablah AR, Bellenger DN, Straub DW, Johnston WJ. Performance implications of CRM technology use: A multilevel field study of business customers and their providers in the telecommunications industry. *Inf Syst Res*, 2012; 23: 418-35.
5. Katz D, Kahn RL. The social psychology of organizations. *Adm Sci Q*, 1978; 46: 118.
6. Jiang W, Zhao X, Ni J. The impact of transformational leadership on employee sustainable performance: the mediating role of organizational citizenship behavior. *Sustainability*, 2017; 9: 1567.
7. Ramos-Villagrasa PJ, Barradaa JR, Fernández-del-Rioa E, Koopmans L. Assessing job performance using brief self-report scales: The case of the individual work performance questionnaire. *Rev. Psicol Trab Organ*, 2019; 35: 195-205.
8. Ji, T, de Jonge, J, Peeters, MC, Taris, TW. Employee sustainable performance (E-super): Theoretical conceptualization, scale development, and psychometric properties. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021; 18: 10497.
9. Yalçın, N, Karakaş, E. Kurumsal sürdürülebilirlik performans analizinde CRITIC-EDAS yaklaşımı. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 2019; 34: 147-162.
10. Düzer, M. Sürdürülebilirlik performans göstergelerine ilişkin açıklamaların finansal performans üzerine etkisi. Doctoral dissertation, Anadolu University, 2018.
11. Öztel, A, Aydın, B, Köse, MS. (2018). Entropi tabanlı TOPSIS yöntemi ile enerji sektöründe kurumsal sürdürülebilirlik performansının ölçümü: Akenerji örneği. *Gümüşhane Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 2018; 9(24): 1-24.
12. Çalışanın sürdürülebilir performansı. [https://scholar.google.com/scholar?q=%22C3%A7al%C4%B1C5%9Fan%22+s%C3%BCrd%C3%BCr%C3%BClebilir+performans%22&hl=tr&as\\_sdt=0,5](https://scholar.google.com/scholar?q=%22C3%A7al%C4%B1C5%9Fan%22+s%C3%BCrd%C3%BCr%C3%BClebilir+performans%22&hl=tr&as_sdt=0,5). Erişim Tarihi: 09.11.2022.
13. Çalışanın sürdürülebilir performansı. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>. (9.11.2022).
14. World Commission on Environment and Development. *Our Common Future: Report of the World Commission on Environment and Development*, London: Oxford: Oxford University Press, 1987.
15. Holling, CS. Understanding the complexity of economic, ecological, and social systems. *Ecosystems*, 2001; 4(5): 390-405.
16. de Jonge, J, Peeters, MC. The vital worker: Towards sustainable performance at work. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019; 16(6): 910.
17. Kim, MJ., Hall, CM., Do perceived risk and intervention affect crowdfunder behavior for the sustainable development goals? A model of goal-directed behavior. *J. Clean. Prod.* 2021; 311: 12761.
18. Wang, J, Yang, X, Bailey, A, Wang, J. Positive spillover of consumers' sustainable behaviors: the mediating role of self-determination need satisfaction. *J. Clean. Prod.* 2021; 317: 128436.
19. Dey, M, Bhattacharjee, S, Mahmood, M, Uddin, M. A, Biswas, S. R. Ethical leadership for better sustainable performance: Role of employee values, behavior and ethical climate. *Journal of Cleaner Production*, 2022; 337: 130527.
20. Tengilimoğlu, D, Işık, O, Akbolat, M. Sağlık işletmeleri yönetimi. Ankara: Nobel Yayıncılık, 2021.

21. Çalışkan, A. Dönüşümcü liderliğin iş performansına etkisi: lider üye etkileşimi ve örgütsel bağlılığın aracılık rolü. *Toros Üniversitesi İİSBF Sosyal Bilimler Dergisi*, 2018; 5(8):104-140.
22. Beloff, B., Tanzil, D., Lines, M. Sustainable development performance assessment. *Environ. Process*, 2004; 23: 271-276.
23. Spreitzer, G, Porath, C.L, Gibson, C.B. Toward human sustainability: How to enable more thriving at work. *Organ. Dyn.*, 2012; 41: 155-162.
24. Porath, C., Spreitzer, G., Gibson, C., Garnett, F.G. Thriving at work: Toward its measurement, construct validation, and theoretical refinement. *J. Organ. Behav.* 2012; 33: 250-275.
25. Spreitzer, G. Porath, C. Creating sustainable performance. *Harv. Bus. Rev.* 2012; 90: 92-99.
26. Dorenbosch, L. Striking a balance between work effort and resource regeneration. In *Sustainability and Human Resource Management*; Ehnert, I., Harry, W., Zink, K.J., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 155-180. 2014.
27. Van Scheppingen, AR, De Vroome, EMM., Ten Have, KCJM., Zwetsloot, GIJM., Wiezer, N., Van Mechelen, W. Vitality at work and its associations with lifestyle, self-determination, organizational culture, and with employees' performance and sustainable employability. *Work*, 2015; 52, 45-55.
28. Tommasetti, A, Antonelli, V, D'Alessio, R, Torre, C. Relationships between the determinants of sustainable performance and employee motivation: A Structural Equation Model. *Journal of Service Science and Management*, 2019; 12(01): 58.
29. Sümbüloğlu, V, Sümbüloğlu, K. Sağlık Bilimlerinde araştırma yöntemleri., 6. Basım, Ankara: Hatiboğlu Yayıncılık, 2013.
30. Alpar, R. Spor sağlık ve eğitim bilimlerinden örneklerle uygulamalı istatistik ve geçerlik güvenirlik. Ankara: Detay Yayıncılık, 2014.
31. Brown, TA, Moore, MT. Confirmatory factor analysis. *Handbook of structural equation modeling*, 2012; 361: 379.
32. Tavşancıl, E. Tutumların ölçülmesi ve SPSS ile veri analizi. (3. Baskı). Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, 2006.
33. Field, A. *Discovering Statistics using SPSS for Windows*. London, Thousand Oaks, New Delhi: Sage Publications, 2000.
34. Martin CR, Newell, RJ. Factor structure of the hospital anxiety and depression scale in individuals with facial disfigurement. *Psychology, Health & Medicine*, 2004; 9(3): 327-336. doi:10.1080/13548500410001721891.
35. Marsh, HW, Hocevar, D. Application of confirmatory factor analysis to the study of self-concept: First-and higher order factor models and their invariance across groups. *Psychological bulletin*, 1985; 97(3): 562.
36. Çapık, C. Geçerlik ve güvenirlik çalışmalarında doğrulayıcı faktör analizinin kullanımı. *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2014; 17(3): 196-205.
37. Wang, J, Wang, X. *Structural equation modeling: Applications using Mplus*. John Wiley & Sons. 2019.

# Investigation of the presence of Zika, Dengue, Chikungunya, and West Nile virus in *Aedes* type mosquitoes in the Eastern Black Sea area of Turkey

## Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesindeki *Aedes* tipi sivrisineklerde Zika, Dengue, Chikungunya ve Batı Nil virüsü varlığının araştırılması

Yasemin COŞGUN<sup>1</sup> (ID), Fatma BAYRAKDAR<sup>2</sup> (ID), Muhammet Mustafa AKINER<sup>3</sup> (ID),  
Burcu GÜRER GİRAY<sup>4</sup> (ID), Berna DEMİRCİ<sup>5</sup> (ID), Hilal BEDİR<sup>6</sup> (ID), Gülay KORUKLUOĞLU<sup>1</sup> (ID),  
Seher TOPLUOĞLU<sup>7</sup> (ID), Selçuk KILIÇ<sup>8</sup> (ID)

### ABSTRACT

**Objective:** Arboviruses are a group of viruses transmitted by arthropods, and are characterized by a wide geographic distribution that causes various infections in humans, both in the enzootic and urban cycles, in environments associated with the presence of vectors. Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV), yellow fever, and West Nile virus (WNV) infections are increasingly public health problems that spread throughout the world. The best known vectors of these viruses are the invasive vectors of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. The aim of this study is located in the Black Sea in northeastern Turkey located in established populations of *A. aegypti* and *A. albopictus* was to investigate the presence of viruses transmitted by mosquito species.

**Methods:** From April to October 2016, it was studied on mosquitoes in the provinces from the western border

### ÖZET

**Amacı:** Arbovirüsler, eklembacaklılar tarafından bulaşan bir virüs grubudur ve vektörlerin varlığı ile ilişkili ortamlarda hem enzootik hem de kentsel döngüler içerisinde insanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olan geniş bir coğrafi dağılım ile karakterizedirler. Dengue virüsü (DENV), Zika virüsü (ZIKV), Chikungunya virüsü (CHIKV) ve Batı Nil virüsü (BNV) enfeksiyonları, dünyaya yayılan ve giderek artan halk sağlığı problemleridir. Bu virüslerin en bilinen vektörleri; invaziv vektörler olan *Aedes aegypti* ve *Aedes albopictus*'tur. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin kuzeydoğusunda yer alan Karadeniz bölgesinde kurulmuş populasyonlarda bulunan *A. aegypti* ve *A. albopictus* sivrisinek türleri tarafından bulaştırılan virüslerin varlığını araştırmaktır.

**Yöntem:** 2016 yılının Nisan-Ekim ayları arasında batı sınır kapısından Ordu iline kadar olan illerde ve iç bölgelere giriş noktaları olan bölgelerde sivrisinekler

<sup>1</sup>Ministry of Health, General Directorate of Public Health, National Virology Reference Laboratory, Ankara

<sup>2</sup>Ministry of Health, General Directorate of Public Health, National Molecular Microbiology Reference Laboratory, Ankara

<sup>3</sup>Recep Tayyip Erdoğan University Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology Zoology Section, Rize

<sup>4</sup>Ankara Provincial Health Directorate, Public Health Molecular Diagnosis Laboratory, Ankara

<sup>5</sup>Kafkas University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Molecular Biology, Kars

<sup>6</sup>Kafkas University, Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Kars

<sup>7</sup>Ministry of Health, General Directorate of Public Health, Department of Zoonotic and Vector-borne Diseases, Ankara

<sup>8</sup>University of Health Sciences, Gülhane Institute of Defensive Health Sciences, Ankara

İletişim / Corresponding Author : Yasemin COŞGUN

Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Viroloji Referans Lab., Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : yasemincosgun2006@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received : 24.09.2022

Kabul Tarihi / Accepted : 05.12.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.58235

Coşgun Y, Bayraktar F, Akiner MM, Gürer Giray B, Demirci B, Bedir H, Korukluoğlu G, Topluoğlu S, Kılıç S. Investigation of the presence of Zika, Dengue, Chikungunya, and West Nile virus in *Aedes* type mosquitoes in the Eastern Black Sea area of Turkey. Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(1): 101 - 108



gate to the province of Ordu and areas with entry points to the inner regions. A total of 267 mosquitoes were collected from 51 different regions of the Black Sea region. All samples were tested for the presence of Dengue, Chikungunya, Zika, and West Nile virus.

**Results:** A total of 267 mosquito samples, 38 *A. aegypti* and 229 *A. albopictus*, were obtained, of which eight were male and 259 were female. No positivity was detected in terms of DENV, CHIKV, ZIKV and WNV in *A. aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes included in the study. No positivity was found in panflavivirus.

**Conclusion:** The fact that none of the investigated viruses were detected in *A. aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes is an important data that vectors in this region have not yet encountered DENV, CHIKV, ZIKV and WNV. In our country, where cases of foreign travel related to these viruses are seen, there may be a possibility of autochthonous transmission in case of encountering viruses that will come from outside and existing vectors. For this reason, similar studies should be carried out in other regions and healthy and up-to-date maps should be created in terms of vector and virus tracking. Thus, when the presence of these viruses entering the country is detected, it will be possible to take quick and effective measures.

**Key Words:** Zika virus, Dengue virus, Chikungunya virus, West Nile Virus, Flaviviruses, *Aedes*

üzerinde çalışılmıştır. Karadeniz bölgesinin 51 farklı bölgesinden toplam 267 sivrisinek toplanmıştır. Tüm örnekler Dengue, Chikungunya, Zika ve West Nile virüsünün varlığı açısından test edilmiştir.

**Bulgular:** 38 *Aedes aegypti* ve 229 *Aedes albopictus* olmak üzere toplam 267 sivrisinek örneği elde edilmiş, örneklerin 8'i erkek, 259'u dişi olarak belirlenmiştir. İncelemeye alınan *Aedes aegypti* ve *Aedes albopictus* sivrisineklerinde DENV, CHIKV, ZIKV ve BNV açısından pozitiflik saptanmamıştır. Panflavivirus açısından pozitiflik bulunmamıştır.

**Sonuç:** *A. aegypti* ve *A. albopictus* türü sivrisineklerde, araştırılan virüslerden hiçbirinin saptanmaması henüz bu bölgedeki vektörlerin DENV, CHIKV, ZIKV ve BNV ile karşılaşmadıkları yönünde önemli bir veri elde edilmiştir. Bu virüslere bağlı yurt dışı seyahati kaynaklı vakaların görüldüğü ülkemizde, dışardan gelecek olan virüslerle mevcut vektörlerin karşılaşması durumunda otoktanöz bulaş ihtimali söz konusu olabilecektir. Bu nedenle diğer bölgelerde de benzer çalışmalar yapılarak vektör ve virus takibi açısından sağlıklı ve güncel haritalar oluşturulmalıdır. Böylece ülkeye giriş yapan bu virüslerin varlığı saptandığında hızlı ve etkin tedbirler almak mümkün olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Zika virüs, Dengue virüs, Chikungunya virüs, Batı Nil Virüsü, Flavivirüsler, *Aedes*

## INTRODUCTION

Dengue, Chikungunya, Zika, Yellow Fever, and West Nile Virus infections are increasingly public health problems that spread throughout the world. The best-known vectors of these viruses are the invasive vectors of *A. aegypti* and *A. albopictus*. The formation of arboviral diseases depends on

complex interactions between the vector, the pathogen, and the environment. The sensitivity of mosquitoes to viral pathogens varies depending on temperature, relative humidity, location, and many other variables (1,2). There is a strong relationship between the distribution of infectious diseases and their vectors. Numerous studies have developed risk maps of arboviral illnesses according to this vector

distribution (3-5). Dengue fever is the most common disease among arboviral diseases and is known to have pandemic potential. Dengue virus causes severe influenza-like disease and can sometimes be severe or even fatal (6). The incidence of the disease has increased by 30 times in the last 50 years. Severe dengue infections were first seen in the 1950s during outbreaks in the Philippines and Thailand. Today it affects Asian and Latin American countries, and it has become a significant cause of hospitalization and death in children and adults (7). Chikungunya fever is the second most common arboviral disease. It is usually characterized by sudden fever elevation seen with joint pain. Other common symptoms are muscle pain, headache, nausea, weakness, and rash. The virus may cause acute, subacute, or chronic disease. It is endemic in Africa but is increasingly spreading across the Indian Ocean, Asia, the South Pacific, Southern Europe, the Caribbean, and Central America (6). The rapid emergence of the virus has been linked to the geographic expansion of the vectors *A. aegypti* and *A. albopictus* (9). Outbreaks were observed in the Americas and some European countries after 2005 (1,2,10). ZIKV was first detected in Uganda in 1947, and then epidemics were recorded in Africa, the Americas, Asia, and the Pacific (11). The symptoms of the disease caused by ZIKV include mild fever, skin rash, conjunctivitis, muscle and joint pain, weakness, headache, and mild symptoms, which last for 2-7 days. However, in 2015, with the association of microcephaly and Guillain-Barré syndrome in an outbreak in Brazil, it suddenly attracted the attention of the whole world (12-14). The World Health Organization (WHO) declared that ZIKV was a global public health emergency in February 2016 (11). The geographical distribution of ZIKV is closely related to the distribution of *Aedes* mosquitoes, the primary vector of ZIKV transmission (15). *A. aegypti* and *A. albopictus* are the primary mosquito vectors for ZIKV (16-17). The presence of *A. aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes in Turkey has been shown in previous studies (18,19). It is known that the West

Nile virus is transmitted by mosquitoes of the species *Culex pipiens*, but this virus may also be transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes* (20,21). Infection is often asymptomatic. Fever, polyarthropathy, rash, lymphadenopathy, headache, and myalgia are the main findings in symptomatic patients. In its neuroinvasive form, CNS involvement is present and may be fatal. West Nile virus is maintained in nature in a cycle involving transmission between birds and mosquitoes. People, horses, and other mammals can be infected. It is widespread in Africa, Europe, Asia, the Middle East, and Australia (22). In the past, Southern Europe, Israel, the Middle East, Romania, and Russia have had outbreaks. Recent epidemiological changes have occurred, and infections leading to fatal meningitis or encephalitis occurred during the 1999-2010 West Nile virus epidemic seen in the Americas (23). In Turkey, in 2010, autochthonous cases started to be detected (24). The aim of study is located in the Black Sea in northeastern Turkey located in established populations of *A. aegypti* and *A. albopictus* was to investigate the presence of viruses transmitted by mosquito species. Thus, the possibility of autochthonous transmission of these viruses in our country can be evaluated.

## MATERIAL and METHOD

### Study area, specimen collection and identification

From April to October 2016, mosquitoes were collected in the provinces from the western border gate to the province of Ordu and in areas with entry points to the inner areas. Within this scope, samples were collected from Artvin, Rize, Trabzon, and Ordu provinces for ten days each month. Mosquito larvae and pupae samples were collected with standard larvae scoops, larval pipettes, and light traps. Systematic evaluations of the samples were performed in the laboratory with stereomicroscopes. Thus, the samples obtained from the field studies were grouped according to their types, put into separate sampling containers, and sent to the laboratory with labels. Mosquitoes were grouped according to type and

according to the field in which they were collected, and a total of 46 pools were formed. A total of 267 mosquitoes were collected from 51 different areas in the Eastern Black Sea region. The generated mosquito pools were tested in the laboratory.

#### Specimen processing and viral RNA extraction

Mosquitoes were placed in Eppendorf tubes with ten mosquitoes per pool and homogenized using sterile sand in Dulbecco's PBS supplemented with 0.2% BSA and antibiotics (100 IU of penicillin/mL and 100 g of streptomycin/mL). The homogenates were clarified by low-speed centrifugation at 1500 rpm for 15 min at 4 °C, and supernatants were aliquoted and stored at -80 °C. Viral RNA was extracted from 400 µL of supernatant using the QIAGEN EZ1 Virus Mini Kit v2.0 and EZ1 advanced extraction robot (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with an internal control.

#### Real time RT-PCR

Each sample was tested for the presence of West Nile virus (25), Zika virus (26), Chikungunya virus (27), Dengue virus (28), and also panflavivirus (29), using an ABI 7500 real-time PCR (polymerase chain reaction) platform (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time RT-PCR was performed using the SuperScript III Platinum One Step qRT-PCR System kit. Primers and probes used in this study was given in Table 1.

#### Ethical Statement

Ethics committee approval was not required as the study was a study conducted in vector mosquitoes and was not conducted in humans or animals. The study was carried out with the approval of the Ministry of Health, Public Health Agency of Turkey, dated 13.06.2016, number 10712557-136.99-E.397 and barcode 00025198221.

Table 1. Primers and probes

Virus	Primer name	5-----3
West Nile virus	WN/ProC/10/F	CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT
	WN/ProC/153/R	GCGTTTTAGCATATTGACAGCC
	WN/ProC/89-113/FT Probe	(FAM)-CTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT-(Tamra)
Zika virus	Zik1/835/F	AAGCTYCGCGTCCTTTACCAAG
	Zik1/911/R	CCAAATTGTCCYGGTCTTCCT
	Zik1/860/FT Probe	(FAM)-CCAATGTCYTCMGCCTGGACACCTTT-(Tamra)
Chikungunya virus	Chik/E1/10366/F	AAGCTYCGCGTCCTTTACCAAG
	Chik/E1/10554/R	CCAAATTGTCCYGGTCTTCCT
	Chik/E1/10486/FT Probe	(FAM)-CAATGTCYTCMGCCTGGACACCTTT-(Tamra)
Dengue virus	DENV-F	5'-UTR region (Triplex, Real-time RT-PCR Assay (CDC))
	DENV-R1	
	DENV-R2	
	DENV-P	
Panflavivirus	Flavi all S	TACAACATgATggggAARAgAgARAA
	Flavi all AS 2	gTgTCCCAgCCNgCKgTgTCATCWgC
	DEN4 F	TACAACATgATgggRAAACgTgAGAA

## RESULTS

A total of 267 mosquito samples were examined. Female mosquitoes constitute 95.8% (254/267) of the study group. *A. albopictus* accounts for 86.2% (230/267) of mosquitoes. 62.5% (167/267) of the samples were collected from Artvin, 18.4% (49/267) from Trabzon, 14.6% (39/267) from Rize and 4.5% (12/267) from Ordu provinces. All of the samples collected in Trabzon consisted of *albopictus*, while

*albopictus* species were seen as dominant in Artvin and Ordu, and in Rize the type of *aegypti* was seen at a higher rate (Table 2). All samples were tested for the presence of Dengue, Chikungunya, Zika, and West Nile virus and none of the samples were positive. In addition, no positive results were found in the panflavivirus PCR assay performed for all samples. It was determined that these arboviruses were not found in the *Aedes* mosquitoes collected from the Eastern Black Sea region of Turkey (Figure 1).

Table 2. Properties of the studied mosquitoes

		Species				Total
		<i>A. aegypti</i>		<i>A. albopictus</i>		
		♀	♂	♀	♂	
Provinces	Artvin	7	1	156	3	167 (62.5%)
	Ordu	1	0	11	0	12 (4.5%)
	Rize	21	7	11	0	39 (14.6%)
	Trabzon	0	0	49	0	49 (18.4%)
		29 (10.8%)	8 (3%)	227 (85%)	3 (1.2%)	267



Figure 1. Provinces where mosquitoes are collected and viruses are investigated (<https://earth.google.com/web>)

## DISCUSSION

The presence of *A. aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes in the Black Sea region where mosquitoes were sampled was shown previously (18). However, the investigation of arboviruses in *Aedes* mosquitoes in this region is necessary to determine whether the people are at risk of these diseases. The presence of these species of mosquitoes, which are the primary vectors of those viral agents, poses a threat. Therefore, the existence of viruses in these vectors should be monitored at regular intervals. Although the sensitivity of vectors to viruses varies according to the conditions of the region in question, it is possible that viruses will be able to enter a country as international travels and trade are commonly practiced. In Turkey, there are some cases of foreign-origin infections with the Dengue, Zika, and Chikungunya viruses from time to time. These cases are generally seen in citizens who return after a trip abroad or in guests coming to visit Turkey from abroad (30,31). In our country, autochthonous cases have not been reported yet. However, the situation for West Nile virus is different. Confirmed cases of West Nile virus have been reported in Turkey since 2010 (24,31). West Nile cases in Turkey are diagnosed more often in the southern provinces. In our study, panflavivirus PCR tests were performed after Dengue,

Zika, Chikungunya, and West Nile virus PCR tests were found to be negative. As a result of those tests, no positivity was found. It was shown that other flaviviruses (yellow fever, Japanese encephalitis virus) were not present in *Aedes* mosquitoes in this region. However, a limitation of our study is that these virus were not investigated in non-*Aedes* mosquitoes. Especially for the West Nile virus, *Culex pipiens* mosquitoes play the primary vector role, and such mosquitoes need to be studied. In particular, this virus has been previously researched due to West Nile cases seen in the south of Turkey in 2010 (24,31). Some studies also investigated the presence and transmission of the West Nile virus in *Aedes* mosquitoes (20,21).

In conclusion, as a result of our research, none of the viruses investigated in *A. aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes were detected; it is an important finding that the vectors in this region are not carrying the Dengue, Zika, Chikungunya, or West Nile viruses. Similar studies in other parts of the country are needed to create a vector and arboviral infection map of Turkey. New studies should be conducted in which the number of samples is higher and more diverse mosquitoes are investigated. Thanks to vector and virus monitoring, it will be possible to take fast and effective measures when the presence of these viruses is detected.

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

\* This study does not require Ethics Committee Approval.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.



## REFERENCES

1. Huber JH, Childs ML, Caldwell JM, Mordecai EA. Seasonal temperature variation influences climate suitability for dengue, chikungunya, and Zika transmission. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018; 12: e0006451.
2. Tjaden NB, Suk JE, Fischer D, Thomas SM, Beierkuhnlein C, Semenza JC. Modelling the effects of global climate change on Chikungunya transmission in the 21st century. *Sci Rep*, 2017; 19: 3813.
3. Carlson CJ, Dougherty ER, Getz W. An ecological assessment of the pandemic threat of Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016; 26: e0004968.
4. Messina JP, Kraemer MU, Brady OJ, Pigott DM, Shearer FM, Weiss D, et al. Mapping global environmental suitability for Zika virus. *Elife*, 2016; 19: e15272.
5. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 6: e1760.
6. Schaffner F, Mathis A. Dengue and dengue vectors in the WHO European Region: past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infect Dis*, 2014; 14: 1271-80.
7. Promoting dengue vector surveillance and control. <http://www.who.int/denguecontrol/disease/en/>, Accessed Date: 01.08.2022.
8. Van Bortel W, Dorleans F, Rosine J, Bateau A, Rousset D, Matheus S, et al. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. *Euro Surveill*, 2014; 19: 20759.
9. Horwood PF, Buchy P. Chikungunya. *Rev Sci Tech*, 2015; 34: 479-89.
10. Chikungunya. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>, Accessed Date: 01.08.2022.
11. Zika virus. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>, Accessed Date: 01.08.2022.
12. Rodriguez-Morales AJ. Zika: the new arbovirus threat for Latin America. *J Infect Dev Ctries*, 2015; 9: 684-5.
13. Lover AA. Zika virus and microcephaly. *Lancet Infect Dis*, 2016; 16(12): 1331-2.
14. Johansson MA, Miery-Teran-Romero L, Reefhuis J, Gilboa SM, Hills SL. Zika and the risk of microcephaly. *N Engl J Med*, 2016; 375: 1-4.
15. Wikan N, Smith DR. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis*, 2016; 16: e119-e126.
16. Weinbren MP, Williams MC. Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1958; 52(3): 263-8.
17. Gendernalik A, Weger-Lucarelli J, Garcia Luna SM, Fauver JR, Rückert C, Murrieta RA, et al. American *Aedes vexans* mosquitoes are competent vectors of Zika virus. *Am J Trop Med Hyg*, 2017; 96: 1338-40.
18. Akiner MM, Demirci B, Babuadze G, Robert V, Schaffner F. Spread of the invasive mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region increases risk of Chikungunya, Dengue, and Zika outbreaks in Europe. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016; 10: e0004664.
19. Oter K, Gunay F, Tuzer E, Linton YM, Bellini R, Alten B. First record of *Stegomyia albopicta* in Turkey determined by active ovitrap surveillance and DNA barcoding. *Vector-Borne Zoon Dis*, 2013; 13: 753-61.
20. Veronesi E, Paslaru A, Silaghi C, Tobler K, Glavinic U, Torgerson P, et al. Experimental evaluation of infection, dissemination, and transmission rates for two West Nile virus strains in European *Aedes japonicus* under a fluctuating temperature regime. *Parasitol Res*, 2018; 117: 1925-32.

21. Martinez D, Murray KO, Reyna M, Arafat RR, Gorena R, Shah UA, et al. West Nile virus outbreak in Houston and Harris county, Texas, USA, 2014. *Emerg Infect Dis*, 2017; 23: 1372-76.
22. West Nile virus. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>, Accessed Date: 01.08.2022.
23. Murray KO, Mertens E, Despres P. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res*, 2010; 41: 67.
24. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, Oncul O, Tosun S, Karabay O, et al. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveill*, 2012; 17: 20182.
25. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods*, 2007; 146: 355-8.
26. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*, 2008; 14: 1232-39.
27. Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, Murri S, Tolou HJ, Peyrefitte CN. Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J Virol Methods*, 2005; 124: 65-71.
28. Emergency Use Authorization-Trioplex, Real-time RT-PCR Assay.
29. Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virol J*, 2013; 10: 58.
30. Sezen A, Yildirim M, Kultur MN, Pehlivanoglu F, Menemenlioglu D. Cases of Zika virus infection in Turkey: newly married couple returning from Cuba. *Mikrobiyol Bul*, 2018; 52(3): 308-15.
31. Ergunay K, Whitehouse CA, Ozkul A. Current status of human arboviral diseases in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011; 11: 731-41.

## Tip 1 diyabetes mellitus tanılı bir olguda rinoserebral mukormikoz

### Rhinocerebral mucormycosis in a case diagnosed with type 1 diabetes mellitus

Ayşe ALICI<sup>1</sup> (ID), Aytekin FIRTINA<sup>2</sup> (ID), Gülgün YENİŞEHİRLİ<sup>1</sup> (ID), İbrahim ERDİM<sup>3</sup> (ID), Elif AKÇAY<sup>4</sup> (ID)

#### ÖZET

Mukormikoz, Mucorales takımı küf mantarları tarafından oluşturulan, oldukça hızlı ilerleyen, etkin tedaviye rağmen mortalitesi yüksek olan invaziv bir fungal enfeksiyonudur. Diyabetes mellitus, kanser immunoterapisi, kök hücre transplantasyonu gibi durumlar mukormikoz için risk faktörüdür. Çalışmamızda, hastanemizde takip ettiğimiz bir rinoserebral mukormikoz vakası bildirmeyi amaçlanmıştır. Bilinen tip1 diyabeti olan 20 yaşında kadın hasta, boğaz, boyun, baş ağrısı, halsizlik ve yüzünde uyuşukluk şikâyeti ile hastanemiz kulak burun boğaz polikliniğine başvurmuştur. Hastanın fizik muayenesinde kanlı nazofarengeal akıntı görülmüş ve servise yatırılmıştır. Yatışının birinci gününde diyabetik ketoasidoza giren ve bilinci bozulan hasta yoğun bakım ünitesine yatırılmıştır. Hastanın manyetik rezonans (MR) görüntülemesinde paranasal sinüslerde ve her iki mastoid hücrede sıvı sinyalleri ve nazofarenks ve nazofarenkse komşu yumuşak dokularda mukormikoz ya da invaziv *Aspergillus* düşündüren alanlar görülmüştür. Hastanın difüzyon MR'ında akut iskemik lezyonlar izlenmiştir.

#### ABSTRACT

Mucormycosis is an invasive fungal infection caused by mold fungi of the Mucorales order, which progresses quite rapidly and has a high mortality despite effective treatment. Conditions such as diabetes mellitus, cancer immunotherapy, stem cell transplantation are risk factors for mucormycosis. In this study, we aimed to report a case of rhinocerebral mucormycosis that we followed in our hospital. A 20-year-old female patient with known type 1 diabetes was admitted to the otolaryngology outpatient clinic of our hospital with complaints of sore throat, neck, headache, weakness and numbness on her face. The patient was admitted to the ward due to the presence of bloody nasopharyngeal discharge in the physical examination. The patient, who entered diabetic ketoacidosis on the first day of hospitalization and disorder of consciousness, was admitted to the intensive care unit. In the magnetic resonance (MR) imaging of the patient, fluid signals in the paranasal sinuses and both mastoid cells and areas suggestive of mucormycosis or invasive *Aspergillus* were observed in the nasopharynx and soft tissues adjacent to the nasopharynx. Acute ischemic lesions were observed in the diffusion MRI

<sup>1</sup>Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Tokat

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Ankara

<sup>3</sup>Sancaktepe Şehit Prof. Dr. İlhan Varank EAH., KBB Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi Kliniği, İstanbul

<sup>4</sup>Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji AD., Tokat



İletişim / Corresponding Author : Ayşe ALICI

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Tokat - Türkiye

E-posta / E-mail : aysealici14@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 16.08.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 24.02.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.70845

Alıcı A, Firtina A, Yenişehirli G, Erdim I, Akçay E. Tip 1 diyabetes mellitus tanılı bir olguda rinoserebral mukormikoz.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(1): 109 - 116

Nazofarengeal sürüntü örneğinin kültüründe septasız dik açılı ile dallanan hifal yapılar ve rizoid yapıları görülmüş ve mucareles olduğuna karar verilmiştir. Hastadan alınan nazofarengeal biyopsi materyalinde patolojik olarak da mukormikozu düşündüren hifal yapılar görülmüştür. Hastaya amfoterisin B 250 mg tedavisi başlanılmıştır. Hasta yatışının 35. gününde kardiyopulmoner resüsitasyona cevap vermeyerek vefat etmiştir. Diabetes mellitus gibi immün sistemin baskılandığı hastalarda fırsatçı mantar enfeksiyonlarının görülebileceği ve çok hızlı yayılmasından dolayı enfeksiyonun kontrol altına alınmasının zor olacağı akılda tutulmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Diabetes mellitus tip 1, mukormikoz, rinoserebral

of the patient. In the culture of the nasopharyngeal swab, hyphal structures without septa and branching at right angles were seen and it was decided that they were mucareles. In the nasopharyngeal biopsy material taken from the patient, hyphal structures and rhizoid structures were seen pathologically suggestive of mucormycosis. The patient was started on amphotericin B 250 mg treatment. The patient died on the 35th day of her hospitalization, not responding to cardiopulmonary resuscitation. It should be kept in mind that such opportunistic fungal infections can be seen in patients with suppressed immune system such as diabetes mellitus, and it will be difficult to control the infection due to its rapid spread.

**Key Words:** Diabetes mellitus type 1, mucormycosis, rhinocerebral

## GİRİŞ

Mukormikoz (zigomikoz olarak da kullanılır), Mucorales takımı küf mantarları tarafından oluşturulan fırsatçı mantar enfeksiyonlarına denir. Mukormikoz etkeni olarak bildirilen patojenler arasında *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. ve *Lichtheimia* spp. (eskiden *Absidia*), *Rhizomucor* spp. ve *Cunninghamella* spp. gösterilmektedir (1). En sık karşılaşılan etken *Rhizopusoryzae*'dir (2). Mukormikoz, hızlı ilerleyen, etkin tedaviye rağmen mortalitesi yüksek olan invaziv bir fungal enfeksiyondur (3). Daha eski kaynaklarda mortalite oranları %70-90 olarak verilirken agresif cerrahi debridman ve etkili antifungal tedaviyle birlikte bu oran %40-80 olarak belirtilmektedir (1,4,5). Bu mortalite oranları hastalığın klinik formu ve altta yatan predispozan faktörlere bağlıdır. Yüksek sağ kalım oranları immünkompetan olan ve komorbiditesi olmayan hastalarda raporlanmakta iken santral sinir sistemi tutulumu ile giden ve kök hücre

transplantasyonu yapılan hastalarda prognoz daha kötüleşmekte ve mortalite oranları %80 düzeylerine ulaşmaktadır (1). Diabetes mellitus tanılı hastalarda mortalite oranı %44 olarak bildirilmektedir (6).

Mukormikoz enfeksiyonu risk faktörlerinin önem sıralamasında, tıp bilimindeki ilerlemelerle birlikte değişiklikler olmuştur. 20. yy ortalarında en önemli risk faktörü diyabet iken, son yıllarda kanser immunoterapisi, kök hücre transplantasyonu ve akut lösemiler de öne çıkmaktadır (1,4). Ayrıca immünkompetan kişilerde travmaya bağlı görülen vakalar görülmektedir (7). Ek olarak hematopoetik kök hücre transplantasyonu yapılan vakalarda, profilaktik olarak vorikonazol verilmesi de mukormikoz enfeksiyonu açısından risk oluşturmaktadır (8).

Mukormikozun; rinoserebral, pulmoner, gastrointestinal, kutanöz ve dissemine olmak üzere başlıca beş klinik formu bulunmaktadır (1,5,8). Pulmoner, gastrointestinal ve dissemine tutulum yapan formlar derin nötropenik, hematolojik

malignitesi olan veya solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda sık görülürken; kutanöz form genelde immünsüpresyonu olmayan travma ve yanık hastalarında görülmektedir. Tüm bunlarla birlikte rino-orbito-serebral formu daha çok kontrolsüz diyabet ve bu durumun neticesinde ortaya çıkan diyabetik ketoasidoz hastalarında izlenmektedir (1,8,9).

Bu çalışmamızda, hastanemizde takip edilen bir rinocerebral mukormikoz vakası bildirmek amaçlanmıştır.

## OLGU

20 yaşında, dört yıldır bilinen tip 1 diyabeti olan kadın hastanın, birinci gün boğaz ağrısı ve baş ağrısı olmuştur. İkinci gün halsizlik olmuş ve tüm günü uyuyarak geçirmiştir. Ardından bir sağlık kurumuna baş ağrısı ve boğaz ağrısı şikayeti ile başvurmuş ve amoksisilin klavulunik asid 2x1gr başlanmıştır. Sağlık kurumuna başvurduktan iki gün sonra boyun ağrısı artmış ve sesi kısalmıştır. Bunun üzerine hastanemiz kulak burun boğaz polikliğine başvuran hasta mevcut şikayetlerine ek olarak yüzünde uyuşukluk olduğunu belirtmiştir. Fizik muayenesinde sağ vokal kord paralizisi ve nazofarenkste kanlı akıntı görülmesi üzerine mukormikoz, invazivaspergillus ön tanısı ile nazofarengeal sürüntü örneği alınmış, örnek mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiş ve hastanın servise yatışı yapılmıştır.

Yatışının birinci günü gecesinde hastanın ağzında kayma, sağ göz kapağında düşüklük gözlenmiştir. Hastanın gözünü kapatamadığı, konuşamadığı ve su içemediği belirlenmiştir. Yapılan nörolojik muayenesinde; sağ pupilin fiks dilate ve sağ gözün donuk olduğu, sağ fasiyalparaliz varlığı, dilin orta hatta donuk olduğu ve hareket etmediği, öğürme refleksinin azaldığı baş kontrolünü sağlayamadığı ve omuzlarını güçlükle kaldırabildiği tespit edilmiştir. Bilinen tip diyabeti olan hastanın yatışının birinci gününde kan glikoz değeri 368mg/dl, HbA1C:13,5 kan gazı incelemesinde kan pH:7,2, PO2:60 MMHG, PCO2:18.4 MMHG, HCO3:7.1 MMOL/L, tam idrar tahlili

incelemesinde keton pozitif saptanması üzerine hastaya diyabetik ketoasidoz tanısı konularak yoğun bakıma yatırılmıştır. Yatışı esnasında WBC mL de 15.400, CRP:80 mg/L olarak bulunmuştur. Hastaya diyabet ketoasidoz tedavisi için hidrasyon ve insülin infüzyon başlanarak yakın aralıklarla kan şekeri ve kan gazı takibi yapılmıştır. Sekizinci Saatte diyabetik ketoasidozdan çıkan hastaya besleme ile birlikte saatlik kan şekere göre insülin tedavisi düzenlenmiştir. Bilinç durumu bozuk, solunum sıkıntısı olan hasta elektif olarak entübe edilmiştir. Hastanın çekilen manyetik rezonans görüntülemesinde paranasal sinüslerde ve sağ mastoid hücrede daha belirgin olmak üzere her iki mastoid hücrede sıvı sinyalleri venazofarenks ve nazofarenkse komşu yumuşak dokularda mukormikoz yada invaziv *Aspergillus* düşündürülen kontrast tutulumu göstermeyen hipointens alanlar görüldüğü rapor edilmiştir. Hastanın çekilen difüzyon MR'ında sağda postsantralğirusda ve ventrikül gövdesi düzleminde pariyetal lobtafokal difüzyon kısıtlayan akut iskemik lezyonlar izlenmiştir. Hastaya ilk gün vankomisin 500 mg 2x1 ve piperasilin tazobaktam 4,5 g 3x1 tedavisi başlanmıştır.

Hastanın yatışının birinci gününde beyin omurilik sıvısı kültürü, boğaz kültürü, tüberküloz kültürü ve mikobakteri PCR istenmiş ve bunların hepsi negatif olarak sonuçlanmıştır. *Brucella* açısından Rose Bengal ve Wright tüp aglütinasyon testleri negatif olarak bulunmuştur.

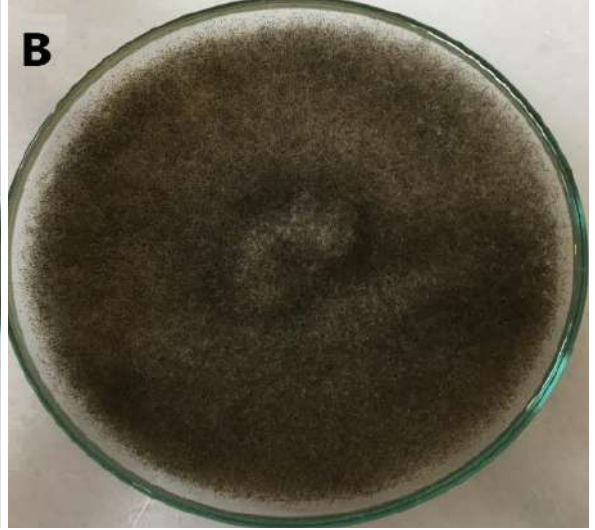
Hastanın alınan nazofaringeal sürüntü örneğinin direkt boyalı mikroskopik incelemesinde; %90'ı polimorfo nükleer lökosit olan her alanda >25'den fazla lökosit varlığı görülmüş ancak hifal yapılar gözlenmemiştir. Nazofaringeal sürüntü örneğinin kültürü için kanlı besiyeri, sikloheksimidisiz ve sikloheksimidli Sabouraud dekstroz agara ekim yapılmıştır. Bir gün sonra hastanın kanlı besiyerinde metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve beyaz renkli pamuk gibi küf kolonileri görülmüştür. Sikloheksimidisiz Sabouraud dekstroz agardada bir gün sonra beyaz renkli küf kolonileri üremiştir (Şekil1a ve b). Kültürden Laktofenol pamuk mavisi ile yapılan

boyamada dik açıyla dallanan, septasız hifal yapılar ve rizoid yapıları görülmüştür (Şekil 2a, b, c). Aynı zamanda lam kültürü yapılmış ve lam kültüründe de septasız hifal yapılar ve rizoid yapıları belirlenmiştir (Şekil 3). Hastanın yatışının üçüncü gününde tekrar

gönderilen nazofaringeal sürüntü örneğinde yine aynı şekilde *Mucorales* üremesi saptanmıştır. Daha sonra etken, Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) ile *Rhizopus oryzae* (score:2,29) olarak tanımlanmıştır.



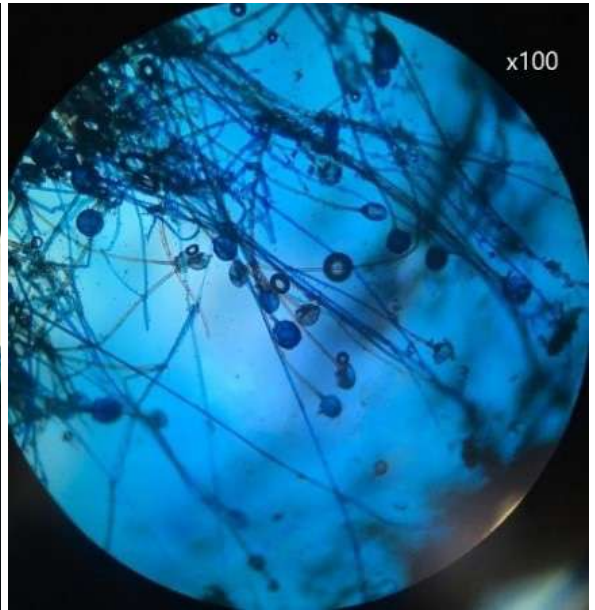
Şekil 1a. Sikloheksimidsiz Saboraud dekstroz besiyeri görüntüsü birinci gün



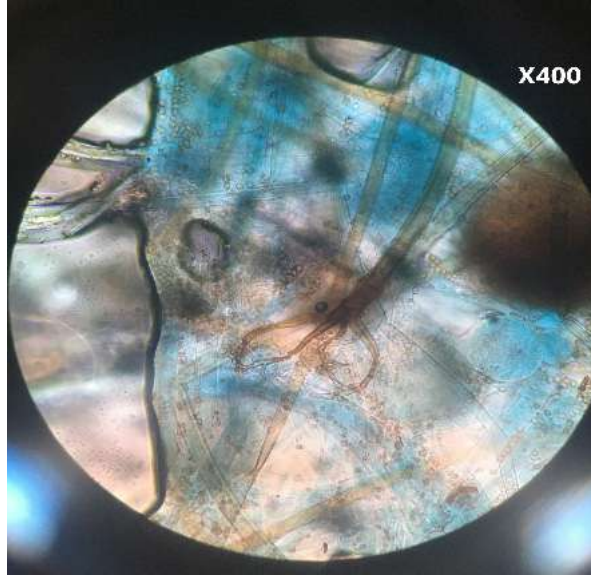
Şekil 1b. Sikloheksimidsiz Saboraud dekstroz besiyeri görüntüsü beşinci gün



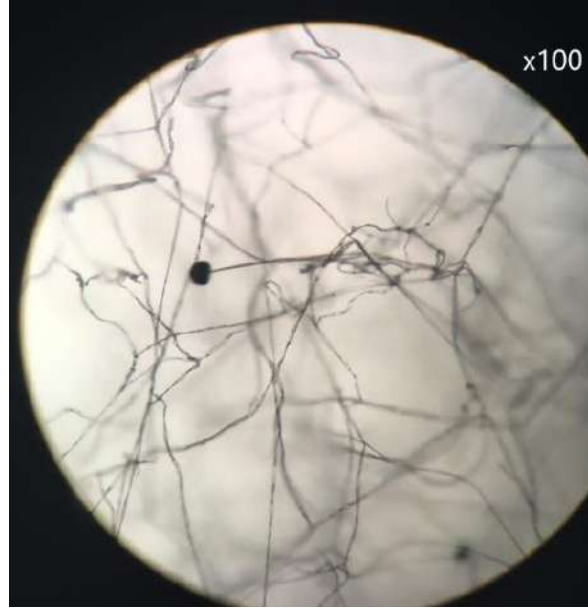
Şekil 2a. Kültürden Laktofenol Pamuk Mavisi ile boyanmış mikroskopik görüntü - 1



Şekil 2b. Kültürden Laktofenol Pamuk Mavisi ile boyanmış mikroskopik görüntü - 2



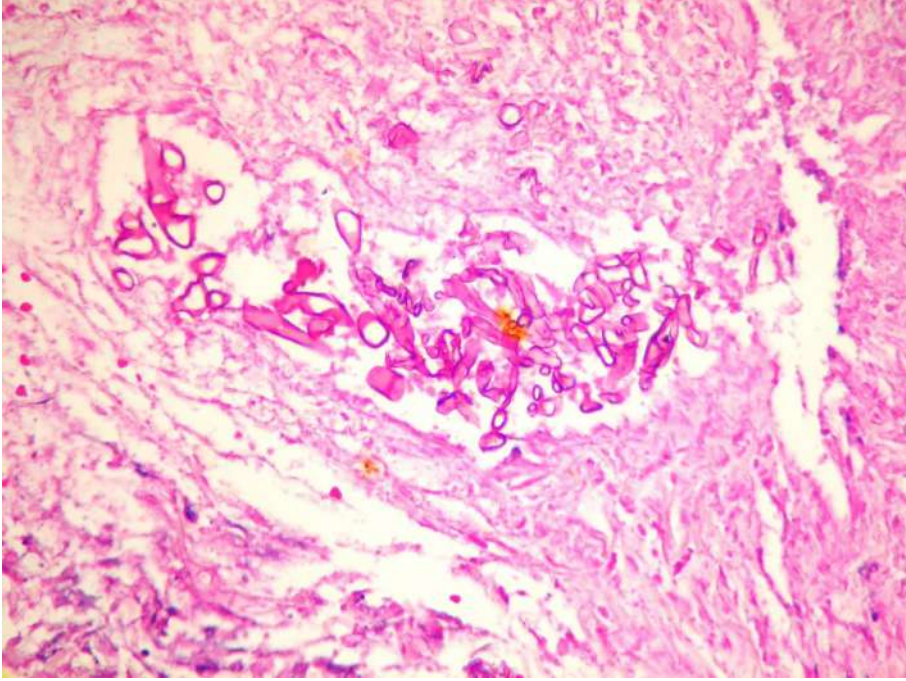
Şekil 2c. Kültürden Laktofenol Pamuk Mavisi ile boyanmış mikroskopik görüntü - 3



Şekil 3. Lam kültürü görüntüsü

Hastaya yatışının yedinci günü ve 20. gününde olmak üzere iki kez kulak burun boğaz kliniği tarafından nazofarenks ve sert damaktaki nekrotik alanlarının debridmanı amacıyla operasyon yapılmış,

operasyon materyalinin patolojik incelemesinde mukormikozisle uyumlu hifal yapılar görülmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. Nekrotik materyal içinde düzensiz, kalın, septa içermeyen mukormikozis hifaları (HE X400)

Nazofaringeal örnekte *Mucorales* ve MRSA üremesi üzerine; enfeksiyon hastalıkları tarafından hastanın piperasilin-tazobaktam ve vankomisin tedavisi sonlandırılarak, linezolid 600 mg 2x1 ve lipozomal amfoterisin B 5 mg/kg olacak şekilde 200 mg/gün olarak başlanılmıştır. Hastanın yoğun bakıma yatışının dördüncü gününde trekeal aspirat kültüründe *Acinetobacter baumannii* üremesi üzerine hasta enfeksiyon hastalıklarına konsulte edilmiş ve tedaviye meropenem 1 gr 2x1, fosfomisin 4 gr 4x1 eklenmiş ve amfoterisin B dozu 6 mg/kg olacak şekilde 250 mg/gün 'e çıkarılmıştır. Hastanın yatışının altıncı gününde kan ve idrar kültürlerinde de *Acinetobacter baumannii* üremesi olmuş ve enfeksiyon hastalıklarının önerisiyle tedaviye devam edilmiştir. Hastanın linezolid tedavisi 25 gün sonra sonlandırılmıştır. Tedavisi sürerken, yatışının 35. gününde kardio pulmoner arrest olan ve resüsitasyona yanıt vermeyen hasta vefat etmiştir.

## TARTIŞMA

Mukormikozis, *Zygomycetes* sınıfından mantarların neden olduğu bir enfeksiyon hastalığıdır. Mukormikozis, hematolojik ve allojenik kök hücre transplantasyonu yapılan hastalarda kandidiyazis ve aspergillozdan sonra en sık görülen üçüncü invaziv mikozdur (10).

Mukormikoz epidemiyolojisi gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde farklılık göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde hastalık yaygın değildir ve şu anda çoğunlukla diyabetes mellitus tanılı ve hematolojik maligniteleri olan kemoterapi gören hastalarda görülmektedir. Buna karşın gelişmekte olan ülkelerde, özellikle Hindistan'da, mukormikoz vakaları, sporadik olmasına rağmen, esas olarak kontrolsüz diyabet veya travması olan hastalarda ortaya çıkmaktadır (10).

Mukormikoza yatkınlık yaratan en önemli durumlar, kök hücre transplantasyonu olan veya



olmayan malign hematolojik hastalık, uzun süreli ve şiddetli nötropeni, diyabetik ketoasidozlu veya diyabetik ketoasidozu olmayan kontrolsüz diyabetes mellitus, aşırı demir yüklenmesi, majör travma, uzun süreli kortiko steroid kullanımı, intravenöz ilaç kullanımı, yeni doğanlarda prematürel ve yetersiz beslenmedir (10). Roden ve ark. (6) 929 zygomikozis vakasının inceledikleri çalışmalarında; altta yatan hastalık olarak en sık diyabetes mellitus (%36), ikinci sırada malign hastalıklar (%17) ve solid organ transplantasyonu (%7) olduğunu bildirmişlerdir. Bu olguda da altta yatan kontrolsüz tip 1 diyabet hastalığı bulunmakta ve mukormikozis için risk oluşturmaktaydı.

Klinik görünümüne ve anatomik lokalizasyonuna göre, invaziv mukormikozis rino serebral, pulmoner, kutanöz, gastrointestinal, dissemine ve endokardit, osteomyelit, peritonit ve böbrek enfeksiyonu gibi nadir formlar olmak üzere altıya ayrılmaktadır (10). En yaygın görülen form rinoserebral tutulumdur. Roden ve ark. (6) da çalışmalarında rinoserebral form %39, pulmoner form %24, kutanöz form %19, gastrointestinal form %7 ve dissemine form %3 olarak tespit etmişlerdir. Ülkemizden Arda ve ark. (8) 12 mukormikozis olgusunu inceledikleri çalışmalarında; hastaların altısında rinoorbital, dördünde rinoserebral, birinde pulmoner ve birinde de hem pulmoner hem rinoserebral tutulum bildirmişlerdir. Rinoserebral tutulum diyabet hastalarında en yaygın görülen formdur. Enfeksiyon, paranasal sinüslerde mantar sporangio sporlarının solunmasından sonra gelişmektedir. Daha sonra hızla bitişik dokulara yayılarak; arkada sfenoid sinüsü, lateralde kavernöz sinüse ve kraniyalde beyni istila etmek için yayılabilmektedir. (10). Bizim olgumuzda da enfeksiyon nazofarenksten hızla paranasal sinüslere ve beyne yayılmış ve hastanın kliniği birkaç gün içinde kötüleşmiştir.

Mukormikoz tanısı mikolojik, histolojik ve görüntüleme laboratuvarlarının birlikteliğine dayanmaktadır. Hastada mukormikozdan şüphelenildiğinde hızlıca ilgili görüntüleme

yöntemleri çalışılmalı, mikolojik kültür ve histolojik inceleme için biyopsi materyalleri toplanmalıdır. Histolojik incelemede, dokuda kurdele benzeri geniş ve düzensiz, kalın duvarlı ve septasız hiflerin görülmesi tanıyı desteklemektedir. Görüntüleme yöntemlerinde özellikle anjio invazyon varlığı mukormikoz enfeksiyonları için karakteristiktir. Mikolojik kültür için 30 °C ve 37 °C olmak üzere iki ayrı sikloheksimid içermeyen standart mikolojik besi yerlerine ekim yapılmalıdır. Histolojik yöntemlerle ispatlanmış olguların %40'ında kültür negatifliği görülebilmektedir. Tek başına kültür sonuçlarıyla tanı kesin olarak konulamaz veya reddedilemez (1,2,5,11). Tüm tanısal yöntemler ve klinik bulgular eşliğinde hasta yönetimi sağlanmalıdır. Bu olguda ise hastadan alınan nazofarengeal sürüntü örneğinin direkt mikroskopik incelemesinde mantar hifleri görülmemiş ancak kültürün mikroskopik incelemesinde rizoid yapıları ile birlikte kalın düzensiz dik açılı dallanan septasız hifler *Mucor* mikozis enfeksiyonunu düşündürmüştür. Hastanın nazofarengeal biyopsi materyallerinin patolojik incelemesinde, mucoral eshiflerinin görülmesi tanıyı desteklemiştir. Daha sonra MALDI-TOF MS ile kesin tanı *Rhizopus oryzae* olarak konulmuştur.

Mukormikoz şüphesi veya tanısı acil tedavi endikasyonudur. Mukormikoz tedavisi, cerrahi debridman, etkin antifungal tedavi ve altta yatan predispozan hastalıkların tedavisine dayanmaktadır (1,5,11). Cerrahi debridman temiz marginli olarak yapılmalıdır. Hastanın takiplerinde tekrarlayan debridmanlar gerekebilir. Medikal tedavide ilk ilaç olarak lipozomal amfoterisin-B önerilmektedir. Yapılan çalışmalarda; isavuconazol etkinliğinin de amfoterisin-B ile benzer sonuçlar verdiği ve isovuconazolün, renal yetmezliği olan mukormikoz enfeksiyonlarında amfoterisin-B tedavisine alternatif olduğu bildirilmektedir. Tedavi süresi her hasta için değişmekle birlikte üç yıla kadar devam eden vakalar belirtilmektedir. Başlangıç bulguları ve görüntüleme düzeline kadar tedavi devam etmelidir. Isavuconazol ve posakonazol idame tedavisinde kullanılmaktadır

(1). Bu vakada, tedavide lipozomal amfoterisin B kullanılmış ve iki kez cerrahi debridman yapılmış, ancak mucormikozisin hızla ilerlemesi ve ek başka bakterilerin de üremesinden dolayı enfeksiyon kontrol altına alınamamış ve hasta kaybedilmiştir.

Sonuç olarak, kontrolsüz tip 1 diyabeti olan

hastada gelişen mukormikozis vakası bildirilmiştir. Diabetes mellitus gibi immun sistemin baskılandığı hastalarda, bu tip fırsatçı mantar enfeksiyonlarının görülebileceği ve çok hızlı yayılmasından dolayı enfeksiyonun kontrol altına alınmasının çok zor olacağı akılda tutulmalıdır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SC, Dannaoui E, Hochhegger B, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis*, 2019;19(12):e405-21.
2. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick Barbara, et al. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. New York: Mcgraw-Hill Education. 2016.
3. Taşbakan MI, Bilgin A, Soyer NA, Sipahi OR, Kandiloğlu G, Tombuloğlu M, et al. Aplastik anemili bir olguda mukormikoz. *Ege Tıp Derg*, 2007;46(1):57-60.
4. Camara-Lemarroy CR, González-Moreno EI, Rodríguez-Gutiérrez R, Rendón-Ramírez EJ, Ayala-Cortés AS, Fraga-Hernández ML, et al. Clinical features and outcome of mucormycosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2014;2014.
5. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. Ninth edition. Amsterdam: Elsevier Inc. 2021.
6. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis*, 2005;41(5):634-53.
7. Adulkar NG, Radhakrishnan S, Vidhya N, Kim U. Invasive sino-orbital fungal infections in immunocompetent patients: a clinico-pathological study. *Eye*, 2019;33(6):988-94.
8. Arda B, Erdem A, Sipahi OR, Taşbakan MI, Pullukçu H, Taşbakan MS, et al. Mukormikoz: 12 olgunun retrospektif değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 2011;45(3):504-11.
9. Niyaz L, Yıldırım N, Başmak H. İki olgu nedeniyle orbital mukormikoz. *Türk Klin J Ophthalmol*, 2011;20(2):108-11.
10. Petrikos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis*, 2012;54(Suppl 1):S23-34.
11. Tille PM. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. Thirteenth edition. St. Louis, Missouri:Elsevier. 2014.

# Antifungal susceptibility testing, reporting and antifungal resistance: current status

## Antifungal duyarlılık testleri, raporlama ve antifungal direnç: güncel durum

Ali Korhan SİĞ<sup>1</sup> (ID)

### ABSTRACT

Appropriate early treatment is crucial for prognosis in invasive fungal infections (IFIs). Antimicrobial susceptibility has generally an important role for treatment options and clinical outcome. "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" and "The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" defined standard procedures and recommendations on interpretations of minimum inhibitory concentrations (MICs). However, they do not include epidemiological cut-off values (ECOFFs) and/or clinical breakpoints (CBPs) for every fungi and antifungal agent, so only MIC values can be shared to guide clinicians. Microbiological resistance is determined by interpreting the *in vitro* MICs with comparison of CBPs. There are many mechanisms that lead to antifungal resistance (AFR). There are increasing trends in fluconazole and echinocandin resistance for yeasts and in triazole resistance for molds. Although clinical reflections of these high MICs are sometimes very obvious, there is insufficient data to show in every fungi. Clinical resistance is the event that an infection does not resolve for various reasons despite appropriate treatment, and can be attributed to many

### ÖZET

İnvazif fungal enfeksiyonlarda (IFE) erken tanı ve tedavi prognoz için çok kritiktir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri, genel olarak tedavi seçenekleri ve klinik prognoz açısından önemli bir role sahiptir. "Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST)" ve "Klinik ve laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)" minimum inhibitör konsantrasyonların (MİK) yorumlanması için standart prosedürler ve yöntemleri belirlemişlerdir. Ancak, her mantar ve antifungal için epidemiyolojik eşik değeri (EED) ve/veya klinik eşik değeri (KED) tanımlanmamıştır, bu nedenle klinisyenleri yönlendirebilmek adına sadece MİK değerleri raporlanabilir. Mikrobiyolojik direnç, *in vitro* MİK değerlerinin KED verileri ile yorumlanması ile belirlenir. Antifungal direnç (AFD) yol açan çok sayıda mekanizma bulunmaktadır. Mayalarda flukonazol ve ekinokandinlere, küflerde ise triazolere dirençte bir artış eğilimi söz konusudur. Her ne kadar bazı durumlarda yüksek MİK değerleri ile klinik tablo doğrudan ilişki gösterse de her mantar için bu durum gösterilememektedir. Klinik direnç, doğru tedaviye rağmen, enfeksiyon tablosunun çeşitli başka sebeplerle düzelmemesi olayıdır ve birçok nedene bağlanabilir. Bu nedenle, antifungallere duyarlı bir

<sup>1</sup>University of Health Sciences, Balıkesir Atatürk City Hospital, Department of Medical Microbiology, Balıkesir, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Ali Korhan SİĞ

Sağlık Bilimleri Üni., Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi, Tıbbi Mik. Lab., Balıkesir - Türkiye

E-posta / E-mail : dr\_korhan@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 06.12.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 12.04.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.97957

SİĞ AK. Antifungal susceptibility testing, reporting and antifungal resistance: current status.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(1): 117 - 132

reasons. Thus, every infection caused by susceptible organism is not always successfully treated, every infection caused by resistant organism is not always a failure. The aim of this review is to create an overall perspective to antifungal susceptibility testing and notify current condition of AFR worldwide and in our country. As IFIs show epidemiological changes and become more frequently recognized, studies on the use of antifungals have also increased, while AFR has come to the fore as one of the current problems. With *Candida auris*, it is clear that it is necessary to put an end to the relative “ignorance of fungi”.

**Key Words:** Antifungal resistance, invasive fungal infections, candidiasis, epidemiologic cut-off value, clinical breakpoint

mikroorganizmanın oluşturduğu her enfeksiyon başarı ile tedavi edilemez, öte yandan dirençli organizma ile oluşan her enfeksiyonda da terapötik başarısızlık olmaz. Bu derlemenin amacı; antifungal duyarlılık testleri konusunda genel bir bakış sunmak ve dünyadaki ve ülkemizdeki güncel AFD durumunu tartışmaktır. IFE’ler için bir epidemiyolojik değişim söz konusudur ve bu enfeksiyonlarla daha sık karşılaşmaktadır. Buna bağlı olarak da, antifungaller ile ilgili çalışmalar da artmış, öte yandan AFD sorunu da gündeme oturmuştur. *Candida auris* ile birlikte görülmüştür ki, mantarların görece “göz ardı edilmesine” bir son verilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Antifungal direnç, invaziv fungal enfeksiyonlar, kandidiyaz, epidemiyolojik eşik değeri, klinik eşik değeri

## INTRODUCTION

Appropriate early treatment is crucial for prognosis in invasive fungal infections (IFIs) (1). For this reason, many organizations, especially The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) have published various guidelines (2). In fact, joint scoring systems have been developed with the cooperation of several organizations to provide a practical approach to IFI cases (3,4). The most important problems are the processes of detecting and isolating the infectious agent, defining to the species level, and performing the antifungal susceptibility tests (AFSTs), that have long turnaround time periods.

### Antifungal Susceptibility Tests

Antifungal susceptibility tests are recommended in case of i. isolates from sterile body fluids, ii. isolates with potential of antifungal resistance (AFR), iii. isolates that are rarely encountered, and iv. particular clinical requests due to a valid reason (such

as treatment failure) (5-8) (Table 1). Definition of the minimum inhibitory concentrations (MICs) is not enough to evaluate the isolate, but they should also be interpreted according to the standards of “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)” or “The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)”. Epidemiological cut-off values (ECOFFs) and clinical breakpoints (CBPs) were determined for fungi and antifungals (9-11). ECOFFs are obtained by forming a normal distribution curve following the studies of many different strains from different geographical regions in many centers with the same method. CBPs can be defined with addition of pharmacokinetic-pharmacodynamic animal and human studies, Monte-Carlo simulation, and findings of clinical studies. In other words, while ECOFF only indicates whether the microorganism harbours an adaptive/acquired resistance mechanism, CBP actually gives data on whether therapeutic success can be achieved (12).

**Table 1.** Recommendations for routine mycology (adapted from references 8 and 12)

Method	Recommendation
Routine	Species level identification for strains isolated from sterile and deep infection sites
	Species level identification of <i>Aspergillus</i> and genus level identification for other molds
	Even if it is not recommended to make routine susceptibility tests for molds, four-well azole-containing agar screening test is advised for <i>A. fumigatus</i> complex
	Treatment according to recommendations of international guidelines (like ESCMID)
	Report susceptibility for intrinsic resistance (IR) without performing
	Fluconazole, voriconazole and echinocandin susceptibility tests for yeasts isolated from sterile and deep infection sites
Treatment	Amphotericin B susceptibility test
Unresponsive IFI	Combination treatment
	Search for reasons which could lead to clinical resistance (e.g. invasive catheters)
Rare isolates	Susceptibility test possible but only MIC and for some species ECOFF values could be reported. Clinicians should be informed about WT, non-WT terminology.

In EUCAST standards, a limited number of fungi have the threshold values, and wild type (WT), non-wild-type (non-WT), susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R) categories are determined. EUCAST considers only the broth microdilution (BMD) technique as the reference method and has not included caspofungin testing. In CLSI standards, there is also a Susceptible Dose-Dependent (SDD) definition in addition to other categories. CLSI accepts both BMD and disk diffusion (DD) as the reference methods. In molds, the concept of minimum effector concentration (MEC) is used instead of MIC, which's evaluation and interpretation methods are different (9-11).

In routine AFST, it is recommended to study fluconazole, voriconazole and an echinocandin (micafungin or anidulafungin) for yeasts and

amphotericin B (AmB) when necessary (6). However, CLSI and EUCAST standards do not have ECOFFs and/or CBPs for every yeast and every antifungal agent. Therefore, it is not possible to interpret some MIC results. For example, for *Candida krusei*, EUCAST gave only ECOFF, except for anidulafungin and AmB. Again, EUCAST for *Candida tropicalis* did not share CBP data for micafungin. For *Candida kefyr*, there is no CBP data for either EUCAST or CLSI, and ECOFF data is very limited. Since *Candida famata* is a rare isolate, it is not included in both standards, only the MIC value can be provided for this organism. Although caspofungin is included in the CLSI standards, it is not generally recommended if another echinocandin, such as micafungin, can be studied due to interlaboratory variations (9,10,13). For *Cryptococcus* species, CLSI has determined genotype-

specific ECOFFs, while EUCAST has published species-specific values. Recently, EUCAST has also suggested ECOFF values for *Fusarium* species (13). In addition to all these, particular attention should be paid to the epidemiological data of the country of origin during reporting. Abnormal /unprecedented/unique organisms with resistance profiles observed should be sent to reference laboratories. For example, *Candida glabrata* complex, which is phenotypically resistant to echinocandins and whose molecular resistance was also confirmed, has been recently reported (14). Again, voriconazole and echinocandin resistance in *Candida albicans* is very rare.

Broth microdilution (BMD) method takes a long time and is expensive, its plates have a short lifespan (six months or less at -70°C) and it requires serious experience. Its routine application is barely possible for most laboratories, and easier and more practical methods are required. So far, many methods have been tried, such as spectrophotometric devices (VITEK 2 Yeast AST, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), BMD+colorimetric kits (The Sensititre YeastOne - Thermo Scientific, Waltham MA, USA; Micronaut AM - Merlin Diagnostika, Berlin, Germany) and gradient strip tests (ETEST - bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France; MIC Test Strip - Liofilchem Srl. Roseto degli Abruzzi, Italy). Also, studies are carried out to examine antifungal susceptibility with “matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics GmbH; Co. KG, Bremen, Germany; VITEK®MS, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France)”. However, there are serious reliability issues with these tests. Actually, ECOFF and CBP data are method specific, and whether the threshold values determined for CLSI or EUCAST for BMD can be used in the interpretation of the results obtained by other methods have been the subject of many studies. CLSI standards are generally recommended with VITEK 2 Yeast AST (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and good agreement was observed. On the other hand, it has been reported that there may be problems in fluconazole analysis,

especially for *C. glabrata* complex and *C. kefyr*. In addition, interlaboratory variations have been reported and the narrow MIC range for AmB causes problems. It has been reported to have false-resistant results for some strains and antifungals (such as *Candida auris*) (5). The SensititreYeastOne (SYO) (Thermo Scientific, Waltham MA, USA) is a BMD-based method containing the alamarBlue indicator. This technique, which is in good harmony with CLSI, creates advantages such as long shelf life and easy usability. It should be noted that the lowest categorical agreement was observed with the reference methods for *C. glabrata* complex and *C. tropicalis*, although the researchers reported that they observed less than 1% major and minor errors. Micronaut AM (Merlin Diagnostika, Berlin, Germany) is also a SYO-like kit based on EUCAST. However, this technique still needs multicenter studies involving many strains. When the gradient strip method was performed with RPMI 1640 agar with 2% glucose, after 24 to 48 hours of incubation, azole and echinocandin (except caspofungin) in *Candida* isolates showed a 90% or more agreement with reference methods. Researchers especially stated that they did not encounter “very major error (susceptible result to resistant strain)” (5,7,15). Although such promising results have been observed, the authorities are still hesitant about the interpretation with ECOFF and CBP values in the routine laboratory, since these values are method-specific and significant variations were observed in interlaboratory studies. Therefore, it is essential to use reference methods (12).

Recently, EUCAST recommended the four-well azole-containing agar screening method (azole-agar screening) for *Aspergillus fumigatus* complex. This test is a method depending on whether there is a growth after inoculation of certain inoculum isolates on RPMI 1640 agar plates containing itraconazole, posaconazole and voriconazole and incubation for 48 hours. However, as the name suggests, it is a screening test, since resistant strains should be tested with the reference method for confirmation (15,16). The

performance of this test is relatively poor with sibling species (complex members other than *A. fumigatus sensu stricto*), also called cryptic strain (15,17). There are studies indicating same method to be used for echinocandins in *Aspergillus* species, but it has not been included in the guidelines yet (18).

Identification of fungi with the MALDI-TOF MS device has entered routine laboratory use. Since it is basically a mass spectrophotometry, studies have been carried out that it can also be used in the determination of the AFR profile. The method is based on the examination of the spectra of fungi exposed to the antifungal agent at different dilutions and their interpretation according to the minimum profile change concentration (MPCC). However, for now, there are problems of reproducibility, standardization, validation and profile library (5,7,13,15).

Culture independent molecular techniques are also in the agenda for the identification of fungi. SeptiFast (Roche, Basel, Switzerland) and T2 *Candida* system (T2 Biosystems, Lexington, MA, USA) for the detection and identification of *Candida* species, and AsperGenius (PathoNostics, Maastricht, Netherlands) and MycoGENIE (Ademtech, Pessac, France) kits for *Aspergillus* were developed. However, these kits do not comment on antifungal susceptibility. Molecular investigation of azole resistance in *Candida* species is challenging, as multiple mechanisms for resistance operate and their genetic origins are different. The problem in *Aspergillus* is that in only 30% of the azole-resistant strains the resistance mechanisms have been elucidated. In this context, searching for a resistance mutation for *A. fumigatus* complex by AsperGenius (PathoNostics, Maastricht, Netherlands) and MycoGENIE (Ademtech, Pessac, France) kits may provide some clinical benefit, but it is not yet recommended in the routine laboratory. On the other hand, echinocandin resistance in *Candida* species is generally based on the *FKS* mutations. Especially for *C. glabrata* complex, the demonstration of *FKS* mutations in cases of therapeutic failure may indicate that the strain may be resistant to echinocandins,

even in lack of any MIC data (7,12).

Clinical resistance can be encountered and therapeutic failure may occur even in such cases of susceptible MICs (90-60 rule) (12,15,19). Here it is necessary to explain the concepts of resistance. Microbiological resistance and clinical resistance are defined as different concepts. Microbiological resistance is determined by interpreting the MIC value with comparison of CBPs. Two concepts have also come into play for microbiological resistance; intrinsic resistance (IR) and acquired resistance. The terminology of IR is defined as the resistance of the microorganism to an antifungal drug due to its inherent functional or structural characteristics (lack of drug target, inability of the drug to penetrate the cell wall/membrane, etc.). This type of resistance is seen in all strains of that species and is independent of exposure to the antifungal drug. Acquired resistance is seen in some strains of that species that are normally susceptible to the antifungal drug, usually following exposure (clinical practice or environmental exposure). These two resistance profiles generally use the same molecular mechanisms. The IR status of fungi, which are frequently seen as clinical agents, are summarized in Table 2, whereas acquired resistance can be highly variable within the species. Clinical resistance, on the other hand, is the event that an infection does not resolve for various reasons despite appropriate treatment, and can be attributed to many reasons (Table 3) (19,20). In other words, while microbiological resistance is a laboratory terminology, clinical resistance is based on a clinical condition. Of course, within this concept, the question of compatibility of microbiological and clinical resistance, how resistance affect clinical success and at which MIC values comes into play.

Recommendations for reporting susceptibility by considering both the type of microorganism, the pharmacological properties of the antifungal, and the type/location of infection are presented in Table 4 (6).

**Table 2.** Intrinsic Resistance (adapted from references 6 and 8)

Organism/Antifungal	Fluconazole	Isavuconazole	Itraconazole	Posaconazole	Voriconazole	Echinocandins <sup>1</sup>	Flucytosine	Amphotericin B
<i>Candida krusei</i>	IR							
<i>Candida lusitanae</i>								*
<i>Cryptococcus</i> spp.						IR		
<i>Rhodotorula</i> spp.						IR		
<i>Trichosporon</i> spp.						IR		
Order of <i>Mucorales</i>	IR				IR	IR**		
<i>L. prolificans</i>	IR	UI	IR	IR	***	UI		UI
<i>Fusarium</i> spp.						UI		
<i>Purpureocillium lilacinum</i>								UI
<i>Aspergillus terreus</i> complex								NR****
<i>Aspergillus</i> spp.	IR						NR*****	

IR: Intrinsic Resistance; NR: No Reporting; UI: Under Investigation; <sup>1</sup>Micafungin, Anidulafungin and Caspofungin

\* *C. lusitanae* is not intrinsically resistant to Amb, but resistance may occur during treatment.

\*\* Order of *Mucorales* is accepted as intrinsically resistant to echinocandins in vitro. However, it can be effective in combination therapies. It is not recommended as a monotherapy agent.

\*\*\* *L. prolificans* is intrinsically resistant to azoles except voriconazole.

\*\*\*\* MIC values do not correlate with clinical outcome, AFST is not recommended.

\*\*\*\*\* For *Aspergillus* spp. flucytosine resistance cannot be detected due to pH issues in in vitro tests. Flucytosine can be effective in combination therapies.

**Table 3.** Factors Which Cause Clinical Resistance (adapted from references 49 and 50)

Level of immunosuppression	Directly related to immunity: Neutropenia, HIV etc.
Microorganism load	Onset of treatment and number of microorganisms at the site of infection
Acquired increase in virulence	Although AFR and virulence are inversely correlated, there is increased virulence of <i>C. glabrata</i> complex
Pharmacodynamic/ Pharmacokinetic properties	PD indexes, concentration in infection sites, presystemic elimination etc
Site of infection	Drug penetration, biofilm, link with AFR
Underlying diseases	Comorbidities
Duration of treatment	a. Incompatibility of clinician and/or patient with long term treatment protocols; b. Clinicians' perception of culture positivity as AFR despite successful antifungal treatment
Antibiotics ??	Some antibiotics' promoting effect on fungal growth?



**Table 4.** Recommendations for routine mycology (adapted from references 6, 8 and 13)

Antifungal	Specimen	Recommendation
Amphotericin B	All specimens	No limitation
Echinocandins	Urine	Not report echinocandins. Passage of echinocandins to urine below 1%.
Echinocandins	Ocular samples (cornea, aqueous and vitreous fluid)	Not report echinocandins. Penetration of echinocandins to ocular tissue is highly limited.
Echinocandins	Central Nervous System (CNS) Specimens (Tissue, Abscess, CSF)	Can be reported. Passage of echinocandins to CNS and CSF is weak, but they could reach to effective concentrations against <i>Candida</i> .
Azoles	Urine	Only test and report fluconazole
Azoles	Ocular specimens (Cornea, aqueous and vitreous fluid)	Report fluconazole and voriconazole
Azoles	CNS Specimen (Tissue, Abscess, CSF)	Report fluconazole and voriconazole

### Antifungal Susceptibility and Clinical Reflections

The relationship between clinical prognosis and AFR is not always correlated. “90-60” rule (probability of an infection caused by an antimicrobial-susceptible strain to respond to the correct treatment is 90%, the probability of response to treatment in an infection caused by a resistant strain is approximately 60%.)” is based on a large-scale study (15,19). On the other hand, some studies have found a significant relationship between outcome and microbiological resistance in certain strains;

a. Although the relationship between caspofungin MIC level and prognosis is controversial for *Candida* species (it should be noted that EUCAST and CLSI do not recommend the use of caspofungin for testing), previous echinocandin exposure, presence of *FKS* mutation, and echinocandin MIC levels are significantly meaningful especially for *C. glabrata* complex. It has been noted that the most

serious adverse effect on prognosis was that the strain showed echinocandin resistance in addition to previous echinocandin exposure. It seems clinically difficult to make an interpretation based on the MIC level alone (12). The issue of echinocandin resistance for *Aspergillus* species is not clear, the studies are very limited, and the place of echinocandins in the treatment of invasive aspergillosis (IA) is mostly in the form of combination therapies (21).

b. Although there are many studies on *Candida* infections and azole antifungals, it has not been possible to directly demonstrate the prognostic effect of azole resistance. Authorities draw attention to the necessity of randomized controlled studies on the subject (12). On the other hand, studies indicate that fluconazole MIC values are directly related to therapeutic success (22). The recommendation derived from these data is that this antifungal should not be preferred in infections of strains that

are generally resistant or have high MIC values. In *Aspergillus* species, the relationship between azole resistance and prognosis is much more evident; such that there are recommendations on this subject even in the ESCMID guidelines (21). Azole resistance of environmental origin (due to exposure to pesticides) has become serious in *Aspergillus* species, especially in some countries (such as the Benelux region). Therefore, in countries where the incidence of azole resistance is more than 10%, experts recommend adding an echinocandin to the initial voriconazole therapy (12). The ESCMID guideline strongly recommends the azole agar screening test and the species-level determination of clinical *Aspergillus* strains for routine laboratories, with a particular warning about cryptic species (21).

c. The issue of cryptococcosis is still obscure. Current treatment approach is with AmB (flucytosine may be added to this). Although it is stated that “step-down” can be realized later according to the susceptibility test results, the data on outcome with fluconazole MICs are very limited (12,23).

d. Studies for other rare yeasts and molds are scarce and although there are not enough data, the general principle is to pay attention to IR. Many organizations, especially ESCMID, have already published their guides (23,24).

### Mechanisms of Antifungal Resistance

**Azole Resistance:** Azoles target the enzyme lanosterol 14- $\alpha$  demethylase, which is dependent on cytochrome P450 in the synthesis of ergosterol. The synthesis of this enzyme is controlled by *ERG11* genes in yeasts and *Cyp51* genes in molds. Disruption of ergosterol synthesis in the cell membrane results in fungistatic effects in yeasts and fungicidal effects in molds. Azole resistance is basically based on three main mechanisms: i) up-regulation of the coding of the mentioned enzyme, ii) changes in the azole target site, iii) up-regulation of efflux pumps. Although the dominant mechanism varies according to the species, more than one mechanism may be active in one

strain (25).

In *Candida* species, these mechanisms include point mutations in the *ERG11* sequence, mutations in the regulatory domains of *ERG11* transcription (Upc2) and its associated upregulations (gain-on-function mutations - GOF) and/or Cdr1 and Cdr2 (ABC - “ATP” binding cassette type carrier), and upregulated by GOF mutations (in Tac1 and Mrr1 transcription factors) in efflux pumps. In general, changes in efflux pumps in *Candida* species are thought to be the most rapidly developing resistance mechanism after azole exposure. *ERG11* mutations are mostly concentrated in three “hot-spot (HS)” areas of the enzyme and for *C. albicans*, is especially effective on fluconazole MICs, itraconazole and voriconazole are not much affected by this mutation. The only exception is the Y132F substitution, where all three triazole MICs are affected. In addition to GOF mutations in regulatory domains in *ERG11*, there is chromosomal aneuploidy (chromosome 5). There are also specific cases for *C. glabrata* complex. The mutation of the *MSH2* gene, which encodes the protein involved in the DNA repair mechanism, has been found in most of the resistant strains, but a direct link with AFR has not been established yet. In the case of inhibition of ergosterol synthesis, *C. glabrata* complex also has a unique tolerance mechanism, that it compensate for the loss of its own ergosterol by ingesting serum cholesterol *in vivo*. Although this ingestion also exists in *C. albicans*, the mechanism of *C. glabrata* complex also works under anaerobic conditions and works more rapidly. In *C. parapsilosis* complex, the dominant resistance mechanism is the *ERG11* mutation (Y132F and K143R substitutions). Cross-resistance to other azoles is seen in 60% of fluconazole-resistant *C. parapsilosis* complex strains. *C. krusei* is inherently resistant to fluconazole (its mechanism has not yet been fully elucidated) but is mostly susceptible to other azoles. The major cause of resistance to other azoles is the intense azole exposure of the microorganism due to fluconazole prophylaxis. The high azole MICs seen in *Candida guilliermondii* complex are also thought to

be due to the *ERG11* mutation. There is no or very limited information on other *Candida* species showing high MIC levels (such as *Candida norvegensis*, *Candida inconspicua*, *Candida lipolytica*). It should be noted here that the main cause of fluconazole resistance in *Cryptococcus* species is *ERG11* mutations (20,25,26).

Fluconazole should not be used for mold infections and it has no *in vivo* activity. Two problems stand out with regard to azoles in *Aspergillus* species; i) data on the epidemiology of cryptic species are scarce, but these species may exhibit different resistance profiles, ii) due to environmental azole exposure (such as pesticides), azole-resistant *Aspergillus* rates of up to 30% have been observed in various regions of the world. EUCAST and CLSI have identified a limited number of ECOFF and CBPs related to molds. Warnings regarding cryptic species can be found in ESCMID's directory. Azole resistance in *Aspergillus* species is caused by polymorphisms in CYP51 protein and changes in azole target, increase in target enzyme coding and synthesis, and efflux pumps. In addition to these, biofilm and enzymatic degradation methods of the drug are also available. The CYP51 enzyme encoded by the *CYP51* gene is essential in *Aspergillus* azole resistance. *A. fumigatus* complex, *A. nidulans* and *A. niger* complex carry two *CYP51* paralogs (A and B), while *A. flavus* complex carries three paralogs (additional C). Acquired resistance is largely due to the *CYP51A* mutation and may be accompanied by *CYP51B*. Single *CYP51B* mutation is very rare and its association with resistance has not been demonstrated. *A. fumigatus* complex showing azole resistance but containing wild-type *CYP51A* is very rare. In fact, there are especially *A. flavus* complex strains that do not have a *CYP51* mutation but are evaluated as non-WT. Therefore, phenotypic tests are more valuable than molecular tests, and ESCMID/EUCAST or CLSI criteria should be followed in terms of both AFST and treatment. In addition to mutations, the "CYP51A promoter tandem repeat (TR)" status causes up-regulation of the *CYP51A* gene, leading to its increased coding, which brings

with it azole resistance. In this mechanism, TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A are the observed changes. In efflux pumps (ATP Binding Cassette - ABC and Major Facilitator Superfamily - MFS), very few genes have been shown to be related. It is thought that *cdr1* (*abcB*) from ABC family for *A. fumigatus* and *A. flavus* complex, and *mdrA*, *mfsA*, *mfsB* and *mfsC* from MFS family for *A. fumigatus* complex are thought to be related (21,25,26).

**Echinocandin Resistance:** Echinocandins (micafungin, caspofungin, anidulafungin, and rezafungin) block glucan synthesis in the fungal cell wall structure by targeting the (1-3)-B-D-glucan synthase enzyme non-competitively. Acquired resistance in *Candida* species is low (less than 3%). The exception is *C. glabrata* complex, and its resistance is reported to be increasing especially in the world. Echinocandin resistance is mainly caused by three mechanisms; i) stress response pathways (increased chitin synthesis), ii) acquired mutations in the *FKS* gene encoding the (1-3)-B-D-glucan synthase enzyme, iii) inherent *FKS* variations (*C. parapsilosis* complex and *C. guilliermondii* complex; MIC levels higher than those of acquired mutations). Resistance mutations in *C. albicans* and many other *Candida* species occur in the "hot spot" areas of *FKS1*. In addition, or singularly, *FKS2* mutations are observed in *C. glabrata* complex. The mutation disrupts the drug affinity of the target enzyme and increases the MIC levels. These heterozygous mutations in diploid *Candida* species pose a serious "cost & fitness" problem, which may explain why resistant strains are rare. It should be noted here that *C. glabrata* complex is haploid and echinocandin-resistant *C. glabrata* complex strains can even show cross-resistance with polyene and azole group antifungals. Although the resistance mechanisms of *C. auris* have not been fully elucidated, *FKS1* mutations have been shown (20,26,27).

Echinocandin resistance has also been observed in *Aspergillus* species, but *FKS* mutation has not been demonstrated in these strains. As a matter of fact,

although it was shown that *FKS1* was encoded in species such as the order of *Mucorales* and *Fusarium solani* complex, which are intrinsically resistant to echinocandins, there was not mutations. This indicates that resistance develops in these molds by a mechanism other than *FKS*, which needs further studies (26).

**Polyene Resistance:** AmB is a fungicidal drug, resistance is rare, as its resistance creates a serious “cost & fitness” problem. *C. guilliermondii* complex, *A. terreus* complex, some species of order of *Mucorales* and most *Fusarium* species are inherently resistant. It has been reported that some members of the *C. lusitaniae* and *C. haemulonii* complex show rapid resistance. Although it has been stated that *ERG11*, *ERG3*, *ERG2*, *ERG5* mutations which are heterozygous for *C. albicans* and *ERG2* and *ERG6* mutations in *C. glabrata* complex cause AmB cross-resistance, the mechanism of AmB resistance is still obscure. Such that, except for the *ERG6* mutation, all of them also have cross azole resistance. It is thought that methods of combating oxidative stress (such as “heat shock” proteins-Hsp, superoxide dismutase, catalase) are effective in *A. terreus* complex (20,26).

**“Cost & Fitness”, Antifungal Tolerance and Heteroresistance:** Although AFR ensures the survival of the microorganism, it comes with a price. Generally, the sporulation and growth rate of the microorganism are adversely affected, which leads to a decrease in its virulence. Studies on this subject in azole resistance mostly focused on *C. albicans* and fluconazole. It is noteworthy here that the loss of “fitness” is not due to a single mechanism, but with a cumulative effect. On the contrary, azole resistance developed in *C. glabrata* complex contributes to the virulence of the microorganism. A similar situation is experienced in echinocandin resistance. While *FKS* mutant *C. albicans* loses a degree of ability in reproduction, their hyphal capacity decreases and its virulence is negatively affected, there is no change in this sense for *C. glabrata* complex. AmB causes a great level of “Cost & Fitness”. AmB-resistant

organisms are highly susceptible to external stressors, including oxidative stress, and lose their virulence extensively (26).

When an antifungal susceptible organism is exposed to an antifungal, the ability of some subpopulations of the microorganism to grow even more slowly in the presence of that antifungal is considered as antifungal tolerance. This subpopulation is thought to have this capability via various mechanisms such as Hsp90 and calcineurin. In fact, this situation is defined as the “trailing” effect in *in vitro* AFST. In studies focusing especially on fluconazole and *C. albicans*, it has been stated that this is not exactly defined as resistance, it is directly related to the drug concentration encountered by the microorganism, but it has a therapeutic reflection, and persistent candidemia cases are experienced in such cases (26,28).

Heteroresistance is demonstrated especially in the azole exposure of *C. neoformans* complex. The issue here is that a “reversible resistance” is observed in the subpopulation of the microorganism. This group, which shows drug resistance on azole exposure, loses its “resistance” after the exposure is ended. This ability is thought to be due to the plasticity of cryptococcal genes. Combination therapies seem to be the key to therapeutic success in infections with both tolerant and heteroresistant strains. Because of this ability of cryptococci, combined antifungal treatments have been recommended by the guidelines in cryptococcosis infections (28).

*Candida* species are well-known for their ability to form biofilms. Due to their ability to adhere to surfaces, they can cause manifestations such as catheter-related infections. Although (1-3)- $\beta$ -D-glucan is the key molecule in the biofilm structure, biofilm formation is a multi-mechanical event. *Candida* biofilms show severe tolerance to antifungals. Although mutations that may cause resistance have been encountered, the main mechanism is the prevention of penetration of drugs by the glucan matrix (27).

## Epidemiology of Antifungal Resistance

AFST is an analysis that is laborious, expensive and unnecessary in all cases. Therefore, epidemiological data on AFR are of striking importance. On the other hand, as epidemiological studies have increased, microbiological resistance profiles that show serious variations even at the species level have been encountered (1).

Although *C. albicans* is the most common causative yeast all over the world, there are variations according to geographical areas in following rankings. *C. glabrata* complex, *C. parapsilosis* complex, *C. krusei* and *C. tropicalis* are the leading yeasts, while *Aspergillus* species lead among molds. Therefore, various studies have been conducted on AFR of these microorganisms. In general, fluconazole resistance is less than 1% for *C. albicans* and up to 11% for *C. glabrata* complex, for *C. tropicalis* (below 10%) and *C. parapsilosis* complex (2-5%), however there is an increasing trend in fluconazole resistance. *C. glabrata* complex raises the alarm all over the world in fluconazole resistance and the most serious rates are obtained from North America (10.6%). In addition, *C. parapsilosis* complex shows a similar trend in Europe and Latin America. Unlike *Candida* species, fluconazole resistance in *Cryptococcus* species is stable, however, fluconazole resistance increases up to 24% in relapsed cases (12,26,29,30).

The most serious problem in AFR is the increasing pattern of echinocandin resistance in *C. glabrata* complex and *C. krusei*. The cross-resistance of *C. glabrata* complex with azoles indicates that the treatment options are getting limited in the infections of this microorganism (26,28,29). Multidrug resistance (MDR) can also be seen in *Candida* species, that is generally with both acquired resistance and IR. MDR with singular acquired resistance is rare. *ERG3* and *ERG2* alterations may cause azole and AmB cross-resistance in *C. albicans* and *C. dubliniensis*. Interestingly, previous fluconazole treatment may be a trigger for echinocandin-resistant *C. glabrata* complex. Again, the site of infection (exposure to drug

concentrations below therapeutic doses; abdominal, mucosal areas, foreign body) and biofilm formation are important parameters for the development of MDR (31).

The most prominent representative of AFR today is *C. auris*. 93%, 35% and 7% of strains are resistant to fluconazole, AmB, echinocandins, respectively. 41% of strains are resistant to two different classes of antifungals, and 4% of strains are resistant to three different classes of antifungals. It has been on the world's microbiology agenda with its colonization, ability to survive on surfaces for weeks, and high resistance to disinfectants (32). Unfortunately, the recognition of this microorganism in routine laboratories is directly related to the awareness and technical capacity of laboratory specialists, as the microorganism is misidentified even with many semi-automated/automated methods. According to the records of the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *C. auris* has been reported from 47 countries as of February 2021, but this is actually thought to be higher (33). As a matter of fact, there have been consecutive notifications from Turkey (34,35). The CDC has published a recommendation guideline on when and in which cases screening programs for *C. auris* should be performed (33).

In the study of Calgin and Cetinkol (36), the resistance profile of clinical *Candida* isolates were studied with the VITEK 2 system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and AmB, flucytosine, fluconazole, voriconazole, caspofungin and micafungin resistance were 7.3%, 10%, 9.4%, 7.3%, 2% and 6.5%, respectively. The problem here is the automated system to give false resistant results, especially in some strains and antifungals, and the rates of echinocandin and AmB resistance are very remarkable. Yenisehirli et al. (37) studied AFST with gradient strip test in non-*albicans Candida* species, and they could not detect any strains non-susceptible to echinocandins, except for two *C. tropicalis* isolates, which were found to be in intermediate zone. They also did not find a *C. parapsilosis* complex strain with azole resistance. In

another study that meta-analysed *C. albicans* studies from Turkey, the average resistance to itraconazole and voriconazole was 23.2% and 14.6%. Fluconazole resistance was reported as 9.6% and none of the cases were echinocandin-resistant (38). It is obvious that *C. parapsilosis* complex has become a prevalent problem in Turkey over time. In the multicenter study of Hilmioglu-Polat et al. published in 2018 (39), although only *C. parapsilosis* sensu stricto strains were studied, 9.4% of fluconazole resistance and 4.5% of voriconazole resistance were found, and there was not any echinocandin and AmB resistance. This was followed by fluconazole-resistant *C. parapsilosis* complex clonal spread including *ERG11* Y132F/Y132F+K143R substitutions (40) and similar results were also supported by Demirci-Duarte et al. (41) (*C. parapsilosis* complex; fluconazole resistance is 13.3%; Y132F type resistance is 71.7%). Unfortunately, fluconazole non-susceptible strains have also been reported in *C. tropicalis* isolates (42). In another recently published study, fluconazole resistance was observed in 9.2% and itraconazole resistance in 45.8% in *C. glabrata* complex strains, while 43.4% of isolates were of the non-WT category for voriconazole (43). Considering the cross-resistance nature of *C. glabrata* complex, it has been claimed that if high fluconazole MIC levels and echinocandin *FKS* mutations are detected in coordination, it may be a prognostic factor for therapeutic failure (44). These studies show that azole treatment options are being lost in various strains for Turkey and that echinocandins are also under threat. As a matter of fact, in the large multicenter candidemia study of Arikan-Akdagli et al. (45), fluconazole resistance (7.7%) was observed in *C. parapsilosis* complex strains, but very low fluconazole resistance rates in *C. glabrata* complex strains and absence of resistant *C. tropicalis* strains were notifying. Furthermore, none of the isolates showed echinocandin resistance. On the other hand, this study was followed by the detection of *C. glabrata* complex isolates without phenotypic echinocandin resistance but with *FKS*

mutation (44). Just recently, clinical *C. glabrata* complex isolates with both phenotypic echinocandin resistance and *FKS* mutations were reported (14).

Studies on the epidemiology of *Aspergillus* infections and AFR in Turkey are very limited. The largest study belongs to the recently published 12-year data of Gülmez et al. (1), indicating that *A. fumigatus* complex (50.4%) was most frequently isolated in mold in lower respiratory tract samples, as expected, followed by other *Aspergillus* species (31.3%). However, the most important finding of this study was that there was a significant decrease in the isolation rates of *A. fumigatus* complex over a 12-year period, while numbers of other *Aspergillus* species and non-*Aspergillus* molds (*Penicillium* spp., order *Mucorales*, *Scedosporium* spp., *Alternaria* spp., *Paecilomyces* spp., dematiaceous fungi and unidentified molds) increased significantly. As a matter of fact, with the intensive use of antimicrobials especially in cystic fibrosis patients and the increase in the average life span of these patients, the isolation of different types of molds from the respiratory tract has also increased significantly (46). A clinical strain showing a *CYP51* mutation (TR34/L98H) which is resistant to azole group (itraconazole, voriconazole, posaconazole) drugs from Turkey was reported in 2015 during retrospective screening of laboratory isolates (47). Also in 2018, an *A. fumigatus* complex isolate respiratory sample of a cystic fibrosis patient with phenotypic azole resistance, but without *CYP51A* mutation (48). Obviously, azole-resistant *Aspergillus* is present in Turkey, but its prevalence is obscure.

Although the resistance profile in Turkey is not generally threatening for *Candida* species, one by one resistant cases are reported. It is obvious that a national surveillance network on AFR should be established in Turkey as well. In addition, awareness on *C. auris* needs to be increased, as it has already entered our agenda. Again, there is very little data on the resistance of clinical *Aspergillus* strains in Turkey, and the relationship of resistance

in *Aspergillus* species depending on the use of fungicide should also be investigated.

In conclusion, as IFIs show epidemiological changes and become more frequently recognized, studies on the use of antifungals have also increased, while AFR has come to the fore as one of the current problems. With *C. auris*, it is clear that it is necessary to put an end to the relative “ignorance of fungi”.

Phenotypic AFST methods allow the demonstration of resistance status regardless of fungal species, even

with defined or not yet defined mechanisms. However, they require serious experience and expertise and in some cases, there are problems with MIC detection and accurate interpretation due to variations between laboratories. As a matter of fact, molecular methods can provide an advantage to the laboratory tests when detecting AFR. However, its place in routine laboratories is still controversial (20). Currently, other than the CLSI and EUCAST reference methods, none of the AFST methods could be recommended.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## KAYNAKLAR

1. Gülmez D, Siğ AK, Akar N, Duyan S, Arıkan-Akdağlı S. Changing trends in isolation frequencies and species of clinical fungal strains: what do the 12-years (2008-2019) mycology laboratory data tell about? Mikrobiyol Bul, 2021; 55(1): 53-66.
2. Vasileiou E, Apsemidou A, Vyzantiadis TA, Tragiannidis A. Invasive candidiasis and candidemia in pediatric and neonatal patients: A review of current guidelines. Curr Med Mycol, 2018; 4(3): 28-33.
3. Mellinshoff SC, Hoenigl M, Koehler P, Kumar A, Lagrou K, Lass-Flörl C, et al. EQUAL Candida score: An ECMM score derived from current guidelines to measure qUAlity of clinical candidaemia management. Mycoses, 2018; 61(5): 326-30.
4. Cornely OA, Koehler P, Arenz D, Mellinshoff SC. EQUAL aspergillosis score 2018: An ECMM score derived from current guidelines to measure quality of the clinical management of invasive pulmonary aspergillosis. Mycoses, 2018; 61(11): 833-6.

5. Knabl L, Lass-Flörl C. Antifungal susceptibility testing in *Candida* species: current methods and promising new tools for shortening the turnaround time. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2020; 18(8):779-87.
6. Clinical Laboratory Standards. CLSI Winter 2021 Susceptibility Testing Meeting Series. 25 Jan - 24 Feb, USA. 2021.
7. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal susceptibility testing: current approaches. *Clin Microbiol Rev*, 2020; 33: e00069-19.
8. <https://www.uptodate.com/contents/image?csi=ea2fe15b-d805-4099-a52c-d554066975cb&source=contentShare&imageKey=ID%2F52140>, Date of Access: 20 July 2021.
9. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, Version 10.0, valid from 2020-02-04. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Clinical\\_breakpoints/AFST\\_BP\\_v10.0\\_200204\\_updatd\\_links\\_200924.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/AFST_BP_v10.0_200204_updatd_links_200924.pdf), Date of Access: 24 July 2021.
10. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. 1st ed. CLSI supplement M60. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
11. Performance standards for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 2nd ed. CLSI supplement M61. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
12. Bassetti M, Vena A, Bouza E, Peghin M, Muñoz P, Righi E, et al. Antifungal susceptibility testing in *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* infections: are the MICs useful for clinicians? *Clin Microbiol Infect*, 2020; 26(8): 1024-33.
13. Kidd SE, Crawford LC, Halliday CL. Antifungal susceptibility testing and identification. *Infect Dis Clin N Am*, 2021; 35(2): 313-39.
14. Sig AK, Sonmezer MC, Gülmez D, Duyan S, Uzun Ö, Arikian-Akdagli S. The emergence of echinocandin-resistant *Candida glabrata* exhibiting high MICs and related FKS mutations in Turkey. *J Fungi*, 2021; 7: 691.
15. Sanguinetti M, Posteraro B. Susceptibility testing of fungi to antifungal drugs. *J Fungi (Basel)*, 2018;4(3):110.
16. Guinea J, Verweij PE, Meletiadis J, Mouton JW, Barchiesi F, Arendrup MC, et al. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E. Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. *Clin Microbiol Infect*, 2019; 25(6): 681-7.
17. Serrano-Lobo J, Gómez A, Rodríguez-Sánchez B, Muñoz P, Escribano P, Guinea J. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* clinical isolate screening in azole-containing agar plates (EUCAST E. Def 10.1): low impact of plastic trays used and poor performance in cryptic species. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021; 65(8): e00482-21.
18. Meletiadis J, Siopi M, Kanioura L, Jørgensen KM, Perlin DS, Mouton JW, et al. Development and multicentre validation of an agar-based screening method for echinocandin susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Antimicrob Chemother*, 2019; 74(8): 2247-54.
19. Rex JH, Pfaller MA, Michael A. Has antifungal susceptibility testing come of age?. *Clin Infect Dis*, 2002; 35(8): 982-9.
20. Morio F, Jensen RH, Le Pape P, Arendrup MC. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. *Int J Antimicrob Agents*, 2017; 50(5): 599-606.
21. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikian-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*, 2018; 24(Suppl 1): e1-38.
22. Eschenauer GA, Carver PL. The evolving role of antifungal susceptibility testing. *Pharmacotherapy*, 2013; 33(5): 465-75.
23. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect*, 2014; 20 (Suppl 3): 76-98.



24. Cornely O, Arikan-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. *Clin Microbiol Infect*, 2014; 20(Suppl 3): 5-26.
25. Garcia-Effron G. Molecular markers of antifungal resistance: potential uses in routine practice and future perspectives. *J Fungi*, 2021; 7(3): 197.
26. Ben-Ami R, Kontoyiannis DP. Resistance to antifungal drugs. *Infect Dis Clin North Am*, 2021; 35(2): 279-311.
27. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015; 5:a019752.
28. Perfect JR, Ghannoum M. Emerging issues in antifungal resistance. *Infect Dis Clin North Am*, 2020; 34(4): 921-43.
29. Arastehfar A, Gabaldón T, Garcia-Rubio R, Jenks JD, Hoenigl M, Salzer HJ, et al. Drug-resistant fungi: an emerging challenge threatening our limited antifungal armamentarium. *Antibiotics*, 2020; 9(12): 877.
30. Hendrickson JA, Hu C, Aitken SL, Beyda N. Antifungal resistance: a concerning trend for the present and future. *Curr Infect Dis Rep*, 2019; 21(12): 1-8.
31. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis*, 2017; 216 (Suppl 3): 445-51.
32. Černáková L, Roudbary M, Brás S, Tafaj S, Rodrigues CF. *Candida auris*: a quick review on identification, current treatments, and challenges. *Int J Mol Sci*, 2021; 22(9): 4470.
33. *Candida auris*. <https://www.cdc.gov/fungal/Candida-auris/index.html>, Date of Access: 29 September 2021.
34. Kurt AF, Kuskucu MA, Balkan II, Baris A, Yazgan Z, Oz AS, et al. *Candida auris* fungemia and a local spread taken under control with infection control measures: first report from Turkey. *Indian J Med Microbiol*, 2021; 39(2): 228-30.
35. Kömeç S, Karabiçak N, Ceylan AN, Gülmez A, Özalp O. Three *Candida auris* case reports from Istanbul, Turkey. *Mikrobiyol Bul*, 2021; 55(3): 452-60.
36. Calgin MK, Cetinkol Y. Distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species at a university hospital in Northern Turkey. *J Infect Dev Ctries*, 2018; 12(02): 97-101.
37. Yenisehirli G, Ozveren G, Yenisehirli A, Bulut Y. In vitro susceptibilities of non-albicans *Candida* species to echinocandins, azoles, and amphotericin B in Tokat, Turkey. *Jundishapur J Microbiol*, 2018; 11(6): e59404.
38. Kilbas I, Çiftci IH. A comprehensive meta-analysis of antifungal resistance in *Candida albicans* in Turkey. *Int J Clin Med Res*, 2017; 4(4): 44-50.
39. Hilmiöglu-Polat S, Sharifynia S, Öz Y, Aslan M, Gündođdu N, Serin A, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto* isolated from bloodstream infections in Turkish patients. *Mycopathologia*, 2018; 183(4): 701-8.
40. Arastehfar A, Hilmiöglu-Polat S, Daneshnia F, Pan W, Hafez A, Fang W, et al. Clonal candidemia outbreak by *Candida parapsilosis* carrying Y132F in Turkey: evolution of a persisting challenge. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021; 11: 676177.
41. Demirci-Duarte S, Arikan-Akdagli S, Gülmez D. Species distribution, azole resistance and related molecular mechanisms in invasive *Candida parapsilosis* complex isolates: increase in fluconazole resistance in 21 years. *Mycoses*, 2021; 64(8): 823-30.
42. Arastehfar A, Hilmiöglu-Polat S, Daneshnia F, Hafez A, Salehi M, Polat F, et al. Recent increase in the prevalence of fluconazole-non-susceptible *Candida tropicalis* blood isolates in Turkey: clinical implication of azole-non-susceptible and fluconazole tolerant phenotypes and genotyping. *Front Microbiol*, 2020; 11: 2383.

43. Kaan Ö, Koç AN, Atalay MA, Sarigüzel FM. Molecular epidemiology, antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida glabrata* complex strains in Kayseri/Turkey. *Microb Pathog*, 2021; 154: 104870.
44. Arastehfar A, Daneshnia F, Salehi M, Yaşar M, Hoşbul T, Ilkit M, et al. Low level of antifungal resistance of *Candida glabrata* blood isolates in Turkey: fluconazole minimum inhibitory concentration and FKS mutations can predict therapeutic failure. *Mycoses*, 2020; 63(9): 911-20.
45. Arıkan-Akdagli S, Gülmez D, Doğan Ö, Çerikçioğlu N, Dereli MD, Birinci A, et al. First multicentre report of in vitro resistance rates in candidaemia isolates in Turkey. *J Glob Antimicrob Res*, 2019; 18: 230-4.
46. Irmak İ, Damadoğlu E, Karadeniz Güven DK, Huseynova X, İnkaya AÇ, Er Berrin, et al. Clinical implications of fungal isolation from sputum in adult patients with cystic fibrosis. *Turk J Med Sci*, 2021; 51(3): 1191-200.
47. Özmerdiven GE, Ak S, Ener B, Ağca H, Cilo BD, Tunca B, et al. First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in Turkey. *J Infect Chemother*, 2015; 21(8): 581-6.
48. Güngör Ö, Sampaio-Maia B, Amorim A, Araujo R, Erturan Z. Determination of azole resistance and TR 34/L98H mutations in isolates of *Aspergillus section fumigati* from Turkish cystic fibrosis patients. *Mycopathologia*, 2018 183(6): 913-20.
49. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*, 2008; 46(1): 120-8.
50. de Aguiar Cordeiro R, da Silva BN, de Aguiar ALR, Pereira LMG, Portela FVM, da Rocha MG, et al. Vancomycin enhances growth and virulence of *Trichosporon* spp. planktonic cells and biofilms. *Med Mycol*, 2021; 59(8): 793-801.

## TELİF HAKKI DEVİR FORMU / COPYRIGHT TRANSFER FORM



**HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH**  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Makale Türü/Article Type: ...../...../20...

(...) Araştırma/Research (..) Derleme/Review (..) Olgu Sunumu/Case Report

(..) Editöre Mektup/Letter to Editor (..) Teknik Rapor/Technical Report

Makale Başlığı/Article Entitled : .....

Sayın Editör,

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;

1. Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orjinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Makalenin; derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
3. Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
4. Yayın haklarının Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here, we affirm and warranty as the author(s) of this manuscript submitted to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology that;

1. The article I / We submitted to the Bulletin is original and responsibilities are belong to us ethically and scientifically,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under the evaluation of this bulletin,
3. The article contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal rights and copyrights,
4. The article publishing rights belong to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.

(...1) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...2) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...3) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...4) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...5) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

Not / Note :

1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)
2. Formu aşağıdaki adrese gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below or deliver personally

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology  
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 E Blok Park Girişi 06100 Sıhhiye-ANKARA-TURKEY

Tel/Phone : +90 312 565 55 80

Faks/Fax : +90 312 565 55 91

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

