



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

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

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

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 79 ■ Sayı/Number 4 ■ Yıl/Year 2022

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü adına

On behalf of General Directorate of Public Health

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)

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

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

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

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

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

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

Aralık - 2022 / December - 2022

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç

Anna PAPA, Yunanistan

Aziz SANCAR, ABD

Cristina DOMINGO, Almanya

Daniel MOTLHANKA, Botsvana

Dwight D. BOWMAN, ABD

Isme HUMOLLI, Kosova

Isuf DEDUSHAJ, Kosova

Iva CHRISTOVA, Bulgaristan

Johan LINDH, İsveç

Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail

Manfred WEIDMANN, İngiltere

Paul HEYMAN, Belçika

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba

Sıraç DİLBER, İsveç

Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya

Takashi AKAMATSU, Japonya

Varalakshmi ELANGO, Hindistan

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Alanya

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Ankara

Banu ÇAKIR, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Afyonkarahisar

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Cemile SÖNMEZ, Ankara

Çağatay GÜLER, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Ebubekir CEYLAN, Ankara

Emrah RUH, Kıbrıs

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fehminaz TEMEL, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnaz ÇULHA, Hatay

Gülnur TARHAN, Adıyaman

Hakan ABACIOĞLU, İzmir

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

Hanefi ÖZBEK, İzmir

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

I) AMAÇ VE KAPSAM

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

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

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

II) YAYIN İLKELERİ

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

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

Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.

III) TELİF VE LİSANS

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

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

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

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

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

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

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

V) ÜCRET POLİTİKASI

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

VI) ETİK KURALLAR

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

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

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

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

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

VII) YAZI DİLİ

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

VIII) YAZIM KURALLARI

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

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

Yayımlanmak üzere gönderilecek yazılar;

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

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

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

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

a. Yazının başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.

b. Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.

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

şirkette bir ilişki yoksa, başvuru yazısında belirtilmelidir.

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

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

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

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

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

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

8. Araştırma yazıları;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- **Standart dergi makalesi için örnek:** Demirci M, Ünlü M, Şahin Ü. A case of hydatid lung cyst diagnosed by kinyoun staining of bronco-alveolar fluid. *Türkiye 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 bulunma ya da bilim haberi niteliği taşıyacak bilgilerin iletilmesi amacıyla yazılan yazılar, Yayın Kurulu'nun inceleme ve değerlendirmesinin ardından yayınlanır. Editöre Mektup bir sayfayı aşmamalı ve kaynak sayısı en fazla 10 olmalıdır.

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

14. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

15. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

I) AIM and SCOPE

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

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

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

II) PUBLISHING POLICY

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

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

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

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

III) COPYRIGHT and LICENSING

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

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

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

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

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

IV) OPEN ACCESS POLICY

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

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

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

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

V) PRICE POLICY

Article submission, evaluation and publication are free.

VI) ETHICAL RULES

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

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

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

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

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

VII) LANGUAGE of the JOURNAL

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

VIII) WRITING RULES

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

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

Articles to be submitted for publication;

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

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

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

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

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

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

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

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

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

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

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

8. Research Articles;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ETİK İLKELER VE YAYIN POLİTİKASI

ETİK İLKELER

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

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 yanılma olmaması, karar ve hükümlerin uygunluğunu) etkileyebilecek herhangi bir rekabetçi çatışma varsa çıkar çatışmasının mevcut olduğunu belirtmektedir.

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

Yazarlar inceleme sürecinde bölüm editörlerinden 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 özgünlük ve bilim literatürüne katkıdır.

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

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

ETHICAL PRINCIPLES AND PUBLICATION POLICY

ETHICAL PRINCIPLES

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

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

CONFLICT OF INTEREST POLICY

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

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

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

PUBLICATION POLICY and PEER REVIEW PROCESS

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

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 80

Fax : +90 312 565 55 91

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

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız.

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

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

Furthermore, please check.

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

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

INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL

Scopus

ResearchGate

CAS
A Division of the American Chemical Society

Google
scholar beta

Academic Journals Database
disseminating
quality controlled scientific knowledge

EBSCO
HOST
Electronic
Journals
Service

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

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

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Investigation of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species in atypical pneumonia patients
Atipik pnömonili hastalarda *Legionella pneumophila* ve diğer *Legionella* türlerinin araştırılması
Kerim PARLAK, Ayşegül GÖZALAN, Sibel AYDOĞAN, Adem KOYUNCU, Hatice Canan HASANOĞLU, Selin NAR OTGÜN, Ziya Cibali AÇIKGOZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.45722 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 588 - 597 
2. Evaluation of two SARS-CoV-2 lateral flow antibody kits for serological diagnosis of COVID-19
COVID-19 serolojik tanısında iki SARS-CoV-2 lateral flow antikor kitinin değerlendirilmesi
Derya ALTUN, Yasemin COŞGUN, Hakan Farzin MEHMETZADE, Fatma Gülay KORUKLUOĞLU
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.34966 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 598 - 605 
3. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizma dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları: iki yıllık değerlendirme
Distribution and antibiotic susceptibility of microorganisms isolated from blood cultures of patients hospitalized in intensive care units: a two-year evaluation
Tuğçe ŞİMŞEK BOZOK, Taylan BOZOK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.26937 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 606 - 615 
4. In vitro efficacy and field effectiveness of silica-based acaricide against *Dermanyssus gallinae*
Dermanyssus gallinae mücadelesinde silika bazlı akarisitlerin in vitro etkinliği ve saha koşullarında etkililiği
Nafiye KOÇ, Serpil NALBANTOĞLU
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.43799 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 616 - 621 
5. Tüberküloz tanısında LED floresan mikroskopi performansının değerlendirilmesi
Evaluation of the performance of LED fluorescent microscopy in diagnosis of tuberculosis
Gizem ERDAL, Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Nuri ÖZKÜTÜK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.46244 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 622 - 631 
6. Evaluate the effects of rosmarinic acid in ovariectomized rats: urethane-induced cortical oscillations
Ovariyektomize sıçanlarda rosmarinik asidin etkilerinin değerlendirilmesi: ürethan indüklü kortikal osilasyonlar
Deniz KANTAR, Alev Duygu ACUN, Hakan ER
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.68815 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 632 - 645 
7. COVID-19 pandemisinin Mersin ilindeki tüberküloz kontrolüne etkisi
Impact of the COVID-19 pandemic on tuberculosis control in Mersin province
Gönül ASLAN, Harun GÜLBUDAK, Nuran DELİALİOĞLU, Hamide KAYA, Asena Ayça ÖZDEMİR
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.88965 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 646 - 655 
8. Ticari broiler ve yumurtacı tavuklarda ELISA ile *Mycoplasma synoviae* seropozitifliği
Seropositivity of *Mycoplasma synoviae* by ELISA in commercial broiler and layer chickens
Gülşen GONCAGÜL, Elçin GÜNAYDIN, Özlem KARDOĞAN, Yavuz ÇOKAL
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.20846 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 656 - 665 
9. Seropositivity of HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV and Anti-HIV in patients admitted to Siirt Training and Research Hospital
Siirt Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran hastalarda HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV ve Anti-HIV seropozitifliği
Osman ÖZÜDOĞRU, Ömer ACER
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.89804 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 666 - 673 
10. e-Sağlık okuryazarlığı ölçeği: 45 yaş üstü yetişkinlerde Türkçe geçerlik ve güvenilirlik çalışması
e-Health literacy scale: Turkish validity and reliability study for adults over 45
Ersin USKUN, Edanur DOĞAN, Özgür ÖNAL, Ahmet Nesimi KİŞİOĞLU
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.75608 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 674 - 689 
11. Nested-PCR Assay for molecular identification of cutaneous leishmaniasis species using kinetoplast DNA gene in Mirjaveh and Reg-e Malek provinces (IRAN)
Mirca ve Reg-e Malek (Iran) kentlerinde kutanöz leishmaniasis türlerinin Nested-PCR ile kinetoplast DNA geni kullanılarak yapılan moleküler tanımlanması
Hadi MIRAHMADI, Farzaneh GORGANI, Maliheh METANAT, Soudabeh ETEMADI, Seyed Mehdi TABATABAEI, Mohammad Kazem MOMENI
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.06887 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 690 - 701 
12. Prenatal ve emzirme döneminde maruz kalınan tiamin eksikliğinin yetişkinlikte davranış, öğrenme ve hafızaya etkileri
Effects of thiamine deficiency exposed during prenatal and lactation on behaviour, learning and memory in adulthood
Betül DANIŞMAN, Güven AKÇAY, Deniz KANTAR GÖK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.22120 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 702 - 713 

13. Precision and trueness verification of TSH, Ferritin and Vitamin B12 on Beckman Dxi 800
TSH, Ferritin ve Vitamin B12 testlerinin Beckman Dxi 800 cihazında kesinlik ve doğruluk
verifikasyonu

Gökçe Filiz ATIKELER, Nergiz ZORBOZAN

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.69397 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

714 - 719



14. Apilarnil protects the LPS induced endotoxemic heart

Apilarnil LPS ile indüklenen endotoksemik kalbi korur

Aslı OKAN, Emin KAYMAK, Arda Kaan ÜNER, Sibel SİLİCİ, Züleyha DOĞANYİĞİT

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.78200 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

720 - 729



15. Oxytocin administration improves DNA damage and total oxidative stress parameters in vincristine and cisplatin-induced cortical neuron toxicity

Oksitosin uygulaması vinkristin ve sisplatin kaynaklı kortikal nöron toksitesinde DNA hasarını ve toplam oksidatif stres parametrelerini iyileştirir

Betül ÇİÇEK, Ali TAGHİZADEHGHJALEHJOUGHİ, Serkan YILDIRIM, Gizem ESER, Mustafa GÜL, Mecit KANTARCI, Ahmet HACIMUFTUOĞLU

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.70846 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

730 - 739



16. Salmonella Typhimurium and Salmonella Hessarek in wild birds

Vahşi kuşlarda Salmonella Typhimurium ve Salmonella Hessarek

Elçin GÜNAYDIN, Özlem KARDOĞAN, Gülsen GONCAGÜL, Yavuz ÇOKAL, Pınar MURSALOĞLU KAYNAR

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.34538 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

740 - 747



■ Teknik Rapor / Technical Report

17. Baş biti enfestasyonlarının etkin kontrolü için uluslararası tavsiyeler

International recommendations for an effective control of head louse infestations

Koşa Y. MUMCUOĞLU, Richard J. POLLACK, David REED, Stephen BARKER, Shirley GORDON, Ariel Ceferino TOLOZA, Maria Ines PICOLLO, Aysegül TAYLAN ÖZKAN, Olivier CHOŚIDOW, Birgit HABEDANK, Joanna IBARRA, Terri L. MEINKING, Robert VANDER STICHELE

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.78872 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

748 - 761



■ Derleme / Review

18. How to detect SARS-CoV-2: A brief review about molecular diagnosis techniques

SARS-CoV-2 nasıl tespit edilir: Moleküler tanı teknikleri hakkında kısa bir inceleme

Ahmet ÇARHAN, Ender ŞİMŞEK, Özen ÖZENSOY GÜLER

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.87533 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

762 - 775



19. Pandemi süreci kapsamında biyolojik ve kimyasal silahlar ve alınacak tedbirler

Evaluation of biological and chemical weapons in the scope of the pandemic process and the measures to be taken

Ali Gürkan ARSLAN, Özlem BARIŞ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.41017 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

776 - 783



20. Yangı (iltihap, inflamasyon) süreçlerinde otakoidler

Autacoids in the inflammation

Serkan KEMER, Sefa METİN, Gökçe SURAL, Emine DEMİREL YILMAZ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.66742 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

784 - 801



Investigation of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species in atypical pneumonia patients

Atipik pnömonili hastalarda *Legionella pneumophila* ve diğer *Legionella* türlerinin araştırılması

Kerim PARLAK¹ (ID), Ayşegül GÖZALAN² (ID), Sibel AYDOĞAN³ (ID), Adem KOYUNCU⁴ (ID), Hatice Canan HASANOĞLU⁵ (ID), Selin NAR ÖTÜN⁶ (ID), Ziya Cibali AÇIKGÖZ⁷ (ID)

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to investigate *Legionella* species in 50 patients with atypical pneumonia, using culture, urinary antigen test and molecular techniques.

Methods: Non-selective BCYE- α media (Oxoid, England) and selective BMPA media (Oxoid, England) were used to isolate *Legionella* spp. from respiratory tract samples. The urinary samples of the patients were tested with the Alere BinaxNOW *Legionella* Urinary Antigen Card (Abbott, US) test to identify the presence of *L. pneumophila* serogroup 1 specific bacterial antigen. All respiratory tractsamples were tested with a commercial Duplica RealTime *Legionella pneumophila* 23S rRNA specific region detection kit (Euroclone Diagnostica, Italy) and two home-made PCR methods. Home-made gel electrophoresis PCR tests were performed using Leg primers designed from 16S ribosomal RNA gene partial sequences for *Legionella* spp and primers targeting the Lmip (macrophage

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada atipik pnömoni tanısı alan 50 hastada kültür, üriner antijen testi ve moleküler yöntemler kullanarak *Legionella* türlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Solunum yolu örneklerinden *Legionella* türlerinin izolasyonu için seçici olmayan BCYE- α (Oxoid, İngiltere) ve seçici BMPA (Oxoid, İngiltere) besiyerleri kullanılmıştır. İdrar örneklerinde *L. pneumophila* serogrup 1'e özgü bakteriyel antijenin varlığı Alere BinaxNOW *Legionella* Üriner Antijen Kart (Abbott, ABD) testi ile araştırılmıştır. Tüm solunum yolu örnekleri Duplica RealTime *Legionella pneumophila* 23S rRNA spesifik bölgesini saptayan (Euroclone Diagnostica, İtalya) ticari kit ve iki laboratuvar yapımı PCR yöntemi ile test edilmiştir. Laboratuvar yapımı jel elektroforez PCR testinde *Legionella* spp. için 16S ribozomal RNA gen kısmi dizilerinden tasarlanan Leg primerleri ve *L. pneumophila* için Lmip (macrophage infectivity potentiator) genini hedefleyen primerler

¹Şanlıurfa Training and Research Hospital, Department of Medical Microbiology, Şanlıurfa

²Alanya Alaaddin Keykubat University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Alanya, Antalya

³Ankara City Hospital, Department of Medical Microbiology, Ankara

⁴Atatürk Chest Disease and Chest Surgery Research and Training Hospital, Department of Occupational Diseases, Ankara

⁵Ankara Yıldırım Beyazıt University, Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Ankara

⁶General Directorate of Public Health, National Reference Laboratory for Respiratory Pathogens, Ankara

⁷Ankara Yıldırım Beyazıt University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Kerim PARLAK

Şanlıurfa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Şanlıurfa - Türkiye

E-posta / E-mail : kerimparlak1@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 18.04.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 29.09.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.45722

Parlak K, Gözalan A, Aydoğan S, Koyuncu A, Hasanoğlu HC, Nar Ötün S, Açıkgöz ZC. Investigation of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species in atypical pneumonia patients. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 588 - 597

infectivity potentiator) gene for *L. pneumophila*. In the home-made real-time PCR test, primers targeting the lipopolysaccharide (lps) biosynthesis gene of *L. pneumophila* serogroup-1, the *L. pneumophila* mip gene, and the Legionella spp DNA region encoded by the 16S ribosomal RNA gene were used.

Results: The commercial Real-time PCR assay identified the sequence of *L. pneumophila* 23S rRNA gene specific region in seven respiratory tract samples. Five samples were detected as Legionella spp. in home-made gel electrophoresis-based PCR and home-made Real-time PCR assay. However, all samples tested negative in the urinary antigen card test for *L. pneumophila* serogroup 1.

Conclusion: We conclude that the PCR positivities with three different molecular methods indicate that *Legionella* species other than *L. pneumophila* serogroup 1 should be investigated in the patients with atypical pneumonia using molecular methods. Also, our study demonstrates the significance of PCR methods in the investigation of Legionella species in clinical samples taken from patients with negative test results for *L. pneumophila* serogroup 1 specific urinary antigen test, but who are clinically considered to have *Legionella pneumoniae*.

Key Words: Legionella, *L. pneumophila*, Polymerase Chain Reaction (PCR), urine antigen, atypical pneumonia

kullanılmıştır. Laboratuvar yapımı Real-time PCR testinde ise, 16S ribozomal RNA geni tarafından kodlanan Legionella spp. DNA bölgesini, *L. pneumophila* mip genini ve *L. pneumophila* serogrup 1'in lipopolisakkarit (lps) biyosentez genini hedefleyen primerler kullanılmıştır.

Bulgular: Solunum yolu örneklerinden yedisinde ticari Real-time PCR testi ile *L. pneumophila* 23S rRNA genine spesifik bölge saptanmıştır. Bu örneklerden beşi Laboratuvar yapımı jel elektroforez tabanlı PCR ve laboratuvar yapımı Real-time PCR testleri ile Legionella spp. olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, *L. pneumophila* serogrup 1 için üriner antijen testi tüm örneklerde negatif bulunmuştur.

Sonuç: Sonuç olarak; üç farklı moleküler yöntemle saptanan PCR pozitiflikleri, atipik pnömoni hastalarında *L. pneumophila* serogrup 1 dışındaki Legionella türlerinin de araştırılması gerektiğini düşündürmektedir. Çalışmamız özellikle *L. pneumophila* serogrup 1'e spesifik üriner antijen test negatifliği saptanan ancak klinik olarak *Legionella* pnömonisi olduğu düşünülen hastalardan alınan klinik örneklerin PCR yöntemi ile de araştırılmasının önemli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Legionella, *L. pneumophila*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), üriner antijen, atipik pnömoni

INTRODUCTION

Legionnaires' disease results from infections caused by the members of the *Legionellaceae* family. The *Legionellaceae* family includes at least 60 species and among these, *L. pneumophila* serogroup 1 is the most common pathogen. Responsible for approximately 90% of all *Legionella* infections (1,2).

Legionellaceae are commonly found in external environments due to their acid resistance and ability to survive in natural/artificial water systems and at high temperatures up to 66°C. These bacteria are transmitted to humans through the aerosolization of contaminated water (3).

Legionella infections are classified as nosocomial, community-acquired, and travel-acquired infections

(4). The cases can present sporadically or as outbreaks. Furthermore, they can cause hospital-acquired infections due to the bacterial contamination of hospital water systems or equipment (1,3,5).

The clinical picture associated with this microorganism can range from Pontiac fever associated with mild flu-like symptoms to severe pneumonia, also known as Legionnaires' disease. This bacterium can be fatal for the immunocompromised and individuals with underlying diseases or if left untreated (3,5).

Microbiological laboratory tests are crucial for differential diagnosis since it is almost impossible to differentiate Legionnaires' disease from other types of pneumonia solely through clinical and radiological examinations. Some of the genotypic and phenotypic examination methods used for diagnosis include bacterial culture, direct immunofluorescent antibody (DFA), urinary antigen, and serological and molecular tests (3,6,7).

This study aims to investigate the presence of *Legionella* species using bacterial culture, polymerase chain reaction (PCR), and urinary antigen methods in patients who were diagnosed with atypical pneumonia at chest diseases clinic of a tertiary hospital in Ankara, Turkey.

MATERIAL and METHOD

We investigated the presence of *Legionella* species in the respiratory tract and urine samples of 50 patients with atypical pneumonia diagnosis [35 males (70%) and 15 females (30%)] that had been treated at the Chest Diseases Clinic between October 2014 and January 2016. The patients involved in the study, besides having had pneumoniae, additionally had one or several of the following clinical or laboratory features: CNS abnormalities (irritation, mental confusion, stupor, lethargy, coma); cardiac abnormalities (relative bradycardia); gastrointestinal manifestations (abdominal pain, diarrhea); hepatic involvement (early or mild transient elevations

of the serum transaminases); and/or electrolyte abnormalities (hypophosphataemia, hyponatraemia).

Bacterial isolation

In order to isolate *Legionella* species from patients' respiratory tract samples, we used the standard non-selective BCYE- α medium (ACES Buffer/ Potasyum hidroksid 5,0 g/500 ml; Ferrik pirofosfat 0,125 g/500 ml; L-sistein HCl 0,20 g/500 ml; α -ketoglutarat 0,50 g/500 ml) and the *Legionella*-selective BMPA medium [polymyxin B (8000 IU), anisomycin (8.0 mg), cefamandole (400mcg)] together. 49 sputum and one bronchoalveolar lavage fluid (BAL) samples were examined with gram staining and inoculated in 5% sheep blood agar, EMB, chocolate agar, BCYE- α (Oxoid, UK) and BMPA (Oxoid, UK) media. Approximately 1 mL of sputum was decontaminated using an HCl-KCl acid solution (pH 2.2) at a 1:10 dilution of the samples for 4 minutes and then re-cultured onto BCYE- α and BMPA media. The BAL fluid was not treated for decontamination. After the inoculation of the samples onto the media, they were incubated in a humid atmosphere at 36.5°C.

The bacteria growth in the media, starting from the third day, was monitored at 24 hours of intervals for fourteen days. Since *Legionella* species cannot reproduce on cysteine-free media, the colonies that grew on both selective media and sheep blood agar were not included in the assessment.

Real-time PCR, *Legionella pneumophila* 23S rRNA specific region

Nucleic acid isolation from clinical samples was performed using the manufacturer's instructions using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany). We used the spin column method for this purpose. We used specific solutions (AL buffer, proteinase K, ethanol, wash buffer AW-1, wash buffer AW-2) for breaking down the bacterial cell wall, dissolving the DNA-protein complex, and separating it from other molecules, and centrifuge.

Following the extraction, the bacterial DNA was amplified and detected with the RotorGene 6000

(Corbett Research, Sydney, Australia) device and DuplicaRealTime *Legionella pneumophila* detection kit (Euroclone Diagnostica, Italy). The mixture with a total volume of 21 µL, including the amplification mixture, oligo mix, and internal control, was placed into 250 µL optical tubes as calculated per the procedure. Subsequently, isolated patient samples was added to obtain a total volume of 25 µL. Reaction conditions included 5 minutes of denaturation at 95 °C, followed by 45 cycles at 95 °C for 15 seconds and at 60 °C for 60 seconds.

In the studies carried out by the National Reference Laboratory for Respiratory Pathogens in Public Health Institution of Turkey, bacterial DNA was isolated from clinical specimens using the Biospeedy Nucleic Acid Isolation Kit (Bioeksan, Turkey). The presence of *Legionella* specific genomic structures in DNA isolates was investigated using standard PCR (home-made gel electrophoresis-based PCR) and home-made Real-time PCR methods.

Home-made gel electrophoresis-based PCR

Leg primers designed from the partial sequences of 16S ribosomal RNA gene for *Legionella* species, and the primers targeting the macrophage infectivity potentiator (*Lmip*) gene for *L. pneumophila* were used as primers in home-made gel electrophoresis-based PCR assay (8-11).

Leg 448 A_F: 5'-GAG GGT TGA TAG GTT AAG AGC-3' and Leg 854 B_R: 5'-CGG TCAACT TAT CGC GTT TGC T-3' primers were used for *Legionella* species 16S rRNA gene. Furthermore, *Lmip* L920_F: 5'-GCT ACA GAC AAG GAT AAG TTG-3' and *Lmip* R1548_R: 5'-GTT TTG TAT GAC TTT AAT TCA-3' primers were performed for *L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator (*mip*) gene.

For standard PCR, extracted DNA (5 µl each) were added to microtubes containing 20 µl of PCR mixture to obtain a total of 25 microlitres. The PCR mixture was prepared by using 2.5 µl of 10X PCR buffer, 2 µl of 25 mM MgCl₂, 0.5 µl of 2.5 mM dNTP (200µM), 0.13µl each of Leg 448 and Leg 854 primers (50pmol/µl), 0.13 µl of Taq DNA polymerase (5U/µl),

14.6 µl of molecular grade water. The preparations in the microtubes were initially denatured at 95 °C for 5 minutes and then subjected to 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 seconds, annealing at 62 °C for 45 seconds, and extension at 72 °C for 1 minute using a thermal cycler (Bio-Rad T100). Then the final extension was performed at 72 °C for 10 minutes. The PCR, containing *Lmip* L920 and *Lmip* R1548 primers, was performed with an initial denaturation step at 94 °C for 3 minutes followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 seconds, annealing at 51 °C for 45 seconds and extension at 72 °C for 45 seconds and followed by a final extension at 72 °C for 1 minute (Bio-Rad T100). PCR-amplified DNA fragments were separated in 1.5% agarose gels with TBE buffer and visualized by ethidium bromide staining. A 100-bp DNA ladder was also used as a DNA size marker. *Legionella pneumophila* ATCC 43111 and *E. coli* ATCC25922 were used as positive and negative control strains in standard PCR tests.

Home-made Real-time PCR

The primers targeting the *Legionella* spp. DNA region encoded by 16S ribosomal RNA gene, *mip* gene of *L. pneumophila*, and lipopolysaccharide (*lps*) biosynthesis gene of *L. pneumophila* serogroup 1 were applied in home-made Real-time PCR assays. The primers and probes applied in home-made Real-time PCR assays were designed by National Reference Laboratory using NCBI database (unpublished data). The bacterial DNA was amplified and detected with home-made Real-time PCR in Bio-Rad CFX96 Real-Time System (Paris, France). The Real-time PCR mixture with a total volume of 8 µl, containing 100 µM stock primer & probe, 10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP, 25 mM MgSO₄, 10x Reaction Buffer (KCl, Tris-HCl, pH 9.0, Triton X-100), 5 U/µl recombinant DNA polymerase and storage buffer were placed into 100 µl strip tubes. Subsequently, extracted DNA of 2 µl was added to obtain a total volume of 10 µl. The reaction conditions included 3 minutes of denaturation at 95 °C, followed by 39 cycles at 95 °C for 15 seconds and at 55 °C for 50

seconds.

Urinary Antigen Card Test

The immunochromatographic membrane-based assay was used to investigate the presence of *L. pneumophila* serogroup 1 antigens in patients' urine samples. The Alere BinaxNOW *Legionella* Urinary Antigen Card (Abbott, US) test was used in accordance with the manufacturer's instructions.

The study was approved by the Ankara Yıldırım Beyazıt University Clinic Research Ethics Committee (Date: 15.10.2014 and Number: 26379996/168).

RESULTS

The presence of *Legionella* species was investigated in the respiratory tract (49 sputa and 1 BAL fluid) and urine samples of 50 patients who were being monitored for atypical pneumonia. There were 27 inpatient (54%) and 23 outpatient (46%) subjects. According to medical histories of the patients, there were 1 (2%) hospital-acquired, 12 (24%) travel-acquired, and 37 (74%) community-acquired infections. There were 15 female and 35 male subjects, and the mean age was 56.3 years (range 21-87 years). Twenty-one (42%) patients were smokers, and four patients (8%) used alcohol. The subjects' comorbidities were as follows: coronary artery disease, 15 (30%); COPD (Chronic obstructive

pulmonary disease) 7 (14%); and diabetes mellitus 5 (12%). The clinical, radiological, and laboratory findings of the patients are presented in Table 1. The most common symptom was cough and sputum (92%), and the most common radiological finding was unilateral lung infiltrate (54%).

We picked suspect colonies on specific BCYE- α and BMPA media and subcultured the colonies on BCYE- α and blood media and determined various Gr (+) and Gr (-) bacteria belonging to the throat flora. Culture testing did not reveal the presence of any specific *Legionella* species. All subjects tested negative in the urinary antigen card test for *L. pneumophila* serogroup 1.

Duplica RealTime *L. pneumophila* detection Real-time PCR assay identified the sequence of *L. pneumophila* 23S rRNA gene specific region in seven (samples no; 13, 18, 24, 25, 31, 33 and 48) respiratory tract samples. The sociodemographic, clinical, and laboratory findings of patients who tested positive in Real-time PCR assay are summarized in Table 2.

Furthermore, as shown at Table 3, five of seven samples were detected as *Legionella* spp. in home-made gel electrophoresis-based PCR and home-made Real-time PCR assays.

Where at all seven samples, the presence of *L. pneumophila* rRNA was found by Real-time PCR method (Table 3).

Table 1. Symptoms and findings of all patients

Characteristics	Number (n)	(%)**
Symptoms*		
Fever	27	54
Cough	46	92
Sputum	46	92
Chest pain	28	56
Dyspnea	35	70
Hemoptysis	7	14
Diarrhea	12	24

Table 1 (cont.). Symptoms and findings of all patients

Characteristics	Number (n)	(%)**
Abdominal pain	11	22
Irritation	12	24
Confusion	2	4
Stupor	0	0
Lethargy	0	0
Coma	0	0
Radiography Findings		
Unilateral infiltrate	27	54
Bilateral infiltrate	11	22
Lobar infiltrate	4	8
Pleural effusion	2	4
Pulmonary cavitation	0	0
Patients without radiography results	7	14
Laboratory findings		
Elevated transaminases	11	22
Hyponatremia	9	18
Hypophosphataemia	8	16
Patients without laboratory findings	30	60

* Multiple parameters may be selected

** Indicates row percentages

Table 2. Findings of patients that tested Real-time PCR, *Legionella pneumophila* 23S rRNA specific region

Case	Age/Gender	Smoking Status	Alcohol Use	Chronic Disease	Symptoms	Laboratory Findings	Lung Radiography Findings
13	58/F	No	No	Hypothyroidism, Rheumatoid arth.	Cough, fever, dyspnea, sputum, chest pain	Normal	Normal
18	55/M	No	No	coronary artery disease	Cough, fever, dyspnea, sputum	Normal	Normal
24	32/F	Yes	No	Hypothyroidism	Cough, dyspnea, fever, chest pain	Normal	Unilateral infiltrate
25	32/F	No	No	Asthma	Cough, fever, dyspnea, sputum, chest pain	Normal	Unilateral infiltrate
31	52/M	Yes	No	Asthma	Cough, fever, dyspnea, sputum, chest pain	Elevated transaminases, hyponatremia	Unilateral infiltrate
33	45/M	Yes	No	No	Cough, fever, dyspnea, sputum, chest pain	Elevated transaminases	Unilateral infiltrate
48	75/M	No	No	Asthma, Liver disease	Cough, dyspnea, fever sputum, irritation	Normal	Unilateral infiltrate

Table 3. Comparison of PCR results

Sample No	Real-time PCR*	Home-made gel electrophoresis-based PCR		Home-made Real-time PCR		
	<i>L. pneumophila</i> 23S rRNA	<i>Legionella</i> spp (<i>Leg</i> gene)	<i>L. pneumophila</i> (<i>Lmip</i> gene)	<i>Legionella</i> spp (16S rRNA)	<i>L. pneumophila</i> (<i>mip</i> gene)	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1 (<i>lps</i> gene)
13	Positive	Positive	Negative	Positive (Cq** 25,30)	Negative	Negative
18	Positive	Positive	Negative	Positive (Cq 33,30)	Negative	Negative
24	Positive	Positive	Negative	Positive (Cq 26,27)	Negative	Negative
25	Positive	Positive	Negative	Positive (Cq 30,27)	Negative	Negative
31	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
33	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
48	Positive	Positive	Negative	Positive (Cq 25,24)	Negative	Negative

*DuplicaRealTime *Legionella pneumophila* Detection kit (Euroclone Diagnostica, Italy)

** Cq: Cycle

DISCUSSION

It is impossible to differentiate Legionnaires' disease from other types of pneumonia solely through clinical and radiological examinations. Therefore, genotypic and phenotypic testing methods are prominent in determining the causative microorganism (6). The methods that are used to detect *Legionella* species all have various advantages and disadvantages of their own. For instance, some disadvantages include that the culture method is time-consuming and has a low sensitivity, the urinary antigen test can only detect *L. pneumophila* serogroup 1, and PCR targets different gene regions (1,7). PCR is a diagnostic method that is more sensitive than the bacterial culture in the differentiation of Legionnaires' disease. That being said, according to the standard Case Definition of Legionnaires' Disease, a clinically compatible case tested positive in PCR indicates "probable" Legionnaires' disease (8). Therefore, a patient that tests positive in PCR

needs to be confirmed by sequence analysis or another method. Researchers can investigate various bacterial DNA regions, including the *Legionella mip*, 5SrRNA, and 16S rRNA regions, and the 23S-5S rRNA intergenic spacer region for this purpose (1,3,8). Using bacterial cultures as a reference, Cloud et al. found the sensitivity of PCR to be 100% for the 16S rRNA gene region of *Legionella* species (12). Nazarian et al. investigated the validity of the determination of *Legionella* spp. 23S rRNA with PCR assay and reported the specificity to be 100% and the sensitivity to be 100% for clinical samples and 98.6% for environmental samples (13). In our study, we amplified the *L. pneumophila* 23S rRNA gene specific region, which can detect all serogroups of *L. pneumophila* and found that seven patients tested positive.

Five of these samples tested positive for *Legionella* spp. 16S rRNA in the home-made real-time PCR assay and for *Legionella* spp. Leg region in the home-made gel electrophoresis-based PCR assay. The home-made real-time PCR assays targeting *L. pneumophila* and

L. pneumophila serogroup-1 and the home-made gel electrophoresis-based PCR assays that targeted the *L. pneumophila mip* gene region were not positive for any subject.

It is known that the sensitivity and specificity of PCR methods in diagnosing *Legionella* infections vary according to the targeted genomic regions. Besides, in this study, the clinical samples were tested by Real-time PCR for *L. pneumophila* 23S rRNA specific region just after the sampling was made. However, clinical samples had been stored at -20°C (deep freeze) until home-made Real-time PCR and home-made gel electrophoresis-based PCR methods were carried out. Moreover, bacterial DNA was isolated from clinical specimens using the different Bacterial DNA Isolation Kits, such as QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) and Biospeedy Nucleic Acid Isolation Kit (Bioeksen, Turkey) in the PCR methods studied. Hence, we believe that all these affect the sensitivities of the PCR tests used in the study and finally, the results of our study.

The bacterial culture method is accepted as the gold standard for the diagnosis of Legionnaires' disease (1,3,7). Indeed, the standard Case Definition of Legionnaires' Disease evaluates the isolation of the bacteria from patient samples in a clinically compatible case as "confirmed" Legionnaires' disease. The sensitivity of the method depends on factors such as the total number of bacteria in the specimen, the vitality of the bacteria, the stage of infection, antibacterial drug use, and the quality of the respiratory tract specimen (7). In our study, we were unable to isolate any bacteria from the *Legionellaceae* family.

Divan Khosroshahi et al. reported that 12% of the respiratory tract samples of 109 patients suspected of ventilator-associated pneumonia tested positive in PCR for *L. pneumophila* but were negative in bacterial cultures ascribed to the bacterial airway load and the vitality of the bacteria (1). Similarly, authorsof another study concluded that while PCR results for the two gene regions (*L. pneumophila*

mip gene and *Legionella* genus 16S rRNA gene) were completely correlated, bacterial culture was inadequate in detecting Legionnaires' disease (14). Chen et al. studied a large number of samples and determined the sensitivity of culture, Real-time PCR assay targeting the *mip* gene for *L. pneumophila*, and urinary antigen tests to be 50%, 92%, and 96%, respectively (15).

Urinary antigen tests are preferred for their ease of use in clinical diagnosis, but their most significant disadvantage is that they can only detect the cell-wall antigens of *L. pneumophila* serogroup-1. However, *L. pneumophila* serogroups 2-16 and other *Legionella* species (*L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. longbeach*, *L. dumoffii*, *L. anisa*, etc.) can also cause *Legionella* infections (2). The urinary antigen test's other disadvantages include potential false positivity due to presence of rheumatoid factors and the cross-reactions between other *L. pneumophila* serogroups and other *Legionella* species (16). We believe that the reason why the patients that were tested positive in PCR, tested negative in the urinary antigen test might be due to the fact that the urinary antigen test can only detect *L. pneumophila* serogroup 1. Our interpretation of this result was that non-*L. pneumophila* serogroup 1 species were more prevalent than *L. pneumophila* serogroup 1 in our region.

On the other hand, Mojtahedi et al. found urinary antigen test positivity in 16.7% and *L. pneumophila* 16S rRNA gene PCR positivity in 19.8% of their patients. The authors' concluded that PCR is a better detection method for *Legionella* infection than urinary antigen test (17).

The clinical picture associated with this microorganism can range from mild flu-like symptoms, called Pontiac fever, to severe pneumonia, also known as Legionnaires' disease. In our study, patients tested positive in PCR all had cough, fever and dyspnea. These were followed by sputum and chest pain. We determined the underlying risk factors from most common to least as asthma, COPD and smoking.

When the laboratory findings were evaluated, it was observed that one patient had elevated transaminases and hyponatremia, and one patient had only elevated transaminases. Five of the PCR-positive patients had unilateral infiltrate on chest X-ray. Similar to our study, Erdoğan et al. reported fever in all patients diagnosed with Legionnaires' disease and elevated transaminases in two patients. Contrary to our results, they determined smoking as the primary risk factor for patients (18). The underlying risk factors, symptoms, and laboratory findings of our subjects are compatible with other studies (19-22).

We conclude that the PCR positivities with three different molecular methods indicate that *Legionella* species is a considerable pathogen of patients with atypical pneumonia. Physicians should consider *Legionella* species to increase the effectiveness of

the treatment and reduce mortality, particularly during the peak periods of the disease. Also, our results indicate that urinary antigen test negativity should not exclude other species and serogroups. For this purpose, the patients should be investigated for serogroups other than *L. pneumophila* serogroup 1 using a second method such as PCR. Our study demonstrates the significance of PCR in the investigation of *Legionella* species and serogroups. Furthermore, PCR has been shown to have sufficient sensitivity to detect the pathogen, and after extensive studies, maybe an alternative for other test methods. The clinician and the microbiology laboratory should be cooperating quickly, accurately, effectively, and reliably in diagnosing the patient, initiating a specific treatment and taking effective control measures.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Ankara Yıldırım Beyazıt University, Scientific Research Projects Fund, Turkey. We would like to thank Osama B.A. Abuzaina and Ebru Ş.Ş. Parlak to data collection forth is study and their support.

ETHICS COMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Yıldırım Beyazıt University Clinic Research Ethics Committee (Date: 15.10.2014 and Number: 26379996/168).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Divan Khosroshahi N, NaserpourFarivar T, Johari P. Identification of *Legionella pneumophila* in Intubated Patients With TaqMan Real Time PCR. *Jundishapur J Microbiol*, 2015; 21: 8(3).
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Legionella*. Germany: Leibniz Institut. Available at <<https://www.bacterio.net/genus/legionella>>Accessed August 10, 2020.
3. World Health Organization. Legionella and the prevention of legionellosis. Geneva 2007. Available at <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/43233>>Accessed June 01, 2020.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Report. Legionnaires' disease in Europe 2014; Available <<https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/legionnaires-disease-europe-2014.pdf>> Accessed July 23, 2020.
5. Anbumani S, Gururajkumar A, Chaudhury A. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical & environmental sources in a tertiary care hospital. *Indian J Med Res*. 2010; 131:761-4.
6. Lindsay DS, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GF. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *J Med Microbiol*. 2004;53 (Pt 3):183-7.
7. Çelik Ö, Nar Otgun S, Topal S. Legionnaires Diseases Control Program Manual. Republic of Turkey Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey- 2016. Turkish Available at <<https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar>>Accessed June, 12 2020.
8. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T. Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiology Ecology* 1996; 20 (3): 149-54.
9. Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, Fujii J, Maruta K, Izu K, et al. Development of a new semi nested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(7):2489-94.
10. Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl Environ Microbiol*. 1991;57(2):597-600.
11. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T. Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*. 1993;37(8):617-22.
12. Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard D.R. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol*, 2000;8(5):1709-12.
13. Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylor A, Limberger RJ, Musser KA. Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008;62(2):125-32.
14. Botelho-Nevers E, Grattard F, Viallon A, Allegra S, Jarraud S, Verhoeven P, et al. Prospective evaluation of RT-PCR on sputum versus culture, urinary antigens and serology for Legionnaire's disease diagnosis. *J Infect*, 2016;73(2):123-8.
15. Chen DJ, Procop GW, Vogel S, Yen-Lieberman B, Richter SS. Utility of PCR, Culture, and Antigen Detection Methods for Diagnosis of Legionellosis. *J Clin Microbiol*, 2015;53(11):3474-7.
16. Domínguez JA, Galí N, Pedrosa P, Fargas A, Padilla E, Manterola JM, et al. Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* Urin antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. *J Clin Microbiol*, 1998;36(9):2718-22.
17. Mojtahedi SY, Rahbarimanesh A, Noorbakhsh S, Shokri H, Jamali-Moghadam-Siyahkali S, Izadi A. Urinary antigens and PCR can both be used to detect *Legionella pneumophila* in children's hospital-acquired pneumonia. *Eur J Trans Myol*, 2019;29(2):8120.
18. Erdogan H, Arslan H. Evaluation of a *Legionella* outbreak emerged in a recently opening hotel. *Mikrobiyol Bul*. 2013 Apr;47(2):240-9. Turkish. Erratum in: *Mikrobiyol Bul*, 2013;47(3):570.
19. Sugihara E, Dambara T, Aiba M, Okamoto M, Yonemitsu J, Sonobe S, et al. Clinical characteristics of 8 sporadic cases of community-acquired *Legionella* pneumonia in advanced age. *Intern Med*, 2007;46(8):461-5.
20. Schuetz P, Haubitze S, Christ-Crain M, C Albrich W, Zimmerli W, Mueller B. et al. Hyponatremia and anti-diuretic hormone in Legionnaires' disease. *BMC Infect Dis*, 2013;13:585.
21. Irons JF, Dunn MJ, Kefala K, Thorn S, Lahka F, Caesar D. et al. The effect of a large Legionnaires' disease outbreak in Southwest Edinburgh on acute and critical care services. *QJM*. 2013;106(12):1087-94.
22. Yiallourous PK, Papadouri T, Karaoli C, Papamichael E, Zeniou M, Pieridou- Bagadzouni D. et al. First outbreak of nosocomial *Legionella* infection in term neonates caused by a cold mist ultrasonic humidifier. *Clin Infect Dis*, 2013;57(1):48-56.

Evaluation of two SARS-CoV-2 lateral flow antibody kits for serological diagnosis of COVID-19

COVID-19 serolojik tanısında iki SARS-CoV-2 lateral flow antikor kitinin değerlendirilmesi

Derya ALTUN¹ (ID), Yasemin COŞGUN¹ (ID), Hakan Farzin MEHMETZADE¹ (ID),
Fatma Gülay KORUKLUOĞLU¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: The emergence of new SARS-CoV-2 has prompted the development of new serological tests that could be complementary to RT-PCR. Serological tests can also be used for purposes such as demonstrating the presence of antibodies in individuals who have had the disease, contact screening, screening of healthcare professionals, monitoring of vaccine responses, detection of antibody levels of plasma donors, and determination of seroprevalence in risky groups. For this purpose, different methods such as ELISA, CLIA or rapid antibody detection tests are used. LFIA tests are fast, easy to apply, do not require experience, and are cheap tests that give a result in as little as 10 minutes. However, the clinical performance of existing serological tests used in diagnosis needs to be evaluated. The aim of this study was to assess the performance of two immunological tests for the detection of SARS-CoV-2 antibodies.

Methods: As a positive serum panel, 101 serum samples from patients confirmed by SARS-CoV-2 RT-PCR test and also found antibody positive by ELISA test were included in the study. As the negative serum panel, 30 serum samples were determined, including 11 serum

ÖZET

Amaç: Yeni SARS-CoV-2 virüsünün ortaya çıkışı, RT-PCR'ı tamamlayıcı olabilecek yeni serolojik testlerin geliştirilmesini teşvik etmiştir. Serolojik testler ayrıca hastalığı geçirmiş olan bireylerde antikor varlığının gösterilmesi, temaslı kişilerin taranması, sağlık çalışanlarının taranması, aşı yanıtlarının takibi, plazma verici kişilerin antikor düzeylerinin tespiti ve riskli gruplardaki bireylerde seroprevalansın belirlenmesi gibi amaçlarla kullanılabilir. Bu amaçla ELISA, CLIA veya hızlı antikor tespit testleri gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. LFIA testleri 10 dakika gibi kısa sürede sonuçlanan, hızlı, uygulaması kolay, tecrübe gerektirmeyen ve ucuz testlerdir. Bununla birlikte, tanıda kullanılan mevcut serolojik testlerin klinik performanslarının değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı, SARS-CoV-2 antikorlarının tespiti için iki immünojenik testin performansını değerlendirmektir.

Yöntem: Çalışmaya pozitif serum paneli olarak SARS-CoV-2 RT-PCR testi ile doğrulanan hastalardan alınan ve ELISA testi ile antikor pozitif saptanan 101 serum örneği dahil edilmiştir. Negatif serum paneli olarak da SARS-CoV-2 dışındaki diğer virüslere karşı antikor saptanmış 11 serum

¹General Directorate of Public Health, Department of Microbiology Reference Laboratories and Biological Products, National Virology Reference Laboratory, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Derya ALTUN

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 Refik Saydam Yerleşkesi J Blok Sıhhiye, Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 11.02.2022

Kabul Tarihi / Accepted : 21.09.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.34966

Altun D, Coşgun Y, Mehmetzade HF, Korukluoğlu FG. Evaluation of two SARS-CoV-2 lateral flow antibody kits for serological diagnosis of COVID-19
Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 598 - 605

samples with antibodies against viruses other than SARS-CoV-2, and 19 serum samples from healthy donors in 2019. First, SARS-CoV-2 antibodies were tested by ELISA (Wantai, China) and then these serum samples were tested simultaneously with the SureScreen COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Cassette and YHLO Gline 2019 nCov IgG/IgM kits.

Results: The SureScreen and YHLO Gline kits showed an overall sensitivity of 86.1% and 75.3%, for detecting IgG and/or IgM, respectively. Specificity was 100% in both rapid antibody tests. The kappa value for IgG of the two rapid antibody tests was 0.816, while it was 0.695 for IgM.

Conclusion: Our study shows that SureScreen and YHLO Gline are reliable kits for use as point-of-care tests for rapid antibody detection. According to Cohen's kappa statistics the 91% ($\kappa=0.816$) agreement between SureScreen IgG and YHLO Gline IgG, "Almost Perfect", and 85% agreement ($\kappa=0.695$) between SureScreen IgM and YHLO Gline IgM, "Substantial", indicate a good correlation between the performance of the LFIAs used in the study. Total antibody conformity was determined as 92% ($\kappa=0.822$), "Almost Perfect". Agreement between IgM tests was lower than that between IgG tests.

Key Words: SARS-CoV-2, COVID-19, serology, antibody

örneği ve 2019 yılına ait sağlıklı donörlerden alınmış 19 serum örneği olmak üzere 30 serum örneği belirlenmiştir. Serum örnekleri ilk olarak SARS-CoV-2 Ab ELISA, (Wantai, China) kiti ile test edildi ve daha sonra SureScreen COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Cassette ve YHLO Gline 2019 nCov IgG/IgM kitleri ile eş zamanlı test edildi.

Bulgular: SureScreen ve YHLO Gline kitleri, IgG ve/veya IgM'yi saptamak için sırasıyla %86,1 ve %75,3'lük bir genel duyarlılık gösterdi. Spesifite ise her iki hızlı antikor testinde de %100,0 olarak hesaplandı. İki hızlı antikor testinin IgG için kappa değeri 0.816 iken IgM için 0.695 idi.

Sonuç: Çalışmamız, SureScreen ve Gline'in hızlı antikor tespiti için hasta başı testleri olarak kullanım için güvenilir kitler olduğunu göstermektedir. Cohen'in kappa istatistiğine göre, SureScreen IgG ve YHLO Gline IgG arasında %91 ($\kappa=0.816$) uyum, "Neredeyse Mükemmel" ve SureScreen IgM ile YHLO Gline IgM arasında %85 ($\kappa=0.695$) uyum, "Önemli" olarak bulundu. Bu sonuçlar bu çalışmada kullanılan LFIA'ların performansı arasında iyi bir korelasyon olduğunu gösterdi. Toplam antikor uygunluğu %92 ($\kappa=0.822$), "Neredeyse Mükemmel" olarak belirlendi. IgM testleri arasındaki uyum, IgG testleri arasındakinden daha düşüktü.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, COVID-19, seroloji, antikor

INTRODUCTION

A new coronavirus emerged from the Wuhan region in China in December 2019, causing a new acute respiratory syndrome named coronavirus disease 2019 (COVID-19). This infection, caused by a new Sarbecovirus, is called as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), rapidly turned to be a pandemic and became a common cause of mortality and morbidity around the world (1,2). Detection of viral RNA by real-time

reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in respiratory tract samples in the early phase of infection is considered the gold standard method for screening and diagnosis. However, the sensitivity of the RT-PCR test can vary depending on sample types, sampling technique, anatomical site, time of infection, and viral load (3,4). Computed tomography (CT) complementary to RT-PCR may be helpful for diagnosis, but is not specific (5). Serological tests have been used as complementary tests, especially in the period after the first week, in cases where RT-PCR

tests are negative. It can also be used for purposes such as showing antibody development in patients with the disease, close contact screening, health care worker screening, monitoring of vaccine responses, detection of antibody levels in plasma donors and determining seroprevalence in high-risk groups. Serological tests are also important in demonstrating the presence of antibodies in immune plasma collected from patients with the disease. For this purpose, different methods such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), chemiluminescence enzyme immunoassay (CLIA), or rapid antibody detection tests are used (6). Lateral flow immunoassay (LFIA) tests appear to be suitable for large seroprevalence studies. These tests can be easily used as bedside tests or in small laboratories that do not have ELISA capabilities (7,8). LFIA tests are fast, easy to apply, do not require experience, and are cheap tests that give a result in as little as 10 minutes. In addition, they enable IgM and IgG to be evaluated separately at the same time. The most important disadvantage in serological tests is that antibody formation takes a certain time following infection (9,10). Another disadvantage is the invasive sampling technique such as blood collection. Moreover, the clinical performance of serological tests varies according to the assay method, the application process, the production quality of the target antigen, or the selected target site. Therefore, antibody (Ab) tests with high sensitivity and specificity are needed. Despite the increasing number of commercial test kits, studies are still insufficient to determine the performance of these kits (13-19).

The aim of the present study was to evaluate the performance of two CE-marked immunological tests used in the detection of SARS-CoV-2 antibodies.

MATERIAL and METHOD

Patients and serum samples

During the initial period of the COVID-19 pandemic, consecutive, routine samples from patients over the age of 18 who were hospitalized and

whose COVID-19 PCR positivity were confirmed were included in the study. A total of 131 samples, 101 serum samples obtained from patients confirmed by the SARS-CoV-2 RT-PCR test (Bio-Speedy® COVID-19 RT-qPCR Detection Kit, Bioeksan R&D Ltd., Turkey) and positive by ELISA test, and 30 serum samples as a negative serum panel, were included in the study. All samples were tested with the same PCR kit. The negative serum panel was composed of 11 sera with antibodies detected against viruses other than SARS-CoV-2 and 19 serum samples from healthy donors in 2019.

Serum samples were heat inactivated at 56 °C for 60 minutes and stored at 4 °C until the day of the study. Before the study, all samples were brought to room temperature and vortexed for a short time.

Serological assays

ELISA assay

All patient and control serum samples were tested with the WANTAI SARS-CoV-2 Ab ELISA (Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise, China) kit according to the manufacturer's instructions. Total antibodies against SARS-CoV-2 spike protein were detected by ELISA. WANTAI SARS-COV-2 Ab ELISA is a double antigen sandwich immunoassay for the qualitative detection of antibodies against the RBD domain of the S1 protein. Optical densities were read at 450 nm with an ELISA reader. Samples with an index value higher than 1.1 were considered positive. All serum samples were tested with the same ELISA kit.

Lateral flow immunoassays

The SureScreen Covid-19 IgG/IgM Antibody Test (SureScreen, UK) and Shenzhen YHLO Biotech - Gline 2019-nCoV IgG/IgM Antibody Test (colloidal gold) (Avioq, Bio-Tech, Shandong, China) were used. These are immunochromatographic systems used for the qualitative detection of IgM and IgG antibodies against SARS-CoV-2 in human whole blood, serum, or plasma samples. LFIA tests were performed simultaneously with SureScreen and YHLO Gline with 10 µL of serum, according to the manufacturers' instructions.

According to the manufacturers' instructions, all results should be evaluated within 10-15 minutes. The results were read and interpreted in 10 minutes. The LFIA results were easily interpreted as light and dark pink IgG and IgM lines. In some sera, the IgM line was very difficult to read in both LFIA tests. The results of such samples were considered "Positive". Color density was not evaluated. The sensitivity and specificity of the rapid antibody kits were calculated according to the ELISA results.

Statistical analyses

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were calculated for each serological test. The kappa index was calculated for agreement between all analyzed assays. For the interpretation of kappa statistics, the intervals suggested by Landis and Koch were used. Here, if the Kappa value is 0, it is interpreted as "intra/interobserver harmony depends only on chance, and in other cases there is no harmony". If the kappa value is 1, it is interpreted as "the measurements within/between observers completely match each other". If Kappa value is <0.00, it is interpreted as Poor, between 0.00-0.20 as Slight, between 0.21-0.40 as Fair, between 0.41-0.60 as Moderate, between 0.61-0.80 as Substantial and between 0.81-1.00 as Almost Perfect (11,12). In our study, sample size calculations were made with the G*Power 3.1.9.7 program. The power is calculated as 0.6224. Since the samples were obtained in the first months of the pandemic and during the period when the seroprevalence was very low, the study was carried out with the existing number of samples.

Ethical Approval

This retrospective study was conducted at National Virology Reference Laboratory after the approval of the Head of the Ethics Committee of Clinical Research No:2 of Ankara City Hospital, Ministry of Health (Number: E2-21-837 and Date: 20.09.2021).

All procedures performed in the present study were made in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration (2008).

For this study, the necessary permits were obtained from the Scientific Research Studies platform on COVID-19 of the Ministry of Health with the application number 2021-09-02T15_17_25.

RESULTS

The results for the rapid antibody test kits are summarized in Table 1. The LFIA tests SureScreen and YHLO Gline showed sensitivities of 86.1% and 75.3%, respectively. Specificity was 100.0% in both rapid antibody tests. In the negative serum panel, no false positive results were observed for the parameters of the rapid antibody tests. In the present study, all the samples had a reactive control line and valid results were obtained in all tests performed. Because our sample number is limited, further studies with larger sample numbers will contribute to such studies.

Agreement between serological tests

When the agreement between SureScreen IgG and YHLO Gline IgG was examined according to Cohen's kappa statistics, 91% (kappa value = 0.816), "Almost Perfect", was observed. The agreement between SureScreen IgM and YHLO Gline IgM was 85% (kappa value = 0.695), "Substantial". When overall antibody compatibility was evaluated, it was 92% (kappa value = 0.822), indicating a value as "Almost Perfect".

DISCUSSION

Serological tests, especially rapid antibody tests, are complementary tests in the diagnosis of COVID-19, and in the later stages of the pandemic they play a strategic role in epidemiological studies and determining vaccine efficacy. Some studies on the diagnosis of COVID-19 emphasized the complementary role of serological tests to RT-qPCR, especially in critical patients with negative RT-qPCR.

Table 1. The analytical sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) for SARS-CoV-2 antibody detection for LFIAs

	SureScreen	YHLO Biotech
Sensitivity (95% CI)	86.14% (77.84 - 92.21)	75.25% (65.67 - 83.30)
Specificity (95% CI)	100% (88.43 - 100)	100% (88.43 - 100)
Positive predictive value* (95% CI)	100.00%	100.00%
Negative predictive value* (95% CI)	68.18% (56.86 - 77.7)	54.55% (46.07 - 62.77)
Accuracy* (95% CI)	89.31% (82.72 - 94.03)	80.92% (73.13 - 87.25)

(*) These values are dependent on disease prevalence.

Zhao et al. found 28.6% positivity in the 1-3-day period and 53.6% positivity in the 4-7-day period with the ELISA total antibody test in patients with negative RT-PCR result. Diagnosis rates of 67.1%, based on RT-PCR alone increased to 99.4% when antibody results were also considered (13). Guo et al. reported that 51.9% of the diagnoses were made with a single RT-qPCR test in the first 5.5 days, and when the IgM ELISA test was combined with RT-PCR, the positive detection rate reached to 98.6% (14). There are many different serological tests on the market, and it is clear that we are currently facing difficulties regarding the many factors involved in evaluating the accuracy of these tests. LFIA tests allow the qualitative determination of antibodies against SARS-CoV-2. Recently, many commercial rapid antibody kits have been developed with the CE label. In our study, when the SureScreen and YHLO Gline kits were evaluated in terms of IgM and/or IgG antibodies, they revealed a sensitivity of 86.1% and 75.3%, respectively. Specificity was 100.0% in both rapid antibody tests. The performance of the Wantai ELISA kit, which is used to calculate sensitivity and specificity, has been found to be quite high in previous studies. Zhao et al. determined that with the Wantai ELISA kit the antibody positivity rates also increased as the days from the onset of symptoms increased and reached to 100% between 15 and 39

days (13). Marlet et al. found that the sensitivity of the Wantai ELISA kit was 97.8% and the specificity was 100.0% in serum samples taken on day 14 after the onset of symptoms (15). Because the ELISA kit we used has high sensitivity and specificity, the sensitivity and specificity of the LFIA kits were calculated according to this kit. With the combined LFIA kit designed by Jiangsu Medomics Medical Technologies in China, 88.6% sensitivity and 90.6% specificity were obtained in a study conducted with 397 RT-PCR-positive COVID-19 patients and 128 control samples obtained from eight different centers (16). Montesinos et al. used 128 SARS-CoV-2 positive and 72 negative control serum samples in their study investigating the serological response with one ELISA, one CLIA, and three LFIAs. In three different LFIA studies, when IgM and/or IgG positivity were evaluated together, they found sensitivity of 68.8%, 71.1%, and 71.9% and specificity of 95.8%, 100.0%, and 100.0%, respectively. When IgM and/or IgG positivity were evaluated together for the CLIA test, they found 64.3% sensitivity and 100.0% specificity. The ELISA test that they used gave 84.4% sensitivity and 100.0% specificity when IgA and/or IgG positivity were evaluated together. However, since 28 of the 128 positive samples were taken between days 0 and 7, this may have led to a low sensitivity (17). Since we did not have the data for the sample

collection time, the specificity and sensitivity could not be calculated in detail according to the times and were stated as a total. However, specificity and sensitivity were found in similar ranges with the studies in the literature. Charlton et al. compared six EIA and six POCT kits and found the sensitivity of the EIA tests ranging between 64-95% and the sensitivity of the POCT tests 64-83 %; specificity being more than 98% in all kits (18). In our study, the sensitivity of the LFIA kits was similarly lower than that of the ELISA tests. Flower et al., tested 11 LFIA kits and obtained sensitivity between 48% and 93% and specificity between 97.2% and 99.8%. They also found 88% sensitivity and 99.8% specificity for SureScreen, one of the LFIA kits tested in our study (19). The results were similar to the SureScreen results in our study. In our study, we aimed to measure SARS-CoV-2 total antibodies with ELISA and LFIA. In the classical antibody response, IgM is usually produced first and then IgG develops. However, studies on SARS-CoV suggested that IgM and IgG may develop between 2 and 4 days apart or at the same time (20,21). For this reason, total antibodies were determined with ELISA. IgG and IgM positivity was evaluated as a IgM and/or IgG with LFIA. Van Elslande et al. evaluated seven different LFIA kits and the overall sensitivities were 65.4-79.1 % and the specificities 85.4-99.0 %. When their performances for IgM and IgG were evaluated separately, the sensitivities were 32-72.5 % for IgM and 55.6-71.2 % for IgG. Moreover, specificity was reported for IgM and IgG as 91.3-100 % and 90.3-99 %, respectively (22). In cases where the performance of LFIAs is evaluated independently from the onset of symptoms, it is obvious that overall evaluation of IgG and IgM positivity is a correct approach. In our study, although positivity was expected in at least one of the IgG or IgM antibodies with rapid antibody tests in sera obtained from patients with infection and with positive ELISA total antibody test, approximately 14% false negative results were obtained with the SureScreen kit and 25% with the YHLO Gline kit. In ELISA tests, the color change due to the reaction of

the patient samples in the virus antigen-coated wells is read spectrophotometrically in the ELISA reader. Since the absorbance values obtained are determined as optical density, the results are clearly perceived and a numerical value emerges. Since there are positive sera with a low OD value with ELISA in the positive serum panel, it was thought that these low positivity levels may not have been detected by card tests. In card tests, band formation is evaluated visually. In cases where there is insufficient band formation to be seen by the naked eye, there may be erroneous negative evaluations depending on subjective evaluations. Ong et al. detected 3 out of 128 negative samples as false positives with the Wantai total antibody kit and they calculated specificity of 98% (23). Therefore, the specificity of ELISA kits may not be 100% and false positive results may occur. For this reason, it is useful to verify the samples by testing them with different ELISA kits. We found lower sensitivity in our study than the manufacturers reported possibly because the patient groups belonging to the samples tested may have had clinical, age, sex, sample collection time, and population differences such as immune competence status. According to Cohen's kappa statistics the 91% (kappa value = 0.816) agreement between SureScreen IgG and YHLO Gline IgG, "Almost Perfect", and 85% agreement (kappa value = 0.695) between SureScreen IgM and YHLO Gline IgM, "Substantial", indicate a good correlation between the performance of the LFIAs used in the study. Total antibody conformity was determined as 92% (kappa value = 0.822), "Almost Perfect". Agreement between IgM tests was lower than that between IgG tests. Studies generally show similar results. When Van Elslande et al. evaluated the compatibility of seven different LFIAs with each other using 153 samples taken from 94 COVID-19 patients, they observed the IgM compatibility to be 58.2-96.1 % and the IgG compatibility to be 78.4-98 %. While a general agreement of 70% was found between IgM LFIAs, an average of 89% agreement was found between IgG LFIAs (22). Charpentier et

al. reported that 82.8% (kappa: 0.643), “Substantial” agreement was observed in IgM and 96.9% (kappa: 0.937), “Perfect conformity”, was observed between the two rapid tests.

There are some limitations of our study. First, the number of samples tested for cross-reaction in the control group was low and serum samples positive for measles, Crimean-Congo hemorrhagic fever and hantavirus serology were used, and it would be more effective to use patient samples with respiratory tract infection for this purpose. A second limitation is the small number of samples used to assess specificity. A third limitation is that no information was available regarding the severity of the disease in the patients from whom the samples were taken. A further limitation of the present study is the lack of data regarding the time of sample collection since the onset of symptoms of the patient samples tested. Another limitation is that the neutralization test could not be used. One of the strengths of this study,

however, is that it investigated the value of IgM as well as IgG with LFIAs. The debate about whether IgM/IgG LFIAs should be used in emergency departments has allowed support for the intended use of IgM/IgG LFIAs for the detection of antibodies against SARS-CoV-2.

CONCLUSION

It was observed that the two different LFIA tests exhibited high sensitivity and specificity when evaluated according to the ELISA test results. The LFIA kits were also found to have good compatibility with each other.

It is thought that rapid antibody tests, whose results are comparable to those of ELISA tests, can be used to evaluate immune status in seroepidemiological studies with their fast and economical use, especially in cases where laboratory conditions cannot be achieved.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Ankara City Hospital Clinic Research Ethics Committee No:2 (Date: 20.09.2021 and Number: E2-21-837).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

KAYNAKLAR

- World Health Organization (WHO), Coronavirus Disease 2019, (2020) (Accessed 12 March 2020), <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- Guarner J. Three emerging coronaviruses in two decades. *Am J Clin Pathol*, 2020;153(4):420-1.
- Yang Y, Yang M, Shen C, Wang F, Yuan J, Li J, et al. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. *medRxiv*, 2020;11:1-15.
- To KK, Tsang OT, 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.
- Xie X, Zhong Z, Zhao W, Zheng C, Wang F, Liu J. Chest CT for Typical Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology*, 2020;296(2): E41-E45.
- Vashist SK. In vitro diagnostic assays for COVID-19: recent advances and emerging trends. *Diagnostics*, 2020;10(4):202.
- Xu Y, Xiao M, Liu X, Xu S, Du T, Xu J, et al. Significance of serology testing to assist timely diagnosis of SARS-CoV-2 infections: implication from a family cluster. *Emerg Microbes Infect*, 2020;9(1):924-7.
- Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *J Clin Microbiol*, 2020;58(6): e00512-20.
- World Health Organization, Laboratory Biosafety Guidance Related to the Novel Coronavirus (2019-nCoV), 2020 (Accessed 12 March 2021), [https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-(covid-19)).
- Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerg Infect Dis*, 2020;26(7):1478-88.
- Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, 1960; 20:37-46.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 1977;33(1):159-74.
- Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*, 2020;71(16):2027-34.
- Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*, 2020;71(15):778-85.
- Marlet J, Petillon C, Ragot E, Abou El Fattah Y, Guillon A, Marchand Adam S, et al. Clinical performance of four immunoassays for antibodies to SARS-CoV-2, including a prospective analysis for the diagnosis of COVID-19 in a real-life routine care setting. *J Clin Virol*, 2020;132:104633.
- Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol*, 2020;92(9):1518-24.
- Montesinos I, Gruson D, Kabamba B, Dahma H, Van den Wijngaert S, Reza S, et al. Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *J Clin Virol*, 2020;128:104413.
- Charlton CL, Kanji JN, Johal K, Bailey A, Plitt SS, MacDonald C, et al. Evaluation of six commercial mid- to high-volume antibody and six point-of-care lateral flow assays for detection of SARS-CoV-2 antibodies. *J Clin Microbiol*, 2020;58(10):e01361-20.
- Flower B, Brown JC, Simmons B, Moshe M, Frise R, Penn R, et al. Clinical and laboratory evaluation of SARS-CoV-2 lateral flow assays for use in a national COVID-19 seroprevalence survey. *Thorax*, 2020;75(12):1082-8.
- Li G, Chen X, Xu A. Profile of specific antibodies to the SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med*, 2003;349(5):508-9.
- Hsueh PR, Huang LM, Chen PJ, Kao CL, Yang PC. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus. *Clin Microbiol Infect*, 2004;10(12):1062-6.
- Van Elslande J, Houben E, Depypere M, Brackenier A, Desmet S, André E, et al. Diagnostic performance of seven rapid IgG/IgM antibody tests and the Euroimmun IgA/IgG ELISA in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect*, 2020;26(8):1082-7.
- Ong DSY, de Man SJ, Lindeboom FA, Koeleman JGM. Comparison of diagnostic accuracies of rapid serological tests and ELISA to molecular diagnostics in patients with suspected coronavirus disease 2019 presenting to the hospital. *Clin Microbiol Infect*, 2020;26(8):1094.e7-1094.e10.

Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizma dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları: iki yıllık değerlendirme

Distribution and antibiotic susceptibility of microorganisms isolated from blood cultures of patients hospitalized in intensive care units: a two-year evaluation

Tuğçe ŞİMŞEK BOZOK¹ (ID), Taylan BOZOK² (ID)

ÖZET

Amaç: Bakteriyemilerde etken mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları merkezlere ve yıllara göre değişiklik göstermektedir. Ampirik tedaviye yol gösterici olması için ortaya çıkan bu değişikliklerin belirlenmesi gerekir. Bu çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların genel dağılımı ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Mart 2019-Mart 2021 tarihleri arasında Niğde Eğitim ve Araştırma Hastanesi yoğun bakım ünitelerinden mikrobiyoloji laboratuvarına gelen kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılık oranları retrospektif olarak değerlendirildi. Kan örnekleri BD BACTEC FX (Becton Dickinson, ABD) otomatize kan kültürü sisteminde çalışılmıştır ve izole edilen bakteri ve mantar suşlarının tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri Vitek 2 compact (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile yapılmıştır.

Bulgular: Toplam 9607 kan kültürü şişesinin 995'inde

ABSTRACT

Objective: The causative microorganisms and their antibiotic susceptibility in bacteremia vary according to the centers and years. These changes should be identified in order to guide empirical treatment. In this study, it was aimed to investigate the general distribution and antibiotic susceptibility of microorganisms isolated from blood cultures of patients in intensive care units.

Methods: Microorganisms isolated from blood cultures from the intensive care units of Niğde Training and Research Hospital between March 2019 and March 2021 were evaluated retrospectively. Blood samples were studied in the BD BACTEC FX (Becton Dickinson, USA) automated blood culture system and the identification and antibiotic susceptibility tests of the isolated bacterial and fungal strains were performed with the Vitek 2 compact (BioMérieux, France) automated system.

Results: A positivity was detected in 995 of a total of 9607 blood culture bottles. Among the isolated

¹Niğde Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Niğde
²Niğde Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Niğde



İletişim / Corresponding Author : Tuğçe ŞİMŞEK BOZOK
Niğde EAH Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Niğde - Türkiye
E-posta / E-mail : tugce_0103@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 04.06.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 29.09.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.26937

Şimşek Bozok T, Bozok T. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizma dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları: iki yıllık değerlendirme. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 606 - 615

pozitiflik tespit edildi. İzole edilen mikroorganizmalar arasında Gram pozitif bakteriler %71,7 (713/995), Gram negatif bakteriler %27,2 (271/995), mayalar %1,1 (11/995) oranında bulundu. Tüm mikroorganizmalar arasında en sık koagülaz negatif stafilkoklar (KNS) %58,9 (586/995), *Acinetobacter baumannii* %10,0 (100/995), *Klebsiella pneumoniae* %7,6 (76/995), *Enterococcus faecium* %4,1 (41/995), *Escherichia coli* %3,8 (38/995) oranında bulundu. Gram pozitif bakterilerden en sık KNS %82,4 (586/711) oranında, Gram negatif bakterilerden en sık *A. baumannii* %36,9 (100/271) oranında tespit edildi. Metisilin direnci KNS'de %89,8, *S. aureus*'da %57,1 oranında bulundu. KNS, *S. aureus* ve *Enterococcus* spp.'de vankomisin direnci sırasıyla %4,4, %3,6 ve %16,0 oranında tespit edildi. ESBL pozitifliği *E. coli*'de %68,4, *K. pneumoniae*'de %87,0'dı. *E. coli*'de en etkili antibiyotikler meropenem (%100), kolistin (%100), amikasin (%100), tigesiklin (%94,7) iken, *K. pneumoniae*'de en etkili antibiyotikler gentamisin (%53,2), amikasin (%51,9), tigesiklin (%48,1) ve kolistin (%46,8) olarak tespit edildi. *Pseudomonas aeruginosa*'ya en etkili antibiyotikler kolistin (%100) ve amikasin (%69,0) olurken, *A. baumannii*'de en etkili antibiyotikler tigesiklin (%100) ve kolistin (%96) olarak tespit edildi. Maya mantarlarından *Candida parapsilosis* %63,6 (7/11), *Candida albicans* %27,3 (3/11) oranında bulundu. *Candida* türlerinde flukonazole direnç tespit edilmedi.

Sonuç: Hastanemiz yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden metisiline dirençli stafilkok ve enterokokların, çoklu antibiyotik direnci gösteren *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarının izole edilmesi; enfeksiyon kontrol programlarının ve akılcı antibiyotik kullanım politikalarının daha etkin uygulanması gerektiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik duyarlılık, kan kültürü, mikroorganizma, yoğun bakım ünitesi

microorganisms, Gram positive bacteria were 71.7% (713/995), Gram negative bacteria 27.2% (271/995), yeast 1.1% (11/995). Among all microorganisms, the most common coagulase negative staphylococcus (CNS) 58.9% (586/995), *Acinetobacter baumannii* 10.0% (100/995), *Klebsiella pneumoniae* 7.6% (76/995), *Enterococcus faecium* 4.1% (41/995), *Escherichia coli* found in 3.8% (38/995). Among the Gram positive bacteria, the most common coagulase negative staphylococci were 82.4% (586/711), and the most common Gram negative bacteria was *A. baumannii* 36.9% (100/271). Methicillin resistance was found in 89.8% of CNS and 57.1% in *S. aureus*. Vancomycin resistance in KNS, *S. aureus* and *Enterococcus* spp. was determined as 4.4%, 3.6% and 16.0%, respectively. ESBL positivity was 68.4% in *E. coli* and 87.0% in *K. pneumoniae*. While the most effective antibiotics against *E. coli* are meropenem (100%), colistin (100%), amikacin (100%), tigecycline (94.7%), the most effective antibiotics against *K. pneumoniae* are gentamicin (53.2%), amikacin (51.9%), tigecycline (48.1%) and colistin (46.8%). The most effective antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* were colistin (100%) and amikacin (69.0%), while the most effective antibiotics against *A. baumannii* were tigecycline (100%) and colistin (96%). Among the yeast fungi, *Candida parapsilosis* was found in 63.6% (7/11), *Candida albicans* 27.3% (3/11). Resistance to fluconazole was not detected in *Candida* species.

Conclusion: Isolation of methicillin resistant staphylococci and enterococci, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *K. pneumoniae* strains showing multiple antibiotic resistance from blood cultures of patients hospitalized in our hospital's intensive care units; showed that infection control programs and rational antibiotic use policies should be made more effective.

Key Words: Antibiotic susceptibility, blood culture, microorganism, intensive care unit

GİRİŞ

Kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE), yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatan hastalarda yaygın bir komplikasyon olup, morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir. Kritik hastalığı olan hastalar; başvuru sırasında yüksek hastalık şiddeti (APACHE III skoru), hastanede uzun süreli yatış, mekanik ventilasyon ihtiyacı, renal replasman tedavisi, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, ameliyat, damar içi kateter kullanımı ve immünosupresyon dahil olmak üzere belirli risk faktörlerine maruz kalır (1). YBÜ'lerde gelişen enfeksiyonların tedavisine erken başlanması hastanın mortalitesi ve morbiditesi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle ampirik tedaviye yol gösterici olması bakımından surveyans kayıtlarının tutulması önemlidir (2). Kandaki etkenlerin hızlı ve doğru tanımlanması için otomatize kan kültürü sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (3). Bakteriyemilerde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların dağılımları ve antibiyotik duyarlılıkları yıllara göre değişiklikler göstermektedir. Ampirik tedavi seçiminde yol göstermesi için etken mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarında oluşan değişiklikler her merkez tarafından sürekli olarak belirlenmelidir (4). Bu çalışmada Mart 2019-Mart 2021 tarihleri arasında Niğde Eğitim ve Araştırma Hastanesi yoğun bakım ünitelerinden mikrobiyoloji laboratuvarına gelen kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizma dağılımı ve antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mart 2019-Mart 2021 tarihleri arasında Niğde Eğitim ve Araştırma Hastanesi yoğun bakım ünitelerinden mikrobiyoloji laboratuvarına gelen kan kültürleri retrospektif olarak değerlendirildi. Hastanemizde, yenidoğan ve çocuk yoğun bakım üniteleri hariç, çalışmanın yapıldığı dönemlerdeki yoğun bakım üniteleri 61 hasta yatak kapasiteli olup, dahili ve cerrahi bölüm hastalarının 2. ve 3. basamak yoğun

bakım takip ve tedavisi yapılmaktadır. Kan örnekleri BD BACTEC PLUS+Aerobic/F (Becton Dickinson, USA) kan kültür şişelerine ekilerek BD BACTEC 9120 ve BACTEC FX (Becton Dickinson, ABD) otomatize kan kültürü sisteminde ortalama 5 gün inkübe edildi. Pozitif sinyal veren şişelerden Gram boyama yapıldı. Aynı zamanda bu şişelerden koyun kanlı ve eozin metilen mavisi (EMB) besiyerlerine pasaj yapılarak aerob ortamda 36 ± 1 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. Üreme tespit edilen örneklerden konvansiyonel yöntemler kullanılarak ön tanımlaması yapılan bakteri ve mantar suşlarının ileri identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri için Vitek 2 compact (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda değerlendirildi.

Difteroidler ve Bacillus türleri iki kan kültürü şişesinden üremediği zaman kontaminasyon olarak değerlendirildi. Çalışmamızın retrospektif yapılması nedeniyle hastalara klinik ve laboratuvar değerleriyle birlikte bakılmadığı için kan kültürü üremeleri yalancı pozitiflik açısından değerlendirilemedi. Her hastanın ilk izolatu değerlendirilmeye alınıp, her hasta için mükerrer kayıtlar hariç tutuldu. Hastanemizde tüberküloz laboratuvarı olmadığı ve tüberküloz tanımlaması yapılamayacağı için myco F şişesi kullanılmamıştır. Bu nedenle TB tespiti yapılamamıştır. Metisilin direnci oksasilin MİK ve/veya sefoksitin tarama sonuçlarına göre, kolistin direnci ise EUCAST önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi.

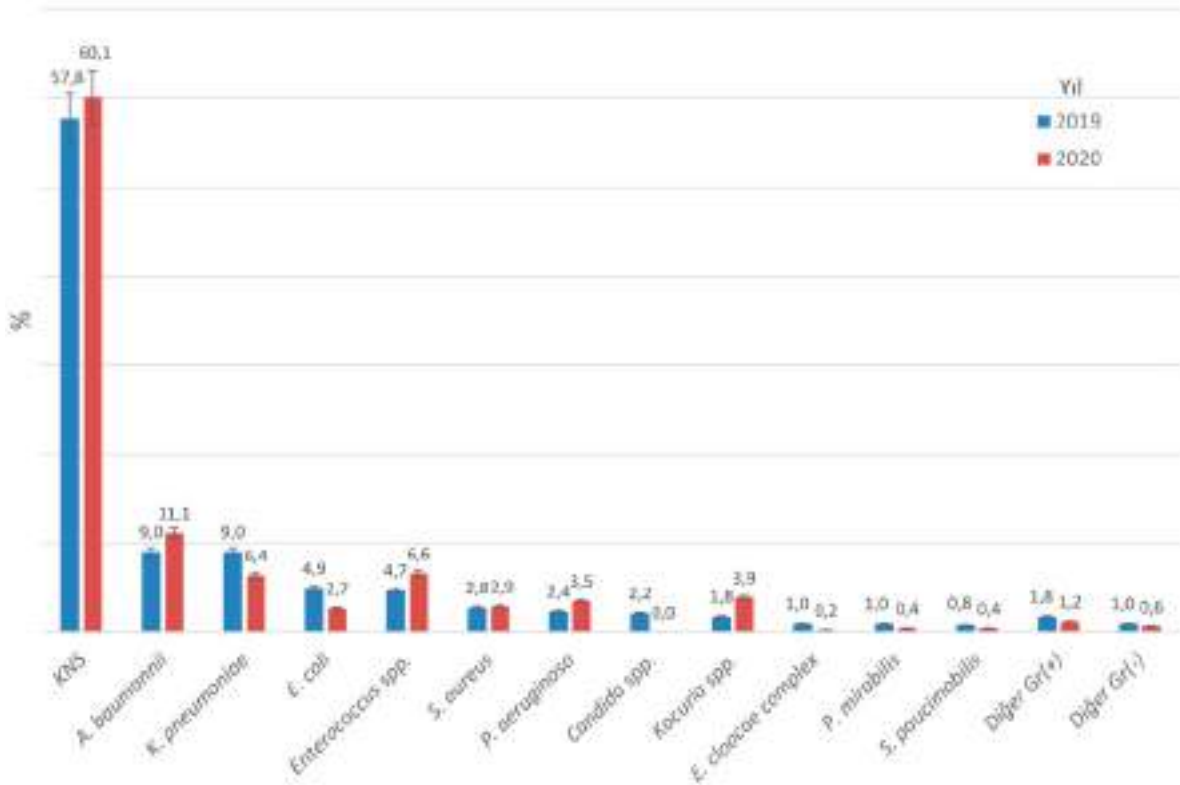
Bu çalışma, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 28.04.2021, Karar no: 54180).

BULGULAR

Toplam 9607 kan kültürü şişesinin 995'inde üreme tespit edildi. Üreme olanların 570'i (%57,3) erkek, 425'i (%42,7) kadındı. Hastaların ortalama yaşı $68,9\pm 16,8$ 'di. İzole edilen mikroorganizmalar

arasında Gram pozitif bakteriler %71,7 (713), Gram negatif bakteriler %27,2 (271), mayalar %1,1 (11) oranında tespit edildi. Tüm mikroorganizmalar arasında en sık koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) %58,9 (586), *Acinetobacter baumannii* %10 (100), *Klebsiella pneumoniae* %7,6 (76), *Enterococcus faecium* %4,1 (41), *Escherichia coli* %3,8 (38)

bulundu. Gram pozitif bakterilerden en sık KNS %82,4 (586/711), Gram negatif bakterilerden en sık *A. baumannii* %36,9 (100/271) görüldü. İki yıllık değerlendirmemizdeki yıllara göre kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizma dağılımı Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Yıllara göre kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı

Metisilin direnci KNS’de %89,8, *S. aureus*’da %57,1 oranında bulundu. KNS ve *S. aureus*’da vankomisin duyarlılığı sırasıyla %95,6, %96,4 oranında tespit edildi. KNS’de linezolid direnci %3,2 oranında görülürken, *S. aureus*’da linezolid direnci saptanmadı. *E. faecium*’da vankomisin direnci %14,6 (6/41), linezolid direnci %7,3 oranında görülürken, *E. faecalis*’te vankomisin direnci %7,7 (1/13), linezolid direnci sırasıyla %7,7 idi. KNS’de 2020 yılında 2019’a

göre; siprofloksasin ($p < 0,0001$), fusidik asit ($p = 0,001$) ve oksasilin ($p < 0,0001$) anlamlı oranda daha dirençli; daptomisin ($p = 0,002$) ise daha duyarlı olarak bulundu. *S. aureus*’da 2020 yılında penisilin anlamlı olarak daha dirençli tespit edilirken ($p = 0,041$), *E. faecium*’da amikasin daha dirençli olarak bulundu ($p < 0,0001$). Diğer antibiyotiklerin duyarlılıkları arasında anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 1).

Tablo 1. Yıllara göre kan kültürlerinden izole edilen Gram pozitif bakterilerin antibiyotik duyarlılık oranları

	KNS			Staphylococcus aureus			Enterococcus faecium			Enterococcus faecalis						
	2019 (n=294)	2020 (n=292)	Toplam (n=586)	P	2019 (n=14)	2020 (n=14)	Toplam (n=28)	P	2019 (n=13)	2020 (n=28)	Toplam (n=41)	P	2019 (n=11)	2020 (n=2)	Toplam (n=13)	P
AM	35.4	18.8	27.1	<0.0001	92.9	78.6	85.7	0.596	0	7.1	4.9	1.00	18.2	100	30.8	0.077
CIP	39.8	27.7	33.8	0.002	64.3	57.1	60.7	0.699	7.7	0	2.4	<0.0001	81.8	100	84.6	1.00
DA	85.0	93.2	89.1	0.002	71.4	78.6	75.0	1.00								
DAP																
E																
FA	26.2	15.4	20.8	0.001	64.3	71.4	67.9	1.00								
VA	96.6	94.5	95.6	0.222	100	92.9	96.4	1.00	84.6	85.7	85.4	1.00	90.9	100	92.3	1.00
GN	59.2	59.9	59.6	0.854	85.7	85.7	85.7	1.00								
GN(YD)									23.1	28.6	26.8	1.00	54.5	100	61.5	0.487
LNZ	97.3	96.2	96.8	0.475	100	100	100		100	89.3	92.7	0.539	90.9	100	92.3	1.00
OX	16.0	4.5	10.2	<0.0001	50	64.3	57.1	0.445								
PEN					35.7	0	17.9	0.041								
SXT	81.3	79.8	80.5	0.647	85.7	85.7	85.7	1.00	38.5	64.3	56.1	0.121	18.2	100	30.8	0.077
TEC					85.7	94.3	89.3	0.385	84.6	75.0	78.0	0.692	90.9	100	92.3	1.00
TGC	98.6	99.0	98.8	1.00	100	92.9	96.4	1.00	100	100	100		100	100	100	
FOX(T)	13.9	3.8	8.9	<0.0001	42.9	50.0	46.4	0.705								

AM: Ampisilin, CIP: Siprofloksasin, DA: Klindamisin, DAP: Daptomisin, E: Eritromisin, FA: Fusidik Asit, VA: Vankomisin, GN: Gentamisin, GN(YD): Yüksek dozda gentamisin, LNZ: Linezolid, OX: Oksasilin, PEN: Penisilin, SXT: Trimetoprim-Sülfametoksazol, TEC: Teikoplanin, TGC: Tigesiklin, FOX(T): Sefoksitin Tarama

E. coli'de ESBL pozitifliği %68,4, *K. pneumoniae*'de %87'di. *E. coli* suşlarına en etkili antibiyotikler meropenem (%100), kolistin (%100), amikasin (%100), tigesiklin (%94,7) iken, *K. pneumoniae* suşlarına en etkili antibiyotikler gentamisin (%53,2), amikasin (%51,9), tigesiklin (%48,1) ve kolistin (%46,8) olarak tespit edildi. *Pseudomonas aeruginosa*'ya en etkili antibiyotikler kolistin (%100) ve amikasin (%69,0) olurken, *A. baumannii* suşlarına en etkili antibiyotikler tigesiklin (%100) ve kolistin (%96) olarak tespit edildi. *A. baumannii*'de 2020 yılında 2019'a göre; amikasin anlamlı oranda daha dirençli ($p=0,04$), *K. pneumoniae*'de tigesiklin daha dirençli ($p=0,023$); amikasin ($p=0,001$), siprofloksasin ($p<0,0001$), kolistin ($p=0,036$), gentamisin ($p<0,0001$), meropenem ($p=0,004$), trimetoprim-sulfametaksazol ($p=0,001$) daha duyarlı olarak bulundu. *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da iki yıl arasında antibiyotik duyarlılıkları açısından anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 2).

Maya mantarlarından en sık *Candida parapsilosis* %63,6 (7/11) görülürken *Candida albicans* %27,3 (3/11), *Candida kefyr* %9,1 (1/11) oranında bulundu. *Candida* türlerinde flukonazole direnç tespit edilmedi.

TARTIŞMA

Kan dolaşımı enfeksiyonlarında en sık Gram pozitif bakteriler görülmektedir. Gram negatif patojenler arasında en yaygın izolatlar *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'dır. *Candida* türleri YBÜ'de önemli bir rol oynar ve KDE vakalarının %8-15'ini oluşturur (1). Yurt dışında 2015'te yapılan çok merkezli bir çalışmada Gram negatif bakteriler %92,6, Gram pozitif bakteriler %69,8 oranında bulunmuştur (5). Hindistan'da 3. basamak bir hastanenin yoğun bakımında yapılan başka bir çalışmada Gram pozitif bakteriler %60,37, Gram negatif bakteriler %60,29, mayalar ise %3,33 oranında tespit edilmiştir (6). Yurt içinde yapılan farklı çalışmalarda kan kültürlerinden elde edilen izolatlarda Gram pozitif bakteriler %54-69, Gram negatif bakteriler %24-41, mayalar %1-10,6 oranları arasında bulunmuştur (7-12). 2016 yılında yayınlanan Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDS) raporunda kan ve BOS'tan elde edilen izolatlar arasında *E. coli* %23,8, *E. faecalis*+*E.*

faecium %18,9, *K. pneumoniae* 17,6, *S. aureus* %15,5, *A. baumannii* %15,1, *P. aeruginosa* %8,0, *S. pneumoniae* %1,1 oranında olduğu belirtilmiştir (13). Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar arasında; Gram pozitif bakteriler %71,7, Gram negatif bakteriler %27,2, mayalar %1,1 oranında tespit edildi. 2020 yılında 2019'a göre *E. coli* ve *K. pneumoniae* üremelerinde azalma gözlemlendi. *Candida* spp. 2019'da tespit edilmezken, 2020 yılında %2,2 oranında bulundu. Yıllar arasındaki farklılıkların; hastaneye yatan hastaların altta yatan hastalıkları, operasyon öyküsü, hastaneye yatış öyküsü, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, total parenteral nutrisyon kullanımı, santral kateter varlığı, mekanik ventilasyon gibi risk faktörlerinin değişkenlik göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Morbidite ve mortalitesinin yüksek olması nedeniyle metisiline dirençli enfeksiyonların tespit edilmesi önemlidir (7). Yurt dışında 2016'da yapılan bir derlemede *S. aureus* izolatları için metisilin direnç oranlarının farklı ülkeler arasında %0-64,5 gibi geniş bir değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir (1). Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda metisilin direnç oranları KNS'lerde %54,9-89,7, *S. aureus*'da %18-71,7 oranları arasında tespit edilmiştir (7-9,10,12-17). 2016 UAMDS raporunda metisiline dirençli *S. aureus* oranı %23,6, 2018 yılında yayınlanan Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) raporunda ise %26 oranında bildirilmiştir (13,18). Bizim çalışmamızda metisilin direnci KNS'de %89,8, *S. aureus*'da %57,1; literatürde çalışmalardaki oranlar arasında ancak ulusal verilerin üstünde tespit edildi. Çalışmamızda 2020 yılında 2019'a göre, *S. aureus*'da metisilin direncinin azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. KNS'de 2020 yılında 2019'a göre siprofloksasin, fusidik asit ve oksasilin anlamlı oranda daha dirençli; daptomisin ise daha duyarlı olarak bulundu. *E. faecium*'da ise amikasin daha dirençli olarak bulundu. Bu farklı oranların nedeninin; yatan hasta profillerinin, uygulanan antibiyoterapilerin ve yapılan invaziv işlemlerin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda *Enterococcus* spp. Gram pozitif bakteriler arasında 2. sıklıkta tespit edildi. Tüm

Tablo 2. Yıllara göre kan kültürlerinden izole edilen Gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık oranları

	<i>Acinetobacter baumannii</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
	2019 (n=46)	2020 (n=54)	Toplam (n=100)	P	2019 (n=46)	2020 (n=31)	Toplam (n=77)	P	2019 (n=25)	2020 (n=13)	Toplam (n=38)	P	2019 (n=12)	2020 (n=17)	Toplam (n=29)	P
AK	41.3	22.2	34.0	0.04	37.0	74.2	51.9	0.001	100	100	100		58.3	76.5	69.0	0.422
AM					0	0	0		12.0	7.7	10.5	1.00				
AMC					6.5	16.1	10.4	0.256	28.0	7.7	21.0	0.145				
CAZ	0	0	0		6.5	22.6	13.0	0.08	36.0	30.8	34.2	0.747	50.0	64.7	58.6	0.471
CIP	0	0	0		6.5	48.4	23.4	<0.0001	28.0	30.8	28.9	0.858	58.3	70.6	65.5	0.697
COL	93.5	98.1	96.0	0.331	37.0	61.3	46.8	0.036	100	100	100		100	100	100	
CRO					6.5	22.6	13.0	0.08	32.0	30.8	31.6	0.938				
ETP					6.5	22.6	13.0	0.08	100	100	100					
FEP					6.5	16.1	10.4	0.256	36.0	38.5	36.8	0.881	50.0	64.7	58.6	0.471
FOX					6.5	19.4	11.7	0.145	84.0	92.3	86.8	0.472				
GN	19.6	16.7	18.0	0.707	34.8	80.6	53.2	<0.0001	64.0	69.2	65.8	0.747	58.3	70.6	65.5	0.694
IPM	6.5	1.9	4.0	0.331									58.3	23.5	37.9	0.119
LEV	0	0	0										58.3	64.7	62.1	1.00
MEM	0	0	0		15.2	45.2	27.3	0.004	100	100	100		58.3	47.1	51.7	0.550
SXT	37.0	31.5	34.0	0.565	17.4	54.8	32.5	0.001	36.0	23.1	31.6	0.486				
TGC	100	100	100		58.7	32.3	48.1	0.023	100	84.6	94.7	0.111				
TZP					6.5	19.4	11.7	0.145	60.0	69.2	63.2	0.728	50.0	58.8	55.2	0.638

AK: Amikasin, AM: Ampisilin, AMC: Amoksisilin-Klavulanat, CAZ: Sefotazidim, CIP: Siprofloksasin, COL: Kolistin, CRO: Seftriakson, ETP: Ertapenem, FEP: Sefepim, FOX: Sefoksitin, GN: Gentamisin, IPM: İmipenem, LEV: Levofloksasin, MEM: Meropenem, SXT: Trimetoprim-Sülfametoksazol, TGC: Tigesiklin, TZP: Piperasilin-Tazobaktam

dünyada olduğu gibi hastanemizde de özellikle enterokok türlerindeki glikopeptid direnci önemli bir sorun teşkil etmektedir. Çalışmamızda *E. faecium*'da glikopeptid direnci %14,6 (6/41) oranında görülürken *E. faecalis*'te %7,7 (1/13) oranında tespit edildi. Hindistan'da yoğun bakım ünitelerinde yapılan bir çalışmada *Enterococcus* türlerinde glikopeptid direnci tespit edilmemiştir (6). Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda; *E. faecalis* suşlarının tamamı vankomisine duyarlı bulunurken, *E. faecium* %90,6 oranında duyarlı (8), Gaziantep'te yapılan çalışmada *Enterococcus* türlerinde glikopeptid direnci saptanmamıştır (12). Başka bir çalışmada *Enterococcus* türleri içinde sadece bir izolatta (%1,73) glikopeptid direnci bulunmuştur (14). 2015'te yapılan bir çalışmada enterokoklarda %5,4 oranında vankomisin direnci saptanırken (15), 2013'te yapılan bir çalışmada ise, *E. faecium* türlerinde %8,6 oranında vankomisin dirençli olduğu bulunmuştur (1). Bizim çalışmamızda özellikle *E. faecium*'daki glikopeptid direncinin yüksek olmasının nedeninin, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların ek hastalıklarına, girişimsel işlemlerin sıklığına, glikopeptid kullanımının yoğunluğuna bağlı olabileceği düşünüldü. Çalışmamızda; KNS'de vankomisin duyarlılığı %95,6 (560/586), *S. aureus*'da %96,4 (27/28) oranında bulundu. Başka çalışmalarda; KNS ve *S. aureus* izolatlarında glikopeptid direncine rastlanmamıştır (12,15,17). 2016 UAMDSS ve 2018 CAESAR raporunda *S. aureus* izolatlarında glikopeptid direnci tespit edilmemiştir. (13,18) Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda vankomisin dirençli *S. aureus* tespit edilememesi ve çalışmamızın retrospektif olması nedeniyle vankomisin direncinin konfirme edilememesi yanlış pozitiflik olabileceğini düşündürmektedir.

Yurt içinde yapılan bazı çalışmalarda; ESBL pozitiflik oranları *E. coli* için %10,0-%70,5 ve *K. pneumoniae* için %23,07-%93,3 gibi geniş bir aralıkta bulunmuştur (7-9,10-14). 2016 UAMDSS raporuna göre ise; ESBL pozitifliği *E. coli* izolatlarında %47,8 oranında, *K. pneumoniae* izolatlarında ise %58,0 oranında bulunmuştur (13). Bizim çalışmamızda; *E. coli*'de ESBL pozitifliği %68,4 (26/38), *K. pneumoniae*'de %87 (67/77) olarak UAMDSS raporuna göre yüksek oranda bulunmuştur. Bunun nedeni;

hastane florasının, yatan hastaların ek hastalıkları ve kliniklerinin, uygulanan antibiyoterapilerin ve destek tedavilerinin farklılığına bağlı olabilir. Yapılan çalışmalarda; *E. coli* ve *K. pneumoniae* için en etkili antibiyotikler amikasin, gentamisin, meropenem, imipenem, tigesiklin, kolistin olarak bildirilmiştir (8,10-14). 2016 UAMDSS ve 2018 CAESAR raporunda *E. coli* ve *K. pneumoniae* için karbapenemler, amikasin ve gentamisin en etkili antibiyotik olarak tespit edilmiştir (13,18). Yapılan diğer çalışmalarla kıyaslandığında çalışmamızda duyarlı antibiyotikler büyük ölçüde aynı saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda; 2020 yılında 2019'a göre *K. pneumoniae*'da ESBL pozitifliğinin ve amikasin, siprofloksasin, kolistin, gentamisin, meropenem, trimetoprim-sulfametaksazol direncinin azalması dikkat çekicidir. Bu durumun bu dönemde yatan hastaların klinik özelliklerinin, uygulanan antibiyoterapilerin, diğer destek tedavilerinin ve yapılan invaziv işlemlerin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa* için amikasin, kolistin, gentamisin, karbapenemler; *A. baumannii*'de ise tigesiklin, kolistin, trimetoprim-sulfametaksazol, amikasin, gentamisin en etkili antibiyotikler olarak bulunmuştur (8,10-14). 2016 UAMDSS ve 2018 CAESAR raporunda ise *P. aeruginosa* için seftazidim, amikasin, gentamisin; *A. baumannii* için amikasin ve gentamisin en duyarlı antibiyotikler olarak tespit edilmiştir (13,18). Çalışmamızda *P. aeruginosa*'ya en etkili antibiyotikler kolistin, amikasin, gentamisin, seftazidim; *A. baumannii*'de tigesiklin, kolistin, amikasin, trimetoprim-sulfametaksazol olarak bulundu. 2020 yılında 2019'a göre, *A. baumannii*'de amikasin anlamlı oranda daha dirençli bulunmuştur. *P. aeruginosa*'da ise 2020 yılında kinolonlar ve aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı direncin azaldığı, karbapenemlere karşı direncin arttığı tespit edilmiştir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülemedi. Bu antibiyotik direnç oranlarının bilinmesi, hastalarımıza ampirik antibiyoterapi başlarken daha dikkatli olmamıza ve başlangıç antibiyotik tedavisine yanıt vermeyen hastalarda antibiyotik revizyonu yaparken bu direnç oranlarını göz önüne alarak değişiklik yapmamıza olanak sağlamıştır.

Candida spp, YBÜ vakalarının %8-15'ini

oluşturmaktadır (1). Ülkemizde yapılan kan kültürlerinin beş yıllık değerlendirmesinin yapıldığı bir çalışmada *Candida* türleri %6 oranında bulunmuştur. *Candida* türlerinin arasında *C. albicans* %53,6, *C. parapsilosis* %18,1, *C. tropicalis* %9 oranında belirlenmiştir (10). 2017'de yapılan bir çalışmada; kan kültürlerinin %14,8'inde *Candida* türleri saptanmıştır. Bunların da %56,1'i *C. parapsilosis*, %31,7'si *C. albicans*, %6,5'u *C. glabrata*, %4,1'i *C. tropicalis*, %1,6'sı *C. pelliculosa* olarak tanımlanmıştır (20). Yedi yıllık dönemde kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise; 24709 kan kültürünün 119'unda (%0,48) *Candida* türleri tespit edilmiş; *Candida* türleri içerisinde *C. albicans* %49, *C. parapsilosis* %23, *C. tropicalis* %14, *C. glabrata* %12 oranında bulunmuştur (21). Bizim çalışmamızda; %1,1 (11/995) oranında *Candida* tespit edildi. *Candida* türleri içerisinde; *C. parapsilosis* %63,6 (7/11), *C. albicans* %27,3 (3/11), *C. kefir* %9,1 (1/11) oranında bulundu. Diğer çalışmalara göre, çalışmamızda maya mantarları daha az oranda tespit edildi. Hastaneye yatan hastaların altta yatan hastalıkları, operasyon öyküsü, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, total parenteral nutrisyon kullanımı, mekanik ventilasyon gibi kandidemi için risk faktörlerinin varlığı bu oranları etkilemektedir.

Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda, kan kültür üremelerinde kontaminasyon olabileceği belirtilmiştir (15,22,23). Çalışmamızın retrospektif yapılması nedeniyle hastalar klinik ve laboratuvar değerleriyle

birlikte değerlendirilemediği için yalancı pozitiflik açısından değerlendirilmemiştir. Bu nedenle yapılan diğer çalışmalara göre özellikle kontaminasyon sayılabilecek mikroorganizmalar sayıca fazla bulunmuştur. Çalışmamızdaki diğer bir kısıtlılık, *S. aureus*'da vankomisin direncinin doğrulanamamasıydı. Ulusal verilerde *S. aureus*'da vankomisin direnci bildirilmemiştir. Çalışmamızda otomatize sistemden elde edilen veride bir izolatta vankomisin direnci tespit edilmişti. Ancak geriye dönük doğrulaması yapılmadığı için sonucun yanlış pozitiflik olabileceği de unutulmamalıdır. Çalışmamızda kolistin direnci EUCAST önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon temelli otomatize sistem ile bakılmıştır. Saflığından şüphelenilen örnekler dışında test tekrarı veya başka bir yöntem ile doğrulaması yapılmamıştır.

Sonuç olarak; kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılık oranları merkezlere ve zamana göre değişkenlik gösterebilmektedir. Klinisyenlere ampirik tedavi protokollerinde yol göstermesi ve antibiyotik revizyonları yapılırken direnç profilini bilmek için, ayrıca merkezlerin kendi enfeksiyon kontrol programlarının ve akılcı antibiyotik kullanımının etkinliğini görebilmek için belirli zaman aralıklarında kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların dağılımını ve antibiyotik duyarlılık paternini gösteren çalışmaların yapılmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:29.04.2021 ve Karar No: 54180).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

- Bassetti M, Righi E, Carnelutti A. Bloodstream infections in the Intensive Care Unit. *Virulence*, 2016; 7 (3): 267-79.
- Dursun ZB, Aydın S, Çelik İ. Yoğun bakım ünitesinde bakteremi nedeni olan mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Flora*, 2019; 24(3):183-9.
- Yiş R. Güneypođu Anadolu Bölgesi'nde bir çocuk hastanesinde kan kültürü sonuçlarının değerlendirilmesi. *Türk Ped Arş*, 2015; 50:102-7.
- Çopur Çiçek A, Şentürk Köksal Z, Ertürk A, Köksal E. Rize 82. Yıl Devlet Hastanesi'nde bir yıllık sürede kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2011; 68(4):175-84.
- Farina C, Arena F, Casprini P, Cichero P, Clementi M, Cosentino M, et al. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures using the lysis-filtration technique and matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): a multicentre study. *New Microbiol*, 2015;38(2):245-50.
- Banik A, Bhat SH, Kumar A, Palit A, Sneha K. Bloodstream infections and trends of antimicrobial sensitivity patterns at Port Blair. *J Lab Physicians*, 2018;10(3):332-7.
- Özkaya E, Tümer S, Kirişçi Ö, Çalışkan A, Erdoğmuş P. Son iki yılda Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesi'nde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2015;72(2):115-22.
- Şafak B, Kılınc O. 2010-2015 yılları arasında kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Klimik Derg*, 2016;29(2):60-4.
- Sevim S, Öztürk Ş, Coşkun A, Özgeç O, Avcı M. BACTEC kan kültür sistemi ile izole edilen mikroorganizmaların değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Derg*, 2007;21(3):135-40.
- Turhanođlu M, Koyuncu E, Bayındır Bilman F, Onur A, Tekay F. Evaluation of the results obtained from microbiological analysis of blood cultures over 5 years. *J Fam Med Health Care*, 2016;2(4):43-50.
- Caskurlu H, Davarci I, Kocoglu ME, Cag Y. Examination of blood and tracheal aspirate culture results in intensive care patients: 5-year analysis. *Medeniyet Med J*, 2020;35(2):128-35.
- Mehli M, Gayyurhan ED, Zer Y, Akgün S, Özgür Akın FE, Balcı İ. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde kan kültürlerinden izole edilen mikro-organizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *İnfeksiyon Derg*, 2007;21(3):141-5.
- https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/uamdss/yillik_raporlar/UAMDSS_2016_Rapor.pdf (Erişim tarihi: 11.05.2021).
- Yılmaz S, Gümral R, Güney M, Bedir O, Üsküdar Güçlü A, Duyan S, ve ark. İki yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkların değerlendirilmesi. *Gülhane Tıp Derg*, 2013;55:247-52.
- Er H, Aşık G, Yoldaş Ö, Demir C, Keşli R. Kan kültürlerinde izole edilerek tanımlanan mikroorganizmaların ve antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2015;45(1):48-54.
- Çetinkol Y, Özenç Çakır F, Enginyurt Ö. Kan kültürlerinden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarında metisiline direncin yıllara göre değişimi. *Ankem Derg*, 2013;27(1):38-42.
- Nazik S, Cingöz E, Şahin AR, Güler S. Kan kültürlerinden izole edilen staphylococcus aureus suşlarında metisilin direncinin yıllara göre değişimi. *Kocaeli Med J*, 2018;7(1):32-36.
- <https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/handle/10665/324806/9789289053860-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Erişim tarihi: 15.05.2021)
- Gözüböyük G, Uyanık MH, Hancı H, Aktaş O, Özbek A. Kan kültürlerinden izole edilen enterokokların antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg*, 2013;27(3):107-12.
- Şırın MC, Ağuş N, Yılmaz N, Bayram A, Yılmaz Hancı S, Şamlıoğlu P, ve ark. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2017;74(3):269-78.
- Gültekin B, Eyięör M, Telli M, Aksoy M, Aydın N. Yedi yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen Candida türlerinin retrospektif olarak incelenmesi. *Ankem Derg*, 2010;24(4):202-8.
- Yılmaz N, Köse Ş, Ağuş N, Ece G, Akkoçlu G, Kıraklı C. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar, antibiyotik duyarlılıkları ve nozokomial bakteriyemi etkenleri. *Ankem Derg*, 2010;24(1):12-9.
- Aydın M, Kaşıkçıoğlu C, Nargiz Koşucu S, Timurkaynak F, Arslan H. Kan dolaşımı infeksiyonu etkenleri ve antibiyotik direnç oranları. *Klimik Derg*, 2016; 9(2):83-6.

In vitro efficacy and field effectiveness of silica-based acaricide against *Dermanyssus gallinae*

Dermanyssus gallinae mücadelesinde silika bazlı akarisitlerin in vitro etkinliği ve saha koşullarında etkililiği

Nafiye KOÇ¹ (ID), Serpil NALBANTOĞLU¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: The poultry red mite, PRM, *Dermanyssus gallinae* (*D. gallinae*), is one of poultry's most important and common pests. Although the presence of a variety of acaricides in control, PRM continues to be frequently reported around the world, owing to the developing resistance and severe legislation prohibiting the use of chemicals. Therefore, new and safe control approaches that do not threaten animal and human health are required. This study is aimed to determine the efficacy of a natural silica-based product based on diatomaceous earth (DE) in-vitro conditions and its combination with locally applied synthetic pyrethroids under field conditions in commercial egg-laying henhouses.

Methods: *Dermanyssus gallinae* populations were collected and transferred alive to the laboratory from integrated cage poultry farms. The bioassays were performed with the liquid formulation of silicon dioxide. The LT_{50} values were calculated by probit analysis using PoloPlus-PC software. The field treatment was conducted using the combination of silicon dioxide and alpha-cypermethrin in two commercial poultry houses with natural PRM infestation. After application, mites were collected with PVC traps on different days. The traps were individually packed and the number of mites

ÖZET

Amaç: Kırmızı kanatlı akar (KKA), *Dermanyssus gallinae* (*D. gallinae*), kanatlı sektörünün en önemli ve yaygın görülen ektoparazitlerinden biridir. Mücadelesinde kullanılan çok sayıda akarisit olmasına rağmen gelişen direnç ve kimyasalların kullanımını yasaklayan mevzuat nedeniyle KKA enfestasyonu tüm dünyada sıklıkla bildirmeye devam etmektedir. Bu nedenle insan ve hayvan sağlığını tehdit etmeyen yeni ve güvenli kontrol metotlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, in vitro koşullarda doğal silika bazlı akarisitlerin etkinliğini ve ticari yumurta tavuğu kümelerinde lokal olarak uygulanan sentetik piretroidler ile kombinasyonunun etkinliğini belirlemek amaçlanmıştır.

Yöntem: *Dermanyssus gallinae* popülasyonları, kafesli, ticari yumurta tavuğu kümelerinden toplanmış ve canlı olarak laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvar denemeleri sıvı formülasyon haline getirilen silikon dioksit ile gerçekleştirilmiştir. LT_{50} değerleri PoloPlus-PC programı kullanılarak probit analizi ile belirlenmiştir. Saha uygulaması, doğal olarak KKA enfestasyonu bulunan iki ticari küme silikon dioksit ve alfa-sipermetrin kombinasyonu kullanılarak yürütülmüştür. Uygulama sonrası belirli günlerde kurulan PVC tuzaklar ile akarlar toplanmıştır. Bireysel olarak paketlenip laboratuvara

¹Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Nafiye KOÇ
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD. Altındağ / Ankara - Türkiye
E-posta / E-mail : nafiye koc@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 16.05.2022
Kabul Tarihi / Accepted : 28.08.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.43799

Koç N, Nalbantoğlu S. In vitro efficacy and field effectiveness of silica-based acaricide against *Dermanyssus gallinae*
Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 616 - 621

was counted under a stereo microscope in the laboratory. The efficiency of the application was then determined by counting the mites under a stereomicroscope.

Results: In laboratory conditions, DE active substance at the concentration of 320 mg/dish eventually reach 100% mortality of *D. gallinae* and the mean LT_{50} values were determined as 26.42 ± 0.57 h. The combination of silicon dioxide and alpha-cypermethrin in field conditions was found to be highly effective in reducing the number of PRMs and its effects lasted for four months following treatment.

Conclusion: These results suggest that DE might offer an environmentally-friendly alternative in PRM control on its own or in combination with widely used synthetic pyrethroids.

Key Words: *Dermanyssus gallinae*, The poultry red mite, silicon dioxide, management

getirilen tuzaklar stereo mikroskop altında incelenmiş ve içerisinde bulunan akarların sayımları yapılarak uygulamanın etkinliği takip edilmiştir.

Bulgular: Laboratuvar koşullarında 320 mg/petri konsantrasyonunda kullanılan silikon dioksit, *D. gallinae* üzerinde %100 ölüm oranı oluşturmuş ve ortalama LT_{50} değeri 26.42 ± 0.57 s olarak hesaplanmıştır. Saha koşullarında ise silikon dioksit ve alfa-sipermetrin kombinasyonunun KKA sayısını azaltmada oldukça etkin olduğu ve etkisinin uygulamayı takiben dört ay sürdüğü tespit edilmiştir.

Sonuç: Laboratuvar koşullarında uygulanan doğal silikon dioksit ve kümeslerde lokal olarak uygulanan piretroid ile kombinasyonlarının, *D. gallinae*'yi kontrol etmek için etkili bir seçenek olabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Dermanyssus gallinae*, kırmızı kanatlı akar, silikon dioksit, mücadele

INTRODUCTION

The ectoparasite, poultry red mite (PRM), *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) has a global distribution with a prevalence rate of over 80% among European layer farms (1), including Turkey (2, 3). It is known as one of the most harmful blood-sucking ectoparasites and its infestation causes significant welfare problems, both directly and indirectly through its role as a vector of infectious disease-causing pathogens (4-6) as well as great economic losses, notably in the egg-laying industry (7), amounting to 231 million euros in Europe (8).

The control of the PRM is primarily based on chemical methods, many of which are not safe for hens, humans, and ecosystems (9, 10). Organophosphates, amidines, carbamates, isoxazolines, and synthetic pyrethroids are still routinely used for the management of *D. gallinae* in egg-laying farms (7, 11). However, the strict legislations about residues threatening human health on products and the increasingly developing resistance causing failure in control, conclude a

discouraging effect for the farmers to avoid chemical strategies (9, 12, 13).

Because of the above-mentioned reasons, new and safer control methods such as vaccination, predatory mites, entomopathogenic fungus, essential oils, and organic acids are required (14, 10). Silica-based products containing silicon dioxide (SiO_2) constitute one of the remaining control options against arthropod pests (15). Silica's acaricidal effects have been attributed to a variety of mechanisms, including affecting the digestive system, blocking the stigmas and trachea, absorbing lipids in the cuticle, and destroying the protective waxy barrier (16). Therefore, the arthropods could not able to develop resistance to such products (17). The impact of these products varies depending on the silica quality, its ability to hold water, environmental factors, and the degree of bonding to the treated surfaces (14, 18). Studies have shown that silica products, both in liquid and powder form, have been proven to have a substantial acaricidal effect. Additionally, the acaricidal effect also was reported both in natural (diatomaceous earth (DE))

and synthetic (amorphous) silica products (15). That's why silica and its combinations have a lot of promise for future non-chemical *D. gallinae* management.

The present study aimed to determine the performance of a natural silica-based product based on DE in-vitro conditions and to indicate the effectiveness of silica combined with topical application of synthetic pyrethroids to cage equipment under field conditions in commercial egg-laying henhouses.

MATERIAL and METHOD

Dermanyssus gallinae populations were collected from integrated cage poultry farms located in Turkey. The sampled mites were subsequently transferred to the laboratory for the experiment in nylon bags containing a paper towel to reduce the humidity inside and allow hiding places for the mites. Totally, the experiments were performed with three replicates, on three different *D. gallinae* populations.

Bioassays

The experiments were conducted under controlled climatic conditions (25 ± 1 °C, 65-70% relative humidity, 16:8 h light-dark photoperiod). For the bioassays, semi-engorged adult female mites were separated and housed in laboratory conditions for 48 hours before being analyzed. All bioassays were performed with mites on filter paper (surface area: 16cm²) found in glass petri dishes (diameter: 9 cm).

A commercial formulation of silica including 100% diatomaceous earth as an active ingredient was used in the experiments. The powdery test substances were combined with distilled water to prepare the fluid products. The mixtures were taken for bioassays onto filter paper that was placed in petri dishes. The active substance was 320 mg/dish. Subsequently, the edges of the filter paper were covered with the glue trap in order to prevent mites from escaping the experimental area. Then, 30 adult female mites were transferred onto the filter paper. Mortality was recorded at least twice until all mites died and mites that could not move when touched with a fine brush were deemed dead. The control groups were sprayed with distilled water,

and the controls' mortality rates were consistently less than 10%. Lethal Time (LT), LT₅₀ values, and their 95% confidence limits were determined by probit analysis using PoloPlus-PC (LeOra, Software, Berkeley, CA, USA). The results have been considered significantly different ($p>0.05$) if the confidence limits did not overlap (19).

Field Trial

The treatment was performed at two commercial poultry houses with a spontaneous PRM infestation history. The houses had cage systems containing 120.000 egg-laying hens. During the field treatment, the temperature and relative humidity of the poultry houses were recorded as 21 °C and 53%, respectively.

Liquid preparation of Silicon dioxide was applied to whole henhouses at the recommended dose (20 gr/m²). The pyrethroid, alpha-cypermethrin, was also performed exclusively in the gap found in the cage rows without contacting hens to prevent leaving residues in eggs or tissues. Before the treatment, the number of mites was first determined using PVC (polyvinyl chloride) traps as described in Koç and Nalbantoğlu, (2021). The mite counts were also recorded after 7, 30, 60, and 90 days of applications. After 48h of each trap being placed, the traps were kept separate in plastic bags, then delivered to the laboratory to be counted for *D. gallinae*.

RESULTS

Bioassays

The results of the bioassays are presented in Table 1. The LT₅₀ values of PRM1, PRM2, and PRM3 were detected as 25.95, 26.1, and 27.23, respectively. Mite mortality reached 100% within 48h after treatment under laboratory conditions.

Field Trial

During the treatment period of four months, a similar effect on the PRM population under field conditions was observed in two different henhouses (Figure 1). The combination of silicon dioxide and alpha-cypermethrin was found to be highly effective

for reducing the number of PRMs during the first two weeks post spraying. In the second week, following the treatment, the average number of PRM were 260 and 480 for Cage1 and Cage2, respectively. In addition, an increase in the mite number was detected in the second month and it was recorded that the

treatment was required after about four months. As a result of multi-residue analysis performed routinely, alpha-cypermethrin residues were not detected in egg samples (personal communications with the henhouses' official veterinarian).

Table 1. LT_{50} values of silicon dioxide in field-collected populations of *Dermanyssus gallinae* (determined by probit analysis)

Populations	LT_{50} (h) (95% CL)	Slope + SE	chi ²	p
PRM1	25.95 (21.148-31.120)	3.597+0.511	8.9645	0.2552
PRM2	26.1 (21.003- 31.490)	3.941+0.537	10.524	0.1607
PRM3	27.23 (22.410- 32.344)	4.079+0.550	8.9894	0.2534

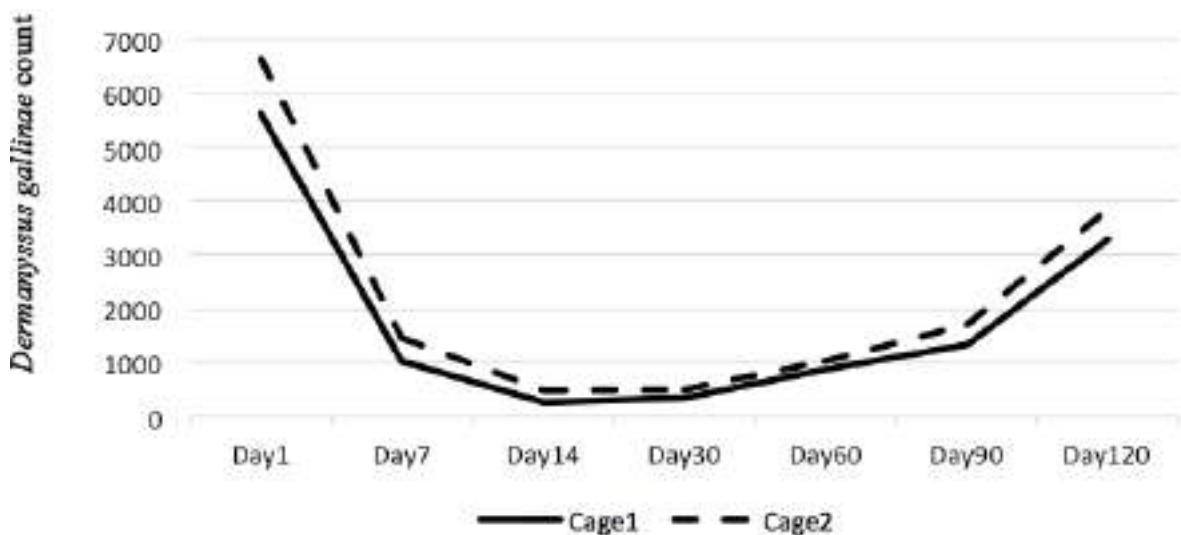


Figure 1. The effect of silicon dioxide and alpha-cypermethrin treatment over time on the presence of *Dermanyssus gallinae* in henhouses

DISCUSSION

Chemical pesticides are indeed considered to be the quickest and easiest tools to control the poultry red mites in henhouses. However, developing resistance against synthetic acaricides (12, 13) and chemical residue found in poultry products (9, 20) leads to failure in the control of mites and therefore, *D. gallinae* will

become a growing threat to global egg production. As a result, more effective and safer approaches for controlling PRM are necessary. This study investigated the efficacy of a natural silica-based product in-vitro and in the field when combined with synthetic pyrethroid.

The result of bioassays showed that PRM mortality reached 100% within 48h after treatment at the recommended dose and the mean LT_{50} values were

determined as 26.42 ± 0.57 on adult mites. The other experimental studies using similar silica-based products reported high LT_{50} values, 31.7 and 34.9 at 25 °C, with 80% relative humidity (21). This can be explained by the effect of the humidity difference. Because the efficacy of silicas is inversely associated with relative humidity. These silicas lose their potency at greater relative humidities (16, 18, 22). Besides adults, silica-based products can affect all developmental stages of mites. Although its effect on eggs is controversial, the hatched larva died one hour after coming into contact with silica. Therefore, the larvae could be considered to be more sensitive than eggs. On the other hand, a significant difference between the larvae and adult mortality when treated with silica was not observed (18).

In the field experiment, a gradual reduction in the mites populations over time was detected in accordance with Alves et al., (2020), which applied liquid silica followed by mechanical cleaning. A previous study reported a 53.5% reduction rate 14 days after silica application in field conditions (23), whereas an approximately 95% decrease in the number of mites was detected on the 14th day in

this study. The increased efficacy could be related to combining alpha-cypermethrin application. To date, combinations of silica-based products and the fungus *Beauveria bassiana* (24, 25), as well as, mechanical cleaning (23) have been assessed. The mortality of the mixture of conidia and DE was recorded as up to 38% higher than in separate applications (24). Mechanical cleaning performed before the application of DE increased the efficacy of the treatment (23).

In conclusion, DE liquid preparations have great potential to reduce the number of *D. gallinae* in henhouses. However, the efficacy remains incapable unless used on its own. Therefore, different combinations are needed to enhance the impact of silicas. In the current study, it was observed that the combined use of the silica-based product with the topical application of alpha-cypermethrin increased the effectiveness. In addition, the application of alpha-cypermethrin on the cage equipment would take advantage in preventing the chemical residue in poultry products. However, further studies are necessary to optimize the combination's practical use, and the eggs should be checked again for alpha-cypermethrin residue.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. George DR, Finn RD, Graham KM, Mul MF, Maurer V, Moro CV, Sparagano OA. Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary and medical science?. Parasit Vectors, 2015; 8(1); 1-10.
2. Koç N, Nalbantoğlu S. Evaluation of in-house factors affecting the population distribution of *Dermanyssus gallinae* in cage and backyard rearing systems by using a modified monitoring method. Exp Appl Acarol, 2021; 84(3); 529-41.

3. Konyalı C, Savaş T. Prevalence of *Dermanyssus gallinae* in backyard poultry houses and its relation with hen-house conditions in Çanakkale, Turkey. ANAJAS, 2021; 36(3); 520-7.
4. Çiloğlu A, Yıldırım A, Onder Z, Yetismis G, Duzlu O, Simsek E, et al. Molecular characterization of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* lineages in Turkey and first report of Plasmodium species in the mite populations. Int J Acarology, 2020;46(4): 241-6.
5. Koç N, Nalbantoğlu S. Yumurta tavuklarında *Dermanyssus gallinae* enfestasyonu ve yumurta verimine etkisi. In: Yalçın S, ed. Yumurta: Beslenme ve Sağlık. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 2021: 134-8.
6. Schiavone A, Pugliese N, Otranto D, Samarelli R, Circella E, De Virgilio C, et al. *Dermanyssus gallinae*: the long journey of the poultry red mite to become a vector. Parasites and Vectors, 2022;15(1): 1-8.
7. Sparagano OAE, George DR, Finn RD, Giangaspero A, Bartley K, Ho J. *Dermanyssus gallinae* and chicken egg production: impact, management, and a predicted compatibility matrix for integrated approaches. Exp Appl Acarol, 2020;82(4):441-53.
8. Sigognault Flochlay A, Thomas E, Sparagano O. Poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestation: a broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. Vectors, 2017;10(1):357.
9. Marangi M, Morelli V, Pati S, Camarda A, Cafiero MA, Giangaspero A. Acaricide residues in laying hens naturally infested by red mite *Dermanyssus gallinae*. PloS one, 2012;7(2):e31795.
10. Sparagano OAE, George DR, Harrington DWJ, Giangaspero A. Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. Annu Rev Entomol, 2014;59:447-66.
11. Thomas E, Chiquet M, Sander B, Zschiesche E, Flochlay AS. Field efficacy and safety of fluralaner solution for administration in drinking water for the treatment of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestations in commercial flocks in Europe. Parasit Vectors, 2017;10(1):1-9.
12. Katsavou E, Vlogiannitis S, Karp-Tatham E, Blake DP, Ilias A, Strube C, et al. Identification and geographical distribution of pyrethroid resistance mutations in the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. Pest Manag Sci, 2020;76(1):125-33.
13. Koç N, İnək E, Nalbantoğlu S, Alpkent YN, Dermauw W, Van Leeuwen T. Biochemical and molecular mechanisms of acaricide resistance in *Dermanyssus gallinae* populations from Turkey. Pestic Biochem Phys, 2022;180:104985.
14. Mul M, Van Niekerk TGCM, Chirico J, Maurer V, Kilpinen O, Sparagano O, Thind B, Zoons J, Moore D, Bell B, Gjevre AG, Chauve, C. Control methods for *Dermanyssus gallinae* in systems for laying hens: results of an international seminar. Worlds Poult Sci J, 2009;65(4):589-600.
15. Maurer V, Perler E, Heckendorn F. In vitro efficacies of oils, silicas and plant preparations against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. In Sparagano OAE ed. Control of Poultry Mites (*Dermanyssus*). 1st ed. Dordrecht: Springer, 2009: 31-41.
16. Mewis I, Ulrichs C. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor*, *Sitophilus granarius* and *Plodia interpunctella*. J Stored Prod Res, 2001;37(2):153-164.
17. Rigaux M, Haubruge E, Fields PG. Mechanisms for tolerance to diatomaceous earth between strains of *Tribolium castaneum*. Entom Exp Applicata, 2001;1:33-9.
18. Schulz J, Berk J, Suhl J, Schrader L, Kaufhold S, Mewis I, et al. Characterization, mode of action, and efficacy of twelve silica-based acaricides against poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) in vitro. Parasitol Res, 2014;113(9):3167-75.
19. Robertson JL, Jones MM, Olguin E, Alberts B. Bioassays with arthropods. 3rd ed. ABD: CRC press, 2017.
20. Gokbulut C, Ozuicli M, Aslan B, Aydin L, Cirak VY. The residue levels of spinosad and abamectin in eggs and tissues of laying hens following spray application. Avian Pathol, 2019;48(1):44-51.
21. Ulrichs C, Han YJ, Abdelhamid MT, Mewis I. Management of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, using silica-based acaricides. Exp Appl Acarol, 2020;82(2):243-54.
22. Kilpinen O, Steenberg T. Inert dusts and their effects on the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). Exp Appl Acarol, 2009;48(1-2):51-62.
23. Alves LFA, de Oliveira DGP, Pares RB, Sparagano OA, Godinho RP. Association of mechanical cleaning and a liquid preparation of diatomaceous earth in the management of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Mesostigmata: Dermanyssidae). Exp Appl Acarol, 2020;81(2):215-22.
24. Steenberg T, Kilpinen O. Synergistic interaction between the fungus *Beauveria bassiana* and desiccant dusts applied against poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*). Exp Appl Acarol, 2014;62(4):511-24.
25. Kilpinen O, Steenberg T. Repellent activity of desiccant dusts and conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when tested against poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*) in laboratory experiments. Exp Appl Acarol, 2016;70(3):329-41.

Tüberküloz tanısında LED floresan mikroskopi performansının değerlendirilmesi

Evaluation of the performance of LED fluorescent microscopy in diagnosis of tuberculosis

Gizem ERDAL¹ (ID), Süheyla SÜRÜCÜOĞLU² (ID), Nuri ÖZKÜTÜK² (ID)

ÖZET

Amaç: Bu araştırmanın amacı akciğer tüberkülozu kuşkusu olan hastaların solunum yolu örneklerinin mikroskopik incelemesinde LED floresan mikroskopi (LED FM) ile Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) boyama yöntemini karşılaştırmak ve LED FM'nin performansını araştırmaktır.

Yöntem: Araştırmada Şubat 2018-Aralık 2019 döneminde akciğer tüberkülozu ön tanıılı hastalardan alınan solunum yolu örnekleri incelenmiştir. NALC-NaOH yöntemi ile işlenen örneklerden iki adet yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar iki okuyucu tarafından kör olarak hem EZN hem de LED FM ile incelenmiştir. Performans değerlendirmesinde kültür sonuçları referans alınmıştır.

Bulgular: Araştırmada 1499 solunum yolu örneği değerlendirilmiştir. Örneklerin 134'ünün (%8.9) kültüründe mikobakteri üremiştir. LED FM'nin duyarlılığı %64.2 (%95 güven aralığında %61.8-%64.4), özgüllüğü %96 (%95 güven aralığında %95.7-%96.3), pozitif prediktif değeri %61.4 ve negatif prediktif değeri %96.5 bulunmuştur. EZN yönteminin

ABSTRACT

Objective: The aim of the study is to compare of the results of LED fluorescent microscopy (LED FM) and Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) staining in the examination of the respiratory specimens and to evaluate the performance of LED fluorescent microscopy with culture.

Methods: In the study, the respiratory specimens obtained from patients prediagnosed with pulmonary tuberculosis were examined in the Tuberculosis Laboratory of Manisa Celal Bayar University Hafsa Sultan Hospital between February 2018 and November 2019. Two smears from each specimen processed with NALC-NaOH method were prepared and they were evaluated both EZN and LED FM by blind readers. The results of culture were used as reference for determination of the performance of LED FM.

Results: In the study 1499 respiratory specimens were evaluated with LED FM. Mycobacteria were grown in the culture of 134 specimens (8.9%). The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of LED FM were found as 64.2% (95% GI, 61.8%-64.4%), 96% (95%GI, 95.7%-96.3%), 61.4% and

¹Manisa Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Manisa
²Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Manisa



İletişim / Corresponding Author : Gizem ERDAL
Manisa Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi, Manisa - Türkiye
E-posta / E-mail : gizemadisanli11@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 18.05.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 19.08.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.46244

Erdal G, Sürücüoğlu S, Özkütük N. Tüberküloz tanısında LED floresan mikroskopin performansının değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 622 - 631

duyarlılığı ise %51.5 (%95 güven aralığında %49-%54), özgülüğü %99.9 (%95 güven aralığında %99.7-%99.9), pozitif prediktif değeri %97.2 ve negatif prediktif değeri %95.4'tür. Ancak LED FM'de yayma şüpheli, kültür negatif (54/1365) sonuçlar EZN'den (0/1365) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.00$). Bunun nedeninin okuyucuların deneyim eksikliğine bağlı olduğu düşünülmüştür. LED FM inceleme süresi %69 zaman tasarrufu sağlanmıştır. Okuyucular arasındaki uyum iyi derecede bulunmuş (Kappa değeri 0.71) ve okuyuculara uygulanan değerlendirme formu sonucu rutin incelemede LED FM tercih edilebileceği belirlenmiştir.

Sonuç: LED FM'nin duyarlılığı EZN'den %12.7 daha yüksek bulunmuştur. Ancak yanlış pozitif sonuç oranının yüksek olması nedeni ile LED FM'nin okuyuculara gerekli eğitim verildikten sonra kullanıma girmesi gereklidir. LED FM'nin ülkemizde büyük ölçekli laboratuvarlarda kullanılmasının maliyet etkin olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz, tanı, LED floresan mikroskopi, florokrom boyama, karbol fuksin boyama, kültür

96.5%, respectively. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of EZN were also found as 51.5% (95% CI, 49%-54%), 99.9% (95% CI, 99.7%-99.9%), 97.2% and 95.4%, respectively. However, smear scarce-culture negative results (54/1365) with LED FM were obtained significantly higher than the results with EZN (0/1365, $p=0.000$). The reason of this was thought to be due to the lack of the experience of the readers. The reading time of LED FM was 69% time saving. The consistency between the readers was found to be good (Kappa value=0.71) and it was determined that LED FM could be preferred in routine examination as a result of the survey conducted to the readers.

Conclusion: The sensitivity of LED FM was found 12.7% higher than the sensitivity of EZN. However, because of the high rate of false positive results, the introduction of LED-FM should be accompanied by appropriate training of the readers. It is also thought that the use of LED FM will be cost-effective in large-scale laboratories in our country.

Key Words: Tuberculosis, diagnosis, LED fluorescence microscopy, fluorochrome staining, carbol fuchsin staining, culture

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), yeni tanı yöntemleri ve antitüberküloz ilaçlara rağmen günümüzde ilk 10 ölümlü nedeninden biridir (1). Önlenabilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olmakla birlikte, her yıl milyonlarca insan tüberkülozdan hayatını kaybetmektedir. Hastalığın yayılımının önlenmesi ve tedavi başarısı için hastalık etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis*'in kısa sürede tanımlanması gereklidir. Tüberküloz tanısında altın standart yöntem kültürdür. Fakat kültür zaman alıcı bir yöntemdir. Bu nedenle akciğer tüberkülozu tanısında balgamın mikroskopik incelemesi hızlı, kolay ve ucuz bir yöntem olarak tüm dünyada geçerliliğini

korumaktadır. Mikroskopik inceleme tüberkülozun laboratuvar tanısının yanı sıra bulaştırıcı hastaların saptanmasında ve tedavinin etkinliğinin izlenmesinde de önemli bir yol göstericidir (2). Mikroskopik incelemede yüz yılı aşkın süredir kullanılmakta olan karbol fuksin boyama yönteminin özgülüğü yüksek (%95) olmakla birlikte duyarlılığı %22-78 arasında değişmektedir (3). Mikroskopinin duyarlılığı çeşitli faktörlerden etkilenir. Hastalığın şiddeti, örnek tipi, örnek toplama kalitesi, örnekteki basil sayısı, örnek işleme yöntemi, boyama yöntemi ve incelemenin kalitesi bu faktörler arasındadır. Negatif sonuç vermek için ışık mikroskopunda en az 300 alan incelenmelidir. Bu nedenle doğru yapıldığında

karbol fuksin boyama yöntemi zaman alıcı ve iş yükünü artırıcıdır. Diğer bir boyama yöntemi ise floresan mikroskopların kullanıldığı florokrom boyama yöntemidir (3). Bu yöntemde koyu zeminde floresans veren basillerin saptanması daha kolay olduğundan daha düşük büyütmede tarama yapılabilir. Böylelikle karbol fuksin boyama yöntemine göre daha az sayıda alan daha kısa sürede taranabilir. Yapılan çalışmalarda florokrom boyama yönteminin karbol fuksin boyama yönteminden %10 daha duyarlı olduğu, özgülüklerinin ise benzer olduğu bildirilmiştir (4). Bu nedenle özellikle yüksek insidanslı ülkelerde ve iş yükü yüksek olan laboratuvarlarda florokrom boyama yönteminin kullanılması önerilmektedir. Ancak bu yöntemin bazı dezavantajları vardır; floresan mikroskoplar pahalıdır, bakımları zordur, karanlık oda gerektirir, aydınlatmada kullanılan civa buharlı lambalar kısa ömürlü ve toksiktir. Floresan mikroskoba alternatif olarak geliştirilen Light emitting diodes (LED) mikroskoplar ise floresan mikroskoplara oranla daha ekonomik, daha düşük bakım gereksinimi olan, daha az elektrik harcayan ve pille çalışabilen cihazlardır. LED ampullerin yarı ömrü uzundur ve ultraviyole ışık üretmez. Aynı zamanda inceleme için karanlık oda gerekmez (4). Ancak inorganik materyallerin florokrom boya ile boyanma olasılığı nedeni ile yalancı pozitiflikler görülebilir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2011 yılında floresan mikroskop kullanan laboratuvarlarda LED mikroskopların kullanımına geçilmesini öneren bir politika yayınlamıştır (4). Bu politikada ışık mikroskobu kullanan laboratuvarlar için de aşamalı olarak LED mikroskoplara geçilmesi önerilmiştir. Bu önerilere rağmen LED mikroskopların kullanımı ışık mikroskopları veya konvansiyonel floresan mikroskoplar kadar yaygın değildir. Dünyada LED mikroskopların rutin kullanımına dair veriler sınırlıdır. Ülkemizde Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı Daire Başkanlığı tarafından uygulanan bir ankete göre ise 2013 yılında mikroskobik inceleme yapan 385 laboratuvardan sadece ikisinde LED floresan mikroskop kullanıldığı bildirilmiştir (5).

Bu araştırmanın amacı akciğer tüberkülozu kuşkusu olan hastaların solunum yolu örneklerinin mikroskobik incelemesinde LED floresan mikroskopi ile EZN boyama yöntemini karşılaştırmak ve LED floresan mikroskopinin performansını araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hafsa Sultan Hastanesi Tüberküloz Laboratuvarı'nda Şubat 2018-Aralık 2019 tarihleri arasında yürütülmüştür.

Araştırmada TB ön tanısı ile mikobakteriyolojik inceleme istenen hastaların balgam ve bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL) gibi solunum yolu örnekleri incelenmiştir. Solunum yolu dışı örnekler, açlık mide sıvısı örnekleri, kültürü yapılmamış örnekler, kültürü kontamine olan örnekler veya tedavi altındaki hastaların örnekleri araştırmaya dahil edilmemiştir. Örneklerin işlenmesinde NALC-NaOH yöntemi kullanılmıştır. İşlenmiş örneklerin süspansiyonlarından biri rutin EZN boyama, diğeri florokrom boyama (Auramine-O) yöntemi ile incelenmek üzere ikişer tane yayma preparat hazırlanmıştır. EZN boya, karbol fuksin çözeltisi, asit alkol ve metilen mavisi çözeltisi ile, florokrom boya ise auramine O, asit alkol ve potasyum permanganat ile Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi'nde tanımlandığı şekilde hazırlanmış ve uygulanmıştır (6). Laboratuvarımızda iç ve dış kalite kontrol uygulamaları sürdürülmektedir.

Araştırma başlamadan önce laboratuvarında rutin hizmet vermekte olan iki teknisyen ve çalışma ekibinde yer alan araştırma görevlisi, iki hafta süre ile LED-FM kullanımı ve florokrom boyalı preparatların değerlendirilmesi konusunda eğitim almıştır. Bir teknisyen preparatları hazırlamış ve boyamış, ikinci teknisyen ve araştırma görevlisi boyalı preparatları değerlendirmiştir. Preparatlara hasta ismi yazılmamış, numaralandırılmıştır. Boyalı preparatlar OLYMPUS CX43RF (SN MA1657, Japonya) LED floresan ataçmanlı mikroskopta x40 objektif ile çift kör olarak okunmuştur.

Preparatlar negatif olarak raporlanmadan önce $\times 400$ büyütmede en az 70 mikroskopik alan taranmıştır. Aydınlık bir odada yapılan değerlendirmede yeşil-sarı, düz veya hafif kıvrık, tek tek veya kümeler halinde basiller aranmıştır. Preparatların değerlendirilmesi yarı kantitatif olarak yapılmıştır (6). Çalışmada LED FM yönteminde iki ayrı okuyucu olduğu için, bakıda pozitif ve/veya yüksek olan değer LED FM sonucu olarak kabul edilmiştir. Ayrıca her lam için okumanın başlangıcı ve bitişi arasındaki süre araştırma ekibi dışındaki bir teknisyen tarafından kronometre ile kaydedilmiştir. İşlenmiş örnekler hem katı hem sıvı besiyerine ekilmiştir. Katı kültür için Löwenstein-Jensen besiyeri (BD, BBL) sıvı kültür için otomatize sistemlerden BD BACTEC MGIT 960 sistemi kullanılmıştır. Tüberküloz basillerinin tanımlanması için BD MGIT TBc Tanımlama Testi (TBc ID, BD) kullanılmıştır. Araştırma sonunda teknisyenlerin LED floresan mikroskopik incelemeye uyumlarının sorgulanması için bir anket uygulanmıştır.

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 21.0 paket programı (SPSS Inc, Chicago, USA) kullanılmıştır. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde ile, sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma ile sunulmuştur. Kategorik değişkenlerdeki farklılıklar Pierson ki-kare testi ile, sayısal değişkenlerdeki farklılıklar Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir.

İki mikroskopik inceleme yöntemi arasındaki uyum kappa değerleri belirlenerek incelenmiştir. Kappa değeri >0.75 mükemmel uyum, $0.40-0.75$ orta-iyi uyum ve <0.40 düşük uyum olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmede $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:26.10.2017 ve Karar No: 20.478.486).

BULGULAR

Araştırmaya Şubat 2018-Aralık 2019 döneminde akciğer tüberkülozu ön tanısı ile mikobakteriyolojik inceleme için gönderilen 1101'i (%73.4) balgam, 392'si BAL (%26.2), altısı (%0.4) endotrakeal aspirat (ETA) olmak üzere toplam 1499 hasta örneği değerlendirilmiştir.

İncelenen 1499 örneğin 71 (%4.7)'i EZN boyama yöntemi ile, 140 (%9.3)'ü LEDFM ile pozitif saptanmıştır. Örneklerin 134 (%8.9)'ünde sıvı veya katı kültürden en az birinde kültürde üreme saptanmıştır. Kültürde üreyen 134 mikobakterinin 36 (%26.9)'ü tüberküloz dışı mikobakteri olarak tanımlanmıştır. Tüberküloz dışı mikobakteri üreyen örneklerin 21'i balgam, 15'i BAL'dır (Tablo 1).

Tablo 1. Klinik örneklerin mikroskopik inceleme ve kültür sonuçları*

Örnek (n)	EZN				LED FM				Kültür			
	Negatif		Pozitif		Negatif		Pozitif		Negatif		Pozitif	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Balgam (1101)	1055	95.8	46	4.2	1021	92.7	80	7.3	1021	92.7	80	7.3
Bronkoalveolar lavaj sıvısı (392)	368	93.9	24	6.1	333	84.9	59	15.1	339	86.5	53	13.5
Endotrakeal aspirat (6)	5	83.3	1	16.7	5	83.3	1	16.7	5	83.3	1	16.7
Toplam (1499)	1428	95.3	71	4.7	1359	90.7	140	9.3	1365	91.1	134	8.9

*Satır yüzdeleri alınmıştır.

Kültürde üreme olan 134 örneğin EZN boyama yöntemiyle bakısında; 69 (%51.5)'u pozitif, 65 (%48.5)'i negatif saptanmıştır. Kültür sonuçları referans olarak alındığında EZN boyama yönteminin

duyarlılığı %51.5 (%95 güven aralığında %49-%54), özgüllüğü %99.9 (%95 güven aralığında %99.7-%99.9), pozitif prediktif değeri (PPD) %97.2, negatif prediktif değeri (NPD) %95.4 olarak hesaplanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. EZN boyama ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

EZN	Kültür negatif		Kültür pozitif		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Negatif	1363	%99.9	65	%48.5	1428	%95.3
Pozitif	2	%0.1	69	%51.5	71	%4.7
Şüpheli pozitif	0		2		2	
1+	0		28		28	
2+	2		18		20	
3+	0		10		10	
4+	0		11		11	
Toplam	1365	%100	134	%100	1499	%100

Kültürde üreme olan 134 örneğin LED FM ile 86 (%64.2)'sı pozitif, 48 (%35.8)'i negatif saptanmıştır. LED FM sonucu şüpheli pozitif olan 52 örneğin ve 2+ olan iki örneğin kültüründe ise üreme olmamıştır. Kültür sonuçlarına göre LED FM'nin duyarlılığı %64.2

(%95 güven aralığında %61.8-%64.4), özgüllüğü %96 (%95 güven aralığında %95.7-%96.3), PPD %61.4, NPD %96.5 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). Tablo 4'te her iki mikroskopik inceleme yönteminin performans değerleri gösterilmiştir.

Tablo 3. LED FM ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

LED FM	Kültür negatif		Kültür pozitif		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Negatif	1311	%96	48	%35.8	1359	%90.7
Pozitif	54	%4	86	%64.2	140	%9.3
Şüpheli pozitif	52		16		68	
1+	0		25		25	
2+	2		19		21	
3+	0		9		9	
4+	0		17		17	
Toplam	1365	%100	134	%100	1499	%100

Tablo 4. EZN boyama ve LED FM'nin performans değerlerinin karşılaştırılması

	EZN	LED FM
Duyarlılık	%51.5	%64.2
Özgüllük	%99.9	%96.0
PPD	%97.2	%61.4
NPD	%95.4	%96.5

LED FM ile EZN sonuçları arasında uyum iyi düzeyde (Kappa değeri 0.63, $p=0.000$) bulunmuştur. İki LED FM okuyucusunun sonuçları arasında da iyi düzeyde uyum (Kappa değeri 0.71, $p=0.000$) gözlenmekle birlikte okuyuculardan birincisinin ortalama okuma süresi 104.5 ± 35.6 saniye, ikincisinin ortalama okuma süresi ise 83.0 ± 25.7 saniye olarak hesaplanmıştır. İki okuma süresi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.01$). Ortalama okuma süreleri EZN için 300 saniye, LED FM için 94 saniye olarak hesaplanmıştır. LED FM, ışık mikroskobu ile okuma süresine oranla %69 zaman tasarrufu sağlanmıştır.

Araştırmanın sonunda her iki okuyucu da floresan boyama yönteminin EZN boyama yöntemine göre daha kolay olduğunu, LED FM ile incelemede alan bulmanın ve okumanın daha kolay ve hızlı olduğunu ve mikroskopi yöntemlerinden birini tercih edecek olsalar LED FM'yi tercih edeceklerini belirtmişlerdir.

TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2009 yılında LED FM'nin tüberküloz tanısında güvenilirliği araştırılmış ve kültür referans yöntem olarak alındığında LED FM'nin duyarlılığı %84, özgüllüğü %98 olarak belirlenmiştir (4). LED FM, EZN mikroskopi ile kıyaslandığında özgüllükte herhangi bir azalma olmadan duyarlılıkta ortalama %6'lık bir artış görülmüştür. Ayrıca LED FM ile yapılan incelemenin EZN'ye göre %50 daha kısa sürede tamamlandığı belirtilmiştir. Bu sonuçların ardından DSÖ 2011 yılında LED FM kullanımına ilişkin bir politika yayınlamıştır (4). Bu politikada LED FM'nin konvansiyonel floresan mikroskopinin yerini alması

önerilmiş ve LED FM'nin EZN boyalı mikroskobik incelemeye alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Araştırmamızda LED FM, EZN boyama yöntemine oranla %12.7 daha duyarlı bulunmuştur. Özgüllüğü ise %3.9 daha düşüktür. Yapılan çalışmalarda da LED FM'nin duyarlılığı EZN'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Bu konuda yapılan bir meta-analizde 2000-2014 yılları arasında yayınlanan 12 çalışma değerlendirmeye alınmış ve LED FM'nin havuzlanmış duyarlılık değeri %66.9, özgüllük değeri %96.1 olarak bulunmuştur (7). Floresan mikroskopi yöntemlerinde duyarlılığın daha yüksek olmasının bir nedeni mikobakterilerin hücre duvarında yer alan mikolik asitin karbol fuksine oranla florokrom boyaları daha iyi absorbe etmesi, bu nedenle hasar görmüş basiller dahil daha fazla sayıda basilin boyanabilmesidir. Duyarlılığı artıran bir başka neden ise, LED FM'de basillerin parlak görünümünden dolayı teknisyenlerin daha çok basili görüp tanıyabilmeleridir (8). Konvansiyonel floresan mikroskopi, LED FM, ve EZN boyama yöntemlerini karşılaştıran ilk çalışma ise 2008 yılında yayınlanmıştır (9). Bu çalışmada toplam 221 balgam örneği değerlendirilmiştir. Örneklerin %16'sında kültürde üreme olmuştur. LED FM'nin duyarlılığı %84.7, özgüllüğü %98.9, konvansiyonel floresan mikroskopinin duyarlılığı %73.6, özgüllüğü %99.8, EZN boyamanın duyarlılığı %61.1 ve özgüllüğü %98.9 olarak bulunmuştur. Ayrıca LED FM ile %61 zaman tasarrufu sağlandığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın ardından özellikle olgu yükü yüksek olan, direnç sorunu yaşanan ve HIV ile komorbid olguların fazla olduğu Afrika ülkeleri, Hindistan, Çin, Etiyopya gibi Asya ülkelerinden araştırmalar bildirilmiştir. Olgu

yükü en yüksek ülkeler arasında olan Hindistan'da 2012 yılında Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı gereği 200 mikroskopi laboratuvarında LED FM'ye geçilmiştir. Bir yıl içinde TB ön tanılı hastalarda EZN pozitifliği

oranında değişiklik olmazken LED FM pozitifliğinde %30 artış gözlenmiştir (10). Bu araştırmalardan bazılarının sonuçları Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5. LED FM ve EZN boyama yöntemlerinin bazı çalışmalardan elde edilen performans değerleri

Araştırma (referans)	Örnek	LED FM		EZN	
		Duyarlılık	Özgüllük	Duyarlılık	Özgüllük
Uganda (11)	1394 balgam	%67.9-71.7	%95.3-99.2	%62.3	%98.4
Bangladeş (12)	150 balgam	%95.3	%94.1	%56.1	%97.6
Uganda (13)	233 balgam	%64.0	%97.0	%56.0	%97.0
Güney Afrika (14)	354 balgam	%46.0		%39.0	
Hindistan (15)	200 balgam	%83.1	%82.4	%81.6	%83.5
Endonezya (16)	660 balgam	%75.5	%90	%54.9	%96.6
Arjantin (17)	6968 solunum örneği	%87.7	%99.9	%76.3	%99.9
Etiyopya (18)	346 balgam	%71.8		%44.5	
Manisa (2020), Türkiye	1499 solunum örneği	%64.2	%96.0	%51.5	%99.9

Buna karşın LED FM'nin EZN ile incelemeye göre tanıya katkısının olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (19). Ruanda'da yapılan bir çalışmada dört orta düzey ve dört periferik laboratuvarında toplam 648 örnek her iki yöntemle ve Xpert ile değerlendirilmiştir (19). EZN'nin duyarlılığı periferik laboratuvarlarda %55.1 iken, LED FM'nin %37 olarak bulunmuştur. Orta düzey laboratuvarlarda ise bu oranlar sırası ile %58.3 ve %62.5'tir. Xpert'in tanıya katkısı ise %32 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle LED FM'nin EZN incelemeye üstünlüğünün olmadığını bildirilmiştir.

Araştırmamızda LED FM yönteminin duyarlılığı yukarıda verilmiş olan çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer veya daha düşüktür. Diyarbakır'da yapılan bir çalışmada da kültür altın standart alınarak 758 klinik örnek LED FM ve EZN ile değerlendirilmiş, EZN boyama yöntemi ve LED FM için duyarlılık ve özgüllükler sırasıyla %49.02, %99.85 ve

%64.7, %96.3 olarak saptanmıştır (20). Bu değerler bizim sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir. Mikroskobik incelemenin pozitif prediktif değerini ve duyarlılığını etkileyen birçok faktör vardır. Çalışılan popülasyondaki hastalık prevalansı, çalışma yöntemi, hastaların klinik tablosu ve değerlendiren kişinin deneyimi bu faktörler arasındadır. Çalışmaların çoğu yüksek olgu yükü olan ülkelerde yapılmıştır. Ülkemizde TB insidansı DSÖ 2019 raporuna göre yüz binde 16'dır (1). Bu oran Hindistan'da yüz binde 199, Uganda'da yüz binde 200, Bangladeş'te yüz binde 221'dir. Araştırmamızda her iki yöntemin özgüllük değerleri benzer (%99.9 ve %96.0) ve literatür sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Çalıştığımız örnek sayısı bildirilen çalışmaların çoğundan fazladır. Bu nedenle elde ettiğimiz performans değerlerinin ülkemiz verisi olarak önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda mikroskopik inceleme sonuçları yarı kantitatif olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar her iki yöntem arasında uyumlu bulunmuştur. Ancak şüpheli pozitif sonuçlar açısından iki yöntem arasında belirgin bir fark vardır. DSÖ Stop TB Partnership tarafından 2013 yılında yayınlanan Tüberküloz Tanısında Balgam Mikroskopisi El Kitabında floresan mikroskopi ile şüpheli pozitif saptanan preparatların EZN ile tekrar boyanmaması gerektiği vurgulanmıştır (21). Bu nedenle araştırmamızda LED FM ile şüpheli pozitif saptanan preparatlar tekrar boyanmamıştır. Mikroskopik inceleme sonucunun şüpheli pozitif olması örnekteki basil yükünün düşük olmasına bağlı olabildiği gibi yanlış pozitifliğe de bağlı olabilir. Basil yükü düşük olan HIV pozitif hastalarda LED FM'nin duyarlılığının daha yüksek olduğunu bildiren araştırmalar vardır (22, 23). Araştırmamızda 52 örnekte LED FM şüpheli pozitif, kültür negatif bulunmuştur. LED FM ile yanlış pozitif sonuç alınmasının bir nedeni örnekteki inorganik materyallerin florokrom boya ile boyanmaları olabilir. Bu sonuç testin özgüllüğünü etkilemektedir. Ancak araştırmamızda yanlış pozitif örnek sayısının beklenenden fazla olmasının en önemli nedeninin okuyucuların LED FM konusunda deneyimlerinin az olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Floresan mikroskoplar ile yanlış pozitif sonuçların alınabileceği ve bu nedenle okuyucuların deneyimlerinin önemli olduğu vurgulanmaktadır (17, 24). Arjantin'de yapılan bir araştırmada daha önce konvansiyonel floresan mikroskop konusunda deneyimi olmayan TB laboratuvarı çalışanları LED floresan mikroskop konusunda eğitim programına alınmış ve yeterlilikleri değerlendirilmiştir (17). İlk üç günlük eğitim sonrası panel sonuçları teknisyenlerin %70'nin yanlış pozitif sonuç verdiğini göstermiştir. Sonraki iki aylık eğitim döneminde ise yanlış pozitif sonuçlarda anlamlı azalma olduğu gözlenmiş, duyarlılık %96.8, özgüllük %99.8'e ulaşmıştır. Yeterli performans değeri için günde en az üç, yılda en az 750 örneğin incelenmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Araştırmamızda deneyim eksikliğinin giderilmesi amacı ile okuyucular

araştırma başlamadan önce florokrom boyama ve LED floresan mikroskop kullanımı için iki hafta süreli eğitim almıştır. Araştırmacıların okuma süreleri arasında anlamlı fark bulunmakla birlikte araştırma sonunda her iki okuyucunun sonuçları uyumlu bulunmuştur. Ancak LED FM ile şüpheli pozitif sonuçların fazla bulunması iki haftalık eğitim süresinin bizim laboratuvarımız gibi örnek sayısı az olan laboratuvarlar için yeterli olmadığını, eğitim süresinin uzatılması ile şüpheli pozitif sonuçların sayısında azalma olabileceğini, bu süre içinde ise şüpheli sonuçların EZN boyama ile doğrulanmasının gerekli olacağını düşündürmektedir.

Araştırmamızda LED FM ile %69 zaman tasarrufu sağlandığı görülmüştür. İnceleme süresinin kısa olması LED FM'nin önemli avantajlarından biridir. Hindistan'da yapılan bir araştırmada EZN inceleme süresi beş dakika iken, LED FM'nin iki dakika olduğu bildirilmiştir (15).

Her iki inceleme yönteminin maliyetleri değerlendirildiğinde LED floresan mikroskop ışık mikroskopuna oranla yaklaşık üç kat daha pahalı bulunmuştur. Araştırmamızda florokrom boyanın ticari kitler yerine laboratuvarında hazırlanarak yapılması maliyeti belirgin ölçüde düşürmüştür. Güney Afrika'da yapılan bir araştırmada da maliyetler lam başına EZN için 2.10 USD, LED FM için 1.63 USD olarak bulunmuştur (14). LED floresan mikroskopların daha pahalı olması tüberküloz laboratuvarlarında kullanımını kısıtlayabilir. Ancak konvansiyonel floresan mikroskoplara oranla daha ucuz olması ve kullanım avantajları dikkate alınmalıdır. Ayrıca LED floresan mikroskopların TB tanısı dışında malarya, tripanozomiyaz ve koksidiyoz gibi hastalıkların tanısında da kullanılabilmesi entegre laboratuvarlar için avantaj oluşturmakta ve maliyet etkinliğe katkı sağlamaktadır (25). Tayland'da yapılan kapsamlı bir maliyet etkinlik analizinde, bina ve personel giderleri, cihaz ve ekipmanlar, sarf malzemelerinin tümü analize dahil edilmiş ve sonuçta LED FM'nin maliyeti 1.03 USD, EZN'nin maliyeti 1.16 USD olarak hesaplanmıştır (26). LED FM'nin kullanıcı dostu

olması da önemli bir avantaj olarak bildirilmektedir (27). Mikroskopun açıldığı anda kullanılabilmesi, sık bakım gerektirmemesi, pille çalışabilmesi, karanlık oda gerektirmemesi, inceleme süresinin kısa olması kullanıcılar için tercih nedeni olmaktadır. Araştırmamızda görevli teknisyenler de alan bulma ve okuma kolaylığı nedeni LED FM yöntemini tercih edeceklerini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak araştırmamızda akciğer TB tanısında LED FM'nin duyarlılığı EZN incelemeye göre %12.7 fazla bulunmuş, LED FM ile %69 zaman tasarrufu sağlanmıştır. Araştırmamızda LED FM ile şüpheli pozitif

sonuç oranı beklenenden yüksektir. Okuyucuların LED FM konusunda deneyimsiz olması bu konuda etkili olabilir. Bu nedenle LED FM'nin rutin kullanıma girmeden önce kullanıcıların yeterli eğitim almaları gerektiği düşünülmüştür. LED floresan mikroskoplar ışık mikroskoplarından daha pahalı olmakla birlikte olgu yükü yüksek olan laboratuvarlarda kullanılmaları durumunda maliyet etkin olabilirler. Bu nedenle olgu yükü düşük olan ülkemizde LED FM'nin öncelikle göğüs hastalıkları hastanelerinin laboratuvarlarında ve büyük ölçekli diğer laboratuvarlarda kullanımının yararlı olacağı düşünülmüştür.

TEŞEKKÜR

Araştırmamızı destekleyen Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimizi sunarız (proje no: 2017-203).

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:26.10.2017 ve Karar No: 20.478.486).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization, Global Tuberculosis Report, 2019. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Somöskövi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, O'Donnell D, Parsons LM, Salfinger M. Lessons form a proficiency testing event for acid fast microscopy. Chest 2001;120(1):250-7.
3. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. (çeviri editörü: Ahmet Başustaoglu) Manuel of Clinical Microbiology. 9. Baskı. Cilt:1. Ankara: Atlas Kitapçılık, 2009: 543-601.
4. World Health Organization, Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis policy Policy statement, 2011 https://www.who.int/tb/publications/2011/led_microscopy_diagnosis_9789241501613/en/ (2019).
5. Özyurt M. Tüberküloz tanısında neredeyiz? Boyama ve kültüre dayalı tanı yöntemleri. 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. Kasım, 9-13, Antalya, Türkiye. 2013.

6. Albay A, Albayrak N, Arslantürk A, Aslan G, Baylan O, Biçmen C, et al. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 935, Ankara, 2014.
7. Chang EW, Page AL, Bonnet M. Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis: a meta-analysis. *Eur Respir J*, 2016;47(3):929-37.
8. Thapa B, Reza LW, Kumar AM, Pandey A, Satyanarayana S, Chadha S. Light Emitting Diode Fluorescence Microscopy increased the detection of smear-positives during follow-up of Tuberculosis patients in India: program implications. *BMC Res Notes*, 2015;8:596.
9. Marais BJ, Brittle W, Painsczyk K, Hesselting AC, Beyers N, Wasserman E et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis*, 2008;47(2):203-7.
10. Reza LW, Satyanarayana S, Enarson DA, Kumar AMV, Sagili KD, Kumar S et al. LED-fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary tuberculosis under programmatic conditions in India. *PLoS One*, 2013;8(10):e75566.
11. Albert H, Manabe Y, Lukyamuzi G, Ademun P, Mukkada S, Nyesiga B et al. Performance of three LED-based fluorescence microscopy systems for detection of tuberculosis in Uganda. *PLoS One*, 2010;5(12):e15206.
12. Khatun Z, Kamal M, Roy CK, Sultana T, Rahman MQ, Azad MBAS et al. Usefulness of light emitting diode (LED) fluorescent microscopy as a tool for rapid and effective method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 2011;37(1):7-10.
13. Cattamanchi A, Huang L, Worodria W, Boon SD, Kalema N, Katagira W et al. Integrated strategies to optimize sputum smear microscopy: a prospective observational study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011;183(4):547-51.
14. Whitelaw A, Peter J, Sohn H, Viljoen D, Theron G, Badri M et al. Comparative cost and performance of light-emitting diode microscopy in HIV-tuberculosis-co-infected patients. *Eur Respir J*, 2011;38(6):1393-7.
15. Bhalla M, Sidiq Z, Sharma PP, Singhal R, Myneedu VP, Sarin R. Performance of light-emitting diode fluorescence microscope for diagnosis of tuberculosis. *Int J Mycobacteriol*, 2013;2(3):174-8.
16. Chaidir L, Parwati I, Annisa J, Muhsinin S, Meilana I, Alisjahbana B et al. Implementation of LED fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary and HIV-associated tuberculosis in a hospital setting in Indonesia. *PLoS One*, 2013;8(4):e61727.
17. Imaz M, Allasia S, Aranibar M, Gunia A, Poggi S, Togneri AM et al. *Biomedica*, 2017;37(2):164-174.
18. Gizaw N, Abera A, Sisay S, Desta K, Kreibich S, Adima LG et al. The yield of Auramine O staining using led microscopy with bleach treated sputum samples for detection of pulmonary tuberculosis at St. Peter tuberculosis specialized hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*, 2019;18:100140.
19. Ngabonziza JC, Ssengooba W, Mutua F, Torrea G, Dushime A, Gasana M et al. Diagnostic performance of smear microscopy and incremental yield of Xpert in detection of pulmonary tuberculosis in Rwanda. *BMC Infect Dis*, 2016;16(1):660.
20. Can Ş. Tüberküloz tanısında LED floresan mikroskop yöntemi ile Ziehl Neelsen yönteminin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
21. Lumb R, Deun A.V, Bastian I, Gerald M.F. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. the handbook global edition. South Australia: SA Patology, 2013.
22. Bhadade A, Mehta P, Kanade S, Nataraj G. Utility of light-emitting diode microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV infected patients. *Int J Mycobacteriol*, 2015;4(1):31-5.
23. Goel S, Pandey R, Kumar M, Kankaria A, Khaneja R. Impact of introducing light-emitting diode fluorescence microscopy services for diagnosis of pulmonary tuberculosis under Revised National Tuberculosis Control Program India. *Lung India*, 2018;35(4):307-11.
24. Frieden T. Toman's tuberculosis: case detection, treatment, and monitoring: questions and answers. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2004.
25. Sagili KD, Muniyandi M, Nilgiriwala KS, Shringarpure KS, Satyanarayana S, Kirubakaran R et al. Cost-effectiveness of GeneXpert and LED-FM for diagnosis of pulmonary tuberculosis: A systematic review. *PLoS One*, 2018;13(10):e0205233.
26. Sohn H, Sinthuwattanawibool C, Rienthong S, Varma JK. Fluorescence microscopy is less expensive than Ziehl-Neelsen microscopy in Thailand. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009;13(2):266-8.
27. Van Deun A, Chonde TM, Gumusboga M, Rienthong S. Performance and acceptability of the FluLED Easy module for tuberculosis fluorescence microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008;12(9):1009-14.

Evaluate the effects of rosmarinic acid in ovariectomized rats: urethane-induced cortical oscillations

Ovariektomize sıçanlarda rosmarinik asidin etkilerinin değerlendirilmesi: ürethan indüklü kortikal osilasyonlar

Deniz KANTAR¹ (ID), Alev Duygu ACUN¹ (ID), Hakan ER² (ID)

ABSTRACT

Objective: Diminished sleep quality is one of the most common menopausal symptoms. It is well known that sleep loss also contributes to memory impairment. Sleep disturbance and cognitive deficit in menopause might be related to a cholinergic deficit during the postmenopausal period. In the present study, we examined the protective effects of rosmarinic acid (RA) on brain activity under urethane anesthesia, memory, and cholinergic markers in ovariectomized rats.

Methods: Wistar rats were randomly divided into four groups: sham (SH); RA-treated (RA); Ovariectomized (OVX); Ovariectomized+RA-treated (OVXRA). RA (50mg/kg, daily) was administered orally by gavage for four weeks after ovariectomy. After four weeks period, we tested object localization memory (OLM). After the behavioral tests, we recorded urethane-induced spontaneous brain activity as a model of sleep brain activity to assess ovariectomy-related sleep alterations. At the end of the experimental period, we measured acetylcholine (ACh) level and acetylcholinesterase (AChE) activity by biochemical methods.

ÖZET

Amaç: Azalan uyku kalitesi en yaygın gözlenen menopoz semptomlarından biridir. Uyku kaybının hafıza bozukluğuna katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir. Menopoz sonrası dönemde gözlenen uyku ve bilişsel bozukluk kolinerjik ileti bozukluğuyla ilişkili olabilir. Bu çalışmada, ovariektomi yapılmış sıçanlarda rosmarinik asidin (RA) ürethan anestezisinde beyin aktivitesi, uzaysal hafıza ve kolinerjik belirteçler üzerindeki koruyucu etkisini inceledik.

Yöntem: Wistar albino sıçanlar rastgele olarak sham (SH); RA uygulanan (RA); Ovariektomi yapılmış (OVX); Ovariektomi yapılan ve RA uygulanan (OVXRA) şeklinde dört gruba ayrıldı. RA (50 mg/kg, günlük) ovariektomi sonrası dört hafta süreyle gavaj yoluyla uygulandı. Dört haftalık sürenin ardından uzaysal hafızanın test edilmesi için obje uzaysal hafızası (OLM) testi gerçekleştirildi. Davranış testlerinden sonra, ovariektomi ile ilişkili uyku değişikliklerini değerlendirmek için uyku beyin aktivitesi modeli olarak ürethan indüklü spontan beyin aktivitesi kaydedildi. Deney süresi sonunda biyokimyasal yöntemler kullanılarak asetilkolin (ACh) düzeyi ve asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi ölçüldü.

¹Akdeniz University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Antalya

²Akdeniz University, Department of Medical Services and Techniques, Vocational School of Health Services, Antalya



İletişim / Corresponding Author : Deniz KANTAR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dekanlık Binası, B Blok 2. Kat. Biyofizik AD. Antalya - Türkiye

E-posta / E-mail : dkantar@akdeniz.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 07.06.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 20.10.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.68815

Kantar D, Acun AD, Er H. Evaluate the effects of rosmarinic acid in ovariectomized rats: urethane-induced cortical oscillations
Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 632 - 645

Results: OVX rats exhibited elevated slow-wave delta and REM delta, theta, beta power. The amplitudes of slow-wave delta and REM delta, theta, beta oscillations were increased in the OVX rats. In parallel to impaired OLM, decreased Ach level and increased AChE activity were detected in OVX rats. Four weeks RA treatment was significantly improved oscillatory power and amplitude alterations in the OVXRA group versus the OVX group. OLM index was increased in the OVXRA group compared to the OVX group. Decreased AChE activity, as well as increased Ach level, was observed in the OVXRA group versus the OVX group.

Conclusion: Thus, the present study indicates that RA might be protective against ovariectomy-induced oscillatory changes under urethane anesthesia and memory impairment by improving the cholinergic system.

Key Words: Ovariectomy, urethane-induced oscillations, memory, cholinergic system, rosmarinic acid

Bulgular: OVX sıçanlarda, artan yavaş dalga delta ve REM delta, teta, beta gücü gözlemlendi. Buna ek olarak, OVX sıçanlarında yavaş dalga delta ve REM delta, teta, beta salınımlarının genlikleri arttığı izlendi. Bozulmuş OLM'ye paralel olarak, OVX sıçanlarında azalmış ACh seviyesi ve artmış AChE aktivitesi tespit edildi. Dört haftalık RA tedavisi, OVX grubuna kıyasla OVXRA grubunda osilasyonlarda gözlenen güç ve genlik değişikliklerini önemli ölçüde iyileştirdi. OLM indeksinin OVXRA grubunda OVX grubuna göre arttığı görüldü. OVXRA grubunda OVX grubuna göre AChE aktivitesinde azalış ve ACh seviyesinde artış gözlemlendi.

Sonuç: Sonuç olarak bu çalışma, RA'nın kolinerjik sistemi iyileştirerek ovariektominin neden olduğu ürethan anestezisi indüklü osilasyon değişikliklerine ve hafıza bozulmasına karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Ovariektomi, ürethan-indüklü osilasyonlar, hafıza, kolinerjik sistem, rosmarinik asit

INTRODUCTION

Menopause is defined as the end of menstruation due to the loss of follicular activity in the ovaries. In menopause, a sharp decrease of estradiol and progesterone production occurs in ovaries which is mainly related to the depletion of the ovarian reserves (1). Given that estrogen is a critical signaling molecule within the brain (2), this permanent fall in circulating estradiol levels affects multiple brain functions. Reports have emphasized the estrogen hormone in sleep regulation and circadian rhythm (3). One of the most common menopausal symptoms in women is diminished sleep quality (4-6). Given that sleep loss ultimately impairs memory (7, 8), improving sleep quality can be a good way to promote cognitive functions in aging women. Studies

indicated that post-menopausal women had higher slow-wave sleep percentages and elevated beta EEG power that accompanies the disturbed sleep quality (9). In parallel, ovariectomized (OVX) rats spent much time in spontaneous slow-wave sleep (SWS) (non-rapid eye movement, NREM) and/or rapid eye movement (REM) sleep compared to OVX rats treated with estradiol and/or progesterone (10). Findings showing an increment in delta EEG activity following sleep deprivation in NREM sleep and a decrement in the night following a daytime nap indicate that delta EEG power reflects the differences in homeostatic sleep regulation (11, 12). Furthermore, elevated beta power is found in some insomniacs and may indicate a higher arousal level related to less satisfactory sleep (13, 14). Besides, both rats and humans exhibit cortical theta wave activity during REM sleep. And

increased sleepiness is associated with increased theta wave power (15, 16). So spectral analysis of the EEG may provide objective sleep measures that change with estrogen deficiency and may be informative to unravel the sleep disturbance problem during menopause.

It has been shown that urethane anesthesia is a good model to study sleep-related EEG changes in rats (17). Urethane anesthesia has sleep like cyclic fluctuations between active REM and quiet SWS stages that closely mimic the full spectrum of natural sleep. So we used this model to examine the oscillatory changes in sleep at OVX rats.

As mentioned above, sleep disturbance in the postmenopausal period may contribute to cognitive decline might be related to the cognitive decline seen in women. It is well known that sleep plays an important role in memory consolidation (18). Both REM and SWS periods, which have specific characteristics of brain oscillations, are associated with the formation of memory. Thus, we analyzed object localization memory in OVX rats in relation to the oscillatory changes during urethane anesthesia.

Both sleep disturbance and cognitive deficit in menopause might be related to a cholinergic deficit in aged women (19). It is known that loss of ovarian activity decreases cholinergic transmission (20, 21). In rodents, ovariectomy reduces performance on learning and memory tasks and this decline in performance parallels a decline in cholinergic activity and choline acetyltransferase (ChAT) levels in several brain regions (22). In addition to its role in cognition, the cholinergic system is also a known modulator of sleep (23). During REM sleep, when low voltage fast activity (LVFA) is present in the cortical EEG, ACh release is elevated, while the release is reduced during SWS, when slow delta waves (<4 Hz) dominate the EEG (24, 25). Therefore, improving cholinergic transmission can be beneficial in the postmenopausal period for both sleep and memory functions. A known strategy to overcome the disorders related to estrogen deficiency is hormone replacement therapy. But it

has been associated with an increased risk of breast cancer and cardiovascular disease for some women (26). Nowadays, there has been a growing interest in natural products (27). A natural compound, rosmarinic acid, has been proposed as a beneficial agent with its multiple bioactivities. In addition to its well-known antioxidant properties, recent studies indicated that RA can improve cholinergic transmission (28, 29). Therefore we suggest that RA may have a potential for the treatment of menopausal symptoms. However, no enough studies are investigating the effects of RA on sleep and cognitive alterations seen in menopause. We also aimed to investigate the protective effects of RA on sleep EEG and memory in OVX rats.

MATERIAL and METHOD

Animals

Thirty two healthy female Wistar rats, aged five months, weighing 300 to 350 g were used. Animals were housed in stainless steel cages in groups of 4 rats per cage at standard conditions ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ and $50 \pm 5\%$ humidity) with a 12 h light-dark cycle and given food and water ad libitum. The experiments were performed between 9:00 and 17:00. Rats were randomly divided into four groups ($n = 8$ per group): Group 1: rats were sham-operated and treated with saline (SH); Group 2: rats were sham-operated and treated with rosmarinic acid (RA); Group 3: rats were ovariectomized treated with saline (OVX); Group 4: rats were ovariectomized and treated with rosmarinic acid (OVXRA). The surgical procedures of ovariectomy were as follows: the rats were intraperitoneally anesthetized with a combination of ketamine (80 mg/kg, i.p.) and xylazine (5 mg/kg, i.p.) A vertical incision was made inferior to the abdomen. The uterine tubes were clamped, and the ovaries were excised. The skin was closed with wound clips. RA (Carbosynth, San Diego, CA, USA; 50 mg/kg/day, 50 mg of RA dissolved in 0.9% saline solution, to a total volume of 1 mL) was given via gavage for 30 days. After the experimental period, all rats were anesthetized under urethane and

brains were perfused transcardially with heparinized saline. Brain tissues were collected and stored frozen at -80°C until assay determinations.

Object training and testing procedures

Object location memory (OLM) was tested in a experimental apparatus was an open-field box (40x40x40 cm) made of light brown-painted wood, as previously described (30). The floor was covered with sawdust, and the box was placed in a dimly illuminated room. The objects to be discriminated were white glass light bulbs (5 cm diameter, 10 cm length). On the training trial, the rat was placed in the box and allowed to explore two identical objects, placed 5 cm away from the corners of the apparatus for 5 min. To avoid the presence of olfactory trails, sawdust was stirred and the objects were cleaned with 70% ethanol between rats. Retention was tested 24 h after the training trial. For OLM testing, one copy of the familiar object was placed in the middle of the box, and the other familiar object was placed in the same location as during the training trial. All combinations and locations of objects were randomly used in a balanced manner to reduce potential biases due to preference for particular locations. The rat was placed in the experimental apparatus for 5 min, and the time spent exploring each object and the total time spent exploring both objects were recorded. Exploration of an object was defined as pointing the nose to the object at a distance of <1 cm and/or touching it with the nose. The place discrimination index was calculated by using the formula, the time spent with the object moved to a novel place/the total time spent in exploring both the object moved to a novel place and the object remaining in the familiar place $\times 100$.

EEG recordings and analyses

EEG was recorded between 09:00 am and 02:00 p.m. Rats were anesthetized (24 g/100 ml) with intraperitoneal injections of urethane (1.2 g/kg, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The head of the anesthetized animal was attached to the standard stereotaxic frame and four small holes (1.5 mm

diameter) were drilled for the placement of the stainless steel electrodes. Recording electrodes were placed bilaterally on temporal and frontal cortices and reference and ground electrodes were placed on the cerebellar skull. The anesthetized animal was moved into a sound-attenuated recording room. The mean background noise level of the recording room measured 46 dB with a sound level meter (Testo 816 Sound Level Meter, Germany). The EEG signal was amplified (Brainamp EEG/EP Amplifier, Brain Products, Munich, Germany), band-pass filtered (0.1-300 Hz), and digitized at a 1000 Hz sampling rate (Brainvision Recorder, Brain Products, Munich, Germany). EEG signal was recorded for 10 minutes. The EEG data were filtered (0.1-150 Hz) and segmented into SWS and REM periods. Then each period was segmented into 2 s epochs. Frequency analysis was performed using a fast Fourier transform (FFT) algorithm with a 10% Hanning window and spectral EEG powers computed. The EEG variables chosen were absolute power in three frequency bands, delta (0.5-4 Hz), theta (4-8 Hz), beta (13-28 Hz). The epochs were digitally filtered in the delta, theta, and beta frequency ranges. Subsequently, we measured the maximum peak-to-peak amplitudes for each rat's averaged response in terms of microvolts. All analyses were performed with the BrainVision Analyzer program (Brain Products GmbH).

Acetylcholine level

The ACh level was measured using an Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A-12217; Invitrogen, USA). The isolated brain tissues were homogenized for ACh (20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4). According to the manufacturer's instructions, reactions were initiated by adding 100 μl of the working solution, containing 400 μM Amplex Red reagent, 2 U/ml horseradish peroxidase (HRP), 0.2 U/ml choline oxidase, and 1 U/ml acetylcholinesterase, to each microplate well containing 100 μl of the standard or test sample. Each reaction was incubated for 1 h at room temperature with plate agitation and

protection from light. Absorbance was then measured using a microplate reader (Molecular Devices, USA) at a wavelength of 563 nm. Acetylcholine levels were calculated from a standard curve and expressed as mmol/g protein.

Acetylcholinesterase activity

The AChE activity was also measured using an Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A-12217; Invitrogen). The isolated brain tissues were homogenized for AChE (20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4). A working solution, containing 400 µM Amplex Red reagent, 2 U/ml HRP, 0.2 U/ml choline oxidase, and 100 µM acetylcholine, was used for AChE activity measurement. Absorbance was measured using a microplate reader (Molecular Devices, USA) at a wavelength of 590 nm.

Statistical analysis

The statistical analysis of the obtained data was performed by SPSS (SPSS 18.0, SPSS Inc., Chicago,

IL) software for Windows. Statistical comparisons between groups were performed by using the One-way ANOVA test and post hoc Bonferroni test.

The study was approved by the Akdeniz University Animal Experiments Local Ethics Committee (Date: 08.02.2021 and Number: 28).

RESULTS

The mean values of the OLM index for the testing period are given in Figure 1. There was no statistically significant difference in the OLM index between groups during the training period ($p > 0.05$). In the test period, there was a statistically significant difference in OLM index between groups [$F_{3,28} = 11.81$, $p < 0.01$]. In posthoc comparisons, it was found that the OVX group had a significantly lower OLM index compared with the other groups ($p < 0.01$). OLM index was significantly higher in the OVXRA group compared to the OVX group ($p < 0.01$).

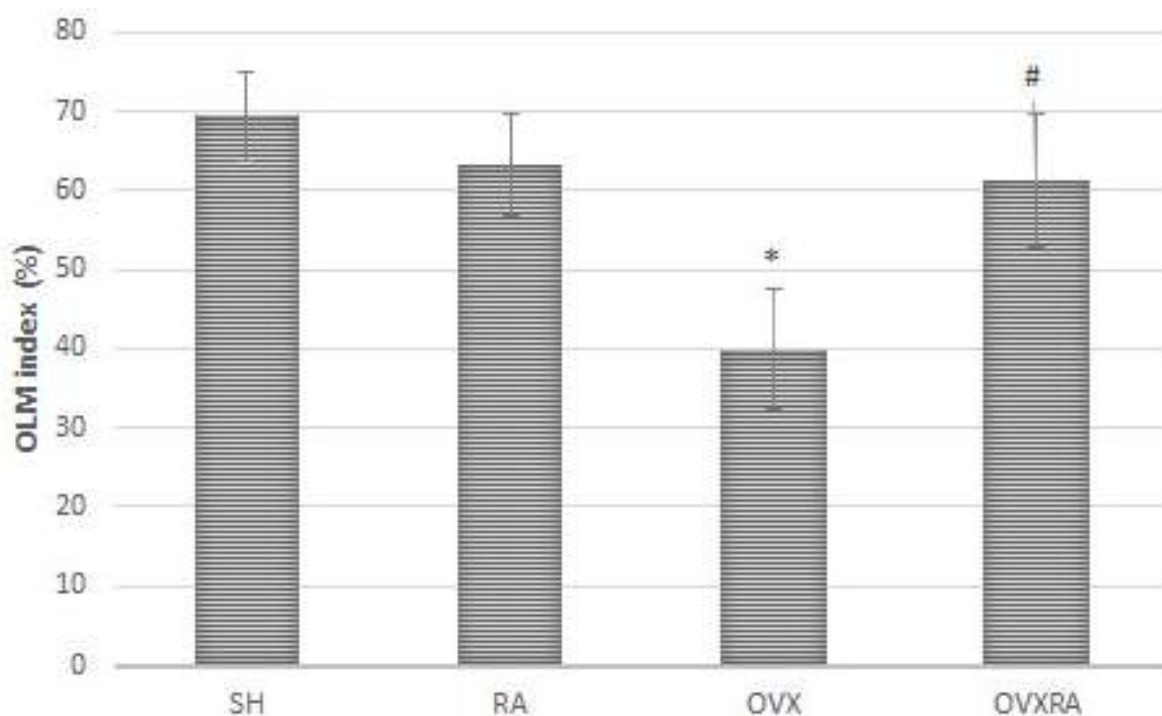


Figure 1. OLM index values of all experimental groups. The results are presented as mean±SEM, n=8 for each group. (*significant vs. SH group; #significant vs. OVX group)

Slow-wave delta-band power spectrum and mean values of all groups are given in Figure 2A and 2B. Figure 2C shows the slow-wave delta oscillations and Figure 2D shows the mean amplitude values of peak-to-peak delta oscillations of all groups. There was a significant difference between group in terms of delta-band power [$F_{3,28} = 50.21$, $p < 0.01$] and peak-

to-peak delta oscillations [$F_{3,28} = 16.80$, $p < 0.01$]. In post hoc comparisons, it was found that the OVX group had significantly higher SW delta oscillatory responses and delta-band power compared with the other groups over frontal locations ($p < 0.01$). The SW delta power and amplitudes were significantly lower in the OVXRA group than the OVX group ($p < 0.01$).

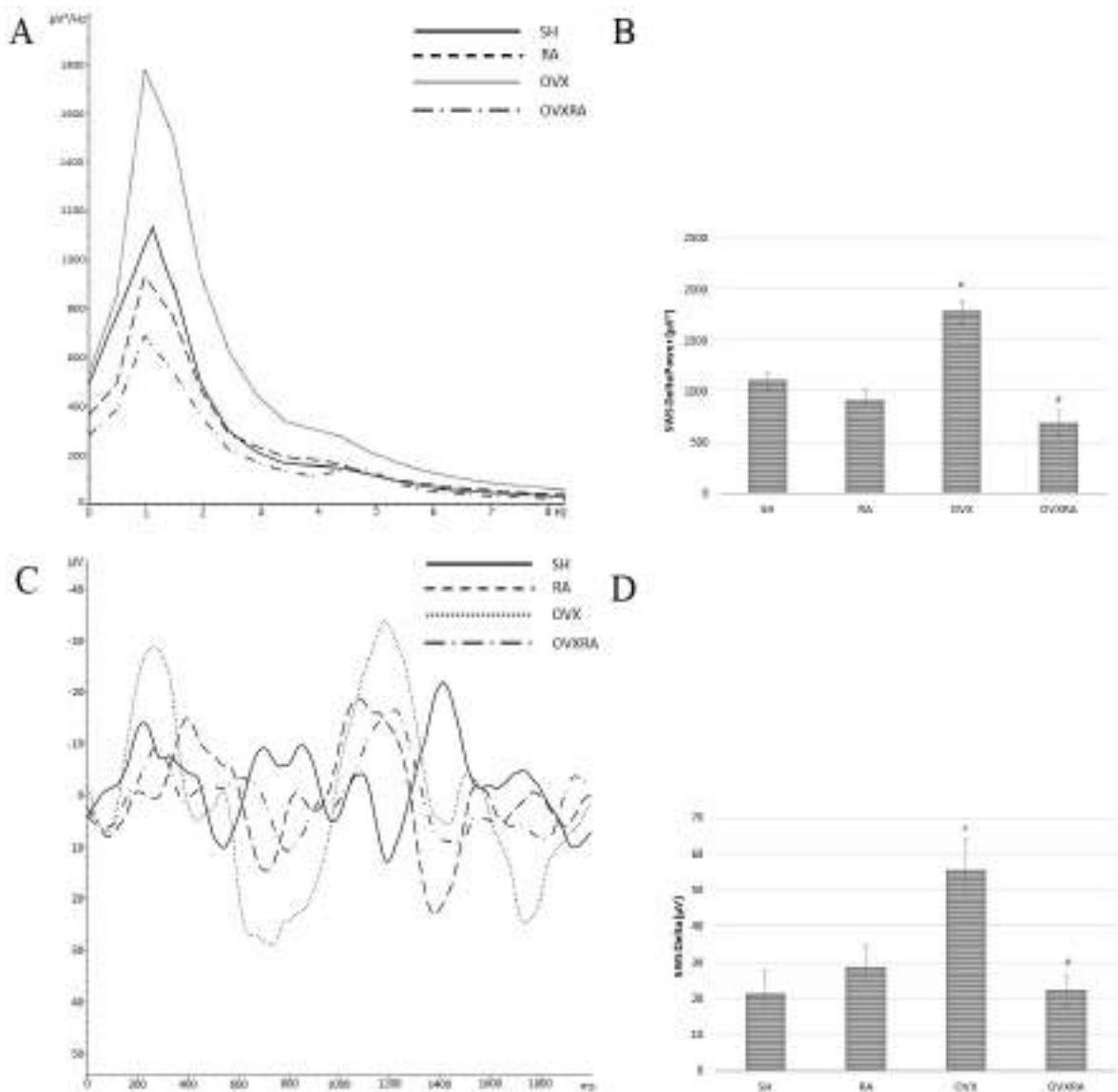


Figure 2. OLM index values of all experimental groups. The results are presented as mean \pm SEM, n=8 for each group. (*significant vs. SH group; #significant vs. OVX group)

REM delta/theta band power spectrum and mean values of all groups are shown in Figure 3A and 3B, respectively. Figure 3C shows the REM beta band power spectrum and Figure 3D shows the mean values. REM delta, theta, beta oscillations and peak-to-peak amplitude values of oscillations for all groups are presented in Figure 4A, 4B, and 4C, respectively. There was a significant difference between group in terms of delta, theta and beta band powers [Delta: $F_{3,28} = 22.34$, $p < 0.01$; Theta: $F_{3,28} = 11.95$, $p < 0.01$; Beta: $F_{3,28} = 24.09$, $p < 0.01$] and peak-to-peak delta,

theta and beta amplitudes [Delta: $F_{3,28} = 22.71$, $p < 0.01$; Theta: $F_{3,28} = 27.18$, $p < 0.01$; Beta: $F_{3,28} = 14.29$, $p < 0.01$]. In post-hoc comparisons, it was found that the OVX group had significantly higher oscillatory responses and power compared with the other groups over frontal locations for all related bands ($p < 0.01$). The all REM band powers and amplitudes were significantly lower in the OVXRA group than the OVX group ($p < 0.01$) and all values returned to the SH group level.

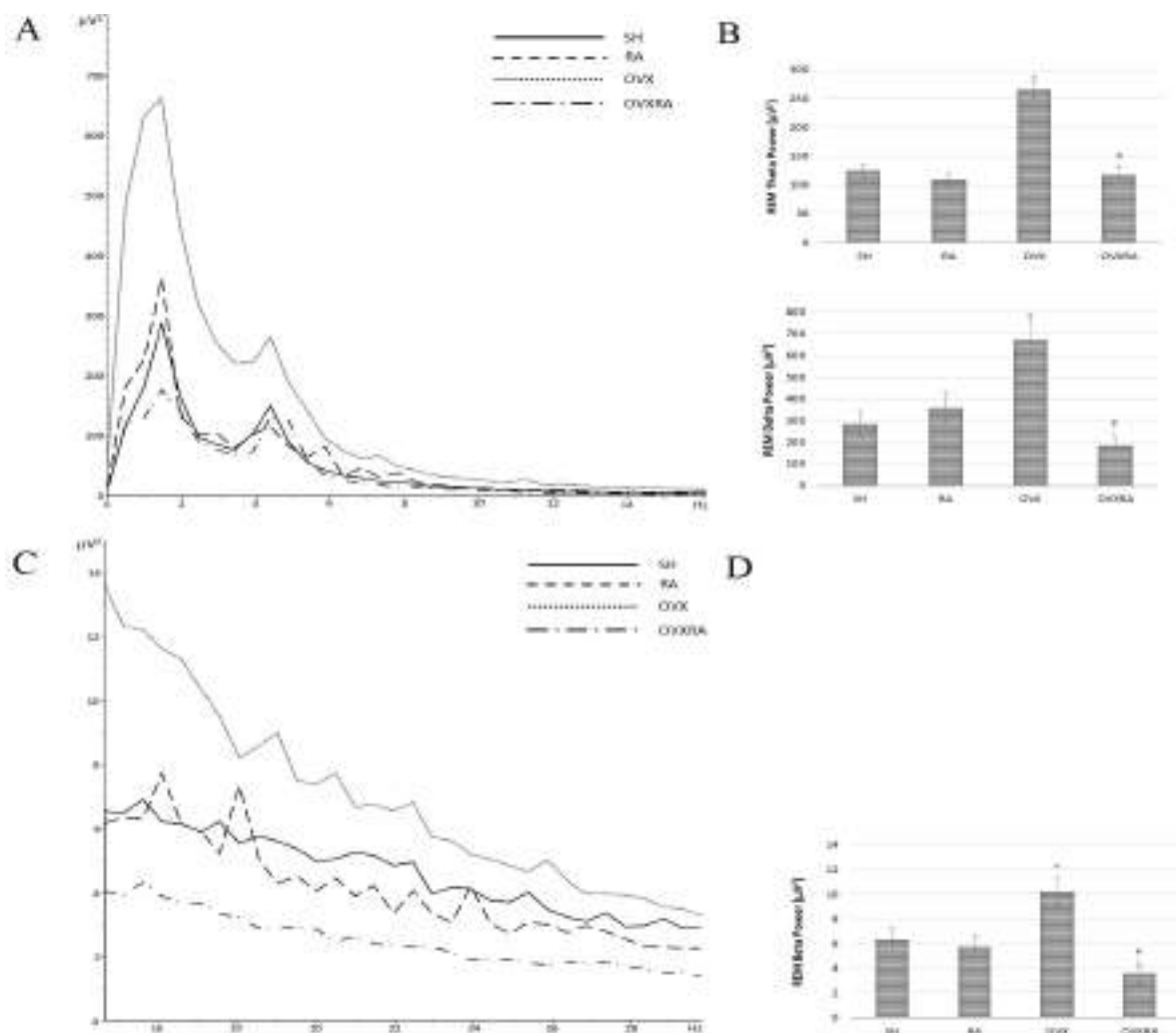


Figure 3. REM delta/theta power spectrum (A) and mean values (B); REM beta power spectrum (C) and mean values (D) of all experimental groups. The results are presented as mean±SEM, n=8 for each group. (*significant vs. SH group; #significant vs. OVX group)

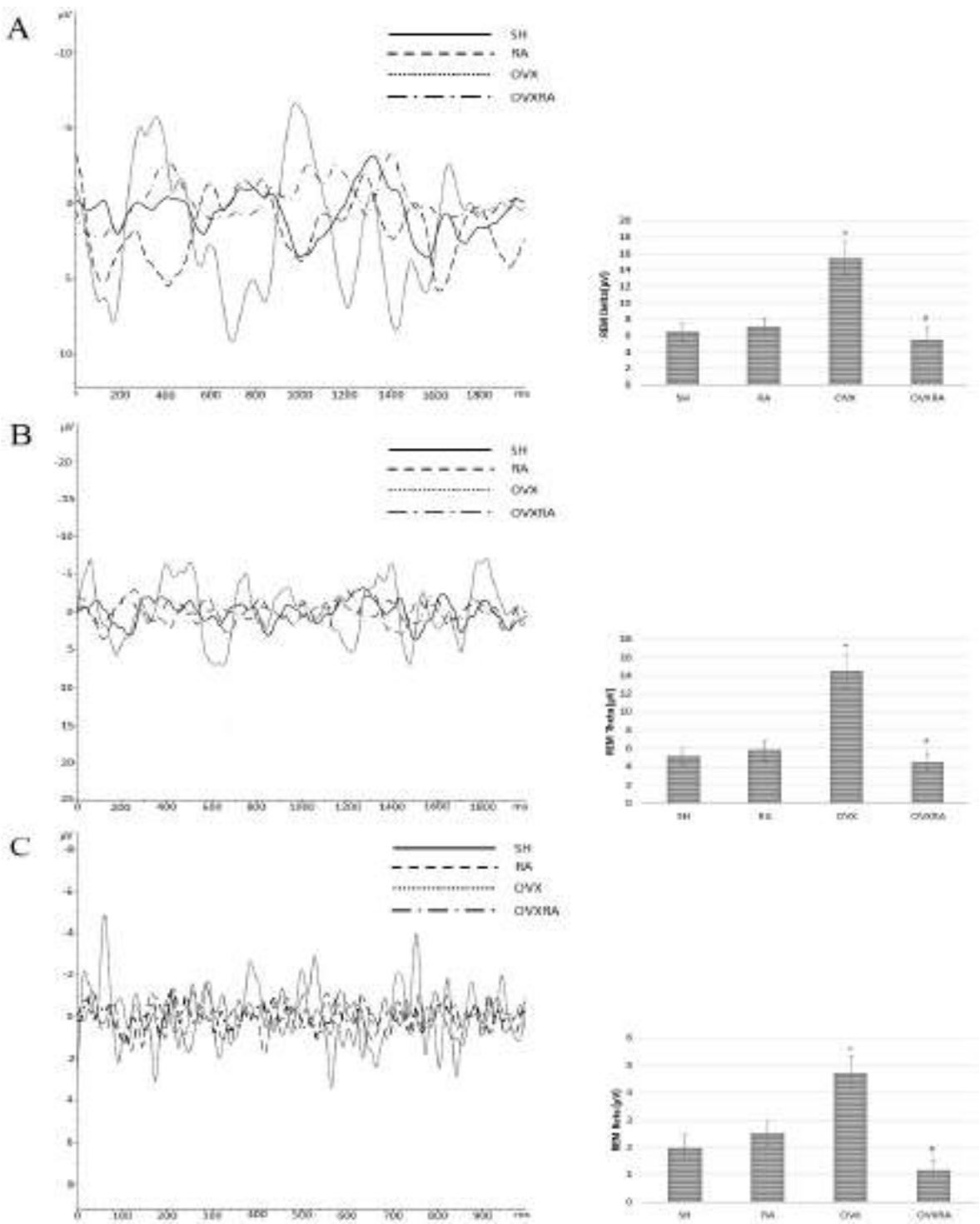


Figure 4. REM delta (A), theta (B), beta (C) oscillations and peak-to-peak amplitude values of oscillations for all experimental groups. The results are presented as mean±SEM, n=8 for each group. (*significant vs. SH group; #significant vs. OVX group)

Mean values of brain ACh levels are given in Figure 5A. There was a statistically significant difference in ACh levels between groups [$F_{3,28} = 19.71$, $p < 0.01$]. Brain ACh levels were significantly decreased in the OVX group with respect to the SH group ($p < 0.01$). ACh levels were significantly elevated in the OVXRA group versus the OVX group ($p < 0.01$). No significant difference was observed in ACh levels in the RA group versus the SH group.

AChE activities in the brain tissues of all groups are shown in Figure 5B. There was a statistically significant difference between groups [$F_{3,28} = 22.56$, $p < 0.01$]. AChE activity was significantly increased in the OVX group with respect to the SH group ($p < 0.01$). The AChE activity was significantly decreased in the OVXRA group versus the OVX group ($p < 0.001$). RA treatment alone was slightly decreased the AChE activity in the RA group but this increment did not reach the significance level.

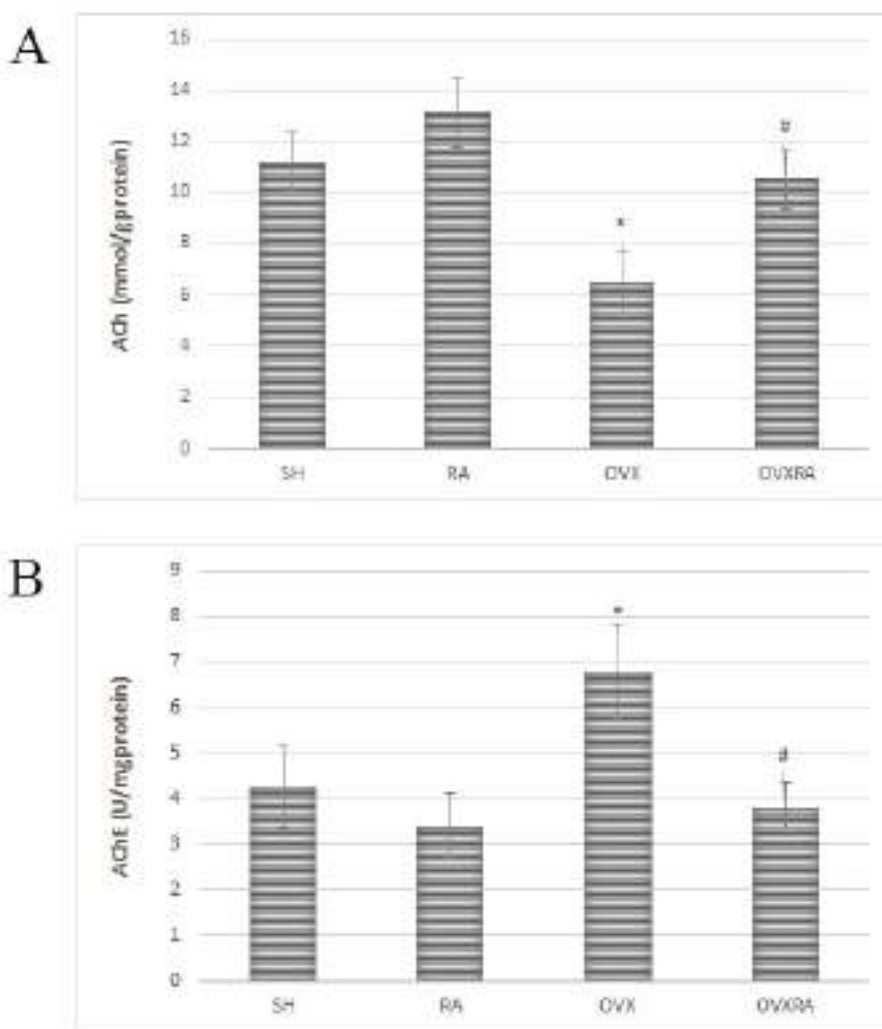


Figure 5. ACh levels and AChE activities of the brain tissues in experimental groups. The results are presented as mean \pm SEM, n=8 for each group. (*significant vs. SH group; #significant vs. OVX group)

DISCUSSION

The deficiency of estrogen in the postmenopausal period is known to be related to sleep disturbance which is a common symptom seen in women. Because sleep regulation plays an essential part in many brain functions including memory formation, improving sleep quality might be a good target to reverse the cognitive decline during menopause. Estrogen replacement therapy (ERT) is a commonly known approach to unravel menopausal symptoms (31, 32). As long-term ERT has been associated with adverse effects in a postmenopausal woman (33, 34), investigating alternative phytoactive agents has gained importance currently. Thus, we examined the effects of RA on urethane-induced EEG as sleep model, spatial memory, and ACh/AChE levels in OVX rats.

Because sleep EEG is a good tool to understand the mechanism underlying the sleep disturbance related to estrogen deficit, we recorded EEG activity during urethane anesthesia as a known model for sleep (17). As natural sleep, urethane anesthesia EEG has two-phase in rats such as SWS and REM sleep. In both phases, we detected a prominent increment in both delta power and amplitude in the OVX group versus the SH group. These results contradict the findings of some human studies showing no change (9) or decrement of sleep delta power in postmenopausal women (35).

But our results are in agreement with earlier reports showing the sleep delta potentiation due to the increment of metabolic needs at some conditions such as sleep deprivation. Delta EEG activity was increased in SWS sleep due to sleep deprivation and was decreased in the night following a daytime nap (11, 12). Moreover, one-night sleep deprivation induced a delta rise in sleep which was attenuated with hormone therapy in OVX rats (10). Thus, it can be concluded that the alterations in the metabolic homeostasis of the brain caused by estrogen deficiency might be responsible for the observed sleep delta increment.

Furthermore, REM theta and beta power and amplitudes were significantly increased in the OVX

group versus the SH group. This is inconsistent with previous studies showing elevated beta power accompanied by lower sleep quality in postmenopausal women (9, 36). This finding could be attributed to a higher arousal level related to less satisfactory sleep in the OVX rats. Besides, in parallel with our finding showing elevated theta response in the OVX rats, increased theta power indicates increased sleepiness (16). It seems quite likely that the estrogen deficiency condition causes arousal at the neural network.

OLM test is a commonly used task that assesses cognition, specifically spatial memory and discrimination in a variety of rodent models. Therefore, in the current study, we measured long-term spatial memory in experimental groups by determining the place discrimination index. OLM index was lower in the OVX rats than the SH rats. Our result is consistent with previous findings which indicated that estrogen deficiency may cause learning and memory impairment (37). Besides, there is emerging evidence for the role of sleep disorders in exacerbating the risk for dementia (38). The observed consequences of estrogen deficiency on sleep EEG, including oscillatory changes, may partly contribute to memory impairment seen in the OVX rats.

Previous studies demonstrated that loss of ovarian activity decreases cholinergic transmission (20, 21). In accordance with these studies, brain ACh levels decreased in the OVX group. This reduction in the ACh levels is parallel to the detected disruption of the spatial memory performance. It is known that ACh transmission plays an essential role in memory performance by strengthening the new synaptic connections (39). Besides cognitive deficit, sleep EEG alterations might be associated with a cholinergic deficit in the OVX group. Because the cholinergic system is a modulator of sleep cycles by which elevation of ACh release during REM sleep and reduction during SWS sleep (24, 25). In parallel with the ACh decrement, AChE activity increased in the OVX group. AChE is the primary cholinesterase in the body that catalyzes the breakdown of ACh.

Previous studies also indicated that ovariectomy results in an increment in AChE activity in the rat hippocampus (40). Besides, many studies have clearly shown that cholinergic systems which modulate some cognitive domains are dependent on estradiol support for adequate functioning (19). These findings indicate that disturbed cholinergic functioning may mediate the deficient sleep EEG activity and spatial memory generation in OVX rats. Consequently, our findings support the idea that changes in cholinergic transmission are an important factor contributing to the development of sleep disruption that leads to cognitive decline in estrogen deficiency.

Previous studies have indicated that polyphenolic compounds such as RA with their low toxic effects might be an alternative therapeutic approach in a variety of pathological conditions. Besides its known antioxidant properties, RA potentiates the cholinergic system by increasing ACh levels (29, 41). In this context, RA supplementation may be protective against menopause-related changes in brain functions. Therefore, we investigated the protective effects of RA on OVX related changes. The current results demonstrated that RA reversed ACh decrement induced by OVX. In parallel, RA decreased the AChE level and thereby it was also damped the degradation of ACh and helped to maintain ACh level. Moreover, we showed that RA decreased the power and amplitudes of SWS delta, REM delta, theta, and beta oscillations in the OVX group compared with the SH group. Our findings are in agreement with our lab and others results which have revealed that RA effectively increased cholinergic transmission (29, 41, 42). Our results also

confirm that RA can efficiently improve brain activity during sleep by decreasing the arousal level which is determined as the decrement of theta and beta activity and rebalanced metabolic homeostasis which is determined as the decrement of delta activity. It is important to mention that cholinergic mechanisms could be involved in the sleep EEG regulation induced by RA treatment in the OVX rats. Moreover, the treatment with RA prevented the decrease of spatial memory concomitant with improved sleep EEG and cholinergic transmission. Because estrogen promotes cholinergic activity (19), therefore, it could be concluded that the protective effects of RA against estrogen deficiency by reversing sleep EEG spectrum changes and related cognitive decline are probably associated with the prevention of cholinergic deficit.

In conclusion, our findings support the functional role of estrogen in sleep activity and showed that estrogen deficiency impaired sleep-related oscillations by causing an increase in homeostatic needs and arousal levels. Besides OVX-induced spatial memory deficit which is partly related to disturbed sleep EEG activity. Cholinergic transmission that plays an essential role both in sleep and memory processes was also altered in the OVX rats. In the current study, we provided evidence that RA treatment may improve sleep quality and cognition in estrogen-deficient rats. The protective effects of RA can be partly explaining by its action on cholinergic transmission. These findings strongly indicate that RA may serve as a beneficial agent to ease symptoms of menopause. Besides, the other neurotransmitter systems and molecular pathways that RA might affect estrogen deficiency remain to be determined in future researches.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Akdeniz University Animal Experiments Local Ethics Committee (Date: 08.02.2021 and Number: 28).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Shuster LT, Rhodes DJ, Gostout BS, Grossardt BR, Rocca WA. Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. *Maturitas*, 2010;65(2):161-6.
2. Brinton RD. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. *Trends Neurosci*, 2008;31(10):529-37.
3. Brown AMC, Gervais NJ. Role of ovarian hormones in the modulation of sleep in females across the adult lifespan. *Endocrinology*, 2020;161(9) bqa128.
4. Danby FW. Management of menopause-related symptoms. *Ann Intern Med*, 2005;143(11):845-6.
5. Kravitz HM, Zhao X, Bromberger JT, Gold EB, Hall MH, Matthews KA, et al. Sleep disturbance during the menopausal transition in a multi-ethnic community sample of women. *Sleep*, 2008;31(7):979-90.
6. Polo-Kantola P. Sleep problems in midlife and beyond. *Maturitas*, 2011;68(3):224-32.
7. Ji X, Fu Y. The role of sleep disturbances in cognitive function and depressive symptoms among community-dwelling elderly with sleep complaints. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2021;36(1):96-105.
8. Kondo R, Miyano I, Lee S, Shimada H, Kitaoka H. Association between self-reported night sleep duration and cognitive function among older adults with intact global cognition. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2021;36(5):766-74.
9. Campbell IG, Bromberger JT, Buysse DJ, Hall MH, Hardin KA, Kravitz HM, et al. Evaluation of the association of menopausal status with delta and beta EEG activity during sleep. *Sleep*, 2011;34(11):1561-8.
10. Deurveilher S, Rusak B, Semba K. Female reproductive hormones alter sleep architecture in ovariectomized rats. *Sleep*, 2011;34(4):519-30.
11. Borbely AA, Baumann F, Brandeis D, Strauch I, Lehmann D. Sleep deprivation: effect on sleep stages and EEG power density in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1981;51(5):483-95.
12. Feinberg I, March JD, Floyd TC, Jimison R, Bossom-Demitrack L, Katz PH. Homeostatic changes during post-nap sleep maintain baseline levels of delta EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1985;61(2):134-7.

13. Perlis ML, Smith MT, Andrews PJ, Orff H, Giles DE. Beta/Gamma EEG activity in patients with primary and secondary insomnia and good sleeper controls. *Sleep*, 2001;24(1):110-7.
14. Buysse DJ, Germain A, Hall ML, Moul DE, Nofzinger EA, Begley A, et al. EEG spectral analysis in primary insomnia: NREM period effects and sex differences. *Sleep*, 2008;31(12):1673-82.
15. Hung CS, Sarasso S, Ferrarelli F, Riedner B, Ghilardi MF, Cirelli C, et al. Local experience-dependent changes in the wake EEG after prolonged wakefulness. *Sleep*, 2013;36(1):59-72.
16. Gorgoni M, Ferlazzo F, Ferrara M, Moroni F, D'Atri A, Fanelli S, et al. Topographic electroencephalogram changes associated with psychomotor vigilance task performance after sleep deprivation. *Sleep Med*, 2014;15(9):1132-9.
17. Clement EA, Richard A, Thwaites M, Ailon J, Peters S, Dickson CT. Cyclic and sleep-like spontaneous alternations of brain state under urethane anaesthesia. *PLoS one*, 2008;3(4):e2004.
18. Dudai Y, Karni A, Born J. The consolidation and transformation of memory. *Neuron*, 2015;88(1):20-32.
19. Newhouse P, Dumas J. Estrogen-cholinergic interactions: Implications for cognitive aging. *Horm Behav*, 2015;74:173-85.
20. O'Malley CA, Hautamaki RD, Kelley M, Meyer EM. Effects of ovariectomy and estradiol benzoate on high affinity choline uptake, ACh synthesis, and release from rat cerebral cortical synaptosomes. *Brain Res*, 1987;403(2):389-92.
21. Gibbs RB. Estrogen and nerve growth factor-related systems in brain. Effects on basal forebrain cholinergic neurons and implications for learning and memory processes and aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1994;743:165-96.
22. Singh M, Meyer EM, Millard WJ, Simpkins JW. Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Sprague-Dawley rats. *Brain Res*, 1994;644(2):305-12.
23. Jouvet M. The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol*, 1972;64:166-307.
24. Celesia GG, Jasper HH. Acetylcholine released from cerebral cortex in relation to state of activation. *Neurology*, 1966;16(11):1053-63.
25. Kanai T, Szerb JC. Mesencephalic reticular activating system and cortical acetylcholine output. *Nature*, 1965;205:80-2.
26. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 2002;288(3):321-33.
27. Işgın K BZ. Premenstrual sendromda beslenme yaklaşımı. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2017;74(3):249-60.
28. Mushtaq N, Schmatz R, Pereira LB, Ahmad M, Stefanello N, Vieira JM, et al. Rosmarinic acid prevents lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct*, 2014;32(3):287-93.
29. Kantar Gok D, Hidisoglu E, Ocak GA, Er H, Acun AD, Yargicoglu P. Protective role of rosmarinic acid on amyloid beta 42-induced echoic memory decline: implication of oxidative stress and cholinergic impairment. *Neurochem Int*, 2018;118:1-13.
30. Roozendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP, et al. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci*, 2010;30:5037-5046.
31. Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, et al. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2000;283:1007-15.

32. LeBlanc ES, Neiss MB, Carello PE, Samuels MH, Janowsky JS. Hot flashes and estrogen therapy do not influence cognition in early menopausal women. *Menopause*, 2007;14:191-202.
33. Rapp SR, Espeland MA, Shumaker SA, Henderson VW, Brunner RL, Manson JE, et al. Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the women's health initiative memory study: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2003; 289:2663-72.
34. Espeland MA, Rapp SR, Shumaker SA, Brunner R, Manson JE, Sherwin BB, et al. Conjugated equine estrogens and global cognitive function in postmenopausal women: women's health initiative memory study. *JAMA*, 2004;291:2959-68.
35. Kalleinen N, Polo-Kantola P, Himanen SL, Alhola P, Joutsen A, Urrila AS, et al. Sleep and the menopause - do postmenopausal women experience worse sleep than premenopausal women? *Menopause Int*. 2008;14(3):97-104.
36. Baker FC, Willoughby AR, Sassoon SA, Colrain IM, de Zambotti M. Insomnia in women approaching menopause: beyond perception. *Psychoneuroendocrinology*, 2015;60:96-104.
37. Sliwinski JR, Johnson AK, Elkins GR. Memory decline in peri- and post-menopausal women: the potential of mind-body medicine to improve cognitive performance. *Integr Med Insights*, 2014;9:17-23.
38. Jee HJ, Shin W, Jung HJ, Kim B, Lee BK, Jung YS. Impact of sleep disorder as a risk factor for dementia in men and women. *Biomol Ther*, 2020;28(1):58-73.
39. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol*, 2006;16(6):710-5.
40. Martins DB, Mazzanti CM, Franca RT, Pagnoncelli M, Costa MM, de Souza EM, et al. 17-beta estradiol in the acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and blood of ovariectomized adult and middle-aged rats. *Life Sci*, 2012;90(9-10):351-9.
41. Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Nabeshima T. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A beta (25-35). *Behav Brain Res*, 2007;180(2):139-45.
42. Gulcin I, Scozzafava A, Supuran CT, Koksal Z, Turkan F, Cetinkaya S, et al. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *J Enzym Inhib Med Ch*, 2016;31(6):1698-702.

COVID-19 pandemisinin Mersin ilindeki tüberküloz kontrolüne etkisi

Impact of the COVID-19 pandemic on tuberculosis control in Mersin province

Gönül ASLAN¹ (ID), Harun GÜLBUDAK¹ (ID), Nuran DELİALİOĞLU¹ (ID), Hamide KAYA¹ (ID),
Asena Ayça ÖZDEMİR² (ID)

ÖZET

Amaç: Dünyayı etkisi altına alan koronavirüs hastalığı (COVID-19) salgını ile mücadele edebilmek için neredeyse sağlık sisteminin tüm kaynakları pandemiye ayrılmıştır. Ayrıca izolasyon, karantina ve kısıtlı hareketlilik gibi pandemi sürecinde uygulanan tedbirler ülkemizde ve dünyada tüberküloz (TB) kontrol programlarını olumsuz etkilemiştir. Bu çalışmada COVID-19 pandemisinin Mersin ilindeki TB hastaları ve TB kontrol programı üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya 1 Ocak 2019-31 Aralık 2020 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Hastanesinin çeşitli kliniklerinden ve Mersin ilindeki verem savaş dispanser (VSD)'lerinden TB ön tanısıyla laboratuvarımıza gelen 3731 hastanın 6328 örneği dahil edildi. Çalışmada 2020 yılı pandemi döneminde örnek sayılarının ne kadar azaldığı, TB tanısı alan hasta sayıları, hastaların yaş dağılımındaki değişim ve TB hastalarının tedavi takibinde gelen kontrol örnek sayıları incelendi.

Bulgular: Çalışmada 2020 yılı pandemi döneminde hasta sayısında %42,2 (n=999) azalma görülürken örnek sayısında %45,4 (n=1860) oranında azalma tespit

ABSTRACT

Objective: All resources of the health system have been allocated to the pandemic to combat the coronavirus disease (COVID-19) epidemic that has affected the world. In addition, measures implemented during the pandemic, such as isolation, lockdown and restricted mobility, adversely affected tuberculosis (TB) control programs in our country and around the world. In this study, it was aimed to investigate the effect of the COVID-19 pandemic on TB patients and TB control program in Mersin province.

Methods: In this study, a total 6328 samples of 3731 patients with a preliminary diagnosis of TB, from Mersin University Hospital and Mersin tuberculosis dispensaries, between January 2019 and December 2020, were included. In the study, how much the number of samples decreased during the 2020 pandemic period, the number of patients diagnosed with TB, the change in the age distribution of the patients, and the number of control samples from the treatment follow-up of TB patients were examined.

Results: In the study, a decrease of 42.2% in the number of patients and a decrease of 45.4% in the

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Mersin
²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp Eğitimi AD., Mersin



İletişim / Corresponding Author : Gönül ASLAN

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Çiftlikköy, Yenişehir Mersin - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 02.09.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 27.11.2021

edilmiştir. Aylara göre hasta sayısındaki en fazla azalma ülkemizde pandeminin başladığı ve kısıtlamaların yoğun olarak uygulandığı Mart, Nisan ve Mayıs ayında (sırasıyla %44,2, %67,2 ve %69,8 oranında) saptanmıştır. Pandemi döneminde TB pozitif hasta sayısında %28,2 azalma görülmüştür. Çalışmada 2019 ve 2020 yılları arasında hastaların cinsiyet dağılımları açısından bir fark saptanmamıştır ($p=0,620$). TB pozitif hastaların yaş ortalaması 2019 yılında $53,5\pm 16,2$ iken 2020 yılında $40,3\pm 19,6$ 'ya düşmüş ve yaş ortalamasındaki azalma anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Yaş grupları karşılaştırıldığında; 2019 yılında 65 yaş üstü hastaların oranı daha fazlayken 2020 yılında 18 yaş altındaki hastaların oranı daha fazla bulunmuştur ($p=0,003$). Çalışmada, 2019 yılında TB hastalarının %73,0'ünden, 2020 yılında ise %52,9'undan tedavi takibi sırasında kontrol örneği geldiği tespit edilmiştir. Pandemi döneminde TB pozitif hastalardan kontrol örneği gelen hasta sayısındaki azalma anlamlı bulunmuştur ($p=0,021$).

Sonuç: Çalışmada elde ettiğimiz bulgular pandemi döneminde uygulanan kısıtlamaların TB tanı ve takibini olumsuz etkilediğini ortaya koymuştur. Ayrıca TB hastalarının yaş ortalamasının azalarak genç yaşa doğru kayma eğilimi göstermesi ve 18 yaş altında pozitif hasta sayısının artması, bu dönemde aile içi bulaşın arttığını düşündürmüştür. Ancak pandeminin TB kontrol programına etkisini ayrıntılı bir şekilde ortaya koyabilmek için daha geniş ölçekli ve uzun periyotlu çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, pandemi, tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis*, kontrol

number of samples were observed during the pandemic period of 2020. The highest decrease in the number of patients by months were observed in March, April and May (respectively 44.2%, 67.2% and 69.8%) when the pandemic started in our country and the restrictions were applied intensively. During the pandemic period, a decrease of 28.2% was observed in the number of TB positive patients. While the mean age of TB positive patients was 53.5 ± 16.2 in 2019, it decreased to 40.3 ± 19.6 years in 2020, and the decrease in the mean age was statistically significant ($p < 0.001$). When the age groups between years are compared; While the rate of patients over 65 years of age was higher in 2019, the rate of patients under the age of 18 was found to be higher in 2020 ($p=0.003$). In the study, control samples came during treatment follow-up from 73% of TB patients in 2019 and 52.9% in 2020. The rate of decrease in the number of patients with control samples from TB positive patients during the pandemic period was found to be statistically significant ($p=0.021$).

Conclusion: The findings of our study revealed that the restrictions applied during the pandemic period adversely affected the diagnosis and follow-up of TB in our region. In addition, the decrease in the average age of TB patients and the tendency towards younger age and the increase in the number of positive patients under the age of 18 suggest that intra-familial transmission increased in this period.

Key Words: COVID-19, pandemic, tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, control

GİRİŞ

Kökene antik çağlara dayanan *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu Tüberküloz (TB) hastalığı, COVID-19 pandemisinden önce dünya genelinde orta ve düşük gelirli ülkelerde ölüm nedenleri arasında ilk onda, ölüme neden olan enfeksiyon hastalıkları arasında ise ilk sıradaydı

(1,2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporuna göre; 2019 yılında yaklaşık 10 milyon yeni TB olgusu görüldüğü ve 1,5 milyon insanın TB nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir (3). Tüberküloz çağlar boyunca epidemik dalgalanmalar göstermiştir. Geçmişteki nedeni tam olarak bilinmese de günümüzdeki epidemik dalgalanmalar küresel boyutta etki göstermektedir. İnsan nüfusu, küreselleşme, yaygın

nüfus hareketleri ve göçler, savaşlar, sosyoekonomik problemler ve salgın hastalıklar TB epidemiyolojisini de etkilemiştir (4). Örneğin, 1918 yılındaki İspanyol influenza pandemisi TB ölüm oranının 1,5 kat artmasına neden olmuştur (5,6). Batı Afrika’da 2014 yılında ortaya çıkan Ebola virüs salgını TB kontrol programını olumsuz etkilemiştir. Salgın sırasında tanı alan TB sayısının azaldığı ve tedavide başarı oranının düştüğü bildirilmiştir (6). Ayrıca salgına bağlı olarak sağlık hizmetlerinin ve tedaviye ulaşma oranının %50 azalması, Batı Afrika’da malarya, HIV/AIDS ve TB ölümlerini 10623 arttırmış ve bunun salgının neden olduğu ölümlerden daha fazla olduğu belirtilmiştir (7).

Aralık 2019’da Çin’de ortaya çıkan ve kısa sürede dünyaya yayılarak pandemiye neden olan koronavirus enfeksiyon hastalığı (COVID-19) etkeni SARS-CoV-2, küresel boyutta sağlık hizmetlerini etkilemiştir. Pandemi sürecinde uygulanan izolasyon ve karantina kısıtlamaları, pandeminin personel, laboratuvar ve sağlık hizmetleri üzerine etkisi TB tanı ve tedavi sürecini de etkilemiştir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde TB kontrol programlarının etkilenmesi, tüberküloza bağlı ölümlerde, %8-20 oranında, artışa neden olacağı tahmin edilmektedir (8). Ayrıca pandemi boyunca sıklıkla uygulanan evde izolasyon önlemleri, aile içi teması artırarak indeks TB olgularından çocuklara bulaş riskini arttıracığı bildirilmiştir (9). Pandemi ile birlikte ortaya çıkan bir diğer risk ise ciddi COVID-19 hastalarında uygulanan immunsupresif tedavilerin latent tüberkülozu aktif enfeksiyona dönüştürmesidir (10). Bu çalışmada, COVID-19 pandemisinin Mersin ilindeki tüberküloz hastaları ve tüberküloz kontrol programı üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Bilimsel Çalışma Platformu’ndan izin alındı (Tarih: 14.02.2021 ve Karar No:2021-02-12T14_40_32) ve Mersin Üniversitesi

Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 03/03/2021 ve Karar No: 2021/218)

Çalışmaya, 1 Ocak 2019-31 Aralık 2020 tarihleri arasında, Mersin Üniversitesi Hastanesinin çeşitli kliniklerinden ve Mersin ilindeki verem savaş dispanser (VSD)’lerinden Mersin Üniversitesi Hastanesi tıbbi mikrobiyoloji - mikobakteriyoloji laboratuvarına tüberküloz ön tanısıyla gelen 3731 hastanın 6328 örneği dahil edildi. Çalışmada 2020 yılı pandemi döneminin tüberküloz üzerindeki etkisini değerlendirmek için; 2019 ve 2020 yılında Mersin Üniversitesi Hastanesi ve VSD’lerdeki hasta başvuruları ve hastalardan gelen örnek sayıları değerlendirildi. Buna göre 2020 yılı pandemi döneminde örnek sayılarının ne kadar azaldığı, tüberküloz tanısı alan hasta sayıları, hastaların yaş dağılımındaki değişim ve tüberküloz hastalarının tedavi takibinde gelen kontrol örnek sayıları hasta dosyaları taranarak incelendi.

Tüberküloz laboratuvar tanısı; steril olmayan klinik örnekler, N-asetil-L-sistein (NALC)-NaOH yöntemiyle homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi yapıldıktan sonra besiyerlerine ekildi ve yayma hazırlandı. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) kültürü için örnekler katı besiyeri Lowenstein-Jensen (LJ) ve sıvı besiyeri Versatrek (Thermo Scientific, ABD) kültür sistemine ekilerek 6-8 hafta inkübasyona bırakıldı. Yayımlar Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak ARB varlığı araştırıldı. Kültürde üremesi olan izolatlarda MTC varlığı mikroskopik inceleme, makroskopik koloni morfolojisi ve MTC’lerde mikobakteriyel protein fraksiyonu MPT64 antijenini tespit eden immünokromatografik test “SD TB Ag MPT64 rapid test” (Standart Diagnostics, Kore) ve “BD MGIT TBc identification Test” (Becton Dickinson, ABD) ile tanımlandı.

İstatistiksel analiz

Çalışmada, 2019 ve 2020 yılları arasında sürekli değişkenlerin analizi Student’s t test ile değerlendirildi. Sürekli değişkenler ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler ile özetlendi. Kategorik değişkenler frekans ve yüzde değerleri ile özetlendi. Kategorik veriler için

Ki-Kare testi kullanıldı. 2x2 boyutundan büyük ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan karşılaştırmalarda iki oran karşılaştırması (Z testi) ile anlamlılığın hangi durumda olduğu tespit edildi. Verilerin analizi TIBCO Statistica® 13.5.0.17 versiyon numaralı paket programı ile yapıldı.

BULGULAR

Çalışma süresi boyunca mikobakteriyoloji laboratuvarına toplam 3731 hastadan alınan 6328 örnek gelmiştir. Hasta ve örnek sayılarının yıllara

göre dağılımı; 2019 yılında 2365 hastadan 4094 örnek, 2020 yılında ise 1366 hastadan 2234 örnek şeklindedir (Tablo 1). Buna göre 2020 yılı pandemi döneminde hasta sayısında %42,2 (n=999) oranında azalma görülürken örnek sayısında %45,4 (n=1860) oranında azalma tespit edilmiştir. Ayrıca hasta ve örnek sayısındaki azalma oranları sırasıyla VSD'lerde %52,8 (n=512) ve %53,6 (n=870); Mersin Üniversitesi hastanesinde %34 (n=487) ve %40 (n=990) oranında saptanmıştır. Hasta ve örnek sayısındaki azalma oranları VSD'lerde Mersin Üniversitesi hastanesine göre daha yüksek gözlenmiştir (p<0,001).

Tablo 1. Mikobakteriyoloji laboratuvarı 2019-2020 yılı TB başvuru sayıları ve pozitif hastaların demografik özellikleri

	2019 yılı n (%)	2020 yılı n (%)	Toplam	Azalma n (%)
Örnek sayısı	4094	2234	6328	1860 (45.4)
MÜH	2472 (60.4)	1482 (66.3)	3954 (62.5)	990 (40.0)
VSD	1622 (39.6)	752 (33.7)	2374 (37.5)	870 (53.6)
Hasta sayısı	2365	1366	3731	999 (42.2)
MÜH	1396 (59.0)	909 (66.5)	2305 (61.8)	487 (34.9)
VSD	969 (41.0)	457 (33.5)	1426 (38.2)	512 (52.8)
MTC pozitif hasta sayısı	71	51	122	20 (28.2)
MÜH	33 (46.5)	21 (41.2)	54 (44.3)	12 (36.4)
VSD	38 (53.5)	30 (58.8)	68 (55.7)	8 (21.1)
Cinsiyet				
Erkek	53 (74.6)	36 (70.6)	89 (73.0)	p ^a =0.620
Kadın	18 (25.4)	15 (29.4)	33 (27.0)	
Kontrol örneği gelen pozitif hasta sayısı	52 (73.2)*	27 (52.9)	79 (64.8)	p^a=0.021
MÜH	24 (72.7)	10 (47.6)	34 (63.0)	p ^a =0.438
VSD	28 (73.7)	17 (56.7)	45 (66.2)	
Pozitif hastaların yaş ortalaması, yıl	53.5±16.2 (18-87)*	40.3±19.6 (1-78)	48.0±18.8 (1-87)	p^b <0.001
Yaş	< 18 yaş	0 (0.0)	6 (11.8)*	6 (4.9)
	18-39 yaş	16 (22.5)	18 (35.3)	34 (27.9)
	40-64 yaş	35 (49.3)	21 (41.1)	56 (45.9)
	≥ 65 yaş	20 (28.2)*	6 (11.8)	26 (21.3)

p^a: Ki-Kare test, p^b: Student's t test, *: p <0.05 anlamlı yüksek olan oranı ifade eder

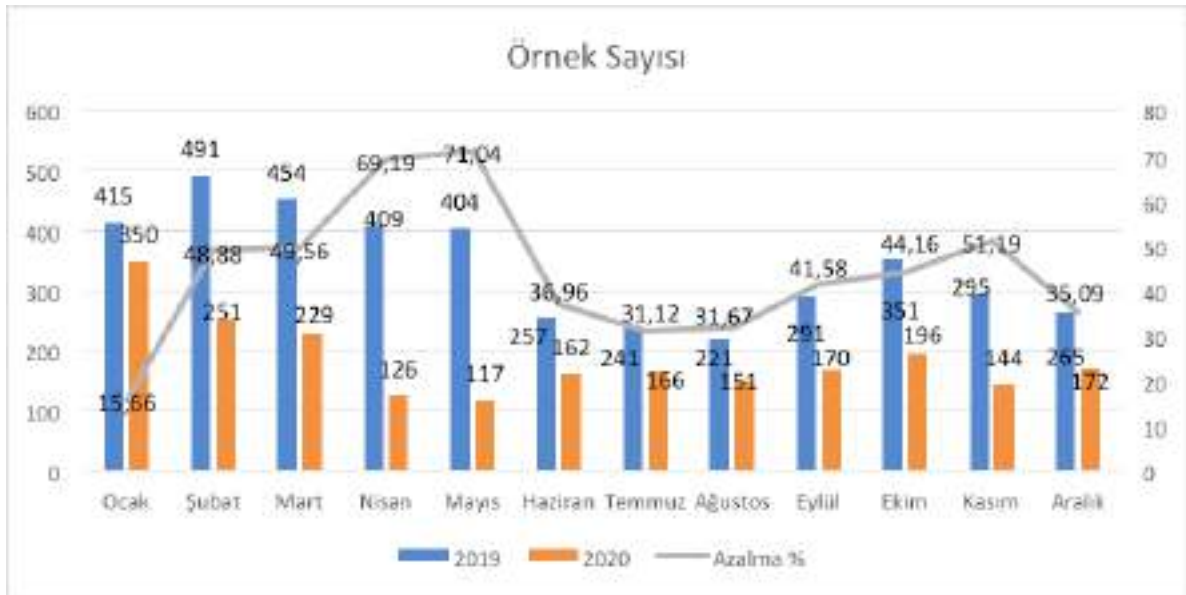
MÜH: Mersin Üniversitesi Hastanesi, VSD: Verem Savaş Dispanseri

Pandemi döneminde aylara göre hasta ve örnek sayısındaki azalma oranlarına bakıldığında hasta sayısındaki en yüksek azalma oranı Mayıs ayında %69,8 (n=164), Nisan ayında %67,2 (n=162) ve Mart ayında %44,2 (n=111) görülürken; en düşük azalma Ocak ayında %9 (n=21), Ağustos ayında %29,7 (n=38) ve Temmuz ayında %31,3 (n=47) oranında tespit

edilmiştir. Örnek sayısındaki en yüksek azalma oranı ise Mayıs ayında %71 (n=287), Nisan ayında %69,2 (n=283) ve Kasım ayında %51,2 (n=151) oranında görülürken; en düşük azalma Ocak ayında %15,7 (n=65), Temmuz ayında %31,1 (n=75) ve Ağustos ayında %31,7 (n=70) oranında tespit edilmiştir.



Şekil 1. 2019-2020 yılları aylara göre TB başvuru sayısı ve pandemi dönemindeki hasta sayısının azalma oranları



Şekil 2. 2019-2020 yılları aylara göre TB laboratuvarı örnek sayısı ve pandemi dönemindeki azalma oranları

MTC pozitif hasta sayıları değerlendirildiğinde; 2019 yılında toplam 71 hasta pozitif bulunurken, 2020 yılında 51 hastada MTC tespit edilmiş ve pandemi döneminde pozitif hasta sayısındaki azalma oranı %28,2 (n=20) bulunmuştur. Pandemi döneminde pozitif hasta sayısındaki azalma oranı Mersin Üniversitesi hastanesinde %36,4 (n=12) ve VSD'lerde %21,1 (n=8) oranında saptanmıştır (p=0,152) (Tablo 1).

Çalışma süresi boyunca pozitif bulunan toplam 122 hastanın %73 (n=89)'ü erkek ve %27 (n=33)'si kadın olup 2019 ve 2020 yılları arasında hastaların cinsiyet dağılımları açısından istatistiksel bir fark saptanmamıştır (p=0.620) (Tablo 1).

MTC pozitif hastaların yaş ortalaması 2019 yılında 53,5±16,2 (min-maks 18-87) iken 2020 yılında 40,3±19,6 (1-78)'e düşmüştür ve MTC pozitif hastaların yaş ortalamasındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p <0.001). Yıllara göre pozitif hastaların yaş dağılımları karşılaştırıldığında 2019 yılında 65 yaş üstü hastaların oranı daha fazlayken 2020 yılında 18 yaş altındaki hastaların oranı daha fazla bulunmuştur (p=0.003) (Tablo 1). Pandemi döneminde tüberküloz hastalarının yaş ortalamasının azalarak genç yaşa doğru kayma eğilimi gösterdiği ve 18 yaş altında pozitif hasta sayısının arttığı tespit edilmiştir.

Pandeminin hasta takibine etkisi değerlendirildiğinde; 2019 yılında 71 MTC pozitif hastanın %73,0 (n=52)'ünden, 2020 yılında ise 51 pozitif hastanın %52,9 (n=27)'undan tedavi takibi sırasında mikobakteriyoloji laboratuvarına kontrol örneği geldiği tespit edilmiştir. Pandemi döneminde MTC pozitif hastalarda kontrol örneği gelen hasta sayısındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.021) (Tablo 1).

TARTIŞMA

Birleşmiş Milletler'in sürdürülebilir kalkınma hedefleri ve DSÖ'nün tüberkülozu sonlandırma stratejisi global olarak TB epidemisini 2030 yılında bitirmeyi hedeflemektedir (1). Bu hedeflere

yönelik ilerleme kaydedilmesine rağmen; COVID-19 pandemisinin sağlık sistemine aşırı yüklenmesi ve SARS-CoV-2 bulaşını azaltmak için alınan önlemler, TB olgularının tespiti ve tedavisi gibi sağlık hizmetlerine erişimi azaltmıştır, bu durumun hem TB olgularında hem de TB'ye bağlı ölümlerde artışa neden olacağı bildirilmiştir (11). Dünyanın çeşitli yerlerinde görülen viral salgın hastalıklar, TB kontrol programını olumsuz etkilemiştir. Örneğin 2014 yılında Batı Afrika görülen Ebola virüs salgını sırasında, Liberya'da TB tanısı, tedavi ve takibinin azalması sonucu, TB tedavi başarısının %80'den %69'a düştüğü raporlanmıştır (6). Ayrıca, Orta Doğu solunum sendromu koronavirüs (MERS-CoV) salgını, Suudi Arabistan'da TB kontrolünü etkilemiştir. Bu viral salgınlar, etkilenen bölgelerde sonraki yıllarda TB yükünün artmasına neden olmuştur (12). DSÖ, TB kontrolündeki ilerlemelerin kaybedilmemesi için COVID-19 pandemi sürecinde TB hizmetlerinin devam etmesini öneren bir bilgi notu yayınlamıştır (13). Ülkemizde de 2020 yılı Nisan ayında pandemi sırasında TB hizmetlerinin devam etmesini istemiştir (14).

Çalışmamızda, COVID-19 pandemisinin TB kontrol programına etkisi değerlendirildiğinde, 2020 yılı pandemi döneminde tüberküloz tanısı için örnek alınan hasta sayısında %42,2 oranında azalma tespit edilmiştir. Aylara göre azalma oranlarına bakıldığında ise en yüksek azalma oranı ülkemizde pandeminin başladığı ve kısıtlamaların yoğun olarak uygulandığı dönem olan Mart, Nisan ve Mayıs ayında (sırasıyla %44,2, %67,2 ve %69,8 oranında) görülürken; en düşük azalma ise ülkemizde COVID-19 olgularının görülmediği Ocak ayında, kısıtlamaların azaldığı dönem olan Temmuz ve Ağustos ayında (sırasıyla %9, %31,1 ve %29,7) tespit edilmiştir. Ülkemizde 2020 yılı Mart-Kasım ayları arasında ulusal tüberküloz referans laboratuvarına gelen başvuruların %69,6 oranında ve ulusal siveyans ağına kayıtlı kültür pozitif hasta sayısının ise %37 oranında azaldığı bildirilmiştir (15). Ayrıca, 2020 yılı Mart-Ekim ayları arasında VSD'lerde yapılan muayene sayısında %42 ve tedaviye alınan olgu sayısında %24,7 oranında

azalma olduğu belirtilmiştir (16). Çin'den bildirilen bir çalışmada, TB başvurularının pandeminin pik yaptığı sokağa çıkma yasağı tedbirlerinin sıkı uygulandığı dönemde keskin bir şekilde azaldığı ve hasta takiplerinin ertelendiği belirtilmiştir (17). 2019 ve 2020 yılı Mart ve Nisan aylarının karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, pandemi süreci ile ilişkili olarak yeni TB tanısı alan vakalarda ve daha önce tanı alan hastaların takiplerinde azalma olduğu, ölüm oranlarında ise artış olduğu tespit edilmiştir (18). Bizim çalışmamızda 2020 yılı pandemi döneminde pozitif hasta sayısının %28,2 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, pozitif hastaların tedavi takibi sırasında alınan kontrol örneği 2019 yılında %73 iken 2020 yılında bu oranın %52,9'a düştüğü saptanmış ve pandemi döneminde TB hastalarından alınan kontrol örneği sayısındaki azalma anlamlı bulunmuştur ($p=0.021$)

Pandemi döneminde uygulanan maske ve fiziksel mesafe politikalarının toplumsal TB bulaşının azalmasına yardımcı olabileceği belirtilmiştir (3,19). DSÖ global verilerine göre pandemi döneminde yeni TB tanısı konan kişi sayısında %18,0 (2019 7,1 milyon-2020 5,8 milyon) oranında azalma görülmüştür (20). Ancak, TB insidansında sağlanan düşüşlerin %2,3'ten %1,9'a gerilediği bildirilmiştir (3,20). Ayrıca ilaca dirençli TB tedavisi sağlanan kişi sayısında %15, koruyucu tedavi oranında ise %21 azalma raporlanmıştır. Bu durumdan, pandemi döneminde tanı ve tedavi hizmetlerinin kesintiye uğraması, sağlık sisteminin hizmet kapasitesinin azalması, sokağa çıkma kısıtlamaları, pandemi sırasında sağlık kuruluşlarına gitmenin riskleriyle ilgili endişeler, TB ve COVID-19 semptomlarındaki benzerliklerden dolayı damgalanma endişesi gibi faktörlerin etkili olduğu belirtilmiştir (20).

Çalışmamızda 2020 yılında TB tanısı alan hastaların hiçbirinin COVID-19 geçirmedeği tespit edilmiştir. Ancak benzer semptomlar gösteren TB ve COVID-19'un, koenfeksiyon varlığında hızlı ilerleyen şiddetli bir tabloya neden olduğu bildirilmiştir (21). Yapılan çalışmalarda, pandemi sürecinde TB

tanısının ihmal edilmesinin COVID-19 ve tüberküloz koenfeksiyonlarının artmasına neden olabileceği belirtilmiştir (21-24). SARS-CoV-2 enfeksiyonunun immün sistem üzerindeki etkisi, CD4 ve CD8 hücre sayısını azaltması latent tüberkülozun aktivasyonuna neden olabileceğinden COVID-19 geçiren hastaların tüberküloz açısından izlenmesi önerilmiştir (25,26). Ayrıca sitokin fırtınasını önlemek amacıyla tedavide uygulanan immüsupresif ajanların da reaktivasyona neden olabileceği bildirilmiştir (22,27). Bu nedenle immüsupresif tedavi öncesi interferon gama salım testi (IGRA) yapılması önerilmiştir (27). Ancak COVID-19'un neden olduğu immün düzensizliğin IGRA testinde belirsiz sonuçlara neden olabileceği unutulmamalıdır (10).

Çalışmamızda TB pozitif hastaların %73'ü erkek, %27'si kadın olup, 2019 ve 2020 yılları arasında cinsiyet dağılımları açısından bir fark saptanmamıştır ($p=0.620$). TB pozitif hastaların yaş ortalaması 2019 yılında 53.5 ± 16.2 iken 2020 yılında 40.3 ± 19.6 'e düşmüştür ve pozitif hastaların yaş ortalamasındaki azalma anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Pozitif hastaların yaş dağılımları karşılaştırıldığında 2019 yılında 65 yaş üstü hastaların oranı daha fazlayken 2020 yılında 18 yaş altındaki hastaların oranı daha fazla bulunmuştur ($p=0.003$) (Tablo 1). 2020 yılında hastaların yaş ortalamasının azalması ve çocuklarda pozitifliğin artması, pandemi döneminde uygulanan maske ve sosyal mesafe kurallarının erişkinlerde toplumsal TB bulaşını azaltmış olabileceğini ancak kısıtlama ve karantina uygulamalarının aile içi TB bulaşını arttırmış olabileceğini düşündürmüştür. DSÖ'nün 2019 yılı global verilerine göre; 10 milyon TB olgusunun %56'sının erkeklerde, %32'sinin kadınlarda ve %12'sinin çocuklarda görüldüğü bildirilmiştir (3). Çocuklarda görülen tüberküloz olguları, kontrol altına alınamamış erişkin tüberkülozunun bir göstergesidir (28). Bir modelleme çalışmasında, tüberküloz yükü yüksek olan ülkelerde enfektif tüberkülozlu bir bireyle aynı evde yaşayan 15 yaşından küçük çocuk sayısı medyanı 15319701(13766297-17061821) ve meydana gelen tüberküloz enfeksiyonlarının medyanı

7591759(5800053-9969780) olarak bildirilmiştir (29). Çocuklara tüberküloz, ev dışında okul ve toplu taşıma gibi çeşitli kalabalık ortamlardan bulaşa da çoğunlukla birlikte yaşadıkları ev halkı üyelerindeki indeks olgulardan bulaşır (28,29). COVID-19 pandemi sürecinde SARS-CoV-2'nin yayılmasını önlemek için uygulanan izolasyon ve karantina önlemlerinin aile içi tüberküloz bulaşını kolaylaştırdığı belirtilmiştir (3,12). Ayrıca, tüberkülozlu indeks olguya maruz kalma yoğunluğu arttıkça aile üyeleri arasında TB enfeksiyonu ve hastalık gelişme riskinin de arttığı raporlanmıştır (30). COVID-19 pandemi döneminde uygulanan 3 aylık bir karantinanın önümüzdeki 5 yıllık süreçte Hindistan'da ek 1,65 milyon TB vakasına ve 438000 TB kaynaklı ölüme neden olabileceği bildirilmiştir (31).

Sonuç olarak bu çalışmada COVID-19 pandemi döneminde tüberküloz tanısı için başvuran hasta sayısında %42,2 ve örnek sayısında %45,4

oranında azalma tespit edilmiştir. Aylara göre TB tanısı için örnek alınan hasta sayısındaki en yüksek azalma ülkemizde pandeminin başladığı ve kısıtlamaların yoğun olarak uygulandığı Mart, Nisan ve Mayıs aylarında görülmüştür. Pandemi döneminde hastaların yaş ortalamasında anlamlı bir düşüş tespit edilmiş ve 18 yaş altındaki hastaların sayısında artış saptanmıştır. Ayrıca, bu dönemde TB pozitif hastaların tedavi takibinde alınan kontrol örneği sayısında anlamlı oranda azalma tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgular pandemi döneminde uygulanan kısıtlamaların bölgemizde TB tanı ve takibini olumsuz etkilediğini ortaya koymuş ve aile içi bulaşın arttığını düşündürmüştür. Ancak pandeminin TB kontrolüne etkisini daha ayrıntılı bir şekilde ortaya koyabilmek için geniş ölçekli ve uzun periyotlu çalışmalara ihtiyaç vardır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:03.03.2021 ve Karar No: 2021/218).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). History of World TB Day. <https://www.cdc.gov/tb/worldtbdays/history.htm> (Erişim tarihi: 13.07.2021).
2. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (Erişim tarihi: 13.07.2021).
3. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131> (Erişim tarihi: 13.07.2021).
4. van Helden PD. The economic divide and tuberculosis. Tuberculosis is not just a medical problem, but also a problem of social inequality and poverty. *EMBO Rep*, 2003;4(1):24-8..
5. Zürcher K, Zwahlen M, Ballif M, Rieder HL, Egger M, Fenner L. Influenza pandemics and tuberculosis mortality in 1889 and 1918: analysis of historical data from Switzerland. *PLoS One*, 2016;11(10):e0162575.
6. Konwloh PK, Cambell CL, Ade S, Bhat P, Harries AD, Wilkinson E, et al. Influence of Ebola on tuberculosis case finding and treatment outcomes in Liberia. *Public Health Action*, 2017;7:62-9.
7. Parpia AS, Ndeffo-Mbah ML, Wenzel NS, Galvani AP. Effects of response to 2014-2015 Ebola outbreak on deaths from Malaria, HIV/AIDS, and tuberculosis, West Africa. *Emerg Infect Dis*, 2016;22(3):433-41.
8. Nikolayevskyy V, Holicka Y, van Soolingen D, van der Werf MJ, Ködmön C, Surkova E, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on tuberculosis laboratory services in Europe. *Eur Respir J*, 2021;57(1):2003890.
9. Togun T, Kampmann B, Stoker NG, Lipman M. Anticipating the impact of the COVID-19 pandemic on TB patients and TB control programmes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2020;19(1):21.
10. Torre A, Aliberti S, Castellotti PF, Cirillo DM, Grisolia A, Mangioni D, et al. Preliminary observations on IGRA testing for TB infection in patients with severe COVID-19 eligible for immunosuppressive therapy. *Respir Med*, 2020;175:106204.
11. McQuaid CF, McCreesh N, Read JM, Sumner T. CMMID COVID-19 Working Group, Houben RMGJ, White RG, Harris RC. The potential impact of COVID-19-related disruption on tuberculosis burden. *Eur Respir J*, 2020;56(2):2001718.
12. Alene KA, Wangdi K, Clements ACA. Impact of the COVID-19 pandemic on tuberculosis control: an overview. *Trop Med Infect Dis*, 2020;5(3):123.
13. World Health Organization (WHO) Information Note Tuberculosis and COVID-19. <https://www.who.int/docs/default-source/documents/tuberculosis/infonote-tb-covid-19.pdf> (Erişim tarihi: 13.07.2021).
14. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Tüberküloz Dairesi Başkanlığı. Tüberküloz Kontrol Hizmetlerinin Devamlılığı, 14.04.2020 tarihli ve 60949272-134.99 sayılı yazı.
15. Arslantürk A. Pandemi den tüberküloz laboratuvarları nasıl etkilendi? TMC 2020 Çevirim İçerik Mikrobiyoloji Sempozyumu Tam Metin Bildiri Kitabı. TMC 2020 Çevirim İçerik Mikrobiyoloji Sempozyumu. Aralık, 25-27, Türkiye. 2020. p.13-16.
16. Özkan S. Tüberkülozun Tanı, Tedavi ve Takibinde Pandemi nin Etkisi. TMC 2020 Çevirim İçerik Mikrobiyoloji Sempozyumu Tam Metin Bildiri Kitabı. TMC 2020 Çevirim İçerik Mikrobiyoloji Sempozyumu. Aralık, 25-27, Türkiye. 2020. p.10-12.
17. Fei H, Yinyin X, Hui C, Ni W, Xin D, Wei C, et al. The impact of the COVID-19 epidemic on tuberculosis control in China. *Lancet Reg Health West Pac*, 2020;3:100032.
18. Magro P, Formenti B, Marchese V, Gulletta M, Tomasoni LR, Caligaris S, et al. Impact of the SARS-CoV-2 epidemic on tuberculosis treatment outcome in Northern Italy. *Eur Respir J*, 2020;56(4):2002665.

19. Mateiro Gomes BL, Carvalho I. Tuberculosis - Reaping benefits from COVID-19 in Portugal. *Pulmonology*. 2021;27(1):4-6.
20. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021> (Erişim tarihi: 23.11.2021).
21. Kumar DR, Bhattacharya DB, Meena DV, Soneja DM, Wig DN. COVID-19 and TB co-infection- 'Finishing touch' in perfect recipe to 'severity' or 'death'. *J Infect*, 2020;81(3): e39-e40.
22. Migliori GB, Thong PM, Akkerman O, Alffenaar JW, Álvarez-Navascués F, Assao-Neino MM, et al. Worldwide effects of coronavirus disease pandemic on tuberculosis services, January-April 2020. *Emerg Infect Dis*, 2020 (11):2709-12.
23. Khayat M, Fan H, Vali Y. COVID-19 promoting the development of active tuberculosis in a patient with latent tuberculosis infection: a case report. *Respir Med Case Rep*, 2021;32:101344.
24. Tadolini M, Codecasa LR, García-García JM, Blanc FX, Borisov S, Alffenaar JW, et al. Active tuberculosis, sequelae and COVID-19 co-infection: first cohort of 49 cases. *Eur Respir J*, 2020;56(1):2001398.
25. Crisan-Dabija R, Grigorescu C, Pavel CA, Artene B, Popa IV, Cernomaz A, Burlacu A. Tuberculosis and COVID-19: lessons from the past viral outbreaks and possible future outcomes. *Can Respir J*, 2020;1401053.
26. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*, 2020;11:827.
27. Liu C, Yu Y, Fleming J, Wang T, Shen S, Wang Y, et al. Severe COVID-19 cases with a history of active or latent tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2020;24(7):747-9.
28. Lamb GS, Starke JR. Tuberculosis in infants and children. *Microbiol Spectr*, 2017; 5(2). doi: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0037-2016.
29. Dodd PJ, Gardiner E, Coghlan R, Seddon JA. Burden of childhood tuberculosis in 22 high-burden countries: a mathematical modelling study. *Lancet Glob Health*, 2014;2(8):453-9.
30. Acuña-Villaorduña C, Jones-López EC, Fregona G, Marques-Rodrigues P, Gaeddert M, Geadas C, et al. Intensity of exposure to pulmonary tuberculosis determines risk of tuberculosis infection and disease. *Eur Respir J*, 2018;51(1):1701578.
31. Cilloni L, Fu H, Vesga JF, Dowdy D, Pretorius C, Ahmedov S, et al. The potential impact of the COVID-19 pandemic on the tuberculosis epidemic a modelling analysis. *E Clinical Medicine*. 2020;28:100603.

Ticari broiler ve yumurtacı tavuklarda ELISA ile *Mycoplasma synoviae* seropozitifliği

Seropositivity of *Mycoplasma synoviae* by ELISA in commercial broiler and layer chickens

Gülşen GONCAGÜL¹ (ID), Elçin GÜNAYDIN² (ID), Özlem KARDOĞAN³ (ID), Yavuz ÇOKAL⁴ (ID)

ÖZET

Amaç: *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*), dünya genelinde kanatlı endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olan, mikoplazma türleri içerisinde klinik açıdan en önemli olan ikinci türdür. Bu çalışmanın amacı, ticari broiler ve ticari yumurtacı sürülerde *M. synoviae*'ya karşı oluşan antikorların varlığını indirek ELISA ile araştırmaktır.

Yöntem: İç Anadolu Bölgesi'nde aşısız ticari broiler (n=380) ve ticari yumurtacı (n=577) sürülerden tesadüfi örnekleme yoluyla aseptik koşullarda vena subcutanea ulnaristen toplam 957 kan örneği toplandı ve serumları ayrıldı. Serum örneklerinde anti-*M. synoviae* antikorları ticari indirekt ELISA kiti ile belirlendi.

Bulgular: Yirmibir ticari broiler sürüsünden alınan 380 ve 33 ticari yumurtacı sürüsünden alınan 577 kan serumu örneğinde sırasıyla seropozitiflik oranı %40,76 (n=155) ve %54,59 (n=315) olarak saptandı.

Sonuç: İç Anadolu Bölgesi'nde kanatlı yetiştiriciliğinde özellikle ticari yumurtacı sürülerde, broilerlere göre *M. synoviae*, enfeksiyonunun daha yaygın olduğu belirlendi. Her iki yetiştirme tipinde *M.*

ABSTRACT

Objective: *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*) is the second most clinically important mycoplasma species, causing significant economic losses to the poultry industry worldwide. The aim of this study is to investigate the presence of antibodies against *M. synoviae* by indirect ELISA in commercial broiler and commercial layer flocks.

Methods: A total of 957 blood samples were collected from vena subcutanea ulnaris under aseptic conditions by random sampling from unvaccinated commercial broiler (n=380) and commercial layer (n=577) flocks in the Central Anatolia Region and their serums were extracted. Anti-*M. synoviae* antibodies were detected by using commercial indirect ELISA kit.

Results: The seropositivity rates were determined 40.76% (n=155) and 54.59% (n=315) in 380 sera from 21 commercial broiler flocks and 577 sera from 33 commercial layer flocks, respectively.

Conclusion: In comparison to broilers, *M. synoviae* infection was shown to be more widespread in poultry breeding, particularly in commercial layer flocks, in the Central Anatolia Region. To avoid economic loss due to

¹Bursa Uludağ Üniversitesi Mennan Pasinli Atçılık Meslek Yüksekokulu, Bursa

²Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD., Kastamonu

³Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kanatlı Hayvan Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara

⁴Onyedi Eylül Üniversitesi, Bandırma Meslek Yüksekokulu, Balıkesir



İletişim / Corresponding Author : Gülşen GONCAGÜL

Bursa Uludağ Üniversitesi Görükle Kampüsü Nilüfer, Bursa - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 09.05.2022

Kabul Tarihi / Accepted : 01.08.2022

synoviae kaynaklı ekonomik kayıp risklerinin oluşmaması için kanatlı damızlık sürülerin biyogüvenlik önemlerinin artırılması, özellikle damızlık sürülerde izleme çalışmaları ile düzenli takiplerin yapılması ve enfeksiyon varlığı saptanmış sürülerde en kısa sürede tedavi uygulamasının önem arzettiği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: *Mycoplasma synoviae*, ELISA, ticari broiler, ticari yumurtacı

M. synoviae in both breeding types, we conclude that it is critical to improve the biosecurity of poultry breeder flocks, conduct regular follow-ups with monitoring studies, especially in breeder flocks, and treat infected herds as soon as possible.

Key Words: *Mycoplasma synoviae*, ELISA, commercial broiler, commercial layer

GİRİŞ

M. synoviae, kanatlı hayvanlarda, sinovitis, peritonitis, yumurta apikal anormallikleri ve üst solunum yollarının subklinik enfeksiyonuna yol açan ve kanatlı sektöründe ciddi ekonomik kayıplara neden olan bir enfeksiyon ajanıdır (1, 2). Ayrıca *M. synoviae* yumurtalarda kabuk ve apeks anormalliklerine, yumurta kalitesinde ve üretiminde düşüşe neden olarak işletme maliyetlerinde artışa neden olabilir (3-6). Bunun yanısıra özellikle 23-25 haftalık broiler damızlık sürülerde de %5 ile %10 oranında topallığa neden olduğu ve tendon kopmasının yaşandığı da bildirilmiştir (7). Kanatlı mikoplazmoz, horizontal veya vertikal bulaşım, genellikle kanatlıların %100'ünü enfekte etmektedir. Bu enfeksiyonu taşıyan kanatlılarda eklem lezyonları her zaman görülmediği için, enfekte olduğu klinik olarak anlaşılamayan taşıyıcıların doğrudan horizontal yolla diğer kanatlılara bulaştırmaya devam etmeleri bildirilmiştir (8-12).

Bu durum enfeksiyonun sürüde kalıcı olarak devamına da neden olmaktadır (13). Özellikle kanatlı endüstrisinin yoğun olduğu ülkelerde, ticari sürülerde enfeksiyonun kontrol altına alınması bir zorunluluk halindedir (14). Enfeksiyonun kontrol altına alınması ve ekonomik kayıpların önlenmesinde başarılı sonuç almak, ancak, enfekte sürülerin doğru

ve zamanında teşhisi ve gerekli önlemin alınması ile mümkün olmaktadır (15,16). *Mycoplasma*'nın teşhis amaçlı izolasyonunda kullanılan genel kültür yöntemi zor, pahalı, zaman alıcı olması, düşük hassasiyet göstermesi ve bazen de miks enfeksiyonlar kaynaklı yalancı negatif sonuç vermesi nedeniyle tercih edilmemektedir (17). Serolojik teknikler, salgınları kontrol etmek için gerekli profilaktik önlemlerin alınmasına rehberlik eden belirli bir patojen için spesifik antikorların saptanması yoluyla bulaşıcı hastalıkların erken izlenmesinde faydalı olabilir (15). Bu amaçla günümüzde *Mycoplasma* teşhisi için ELISA yöntemiyle, antikor varlığı ortaya konulmaya çalışılmaktadır (18). Bunun yanında PCR tekniği ile DNA tespiti ile de yapılmaktadır (14). ELISA'nın kanatlı damızlık ve ticari sürülerde kanatlı mikoplazmozunu saptamaya yönelik izleme programlarında tarama amaçlı kullanılmasından fayda görülmektedir (19). *M. synoviae* enfeksiyonu, Avustralya, Güney Amerika, Asya, Avrupa ve Afrika gibi dünyanın farklı bölgelerinde bildirilmiştir (20). Ancak, *M. synoviae* dünya genelinde çoğu vakada bölgesel olarak görülmüş ve büyük ölçekli salgınlar nadiren meydana gelmiştir. Son on yılda, ticari kanatlı yetiştiriciliğinde *Mycoplasma gallisepticum*'un rolünü *M. synoviae*'nin devralarak daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (4). Bu enfeksiyonun kontrolünde uygun olabilecek kontrol programının belirlenmesinde, programın uygulanacağı

bölgede bulunan kanatlı sürülerinde enfeksiyonun yaygınlığının bilinmesi gerekir. Bu amaçla özellikle Avrupa ve dünya ülkelerinde yapılmış epidemiyolojik çalışmalar kanatlılarda *M. synoviae*'nin yüksek prevalans oranı tespit edilmiştir (4, 6, 18, 21-23).

Kanatlı hayvanı endüstrisinde *M. synoviae* enfeksiyonunun kontrol altına alınması ve önlenmesinde, özellikle kanatlı sürülerinin bu enfeksiyon yönlü izlenmesinin yararlı olduğu ve bu önleme stratejisinin tüm broiler ve yumurta tipi yetiştirmelerde yapılması gerekliliği vurgulanmıştır (23).

Araştırmamızda, kanatlı yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı İç Anadolu Bölgesi'nde ticari broiler ve yumurtacı tavuklarda, kanatlı yetiştiriciliğinin önemli ekonomik kayıplara yol açan önemli patojenlerinden olan *M. synoviae* enfeksiyonunun serolojik olarak ELISA ile varlığının ve yaygınlığının tespit edilmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kan Serum Örnekleri

İç Anadolu Bölgesi'nde, 1-39 günlük 21 farklı ticari broiler (n= 380) ve 1-136 günlük 33 ticari yumurtacı sürüsünden (n=577) aseptik koşullarda aşısız sürülerden tesadüfi örnekleme yolu alınan toplam 957 kan örneklerinden serum eldesi için, kanlar 1000 rpm de 2 dakika santrifüje edildi. Serumlar ependorf tüplere aktararak çalışılncaya kadar -20 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

ELISA yorumu

Toplanan kan serumu örnekleri, ticari *M. synoviae* Antikor Test Kiti (BioChek®, Gouda, Hollanda) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre ELISA ile incelendi. 405 nm'de optik densitede ELISA okuyucu spektrofotometre (ELX800™, Bio-Tek Inst Inc, ABD) ile okundu. *M. synovia*'ya karşı antikor varlığı veya yokluğu her numune için S/P oranını, titre ve genel sürü profili değerleri BioChek® firmasının özel programı ile (BioChek Software Programme, Gouda,

Hollanda) hesaplanarak tespit edildi. *M. synoviae* için antikor durumu S/P oranının 0,499 veya daha düşük olması, antikor titresinin 593 veya daha düşük olması durumunda negatif, S/P oranının 0,500 veya daha büyük, antikor titresinin 594 veya daha büyük olmasında pozitif olarak değerlendirildi.

İstatistiksel değerlendirme

Ticari broiler ve ticari yumurtacı sürüler arasında pozitiflik açısından farklılığın araştırılması için Ki-kare analizi uygulanmıştır. Ticari broiler ve ticari yumurtacı sürüler için yaş ile doğru orantılı olarak pozitiflik oranı arasında ilişkinin araştırılması aşamasında ise Kruskal-Wallis Testi uygulanmıştır.

Bu çalışma Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu izni ile yapılmıştır (Tarih:05.01.2022 ve Karar No: 2022/02).

BULGULAR

Çalışmada İç Anadolu Bölgesi'nde ticari broiler (n= 380) ve ticari yumurtacı sürüsünden (n=577) toplam 957 serum örneğine Ms antikorlarının varlığı açısından değerlendirmek için ELISA uygulandı. Ticari broiler (n= 380) ve ticari yumurtacı sürüsünden (n=577) alınan kan serumlarındaki *M. synoviae* antikor seropozitiflik oranları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 2'de görüldüğü gibi *M. synoviae* antikorları yönünden ticari broiler sürü ile ticari yumurtacı sürü arasında istatistiksel olarak seropozitiflik yüzdesi bakımından fark olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($\alpha=0.05 > p\text{-value}=0.000$).

Çalışma kapsamında ticari broiler ve ticari yumurtacı sürü arasında yetiştirmenin ilk 14 gün $\alpha=0.05 > p\text{-value}=0.014$ ve 28 günlük yaşlarda ($\alpha=0.05 > p\text{-value}=0.026$) seropozitiflik yüzdesi açısından değerlendirildiğinde her iki yetiştirme tipinde de fark olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 6, Tablo 7).

Tablo 7'de görüldüğü gibi, ticari broiler sürü ile ticari yumurtacı sürü arasında istatistiksel olarak seropozitiflik yüzdesi bakımından *M. synoviae* antikorları yönünden fark olmadığı sonucuna ulaşılmıştır ($\alpha=0.05 < p\text{-value}=0.985$).

Tablo 1. Ticari broiler ve ticari yumurtacı sürülerde *M.synoviae* seropozitiflik oranları

Yaş (Gün)	Ticari Broiler Sürü					Yaş (Gün)	Ticari Yumurtacı Sürü				
	Numune Sayısı	Seropozitif Numune Sayısı		Seropozitif Oran (%)			Numune Sayısı	Seropozitif Numune Sayısı		Seropozitif Oran (%)	
		N	P	N	P			N	P	N	P
4	15	14	1	93,3	6,7	32	10	10	-	100	-
23	15	15	-	100	-	18	14	14	-	100	-
26	13	13	-	100	-	22	11	11	-	100	-
1	15	15	-	100	-	25	19	19	-	100	-
1	15	15	-	100	-	35	10	7	3	70	30
1	15	15	-	100	-	30	15	15	-	100	-
4	20	19	1	95	5	72	25	3	22	12	88
4	10	10	-	100	-	84	10	-	10	100	-
39	22	2	20	9	91	54	20	1	19	5	95
39	23	3	20	13	87	1	13	13	-	100	-
39	23	2	21	8,7	91,3	12	15	15	-	100	-
39	22	3	19	13,6	86,4	7	7	7	-	100	-
36	23	4	19	17,4	82,6	108	24	3	21	12,5	87,5
36	22	5	17	22,7	77,3	42	10	3	7	30	70
36	22	4	18	18,2	81,8	84	20	14	6	70	30
36	23	4	19	17,4	82,6	1	15	15	-	100	-
3	18	18	-	100	-	1	10	10	-	100	-
7	18	18	-	100	-	27	20	14	6	70	30
7	18	18	-	100	-	25	20	9	11	45	55
5	18	18	-	100	-	1	20	14	6	70	30
4	10	10	-	100	-	4	10	10	-	100	-
						18	30	20	10	66,7	33,3
						28	10	10	-	100	-
						121	24	-	24	-	100
						121	24	5	19	20,8	79,2
						84	22	4	18	18,2	81,8
						84	23	6	17	26,1	73,9
						96	13	1	12	7,7	92,3
						96	23	1	22	4,3	95,7
						107	23	4	19	17,4	82,6
						107	23	4	19	17,4	82,6
						107	23	-	23	-	100
						136	21	-	21	-	100
TOPLAM	380	225	155	59,21	40,79		577	262	315	45,41	54,59

N= Negatif, P=Pozitif

Tablo 2. Ticari broiler sürü ile ticari yumurtacı sürü arasında pozitif bakımından ilişki analizi

Yetiştirme Tipi	n	Pozitif	Negatif	Ki-Kare analizi p-değeri
Ticari Broiler	380	155	225	0.000
Ticari Yumurtacı	577	315	262	
Toplam	957	470	487	

Tablo 3. Ticari broiler sürü için yaşın artması ile pozitiflik oranının arttığına ilişkin test sonucu

Kruskal-Wallis testi	Serbestlik derecesi	Test istatistiği	p-value değeri
	8	5.67	0.685

Tablo 4. Ticari yumurtacı sürü için yaşın artması ile pozitiflik oranının arttığına ilişkin test sonucu

Kruskal-Wallis testi	Serbestlik derecesi	Test istatistiği	p-value değeri
	20	19.26	0.505

Tablo 5. İlk 14 gün için ticari broiler ve yumurtacı sürünün pozitiflik açısından farklılık analizi

Yetiştirme Tipi	n	Pozitif	Negatif	Ki-Kare analizi p-değeri
Ticari Broiler	172	2	170	0.014
Ticari Yumurtacı	90	6	84	
Toplam	254	8	262	

Tablo 6. İlk 28 gün için ticari broiler ve yumurtacı sürünün pozitiflik açısından farklılık analizi

Yetiştirme Tipi	n	Pozitif	Negatif	Ki-Kare analizi p-değeri
Ticari Broiler	200	2	198	0.026
Ticari Yumurtacı	190	9	181	
Toplam	390	11	379	

Tablo 7. İlk 36 gün için ticari broiler ve yumurtacı sürünün pozitiflik açısından farklılık analizi

Yetiştirme Tipi	n	Pozitif	Negatif	Ki-Kare analizi p-değeri
Ticari Broiler	180	153	27	0.985
Ticari Yumurtacı	328	279	49	
Toplam	508	432	76	

TARTIŞMA

Mikoplasma enfeksiyonları, tek başına veya miks enfeksiyonlar halinde, kanatlı endüstrisinde solunum yolu enfeksiyonlarının ve ağır ekonomik kayıpların başlıca nedenlerinden biridir (6,25). Dünya genelinde kanatlı endüstrisi patojenleri içerisinde yer alan *Mycoplasma* türlerinden *M. synoviae* klinik ve ekonomik açıdan değerlendirildiğinde ikinci önemli türdür(1). Kanatlı endüstrisinde bu enfeksiyonun ekonomik boyutunun önemi açısından erken tespiti, kanatlı yetiştiricileri yönüyle ciddi ihtiyaçtır. Sektörün karlılık düzeyini en üst seviyeye çıkarabilmek için enfekte sürülerin, ari sürülere enfeksiyonu bulaştırmasının önüne geçilmesi önemlidir. Bu amaçla, enfeksiyon kontrol programlarının başarısı ve enfeksiyonun yayılmasını önlemenin gereği, enfekte sürülerin doğru ve zamanında teşhis edilmesi ile mümkündür. *M. synoviae* için serolojik tarama, civcivlerin serumundaki çapraz reaksiyonlar ve spesifik olmayan reaktanlar nedeniyle enfeksiyonun kontrolünün yapılabilmesi ile ilgili geliştirilecek stratejiler açısından enfeksiyonun durumunun bilinmesi gereklidir. Dünya Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından primer tarama testleri olarak serolojik testler önerilmektedir (26).

Bu nedenle *M. synoviae*'nin saptanması için ELISA uygun olacaktır (19, 27-29). Ülkemizde Akan ve ark. (2008) serolojik ve moleküler olarak yaptıkları

bir çalışmada *M. synoviae* pozitiflik oranını %20.9 olarak bildirmişlerdir (30). Damızlık işletmelerde yapılan çalışmada 92 adet serumun %88'i ELISA ile *M. synoviae* yönünden pozitif bulunmuştur (31).

Ege Bölgesi'nde 2015 yılında yapılan çalışmada toplam 60 kümeste bulunan broiler (n=700) ve ticari yumurtacı (n=360) sürülerden alınan toplam 1060 kan serum örneğinde *M. synoviae* seropozitiflik yüzdeleri sırasıyla %62.2 ve %82.7 oranında bulunmuştur (32). Bizim çalışmamızda ise bu oran broilerlerde %40.79, ticari yumurtacılar da ise %54.59 oranında saptanmıştır. Özgür ve Türkyılmaz (2016)'ın yaptığı çalışmada kanatlılarda mikoplazma *M. synoviae* seropozitiflik oranının *M. gallisepticum*'a göre daha yüksek bulunduğu rapor edilmiştir (32). Yıllar ilerledikçe ülkemizde kanatlı sürülerinin *M. synoviae* seropozitiflik yüzdelerinin arttığı bu çalışmalarda gözlenmektedir. Amerika'nın Kaliforniya eyaletinde serum ve yumurta sarısı numunelerinden yapılan çalışmada *M. synoviae* prevalansı eyaletin güneyinde %91, merkezinde %32 olarak belirlenmiştir (33). Amerika'da 80'li yıllarda bu enfeksiyonun bölgesel olarak farklılık göstermekle birlikte yüksek prevalansta seyrettiği görülmektedir. Doğu İngiltere'deki ticari yumurtacı sürülerinde yapılan diğer araştırmada %78.6 gibi yüksek oranda yumurtalarda *M. synoviae* antikorlarının saptandığı bildirilmiştir (21). Feberwee ve ark. (2008), yapmış oldukları çalışmada da, çalışmamızda olduğu gibi

ticari yumurtacı sürülerdeki oranının (%73), broiler sürülerin (%6) seropozitifliğinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (34). Benzer şekilde, Atique ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada broilerlerde %11.19, yumurtacı sürüde ise %25 oranında seropozitifliğe rastlanmıştır (35). İspanya’da yapılan bir çalışmada enfeksiyonun seroprevalansı yumurtacı tavuklarda %95 ve etlik piliçlerde %74, Sırbistan’da 2009 yılında yapılan diğer bir çalışma da yetişkin sürülerde %90 ve yetiştirme döneminde %40 gibi yüksek oranlar bulunmuştur (23, 36). El-Ashram ve ark. (2021)’nin Mısır’da yaptığı çalışmada 3 farklı ırkta; 666 Ross, 95 Lohmann ve 239 yerli olmak üzere toplam 1000 serum örneğinde *M. synoviae* seropozitif oranlarının sırasıyla; %5.40, %27.36, %28.03 olduğu bildirilmiştir (37). Buim ve ark (2009)’nin yaptığı çalışmada ticari yumurtacılar da %69 (38), Suzuki ve ark. (2009)’nin yaptığı diğer bir çalışmada ise %53 oranında seroprevalans bildirilmiştir (39, 40). Aynı yıllarda broilerlerde yapılan araştırma da enfeksiyonun seroprevalansı %35 olduğu bulunmuştur (34). *M. synoviae* enfeksiyonlarının özellikle yumurtacı sürülerde bizim çalışmamızda olduğu gibi yüksek seropozitifliği, bu yetiştirme tipinde yaşam süresinin uzun olması ve kümeslerde yeterli olmayan biyogüvenlik önlemlerine bağlanabilir (12). Broilerlerde enfeksiyonun seroprevalansının yumurtacı sürülere göre düşük olması, yetiştirme periyodunun ilk günlerinde antibiyotiklerin sık kullanımı ve 40 günlük yaşlarda kesilme sevk edilmeleri açıklanabilir. Kanatlı sürülerinde bu enfeksiyonun yetiştirme tipine göre farklı seroprevalans oranına sahip olması; farklı örnekleme yaşları, muhtemelen *M. synoviae*’ya karşı aşılamanın yumurtalık damızlıklara göre broiler damızlık tavuklarda daha yaygın olarak kullanılmasından

kaynaklanabileceği bildirilmiştir (16). Çalışmamızda özellikle yetiştirmenin ilk 28 gün için ticari broiler sürü ile ticari yumurtacı sürü arasında seropozitiflik bakımından fark olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç olarak, Türkiye’de ticari kanatlı çiftliklerindeki *M. synoviae* enfeksiyonları mevcuttur. Bu enfeksiyonun yaygınlığının azaltılması için koruma stratejilerinin oluşturulması ve ekonomik kayıpların engellenmesi için seropozitiflikle ilgili çalışmalar yaygınlaştırılmalıdır.

M. synoviae’nın yüksek seropozitifliği, düzenli monitoring çalışmalarının enfeksiyonun kontrolü için gerekli olduğunu düşündürmektedir. Özellikle vertikal yolla bulaşan enfeksiyonların önüne geçmenin başlangıç noktası olan damızlık sürülerin ari olmasının önemi de oldukça büyüktür (41). Özellikle enfeksiyonun kontrolünde, antibiyotik tedavisinin geçici etkisi, direncin ortaya çıkması ve tüketim için yumurtalarda kalıntı kalma riski nedeniyle *M. synoviae* kontrolü için sürveyans ve aşılama gibi alternatif stratejiler düşünülmelidir (1). Aşı ile ilgili yapılmış bir çalışma da lokal saha izolatlarından hazırlanan *M. synoviae* rekombinant aşısının, membran ve tam hücre aşılmasına kıyasla aşılama ve ticari yumurtacılar da mikoplazma enfeksiyonuna karşı korunması için en iyi seçim olduğunu belirtmiştir (42). *M. synoviae*’nın kanatlı sağlığını tehdit ettiğine dair çalışmalar ve gözlemlerle farkındalık arttıkça ülkesel kontrol programları içerisine *M. synoviae*’nın da dahil edilmesi anlamlı olacaktır. Ticari ve damızlık kanatlı işletmelerinde pratik ve ekonomik uygulama olan mikoplazma monitoring programının oluşturulması, eradikasyon programı çerçevesinde katı biyogüvenlik önlemlerinin uygulanması yoluyla enfeksiyonun kontrolünün sağlanabileceği kanaatindeyiz.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 05.01.2022 ve Karar No: 2022/02).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Feberwee A, Morrow C J, Ghorashi S A, Noormohammadi AH, Landman W J. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. *Avian Pathol*, 2009; 38:333-40.
2. Lierz M, Hagen N, Harcourt-Brown N, Hernandez-Divers SJ, Lüscho D, Hafez HM. Prevalence of mycoplasmas in eggs from birds of prey using culture and a genus-specific mycoplasma polymerase chain reaction. *Avian Pathol*, 2007;36(2):145-50.
3. Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, et al. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Dis*, 2010;54(2):961-4.
4. Landman WJ. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathol*, 2014; 43(1):2-8.
5. Feberwee A, De Wit JJ, Landman WJ. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol*, 2009; 38(1):77-85.
6. Dufour-Gesbert F, Dheilley A, Marois C, Kempf I. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Vet Microbiol*, 2006;114(1-2):148-54.
7. Moreira FA, Cardoso L, Coelho AC. Decreased production in broiler breeders due to tendon rupture by *Mycoplasma synoviae*. *J Hell Vet Med*, 2014;65(2):109-14.
8. Xue J, Xu MY, Ma ZJ, Zhao J, Jin N, Zhang GZ. Serological investigation of *Mycoplasma synoviae* infection in China from 2010 to 2015. *Poult Sci*, 2017; 96(9):3109-12.
9. Ferguson-Noel N, Armour NK, Noormohammadi AH, El-Gazzar M, Bradbury JM. Mycoplasmosis. *Dis Poult*, 2020;13:907-65.
10. Marois C, Oufour-Gesbert F, Kempf I. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 2000; 11;73(4):311-8.
11. Ewing ML, Cookson KC, Phillips RA, Turner KR, Kleven SH. Experimental infection and transmissibility of *Mycoplasma synoviae* with delayed serologic response in chickens. *Avian Dis*, 1998;1:230-8.

12. Kleven SH (2003) *Mycoplasma synoviae*. In: Saif YM (ed) Diseases of poultry, 11th edn. Iowa State University Press, 2003, pp 756-65.
13. Nascimento ER, Pereira VL, Nascimento MG, Barreto ML. Avian mycoplasmosis update. Braz J Poult Sci, 2005 ;7(1):1-9.
14. Sun S, Lin X, Liu J, Tian Z, Chen F, Cao Y, et al. Phylogenetic and pathogenic analysis of *Mycoplasma synoviae* isolated from native chicken breeds in China. BMC Genom. 2017 ;96(7):2057-63.
15. Alam J, Muhammad F, Siddiqui MU, Khan SA, Rehmani S, Ahmad A. Dot-ELISA for Newcastle disease, infectious Bursal disease and mycoplasmosis. Pak J Zool, 2012; 44(5): 1301-5.
16. Ghadimipour R, Gharibi D, Mayahi M. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* among commercial poultry in Khuzestan province, Iran. Arch Razi Inst, 2018; 73:139-46.
17. Ewing ML, Lauerman LH, Kleven SH, Brown MB. Evaluation of diagnostic procedures to detect *Mycoplasma synoviae* in commercial multiplier-breeder farms and commercial hatcheries in Florida. Avian Dis, 1996;1:798-806.
18. Gole VC, Chousalkar KK, Roberts JR. Prevalence of antibodies to *Mycoplasma synoviae* in laying hens and possible effects on egg shell quality. Prev Vet Med, 2012;106:75-8.
19. Luciano RL, Cardoso AL, Stoppa GF, Kanashiro AM, De Castro AG, Tessari EN. Comparative study of serological tests for *Mycoplasma synoviae* diagnosis in commercial poultry breeders. Vet Med Int, 2011;3;2011.
20. Ferguson-Noel SHKaN. *Mycoplasma synoviae* infection. In: Disease of Poultry (Chinese Version). Edited by Saif.Y.M, 12th ed. Beijing: Blackwell Publishing 2008; 999-1014.
21. Hagan JC, Ashton N J, Bradbury JM, Morgan K L. Evaluation of an egg yolk enzyme-linked immunosorbent assay antibody test and its use to assess the prevalence of *Mycoplasma synoviae* in UK laying hens. Avian Pathol, 2004;33:93-7.
22. Catania S, Gobbo F, Bilato D, Gagliazzo L, Moronato ML, Terregino C, et al. Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. Vet Microbiol, 2016;193:60-6.
23. Cortés V, Sevilla-Navarro S, García C, Tudón A, Marín C, Catalá-Gregori P. Seroprevalence and prevalence of *Mycoplasma synoviae* in laying hens and broiler breeders in Spain. Poult Sci, 2021;100(3):100911.
24. Fiorentin L, Soncini RA, da Costa JL, Mores MA, Trevisol IM, Toda M, et al. Apparent eradication of *Mycoplasma synoviae* in broiler breeders subjected to intensive antibiotic treatment directed to control *Escherichia coli*. Avian Pathol, 2003;32(2):213-6.
25. Cobb SP. The spread of pathogens through trade in poultry hatching eggs: overview and recent developments. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 2011;30(1): 165-75.
26. OIE, Animal Health World Organization, "Avian mycoplasmosis," in Manuel of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, chapter 2.3.5, pp 482-496, 2008.
27. Rasool A, Anjum AA, Rabbani M, Lateef M, Nawaz M, Akhtar F, et al. Preparation of *Mycoplasma synoviae* antigens and evaluation by rapid slide agglutination and enzyme linked immunosorbent assay. J Anim Plant Sci, 2017; 1;27(3).
28. Haghghi-Khoshkhoo P, Akbariazad G, Roohi M, Inanlo J, Masoumi M, Sami-Yousefi P. Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in the commercial layer flocks of the centernorth of Iran. Afr J Microbiol Res, 2011; 5(18): 2834-7.
29. Nassik S, Aboukhalid R, Azzam F, Rahmatallah N, Lahlou-Amine I, Fassi-Fihri O, et al. Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of morocco using serological assays and real time PCR. J Life Sci, 2014;8: 815-21.
30. Akan M. Tavuklarda mikoplazma infeksiyonları: koruma ve kontrol. Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara, 2008; 6: 21-4.

31. Dakman A, Günaydın E, Türkyılmaz MA, Güleç M, Coşar M, Özdemir Ü. Damızlık tavuk işletmelerinde tespit edilen mikoplazma enfeksiyonları. J Etlik Vet Microbiol, 2009;20:27-34.
32. Özgün MR, Türkyılmaz S. The Determination of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antibodies in poultry blood sera with ELISA. Kocatepe Vet J, 2016;9(1):19-23.
33. Mohammed HO, Carpenter TE, Yamamoto R, McMartin DA. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layers in southern and central California. Avian Dis, 1986; 30: 519-26.
34. Feberwee A, de Vries TS, Landman WJ. Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. Avian Pathol, 2008;37(6):629-33.
35. Atique MA, Abbas F, Awan MA, Tariq MM, Ahmed Z, Ali I, et al. Identification of avian *Mycoplasma* species in commercial broilers and layers with respiratory symptoms in Balochistan. Afr J Biotechnol, 2012;11(100):16557-9.
36. Kapetanov M, Orlic D, Potkonjak DU, Velhner MA, Stojanov I, Milanov DU, et al. *Mycoplasma* in poultry flocks in the year 2009 compared to the year 2000 and significance of the control measures. Lucrari Sci Med Vet, 2010; 43:249-53.
37. El-Ashram S, Hashad ME, Abdel-Alim GA, Abdelhamid T, N. Deif H. Seroprevalence of mycoplasmosis in broiler, layer, and native chickens in Giza, Egypt. PLoS One, 2021; 16(7):e0254220.
38. Buim MR, Mettifogo E, Timenetsky J, Kleven S, Ferreira AJ. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. Pesq Vet Bras, 2009;29:552-6.
39. Suzuki, K., J. Origlia, F. Alvaez, M. Faccioli, M. Silva, J. Caballero, et al. Relative risk estimation for *Mycoplasma synoviae* in backyard chickens in Paraguay. Int J Poult Sci, 2009; 8:842-7.
40. Stipkovits L, Kempf I. Mycoplasmoses in poultry. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 1996;15(4):1495-525.
41. Eissa S. Preparation and evaluation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* recombinant vaccine. Zagazig Vet J, 2019;47(1):1-10.

Seropositivity of HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV and Anti-HIV in patients admitted to Siirt Training and Research Hospital

Siirt Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran hastalarda HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV ve Anti-HIV seropozitifliği

Ömer ACER¹ (ID), Osman ÖZÜDOĞRU² (ID),

ABSTRACT

Objective: Viral hepatitis infections, including hepatitis B and C, and HIV represent an important public health problem worldwide. In this study, we aimed to investigate the seropositivity of HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV, and Anti-HIV in patients who applied to our hospital between 2019 and 2021.

Methods: In this study, the frequency of HBsAg, Anti-HBs, total Anti-HCV and anti-HIV in patients admitted to our hospital between January-2019-January 2021 was evaluated retrospectively.

Results: HBsAg positivity was determined as 3.28% in a total of 52420 patients. HBsAg positivity was found to be 4.12% (95%CI: 3.9-4.3) in males, whereas 2.67% (95%CI 2.56-2.78) in females. There was a statistically significant relationship between HBsAg positivity and gender and age ($p<0.001$). Anti-HBs level of 54.9% of the patients (95%CI: 44.6-45.6) was found to be sufficient for immunity (Anti-HBs >10 mIU / ml). While this rate was found to be 61.04% (95%CI: 60.5-61.5) in males, it was found to be 50.37% (95%CI: 50-50.7) in females. A significant relationship was found between Anti-HBs positivity and gender and age ($p<0.001$). General Anti-HCV positivity

ÖZET

Amaç: Hepatit B ve C dahil viral hepatit enfeksiyonları ve HIV, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Bu çalışmada 2019 ile 2021 tarihleri arasında hastanemize başvuran hastalarda HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV ve Anti-HIV seropozitifliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada 2019 ile 2021 tarihleri arasında hastanemize başvuran hastalarda HBsAg, Anti-HBs total, Anti-HCV ve anti-HIV frekansı retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Toplam 52420 hastada HBsAg pozitifliği %3,3 olarak belirlendi. Erkeklerde HBsAg pozitiflik oranı %4,2 (%95GA: 3,9-4,3), kadınlarda ise %2,67 (%95GA: 2,56-2,78) olarak bulundu. HBsAg pozitifliği ile cinsiyet ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,001$). Hastaların %54,9'unun (%95GA: 44,6-45,6) Anti-HBs düzeyi bağışıklık için yeterli bulundu (Anti-HBs >10 mIU/ml). Erkeklerde bu oran %61,04 (%95GA: 60,5-61,5) iken kadınlarda %50,37 (%95GA:50-50,7) olarak bulunmuştur. Anti-HBs pozitifliği ile cinsiyet ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,001$). Genel Anti-

²Siirt University, Medical Faculty, Department of Medical Microbiology, Siirt
¹Siirt University, Medical Faculty, Department of Internal Medicine, Siirt



İletişim / Corresponding Author : Ömer ACER
Siirt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Siirt - Türkiye
E-posta / E-mail : omer.acer@siirt.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 21.06.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 19.12.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.89804

Özüdoğru O, Acer Ö. Seropositivity of HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV and Anti-HIV in patients admitted to Siirt Training and Research Hospital
Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 666 - 673

was found as 0.11% (95%CI: 0.09-1.01). There was significant relationship between age groups for anti-HCV positivity ($p<0.001$), whereas the relationship for gender was not significant ($p=0.934$). There was no statistically significant relationship between anti-HIV positivity and age ($p=0.307$) and gender ($p=0.999$). Anti-HIV positivity was determined as 0.3% (95%CI: 0.01-1.05).

Conclusion: As a result, viral hepatitis is an important health problem around the world and for our city. Vaccination, infection control programs, and public education can reduce the risk of new infections. Anti-HIV positivity was found to be very low in our city.

Key Words: Hepatitis, Anti-HBs, Anti-HCV, Anti-HIV, seropositivity

HCV pozitifliği %0,1 (%95GA: 0,09-1,01) olarak bulundu. Anti-HCV pozitifliği için yaş grupları arasında anlamlı ilişki varken ($p<0,001$), cinsiyete göre ilişki anlamlı değildi ($p=0,934$). Anti HIV pozitifliği ile yaş ($p=0,307$) ve cinsiyet ($p=0,999$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Anti-HIV pozitifliği %0,24 (%95GA: 0,01-1,05) olarak tespit edildi.

Sonuç: Sonuç olarak viral hepatit dünya çapında ve şehrimiz için önemli bir sağlık sorunudur. Aşılama, enfeksiyon kontrol programları ve halk eğitimi yeni enfeksiyon riskini azaltabilir. İlimizde anti-HIV pozitifliği çok düşük bulundu.

Anahtar Kelimeler: Hepatit, Anti-HBs, Anti-HCV, Anti-HIV, Seropozitiflik

INTRODUCTION

Hepatitis B and C and HIV infections represent an important public health problem worldwide and affect more people than Human Immunodeficiency Virus (HIV) (1,2). It is an inflammatory disease of the liver that negatively affects both direct and indirect health costs in both developed and developing countries (3). Hepatitis may or may not be contagious and is the most common of the infectious forms of viral diseases (4). It is the leading cause of disability and death and represents the seventh leading cause of death worldwide (5). Five types of viruses, A, B, C, D, and E, cause viral hepatitis, of which only B and C can occur acutely or chronically and can lead to chronic hepatitis (6).

Hepatitis infections are common diseases worldwide, and an estimated 2 billion people have been infected with hepatitis B (HBV) and 170 million people with hepatitis C (HCV) (7). Hepatitis B is the most common form of viral hepatitis, and around 57 million people worldwide are infected with hepatitis B virus (HBV) (8). It is more common in the Middle

East than in America, the prevalence range is 0.6% in Europe and Iraq and over 8% in Sudan (9). The number of individuals infected with HBV in the Eastern Mediterranean Region is more than 21 million (3.3% of the population). Besides, it has been suggested that the HBV prevalence rate in the general population may be higher than in blood donors (10). Hepatitis C affects about 3% of the world's population; however, it has a high prevalence of around 10% in developing countries of Africa, Asia, and South America. Also, Egypt has a high prevalence of 20% due to iatrogenic contamination (6).

In addition to the losses caused by the fulminant course in acute viral hepatitis, chronic liver disease, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma that develop after HBV and HCV infections are important complications affecting human life and the high cost of both treatment and follow-up makes it important to prevent these diseases. The most effective method for protection from HBV infections today is vaccination. Vaccination is not yet possible in HCV infection (11).

According to December 2005 data of the World Health Organization, an average of 40.3 (36.7-45.3) million people in the world have been infected with the human immunodeficiency virus. The prevalence of HIV infection in adults in the world is 1.1%, and it is between 7.5-8.8% in Sub-Saharan Africa. In our country, according to the working yearbook of the Ministry of Health, 31 January 2019, a total of 19748 HIV-positive cases have been reported since 1985.

Although living standards have increased, vaccination programs have become widespread, social awareness has increased, and sufficient awareness has been established, HBV, HCV, and HIV infections still maintain their importance today (12). In addition to the low sociocultural level in our region, it is necessary to know and apply protection methods, especially from viral hepatitis, due to insufficient infrastructure and poor compliance with hygiene rules.

Numerous studies have been published on the prevalence of HBV and HCV in our country. Most of the studies have been done on blood donors. In this study, we aimed to determine the seroprevalence of HBs Ag, Anti-HBs, Anti-HCV, and anti-HIV in patients of various age groups who applied to our hospital.

MATERIAL and METHOD

In our study, we retrospectively evaluated the seroprevalence of HBs Ag, Anti-HBs, Anti-HBc total, Anti-HCV, and anti-HIV in patients of various age groups who applied to the clinics of Siirt Training and Research Hospital between January-2019-January 2021. Hepatitis markers (HBsAg, Anti-HBs, Anti-HBc Total, and Anti-HCV) were studied with the commercial chemiluminescent enzyme immunoassay technique (Architect i1000SR, Abbott, USA). Blood with Anti-HCV and Anti-HIV seropositivity was detected for the first time in our laboratory and with the same positive result in repeated screening results were considered suspicious for HCV and HIV infections. For verification, new blood samples are taken and sent

to Ankara Refik Saydam Hygiene Institute through the Provincial Health Directorate.

SPSS statistics package program (IBM SPSS Version 22.0) was used to evaluate the data. Data were presented as mean and standard deviation for groups. Chi-square test was used to determine the relationship between categorical variables (sex/age groups in terms of positivity). Independent groups t-test was used to compare a numerical measure with a two-group categorical variable (mean age by gender).

This study was approved by the Siirt University Non-Interventional Clinical Research Ethics Committee and the Republic of Turkey Ministry of Health. (Date: 22.01.2021 and Decision Number: 2021/01.03)

RESULTS

In this study, HBsAg positivity, Anti-HBs, Anti-HCV and Anti-HIV positivity were investigated in 52420, 49791, 49196 and 37660 patients, respectively. In more than one result, the most recent result was obtained.

When the general distribution of the patients was examined, it was found that 41.9% of the 52420 patients with HBsAg results were male and 58.1% were female, while the overall HBsAg positivity was 3.28% (95%CI: 2.5-4.1). When we evaluated according to gender, HBsAg positivity rate was found to be 4.12% (CI: 3.9-4.3) in males, whereas 2.67% (95%CI %: 2.56-2.78) in females. When evaluated according to age groups, the highest positivity rate was found in the 46-60 age group. In this age group, the positivity rate was found to be 8.43% (173/2066) (Table 1). There was a statistically significant relationship between HbsAg positivity and gender and age ($p < 0.001$). Age shows a normal distribution. The mean age of the positive patients has been found as 38.2 ± 15.23 years.

In our study, to evaluate the results of Anti-HBs, the results of 49791 patients, including 21167 males (42.5%) and 28624 females (57.5%), were included in the study. Results are given in Table 2. Anti-HBs level

of 54.9% of the patients (95%CI: 44.6-45.6) was found to be sufficient for immunity (Anti-HBs> 10 mIU / ml). While this rate was found to be 61.04% (95%CI: 60.5-61.5) in males, it was found to be 50.37% (95%CI: 50-50.7) in females. A significant relationship was found

between Anti-HBs positivity and gender and age ($p<0.001$). Anti-HBs positivity was found to be higher in men (61.04%) and in the 16-30 age group (61.40%). The mean age of the seropositive has been found as 27.5 ± 15.60 years.

Table 1. Distribution of HBsAg positivity by age and gender

Variable	Group	Total (n)	Prevalence (%)	95%CI	OR (OR CI)	X ²	p
Gender	Male	21947	4.12	(3.92-4.32)	1.57 (1.42-1.73)	84.794	$p<0.001^*$
	Female	30473	2.67	(2.56-2.78)	1		
	Total	52420	3.28	(2.47-4.13)			
Age	0-15	6785	0.34	(0.21-0.47)	0.07 (0.04-0.119)		$p<0.001^*$
	16-30	27236	2.36	(2.24-2.48)	0.50 (0.42-0.59)		
	31-45	10935	5.08	(4.72-5.44)	1.10 (0.92-1.31)		
	46-60	3938	8.43	(7.60-9.269)	1.89 (1.56-2.29)		
	60 >	3526	4.65	(3.98-5.32)	1		
	Total	52420	3.28	(2.47-4.13)			

* $p<0.05$: significant relationship, $p>0.05$: no significant relationship, X²: Chi-square test

Table 2. Distribution of Anti HBs positivity by age and gender

Variable	Group	Total (n)	Prevalence (%)	95%CI	OR (OR CI)	X ²	p
Gender	Male	21167	61.04	(60.54-61.54)	1	559,698	$p<0.001^*$
	Female	28624	50.37	(49,99-50.75)	0.65 (0.62-0.67)		
	Total	49791	54.9	(44.62-45.58)			
Age	0-15	6909	61.20	(59,97-62,11)	1.16 (1.06-1.27)		$p<0.001^*$
	16-30	26689	61.40	(60.64-61.44)	1.17 (1.08-1.27)		
	31-45	10149	35.68	(34.85-36.51)	0.41 (0.38-0.45)		
	46-60	3258	45.98	(44.33-47.639)	0.63 (0.57-0.70)		
	60 >	2777	57.54	(55.76-59.32)	1		
	Total	49791	54.9	(44.62-45.58)			

* $p<0.05$: significant relationship, $p>0.05$: no significant relationship, X²: Chi-square test

In the present study, the Anti-HCV results of 49196 patients, including 20620 men (41.9%) and 28576 women (58.1%), were evaluated. General Anti-HCV

positivity was found as 0.11% (95%CI: 0.09-1.01). When evaluated according to gender, Anti-HCV positivity was found to be 0.1% in both males (21/20620) and females

(31/28576) (Table 3). There was significant relationship between age groups for Anti-HCV positivity ($p < 0.001$), whereas the relationship for gender was not significant ($p: 0.934$). Anti-HCV positivity was found to be higher in the over 60 group (0.44%) (95%CI: 0.23-0.65). The mean age of the positive patients has been found as 51.8 ± 19.63 years.

In addition, in our study, the Anti-HIV results of 37660 patients, 15101 males (40.1%) and 22559

females (59.9%), were evaluated. While general Anti-HIV positivity was determined as 0.03% (95%CI: 0.01-1.05), when evaluated by gender, Anti-HIV positivity was found to be 0.03% both in males (95%CI: 0.01-0.05), and females (95%CI: 0.02-0.04) (Table 4). There was no statistically significant relationship between Anti-HIV positivity and age ($p: 0.307$) and gender ($p: 0.999$). The mean age of the positive patients has been found as 41.6 ± 22.32 years.

Table 3. Distribution of Anti-HCV positivity by age and gender

Variable	Group	Total (n)	Prevalence (%)	95%CI	OR (OR CI)	X ²	p
Gender	Male	20620	0.10	(0.07-0.13)	1	0.007	0.934
	Female	28576	0.11	(0.09-0.13)	1.07 (0.61-1.85)		
	Total	49196	0.11	(0.09-1.01)			
Age	0-15	4782	0	(0-0)	(0-0)	4.055	p<0.001*
	16-30	26959	0.04	(0.02-0.06)	0.10 (0.05-0.21)		
	31-45	10411	0.10	(0.05-0.15)	0.22 (0.10-0.48)		
	46-60	3652	0.41	(0.30-0.52)	0.93 (0.45-1.90)		
	60 >	3392	0.44	(0.23-0.65)	1		
	Total	49196	0.11	(0.09-1.01)			

* $p < 0.05$: significant relationship, $p > 0.05$: no significant relationship, X²: Chi-square test

Table 4. Distribution of Anti-HIV positivity by age and gender

Variable	Group	Total (n)	Prevalence (%)	95%CI	OR (OR CI)	X ²	p
Gender	Male	15101	0.03	(0.01-0.05)	0.98 (0,28-3,49)	0,001	0.999
	Female	22559	0.03	(0.02-0.04)	1		
	Total	37660	0.03	(0.01-1.05)			
Age	0-15	1983	0	(0-0)	(0-0)	4.055	0.307
	16-30	21996	0.02	(0.01-0.04)	0.24 (0.04-1.33)		
	31-45	8356	0.04	(0.01-0.08)	0.48 (0.08-2.899)		
	46-60	2638	0.04	(0.03-0.11)	0.51 (0.05-5.62)		
	60 >	2687	0.07	(0.03-0.17)	1		
	Total	37660	0.03	(0.09-1.05)			

* $p < 0.05$: significant relationship, $p > 0.05$: no significant relationship, X²: Chi-square test

DISCUSSION

Although viral hepatitis has been known for centuries, it is an important public health problem both in the world and in our country due to its high morbidity and mortality and major economic losses (13). Despite the increase in living standards, widespread vaccination programs increased social awareness, and sufficient awareness, HBV, HCV, and HIV infections still maintain their importance today (13,14).

Even though the global incidence of HBsAg has been declining due to successful vaccination programs, Chronic hepatitis (CHB) remains the leading cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC)-related deaths. It is predicted that 887.000 people die each year (15). In Turkey, about 2% of the population is thought to be HBsAg positive, and complication of HBV infection is known to cause 40-50% of liver transplantations between 2012 and 2016 (16,17).

In recent years, several significant epidemiological studies covering the whole of our country have been conducted. The Association of Turkish Liver Surveys (TKAD) reached 5471 people over the age of 18 in a study performed between 2008 and 2011. It was reported that HBsAg positivity was 4%, anti-HBc total positivity was 30.6% and Anti-HBs positivity was 32%. The study reported that HBsAg positivity was lower in western areas while significantly higher in Central Anatolia, Eastern Anatolia, and Southeastern Anatolia. In this work, HBsAg positivity was found as 3.28% and anti-HBs was found as 54.9%. HBsAg seroprevalence varies between 3.9 and 12.5 percent in our country according to the regions, and the anti-HBs seroprevalence varies between 20.6 and 52.3 percent (13). According to other epidemiological studies, the highest rate of HBsAg positivity in our country is in the Southeast region with 4.1 percent and the lowest rate is in the Black Sea region with 1.7 percent (13,18). In the previous studies in our country, Çetinkol et al. (14), Kalaycı et al. (19), Demirpençe et al. (20), Pehlivanoğlu et al. (21), Eratilla et al. (13), Yalçın and Kaya (22) and Yıldız-

Kaya and Kaya (15) reported HBsAg positivity as 4.6%, 1.9%, 12.6%, 3.27%, 11,32%, 2,08% and 1.9%. respectively. In our study, HBsAg positivity was found to be 3.28% between 2019-2021.

When we evaluate previous studies regarding anti-HBs, Eratilla et al. (13) reported anti-HBs positivity as 44.7%. In another recent study, Yıldız-Kaya and Kaya (15) have reported anti-HBs positivity as 54.2%. we found anti-HBs positivity as 54.9%.

In a study in Siirt investigating HBsAg and Anti-HBs seropositivity between 2008-2009 (23), HBsAg seropositivity was reported as 10% in 10630 exemplars and Anti-HBs seropositivity was reported as 48% in 5659 exemplars. In our study, HBsAg and Anti-HBs seropositivity between 2019-2021 was investigated. We found HBsAg seropositivity as 3.28% in 52420 exemplars and Anti-HBs seropositivity as 54.9% in 49791 exemplars. In our country, Hepatitis B vaccine was included in the expanded vaccination program in 1998 and started to be applied free of charge. Between 2005 and 2009, Hepatitis B vaccination was carried out in primary and secondary education. In our study, the highest Anti-HBs positivity in the 0-15, 15-30 age groups may be due to the vaccination program. In addition, the high level of Anti-HBs in men may be due to Hepatitis B vaccination in military service in some periods and the obligatory Hepatitis B vaccination in some professions.

It is estimated that approximately 130 to 210 million people worldwide are chronically infected with HCV (22). In Northern Europe, where the assumed prevalence is the lowest, HCV prevalence is less than 1%. The countries of Asia and Africa are among those with a high prevalence. HCV hepatitis is less prevalent in Turkey than HBV hepatitis, but it may have a higher risk of chronicity. The prevalence of hepatitis C has been reported between 0.4 to 2.2% in our country (22,24,25). In studies conducted in our country, the prevalence of hepatitis C in the Diyarbakır region was 0.93%, in the Batman region 0.72%, in the Aksaray region as 0.6%, in the Van region 0.8% and in the Şanlıurfa region 2.6% and (13,20,22,26,27). In a study

in Siirt investigating Anti-HCV seropositivity between 2008-2009 (23), Anti-HCV seropositivity was reported as 0.6% in 7711 exemplars. In our study, we found Anti-HCV seropositivity as 0.11% in 49196 exemplars. In the present study, Anti-HIV positivity was determined as 0.03% in 15101 exemplars. In previous studies carried out in our country, Çetinkol (14) found Anti-HIV positivity as 0.009%, Demirpençe et al. (20) as 0.015%, and Eratilla et al. (13) as 0.0005%. Seroprevalence values for HBV, HCV, and HIV determine in the present study are similar to those in our country.

Healthcare workers are the most important risk group for HBV. These include dentists, maxillofacial surgeons, nurses, dental technicians, laboratory workers, medicine, dentistry, and nursing students. The average risk of anyone getting HBV is 5.0%. However, this rate rises to 13-28% for dentists (28).

As a result, Hepatitis and HIV infection complications continue to be serious health problems around the world. Therefore, determining chronic carriers is still an important point in preventing

these diseases. Due to the complications that occur during hepatitis and HIV infections, the chronicity of cases requiring lifelong follow-up, and the financial dimension of cases requiring treatment, identification of infected individuals will contribute to the prevention, control, and treatment programs. Although our country is still in the middle endemicity region (2-10%) in terms of HBV, it is noteworthy that HBsAg seropositivity gradually decreases as a result of the national vaccination program. In the coming years, our country may be included among the countries in the low endemicity (<2%) region as a result of precautions, such as the public having more information about the disease, the implementation of effective vaccination programs and screenings performed before marriage or for different reasons. Therefore, we think that determining seroprevalences with new epidemiological studies, informing the society, and taking necessary precautions should be the main target.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Siirt University Non-Interventional Clinical Research Ethics Committee (Date: 22.01.2021 and Number: 2021/01.03).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Ott J, Stevens G, Groeger J, Wiersma S. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine*, 2012;30:2212-9.
2. Çoban M, Sertoğlu E. Beytepe Asker Hastanesine Başvuran Hastalarda HBs Ag, Anti-HBs, Anti-HBc Total ve Anti-HCV Seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg*, 2013;19:152-5.

3. Udompap P, Kim D, Kim WR. Current and future burden of chronic nonmalignant liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2015;13:2031-41.
4. World Health Organization. What is hepatitis? Geneva (CH): World Health Organization, 2016. Available at: <http://www.who.int/features/qa/76/en/>.
5. Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M, Fitzmaurice C, Vos T, Abubakar I, Abu-Raddad LJ, Assadi R, Bhala N, Cowie B. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 2016;388:1081-8.
6. Greenberger NJ. Current diagnosis treatment: gastroenterology, hepatology, endoscopy. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2012.
7. Pyrasopoulou A, Douma S, Vassiliadis T, Chatzimichailidou S, Triantafyllou A, Aslanidis S. Reactivation of chronic hepatitis B virus infection following rituximab administration for rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 2009;31:403-4.
8. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/global-hepatitis-report/en/>.
9. Habibzadeh F. Viral hepatitis in the Middle East. *Lancet*, 2014;384:1-2.
10. World Health Organization. New hepatitis data highlight need for urgent global response. Geneva (CH): World Health Organization; 2017. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/global-hepatitis-report/en/>.
11. Tekin A, Devci Ö. Seroprevalences of HBV, HCV, and HIV among healthcare workers in a state hospital. *Journal of Clinical & Experimental Investigations, Klinik ve Deneysel Arastirmalar Dergisi*, 2010;1.
12. Polat M, Ögüt S, Orhan H, Sucaklı M. Isparta ve Burdur'da çalışan hemşirelerin hepatit B virüs enfeksiyonu konusundaki bilgi, tutum ve davranışları. *Viral Hepatit Derg*, 2006;11:89-94.
13. Eratilla V, Doğan MS, Eratilla E. Seroprevalence of hepatitis and HIV in people admitted to Diyarbakir state hospital. *J Harran Univ Med Fac*, 2018;15.
14. Çetinkol Y. Kars Devlet Hastanesi'ne Başvuran Hastalarda HBsAg, Anti-HCV ve Anti-HIV Seroprevalansı. *Viral Hepat J*, 2012;18:76-80.
15. Kaya SY, Kaya A. Age Specific Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) and AntiHBs Seroprevalence among Patients Admitted to a State Hospital. *Viral Hepat J*, 2020;26:85-87.
16. Irmak H, Yardım N, Keklik K, Temel F. Türkiye Viral Hepatit Önleme ve Kontrol Programı 2018-2023. Sağlık Bakanlığı Yayın, 2019.
17. Nakil Sayıları - TTDIS Karar Destek Sistemi. Organ, Doku Nakli ve Diyaliz Hizmetleri Daire Başkanlığı. <https://organkds.saglik.gov.tr/KamuyaAcikRapor.aspx?q=ORGANNAKLI> (date of access: 11.03.2018).
18. Özdemir D, Kurt H. HBV Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi. *Viral Hepatit*, 2007;1:108-22.
19. Kalayci R, Balci H, Akdemir Y, Altındiş M. Halk Sağlığı Laboratuvarına Başvuran Portörlerde HBsAg Sıklığı. *Viral Hepat J*, 2012;18:57-9.
20. Demirpençe Ö, Tezcan SI, Değirmen E, Mert D, Gümüş A, Çelen MK. Batman Devlet Hastanesine başvuran kişilerde hepatit ve HIV serolojisinin sonuçları. *Viral Hepatit Derg*, 2012;18:6-10
21. Pehlivanoglu F, Yasar KK, Sengöz G. Seroprevalences of Hepatitis B and C in patients undergoing an operation. *Viral Hepatit Derg*, 2011;17.
22. Yalçın MS, Kaya F. Aksaray ilindeki HBsAg/HCV prevalansı, HCV'li hastaların demografik verileri ve yeni tedavilere ulaşım oranları. *Ortadoğu Tıp Derg*, 2019;11:524-8.
23. Tunc N, Eraydin H, Cetinkaya E, Oduncu MK, Toy S. Siirt Devlet Hastanesi'ne başvuran hastalarda HBsAg, anti-HBs, anti-HCV ve anti-HIV seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg*, 2011;17:7-11.
24. Bruggmann P, Berg T, Øvrehus A, Moreno C, Brandão Mello CE, Roudot-Thoraval F, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *J Viral Hepat*, 2014;21:5-33.
25. Çeldir M, Kara I, Coşkuner S, Keskin B, Küçüker M, Orer H, Ergönül O. Hepatitis C prevalence in Turkey: estimation through meta-analysis: İlayda Arjen Kara. *Eur J Public Health*, 2014;24:163-032.
26. Gültepe B, Dülger AC, Aytemiz E. Epidemiology of the hepatitis C infection in Van's region. *East J Med*, 2013;18:123.
27. Mıstık R. Türkiye'de viral hepatit epidemiyolojisi yayınların irdelenmesi. *Viral hepatit*, 2007;1:10-50.
28. Akca G. Diş Hekimliğinde Kan Yoluyla Bulaşan Viral İnfeksiyonlar ve Önemi. *Hastane İnfeksiyonları Derg*, 2008;12:5-10.

e-Sağlık okuryazarlığı ölçeği: 45 yaş üstü yetişkinlerde Türkçe geçerlik ve güvenilirlik çalışması

e-Health literacy scale: Turkish validity and reliability study for adults over 45

Ersin USKUN¹ (ID), Edanur DOĞAN¹ (ID), Özgür ÖNAL¹ (ID), Ahmet Nesimi KİŞİOĞLU¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Günümüzde sağlık bilgilerinin elektronik ortamlarda giderek artan paylaşımı, bireylerin sağlıklı ilgili bilgiye ulaşma ve karar alma süreçlerini, e-sağlık okuryazarlığı düzeyine göre değişen oranda etkiler hale gelmiştir. Bu çalışma, Norman ve Skinner'in "e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği"nin (e-Health Literacy) Türkçeye uyarlanması ve geçerlik ve güvenilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yöntem: Metodolojik tipteki bu çalışmada, ölçeğin dilsel eşdeğerlik çalışması ve kapsam geçerliği değerlendirilerek elde edilen Türkçe son hali 45 yaş üstü 400 kişiye uygulandı. Veriler SPSS (22.0) ile analiz edilmiştir. Doğrulayıcı faktör analizi AMOS (24.0) programı kullanılarak yapılmıştır. Kapsam geçerliği Davis tekniği kullanılarak ve Kapsam Geçerliği İndeksleri belirlenerek değerlendirilmiştir. Ölçeğin Türkçe versiyonunun psikometrik ve güvenilirlik analizleri yapılmıştır. Uzman görüşlerinin uyumu Kendall'ın Uyum Testi ile test edilmiştir. Yapı geçerliğini değerlendirmek için faktör analizi yapılmıştır. Faktör analizine uygunluğun değerlendirilmesinde Kaiser-Meyer-Olkin testi (KMO) ve Bartlett Küresellik Testi

ABSTRACT

Objective: Today, the increasing sharing of health information in electronic media has affected individuals' access to health-related information and decision-making processes in varying rates depending on the level of e-health literacy. This study was carried out to adapt Norman and Skinner's "e-Health Literacy Scale" (e-Health Literacy) into Turkish and to evaluate its validity and reliability.

Methods: In this methodological study, the final Turkish version of the scale, which was obtained by evaluating the linguistic equivalence study and content validity, was applied to 400 people over the age of 45. Data were analyzed with SPSS (22.0). Confirmatory factor analysis was performed by using the AMOS (24.0) program. Content validity was evaluated by using Davis technique and determining Content Validity Indices. Psychometric and reliability analyzes of the Turkish version of the scale were performed. The concordance of expert opinions was tested with Kendall's Test. Factor analysis was performed to evaluate the construct validity. Kaiser-Meyer-Olkin test (KMO) and Bartlett Sphericity Test were used to evaluate the suitability for

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD., Isparta



İletişim / Corresponding Author : Ersin USKUN

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Halk Sağlığı AD., Isparta - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 06.09.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 16.11.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.75608

Uskun E, Doğan E, Önal Ö, Kişioğlu AN. e-Sağlık okuryazarlığı ölçeği: 45 yaş üstü yetişkinlerde Türkçe geçerlik ve güvenilirlik çalışması
Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 674 - 689

kullanılmıştır. Açımlayıcı faktör analizi ile belirlenen modeller, doğrulayıcı faktör analizi ile incelenerek ve model uyum indeksleri kullanılarak son model oluşturulmuştur. En düşük ve en yüksek puan alan gruplar arası fark bağımsız gruplarda t testi kullanılarak analiz edilmiştir. Ölçüt geçerliğinin değerlendirilmesi amacıyla Yaşlılarda Teknoloji Kullanımı Ölçeği ile olan korelasyon Pearson korelasyon testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Analizlerde ölçeğin orijinalinde olduğu gibi, sekiz maddeden oluşan tek faktörlü yapı gösterdiği, maddelerin toplam varyansın %84,15'ini sağladığı tespit edilmiştir. Ölçeğin iç tutarlılık analizinde Cronbach alfa değerinin 0,97 olduğu ve yüksek bir güvenilirliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ölçüt geçerliği değerlendirmesinde, uyarlanan ölçeğin Yaşlıların Teknolojiye Yönelik Tutum Ölçeği ile orta düzeyde bir korelasyon gösterdiği görülmüştür ($r=0,497$; $p<0,001$). Ölçeğin her maddesi için en düşük ve en yüksek puan alan gruplar arasında anlamlı fark olduğu (tüm karşılaştırmalar için $p<0,001$), bu nedenle ölçek maddelerinin ölçmek istenen özelliği ayırt edici ve geçerli olduğu tespit edilmiştir. Ölçekte taban ve tavan etkisinin olmadığı görülmüştür.

Sonuç: e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği Türkçe versiyonu, 45 yaş üstü yetişkinlerde, e-sağlık okuryazarlığı düzeylerini belirlemek amacıyla geçerli ve güvenilir biçimde kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: e-Sağlık, e-Sağlık okuryazarlığı, geçerlik ve güvenilirlik

factor analysis. The models determined by exploratory factor analysis were examined with confirmatory factor analysis and the final model was created by using model fit indices. The difference between the lowest and highest scoring groups was analyzed using the t test in independent groups. In order to evaluate the criterion validity, the correlation with the Technology Use in the Elderly Scale was evaluated using the Pearson correlation test.

Results: In the analyzes, it was determined that the scale showed a single factor structure consisting of eight items, as in the original, and the items provided 84.15% of the total variance. In the internal consistency analysis of the scale, it was determined that the Cronbach's alpha value was 0.97 and it had a high reliability. In the evaluation of criterion validity, it was observed that the adapted scale showed a moderate correlation with the Attitudes towards Technology Scale of the Elderly ($r=0.497$; $p<0.001$). For each item of the scale, it was determined that there was a significant difference between the groups with the lowest and highest scores ($p<0.001$ for all comparisons), therefore, the items of the scale were distinctive and valid for the feature that was intended to be measured. It was observed that there was no floor and ceiling effect in the scale.

Conclusion: The Turkish version of the e-Health Literacy Scale can be used validly and reliably to determine e-health literacy levels in adults over the age of 45.

Key Words: e-Health, e-Health literacy, validity and reliability

GİRİŞ

Sağlık hizmetini kullananların en az o hizmeti sunanlar kadar sorumluluk sahibi olması gerektiği görüşü giderek yaygınlaşmaktadır. Bireylerin kendi sağlığının bilincinde olmaları istemi, bilgi edinme, bu bilgiyi ve kendi sorumluluğunda olanları anlama

ve karar verme konularına dahil olmalarını da beraberinde getirmektedir (1). Ottawa Sağlığı Geliştirme Bildirgesi'nde bireylerin sağlıklı seçimler yapabilmeleri ve bu konuda etkin olabilmelerinin tam sağlıklılık hali için gerekli olduğundan bahsedilmiştir (2). Ancak bunun için bireylerin kendi sağlık sorumluluklarını alabilecek yeterli ve gerekli

donanım ve beceriye sahip olması gerektiği açıktır (1). Yaşamı sürdürmede yeterli bilgi ve beceriye sahip olsa da bazen bireyler, sağlığın gereklerini anlama ve hayatlarına geçirmede zorluk yaşayabilir. Yaşamın içinde etkin biçimde yer alabilen birçok kişi, sağlık bilgisini bulma, anlama veya kullanmada zorlanabilir.

Sağlık okuryazarlığı tanımı günümüzde, sağlıkla ilgili bilgileri okuyup anlayabilme ve sağlık bilgilerine uygun davranışlarda bulunma, sağlık personeli ile iletişim kurabilme ve sağlık tavsiyelerine uyum gösterme gibi daha kapsamlı ve birbiriyle ilişkili yeterliliklerin birlikte kullanımını kapsayacak biçimde genişletilmiştir (3). Daha açık ve yaygın kullanılan haliyle sağlık okuryazarlığı, 'Kişilerin, sağlık kararı verirken gerekli temel sağlık bilgi ve hizmetlerini alma, bunları anlayabilme ve kullanabilme kapasitesine sahip olma derecesidir' (4, 5). Toplumdaki bireylerin sağlık okuryazarlığını geliştirmeden bu alandaki bilimsel gelişmelerin sağlık çıktılarına yansımaları ve iyileştirmesi yeterli düzeyde ol(a)mayacaktır (1).

Günümüzde sosyal medya kullanımının yaygınlaştığı ve bu kullanımın sağlık iletişimi alanında da artış gösterdiği söylenebilir. Sosyal ağlar sağlık alanında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Sağlık bilgilerinin elektronik ortamlarda paylaşımı, mesajın geniş kitlelere ve hızla yayılmasını ve etki oluşturmasını sağlamakta, böylece bireyler arası ilişkiler de bir şekilde etkilenmektedir (6).

Ülkemizde sosyal medya kullanımı diğer ülkelerde olduğu gibi giderek artış göstermektedir. İnternet; günümüzde pek çok konuda bilgi edinmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Bu nedenle sosyal medya ve internet okuryazarlığının önemi giderek artmaktadır.

İnternette sağlıkla ilgili bilgi arayan bireylerin büyük çoğunluğu sağlık ekibiyle iletişim kurarken ve sağlıkla ilgili yapılan açıklamaları anlamada internetin önemli bir etkisi olduğunu belirtmektedir (7). Bununla birlikte internette var olan bilginin her zaman doğru olmayabileceği, bireylerin yanlış, yanıltıcı ve düşük kaliteli bilgilere ulaşmasının da olası olduğu ve bunun yol açabileceği sonuçlara karşı dikkatli olunması gerektiği de bildirilmektedir (8, 9). Bilgi ve iletişim

teknolojilerinin tüm yönleriyle bireylerin ve hastaların sağlığının iyileştirilmesinde, sağlık hizmetlerine erişebilirliği artırmada, bireylere kaliteli, verimli ve etkili hizmet sunmada kullanılması e-sağlık olarak tanımlanmaktadır (10). e-sağlık okuryazarlığı konusunda bireylerin algı ve tutumları konusunda çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bunlara ek olarak, yaşlıların kapasite ve sınırlamaları internete ulaşım için kullanılan teknolojik ürünlerin tasarımında pek de fazla dikkate alınmamaktadır. Yetişkinlerin ve özellikle de yaşlıların interneti ve yeni teknolojileri ne ölçüde kullandıkları, bilgiye erişim özelinde sağlıkla ilgili bilgileri internet yoluyla edinme konusundaki beceri ve tutumları günümüzde araştırılması gereken önemli konular arasına girmiştir.

Ölçek uyarlama çalışmaları, başka dil ve kültürde geliştirilmiş bir ölçeğin farklı dillere ve kültürlere uyarlanması çalışmalarıdır. Ölçek uyarlaması yeni bir ölçek geliştirmekten daha hızlı ve ucuz olması, yeni test geliştirmek için gerekli teknik bilgi ve becerinin olmaması, orijinal test iyi bilindiğinde güvenlik hissini yeni teste göre daha yüksek olması ve farklı kültürlerde aynı durumu ölçüp karşılaştırmayı olanaklı kılması gibi sebeplerle tercih edilmektedir.

e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği (e-Health Literacy) bireylerin sağlıkla ilgili bilgi teknolojilerini kullanmadaki becerilerini ve e-Sağlık programları ve bireyler arasındaki etkileşimi belirlemeye yardımcı olmak üzere Norman ve Skinner tarafından 2006 yılında geliştirilmiştir (11). e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin, 2015 Yılında Coşkun ve Bebiş Tarafından adolesan yaş grubunda (12), 2017 Yılında ise Tamer Gencer tarafından 18-45 yaş grubunda Türkçe Geçerlik Güvenirlilik çalışmaları yapılmıştır (13). Ancak 45 yaş üstü yetişkinlerde ve yaşlı grup olan 65 yaş üstünde Türkçe geçerlik güvenirlilik çalışması bulunmamaktadır. Günümüzde, Covid-19 Pandemisi ile birlikte, (HES kodu kullanımı, aşı uygulamalarına başvuru randevu alma vb. uygulamalarla) Türkiye'de, orta ve ileri yaş grubundaki yetişkin bireyler, kendisini daha fazla e-sağlık uygulamalarını kullanmak zorunda hissetmektedirler. Ancak bu yaş grupları için, e-sağlık

okuryazarlığını tespit etmek üzere geliştirilmiş veya uyarlanmış bir ölçek bulunmamaktadır. Bu tür bir ölçeğin Türkçeye ve kültürümüze uyarlanması bu alanda yapılacak çalışmalarda ölçümü kolaylaştıracak ve uluslararası karşılaştırmayı mümkün hale getirecektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmanın amacı ve tipi

Bu çalışma, Norman ve Skinner'in "e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği"nin Türkçeye uyarlanması ve geçerlik ve güvenirliliğinin yapılması amacıyla gerçekleştirilmiş kesitsel ve metodolojik bir çalışmadır.

Evren, Örnek Örnekleme

Ölçeğin dilsel eşdeğerlik çalışması için, çok iyi veya mükemmel düzeyde İngilizce dil becerisine sahip 30 kişiye iki hafta ara ile Türkçe ve İngilizce ölçek soruları uygulanmıştır. Bunun için Süleyman Demirel Üniversitesi'nde görevli 30 akademisyene iki hafta ara ile online anket soruları gönderilerek yanıtlamaları istenmiştir.

Psikometrik analiz yapılan bu tip araştırmalarda ölçeğin örneklem büyüklüğünün tespit edilmesinde, ölçekteki madde sayısının 5 ila 10 katına kadar sayıda örnekleme yapılması ve bu sayının 200'ün altında olmaması önerilmektedir (14). e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği, iki değerlendirme sorusu ve sekiz maddeden oluştuğundan, verilerin güvenirliliğini de artırmak amacıyla, 45 yaş üstünde 400 kişiye yüz yüze görüşme yöntemiyle anket uygulanarak veri toplanmıştır.

Veri Toplama Formu

Veriler Mart-Nisan 2021 tarihleri arasında toplanmıştır. Araştırmanın verileri Sosyodemografik Veri Formu, e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği Türkçe versiyonu (Tablo 1) ve "Yaşlıların Teknolojiye Yönelik Tutum Ölçeği" kullanılarak toplanmıştır.

Sosyodemografik Veri Formu; bireylerin sosyodemografik özellikleri ile ilgili (yaş, cinsiyet, eğitim durumu, medeni durum, gelir algısı, internette

geçirilen süre, interneti sağlıkla ilgili bilgi edinmede kullanma) yedi sorudan oluşmaktadır. Araştırma grubunun sosyodemografik özelliklerinin dağılımı Tablo 2'de sunulmuştur.

e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği (e-Health Literacy); orijinali, bireylerin sağlık ile ilgili bilgi teknolojisini kullanmadaki becerilerini ve e-sağlık programları ve bireyler arasındaki uyumu belirlemek üzere Norman ve Skinner tarafından geliştirilmiştir (11). e-Sağlık, sağlık problemleri ile ilgili elektronik ortamda bulunan sağlık bilgilerini bulma, değerlendirme ve uygulama konusunda bireylerin becerilerini ölçmek için geliştirilmiş bu ölçek; iki'si internet kullanımını değerlendirmeyle ilgili, sekiz'i internet tutumunu ölçen maddelerden oluşmaktadır. Beşli likert tipi olan ölçeğe verilen cevaplar için "kesinlikle katılmıyorum" için 1 puandan, "kesinlikle katılıyorum" için 5 puana kadar puanlar verilmekte ve internet tutumunu ölçen sekiz maddenin puanları toplanarak değerlendirme yapılmaktadır. Ölçekten alınabilecek en düşük puan 8, en yüksek puan 40'tır. Alınan puanın yüksekliği e-sağlık okuryazarlığının yüksek düzeyde olduğu anlamında yorumlanmaktadır.

Yaşlıların Teknolojiye Yönelik Tutum Ölçeği; Rosen ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan "Medya ve Teknoloji Kullanım ve Tutum Ölçeği"dir (Media and Technology Usage and Attitudes Scale) ve 68 maddeden oluşmaktadır. Bu maddelerin 50'si medya ve teknoloji kullanım düzeylerini belirlemeye yönelik, 18'i ise tutumu belirlemeye yöneliktir (15). Ölçeğin Türkçeye uyarlaması Özgür tarafından 2016 yılında gerçekleştirilmiştir (16). Onsekiz maddeden oluşan "Medya ve Teknoloji Tutum Ölçeği" bölümü; 'Teknolojiye Yönelik Olumlu Tutumlar', 'Teknolojiye Bağımlılık Veya Teknolojiye Sahip Olmamanın Yarattığı Kaygı', 'Teknolojiye Yönelik Olumsuz Tutumlar' ve 'İş Değiştirme İçin Tercih' olmak üzere dört alt boyuttan oluşmaktadır. Kalınkara ve Sarı tarafından tutum ölçeği yaşlılara uyarlanmış ve yaşlılara uygun olmadığı gerekçesi ile alt boyutlardan dördüncüsü olan 'İş Değiştirme İçin Tercih' alt boyutu ölçekten çıkarılarak, Yaşlıların Teknolojiye Yönelik Tutum

Ölçeği olarak üç alt boyut ve 12 madde üzerinden uyarlama çalışması yapılmıştır (17). Bu üç alt boyutun toplamı yaşlılar için teknolojiye yönelik tutum puanını oluşturmaktadır. Ölçekten alınabilecek en düşük puan

12, en yüksek puan 60'dır. Ölçeğin alt boyutları için Cronbach alfa (α) değerleri 0,76 ile 0,79 arasında dağıldığı bildirilmiştir (17).

Tablo 1. e-Sağlık okuryazarlığı ölçeği Türkçe versiyonu

İnternet Kullanımı ile İlgili Maddeler (Bu maddeler puanlamada kullanılmamaktadır)					
*- Sağlığınız hakkında karar vermenize, internetin yardımının ne kadar yararlı olduğunu düşünüyorsunuz?					
<input type="radio"/> Hiç yararlı değil <input type="radio"/> Yararlı değil <input type="radio"/> Kararsızım <input type="radio"/> Yararlı <input type="radio"/> Çok yararlı					
*- İnternetteki sağlık kaynaklarına erişebilmeniz sizin için ne kadar önemli?					
<input type="radio"/> Hiç önemli değil <input type="radio"/> Önemli değil <input type="radio"/> Kararsızım <input type="radio"/> Önemli <input type="radio"/> Çok önemli					
İnternet Tutumu ile İlgili Maddeler					
Maddeler	1= Kesinlikle katılmıyorum 2= Katılmıyorum 3= Kararsızım 4= Katılıyorum 5= Kesinlikle katılıyorum				
	1	2	3	4	5
1- İnternette hangi sağlık kaynaklarının ulaşılabilir olduğunu biliyorum.					
2- İnternetteki yararlı sağlık kaynaklarını nerede bulacağımı biliyorum.					
3- İnternetteki yararlı sağlık kaynaklarını nasıl bulacağımı biliyorum.					
4- Sağlıkla ilgili sorularına yanıt bulmak için interneti nasıl kullanacağımı biliyorum.					
5- İnternette bana yardımcı olması için bulduğum sağlık bilgilerini nasıl kullanacağımı biliyorum.					
6-İnternette bulduğum sağlık kaynaklarını değerlendirebilecek beceriye sahibim.					
7- İnternetteki yüksek kaliteli sağlık kaynaklarını düşük kaliteli sağlık kaynaklarından ayırt edebilirim.					
8- Sağlıkla ilgili kararlar verirken internetteki bilgileri kullanma konusunda kendime güveniyorum.					

Tablo 2. Araştırma grubunun tanımlayıcı özelliklerinin dağılımı

Özellikler	Sayı	Yüzde (%)
Yaş		
45-64	279	69,8
65 yaş ve üstü	121	30,3
Cinsiyet		
Erkek	247	61,8
Kadın	153	38,3
Eğitim durumu		
İlköğretim ve altı	154	38,5
Lise ve üstü	246	61,5
Medeni durum		
Evli	337	84,3
Bekar	63	15,7
Gelir algısı		
İyi-Çok iyi	134	33,5
Orta	247	61,8
Kötü-Çok kötü	19	4,7
Günlük internette geçirilen süre		
Hiç kullanmıyor	71	17,8
Günde 6 saatten az	279	69,7
Günde 6 saatten fazla	50	12,5
İnterneti sağlıkla ilgili bilgi edinmede kullanma		
Evet	154	38,5
Hayır	246	61,5
Toplam	400	100,0

İstatistik Analizler

Dil geçerliğinin sağlanması, Norman ve Skinner'in e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin Türkçeye adaptasyonu ve İngilizceye tekrar çevrilmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada hedef ve kaynak dil için profesyonel çeviri hizmeti sunan bir bürodan çeviri hizmeti alınarak, orijinal ölçek Türkçeye çevrildi. Türkçeye çevrilen form başka bir çevirmen tarafından tekrar orijinal diline çevrilmiştir. Orijinal form ve hedef dildeki formun tutarlılıklarını incelenerek ölçek maddelerinin dil denkleğini sağlayıp sağlamadığı değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda gerekli düzeltmeler yapıldıktan sonra

ölçek, Türkçeye uygunluk açısından bir Türk Dili ve Edebiyatı Öğretmeni tarafından değerlendirilerek ölçeğe son hali kazandırılmıştır.

Ölçeğin dilsel eşdeğerlik değerlendirmesi için önce Türkçe ölçek, iki hafta sonra da orijinal dildeki (İngilizce) ölçek Süleyman Demirel Üniversitesi'nde görevli 30 akademisyene uygulanmıştır. Ölçeğin Türkçe ve İngilizce versiyonlarının istatistiksel olarak dilsel eşdeğerlik durumu korelasyon analizi (Pearson Momentler Çarpımı Katsayısı) ve bağımlı gruplarda t-testleriyle (Paired-t test) analiz edilmiştir.

Orijinal ölçeğin Türkçeye adaptasyonu ve İngilizceye tekrar çevrilmesi ve dilsel

eşdeğerlik çalışmasından sonra ölçeğin Türkçe son hali kapsam geçerliği için uzman görüşlerine hazır hale getirilmiştir. Kapsam geçerliğinin değerlendirilmesinde Davis Tekniği kullanılmıştır (18). Bu teknikte uzmanlardan görüşlerini madde özelliği temsil ediyorsa ‘uygun’dan, madde özelliği temsil etmiyor ise ‘uygun değil’e kadar 4’lü dereceli olarak bildirmeleri istenmiştir. Cevaplardan uygun ve madde hafifçe gözden geçirilmeli olanların toplamı, toplam uzman sayısına bölünerek, her madde için Kapsam Geçerliği İndeksi (KGI) hesaplanmıştır. Dil eşdeğerliği çalışılan “e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği” ile ölçeğin orijinal İngilizce versiyonu, anlaşılabilirlik, amaca hizmet edebilme ve dilimize uygunluğunun değerlendirilmesi amacıyla sağlık alanında çalışan 10 öğretim üyesinin görüşüne sunulmuş ve KGI indeksleri hesaplanarak kapsam geçerliği değerlendirilmiştir. Ayrıca Kendall Uyumluluk Testi (Kendall’in Uyum [W] katsayısı) ile uzman görüşleri arasındaki uyum incelenmiştir (19).

Ölçeğin psikometrik analizlerinde geçerliğin değerlendirilmesi için yapı geçerliği ve ölçüt geçerliği test edilmiştir. Ölçeğin yapı geçerliğinin test edilmesinde açılımlayıcı ve doğrulayıcı faktör analizleri kullanılmıştır. Açılımlayıcı faktör analizinde; faktör analizi için uygunluk Keiser-Meyer-Olkin (KMO) testi ile ve örneklem büyüklüğünün yeterliği Bartlett Küresellik Testi ile incelenmiştir. Ölçeğin faktörlerini belirlemek ve yapı geçerliğini test etmek için açılımlayıcı faktör analizi (Principal Component faktör analizi) kullanılmıştır. Değerlendirmeler alan yazında yer alan sınır değerler dikkate alınarak yapılmıştır. Bu konuda KMO testinden elde edilen sonuçların 0,50’den küçük olmasının kabul edilebilir olmadığı, bu değerlerin 0,90’dan büyük olması halinde ise mükemmel olduğu bildirilmektedir (14). Ölçeğin faktör analizinin yapılabilmesi için, kabul edilir varyans düzeyinin incelenmesi gereklidir. Bunun için Bartlett küresellik testi’nin p değeri 0,05’ten büyük olmamalıdır, aksi halde faktör analizi yapılamaz (20). Doğrulayıcı faktör analizi AMOS (Versiyon 24.0) programı kullanılarak yapılmıştır.

Ölçekte bulunan maddelerin farklı boyutlar altında

toplanıp toplanmayacağını değerlendirmek için faktör analizi yapılmalıdır. Bu analizle çok sayıda maddenin daha az sayıda “faktör”le ifade edilmesinin mümkün olup olmadığının test edilmesi sağlanır. Ölçeğin maddeleri arasında yüksek ilişkili olanlar faktörleri oluşturur. Literatürde faktör analizi ile elde edilen faktör yükleri incelenerek, 0,40’ın altında olanların (bazılarına göre 0,30’un altında olanların) ölçekten çıkarılması gerektiği bildirilmektedir (14). Ölçek maddelerinin, ölçek yapısını iyi açıklayabilmesi için faktör yükleri 0,70 ve üzerinde olmalıdır (21).

Açılımlayıcı faktör analizi ile belirlenmiş olan modellerin, doğrulayıcı faktör analizi ile doğrulanıp doğrulanmadığının incelemesi amacıyla faktör analizi yapılmalıdır (22). Bu analizde model uyumunun ortaya çıkarılmasında çeşitli uyum indekslerinden yararlanılmaktadır (23). Bu çalışmada bu indekslerden, Ki-Kare Uyum Testi (Chi-Square Goodness), Karşılaştırmalı Uyum İndeksi (Comparative Fit Index, CFI), İyilik Uyum İndeksi (Goodness of Fit Index, GFI), Düzeltilmiş İyilik Uyum İndeksi (Adjusted Goodness of Fit Index, AGFI), Yaklaşık Hataların Ortalama Karekökü’dür (Root Mean Square Error of Approximation, RMSEA) ve Normlaştırılmış Uyum İndeksi (Normed Fit Index, NFI) değerinden yararlanılmıştır.

Ayrıca modelin gerçeğe en yakın model olduğu söylenen indeks değerleri de bulunmaktadır. Bunlar, Beklenen Çapraz doğrulama İndeksi (ECVI, Expected Cross Validation Index), Akaike Bilgi Kriteri (AIC, Akaike Information Criterion) ve Tutarlı Akaike Bilgi Kriteri (CAIC, Consistent Akaike Information Criterion) değerleridir (22). Doğrulayıcı faktör analizi sırasında bu değerler de hesaplanarak elde edilen son modelde bu değerlerin diğerlerinden küçük olmasına dikkat edilmiştir.

Ölçeğin ölçüt geçerliğinin test edilmesi için benzer özelliği ölçen ölçeğin (Yaşlılarda Teknoloji Kullanımı Ölçeği) aynı gruba eş zamanlı uygulanması sonrası iki ölçeğin puanları arası korelasyonlarına (Pearson korelasyon testi ile) bakılarak değerlendirme yapılmıştır.

Ölçeğin Güvenirlilik Analizi; Cronbach alfa katsayısı, madde toplam korelasyonu, Alt %27 ve üst %27'lik grup ortalamaları farkına dayalı madde analizi ve Ölçeğin taban ve tavan etkisi incelemesi yoluyla değerlendirilmiştir. İç tutarlılık değerlendirmesinde Likert tipi ölçeklerde güvenirliliği ölçmede Cronbach alfa katsayısı hesaplandığından bu çalışmada da iç tutarlılık Cronbach alfa katsayısı hesaplanarak değerlendirilmiştir. Madde toplam korelasyonu; test maddelerinin güvenirliliğini sınamak üzere Pearson Momentler Çarpımı Korelasyon Tekniği kullanılarak madde analiz işlemleri şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bunun için her bir madde ile test toplam puanı arasındaki ilişkiye bakılarak, madde toplam ve her bir sorunun değerini toplamdan çıkararak kalan değer ile madde arasındaki ilişki incelenmiştir.

Alt ve üst grup ortalamaları farkının madde analizinde, en yüksek puan alan üst %27'lik grup ile en düşük puan alan alt %27'lik grup arasındaki farkın değerlendirilmesinde bağımsız grup t testi kullanılmıştır. Ölçeğin taban ve tavan etkisi incelemesi için ölçekten alınabilecek en düşük (taban) puan 8 ve en yüksek (tavan) puan 40 alanların tüm grup içindeki yüzdeleri hesaplanmıştır. Taban ve tavan puan alanların dağılımının grubun %5 ila 20'si arasında olması önerisine göre (21) değerlendirme yapılmıştır.

Etik Kurul ve Ölçek Kullanım izinleri

Orijinal ölçeği geliştirmiş olan araştırmacılardan Norman ve Skinner ile email yoluyla yazılı iletişim kurulmuş ve Türkçe uyarlama, geçerlik ve güvenirlilik çalışmasını yapmak üzere izin alınmıştır.

Ölçeğin ölçüt geçerliğinin değerlendirilmesi için kullanılacak olan "Yaşlıların Teknolojiye Yönelik Tutum Ölçeği"nin kullanım izinleri için ölçeği Türkçe ye uyarlayan Özgür'le ve yaşlılarda Türkçe Geçerlik Güvenirlilik Çalışmasını yapan Kalınkara ve Sarı ile email yoluyla yazılı iletişim kurularak kullanım izinleri alınmıştır.

Bu çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan onay alınmıştır (Tarih:01.04.2021 ve Karar No: 170).

BULGULAR

e-Sağlık Okuyazarlığı Ölçeği'nin İngilizce ve Türkçe versiyonlarının aynı gruba uygulanması ile elde edilen Pearson Momentler Çarpımı korelasyon katsayıları ve bağımlı grup t-testi (Paired t-test) sonuçları Tablo 3'de görülmektedir. Analizler sonucu uyarlanan ölçekteki maddelerin tamamının dilsel eşdeğerliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Pearson'ın korelasyon katsayılarına göre, Türkçe ve İngilizce versiyonların maddeleri arasında, yalnız altıncı maddede orta düzeyde olmak üzere, diğer maddelerde ileri düzeyde pozitif yönde anlamlı korelasyon olduğu belirlenmiştir (Korelasyon katsayıları ve p değerleri için bakınız Tablo 3). Bağımlı grup t testi sonuçlarına göre Türkçe ve İngilizce formların hem maddeleri arasında hem de toplam puanlar arasında farklılık olmadığı görülmüştür. Tüm karşılaştırmalar için p değerlerinin 0,05'in üzerinde olduğu görülmüştür.

Kapsam geçerliğini değerlendirmede, uzman görüşlerine göre ölçek maddelerinin KGİ değerlerinin 0,80-1 arasında dağıldığı belirlenmiştir. Kendall'ın Uyum Testi ile uzman görüşlerinin birbiri ile uyum gösterme düzeyleri incelenmiş ve kuvvetli düzeyde uyumlu olduğu görülmüştür (Kendall's $W=0.595$, $p<0,001$).

Ölçeğin yapı geçerliğinin belirlenmesi için açımlayıcı ve doğrulayıcı faktör analizi kullanılmıştır. Açımlayıcı faktör analizi sonuçları Tablo 4'te görülmektedir. Faktör analizine uygunluk için değerlendirmesinde KMO katsayısı 0,94 olarak bulunmuştur. Bu değer 0,90'dan büyük olduğundan faktör analizi yapmaya uygun olarak değerlendirilmiştir. Örneklem büyüklüğünün yeterliğinin değerlendirilmesinde Bartlett testi ki-kare değeri 4508,0 ve p değeri $<0,001$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre örneklem büyüklüğünün faktör analizine uygun olduğuna karar verilmiştir.

Açımlayıcı faktör analizine ait ortak varyans (communality) değerleri Tablo 4'te görülmektedir. Ortak varyans değerlerinin yüksek olması toplam varyansın o kadar yüksek düzeyde açıklanabildiğini

Tablo 3. Dilsel eşdeğerlik çalışması için Türkçe ve İngilizce ölçek formlarının korelasyon ve bağımlı grup t-testi sonuçları

Maddeler	Pearson'ın Korelasyon katsayısı (r)	p*	p**
İnternet Kullanımı İle İlgili Maddeler			
Türkçe Madde 1- İngilizce Madde 1	0,625	<0,001	0,712
Türkçe Madde 2- İngilizce Madde 2	0,933	<0,001	0,326
İnternet Tutumu İle İlgili Maddeler***			
Türkçe Madde 1- İngilizce Madde 1	0,536	0,002	0,161
Türkçe Madde 2- İngilizce Madde 2	0,586	0,001	0,769
Türkçe Madde 3- İngilizce Madde 3	0,775	<0,001	1,000
Türkçe Madde 4- İngilizce Madde 4	0,726	<0,001	0,255
Türkçe Madde 5- İngilizce Madde 5	0,962	<0,001	0,326
Türkçe Madde 6- İngilizce Madde 6	0,385	0,036	0,109
Türkçe Madde 7- İngilizce Madde 7	0,556	0,001	0,255
Türkçe Madde 8- İngilizce Madde 8	0,850	<0,001	0,662
Türkçe Toplam Puan_İngilizce Toplam Puan	0,890	<0,001	0,229

* Pearson korelasyon testi, ** Bağımlı Grup t-testi,

*** Bu maddelerin toplamı ölçek toplam puanını vermektedir.

Tablo 4. e-Sağlık Okuryazarlığı ölçeği'nin açımlayıcı faktör analizi sonuçları

	Ortak varyans (<i>communality</i>) değeri
Madde 1	0,749
Madde 2	0,832
Madde 3	0,887
Madde 4	0,872
Madde 5	0,895
Madde 6	0,849
Madde 7	0,785
Madde 8	0,862
Keiser-Meyer-Olkin (KMO)	0,937
Ki-kare	4508,0
p- değeri	<0,001

göstermektedir. Ölçeğin özdeğeri birin üzerinde olan tek bir faktöre sahip olduğu ve ölçek özdeğeri 6,73 ve toplamda açıklanan varyansın ise %84,15'ini sağladığı belirlenmiştir. Ölçeğin tek bir bileşenli olması nedeniyle Varimax eksen döndürme işlemi gerçekleştirilememiştir (Tablo 5).

e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin birinci düzey doğrulayıcı faktör analizi yapıldığında ölçekte yer alan maddelere ait model uyum değerlerinin kabul edilebilir düzeyde olmadıkları görülmüştür (Tablo 6). Bu nedenle modifikasyon indekslerinde iyileştirme yoluna gidilmiş ve uyumu azaltan değişkenler belirlenerek, artık değerler arasında kovaryans yüksek olanlar için yeni kovaryanslar oluşturulmuştur. Modelin doğrulayıcı faktör analizi ve bağlantı diyagramı Şekil 1'de görülmektedir. Yeni oluşturulan kovaryanslara göre uyum indeksleri hesaplanmış ve kabul edilen değerleri sağladıkları görülmüş, e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin tek faktörlü yapısı doğrulanmıştır (Tablo 6).

Ölçüt geçerliği için benzer özelliği ölçen ölçeğin (Yaşlıların Teknolojiye Yönelik Tutum Ölçeği) aynı gruba eş zamanlı uygulanması sonrası iki ölçeğin toplam puanları arası korelasyonlara bakılmıştır. Pearson korelasyon katsayısı (r) 0,497 olarak

belirlenmiş ($p<0,001$) ve bu iki ölçek arasında orta düzeyde bir korelasyon olduğu görülmüştür (21).

Ölçeğin güvenirlik analizi sonucunda hesaplanan Cronbach alfa katsayısı 0,97 olarak belirlendi ve çalışmada kullanılan ölçeğin yüksek bir güvenirlik düzeyine sahip olduğu kabul edilmiştir. Ölçekten madde silindiğinde Cronbach alfa katsayısının 0,96 ile 0,97 arasında değiştiği ve madde çıkarılmasıyla daha yüksek bir Cronbach's Alfa değerine ulaşılmadığı bu nedenle ölçeğin orijinalinde olduğu gibi sekiz madde ile yüksek bir güvenilirliğe sahip olduğu tespit edilmiştir.

Madde toplam korelasyonu incelendiğinde, korelasyon katsayılarının 0,83-0,93 arasında dağıldığı belirlenmiştir. Madde ortalamaları 2,85 (minimum) ile 3.02 (maksimum) arasında değişmektedir. Ölçek maddelerinin toplamının genel ortalaması $23,48\pm 9,54$ olarak elde edilmiştir (Hotelling $T^2 = 30,441$; $F=4,283$; $p<0,001$) (Tablo 7).

Ölçekten en yüksek puanı almış % 27'lik gruba en düşük puanı almış %27'lik grup arasında her bir madde ortalamalarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 7). Ölçekteki maddelerin tümünün ölçmek istenen özelliği ayırt edici ve geçerli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 5. e-Sağlık Okuryazarlığı ölçeği'nin özdeğer istatistiğine bağlı faktör sayısı ve açıklanan toplam varyans

Faktör	Faktör yükü	Toplam	Özdeğer		Açıklanan toplam varyans	
			Varyans yüzdesi	Birikimli Varyans Yüzdesi	Varyans yüzdesi	Birikimli Varyans Yüzdesi
1	0,75	6,73	84,15	84,15	84,15	84,15
2	0,83	0,44	5,48	89,63		
3	0,89	0,24	3,04	92,67		
4	0,87	0,20	2,45	95,12		
5	0,90	0,14	1,73	96,85		
6	0,85	0,10	1,23	98,08		
7	0,79	0,09	1,06	99,14		
8	0,86	0,07	0,86	100,00		

Tablo 6. e-Sağlık Okuryazarlığı ölçeği'nin doğrulayıcı faktör analizi model uyum indeksleri

Uyum İndeksleri	Mükemmel Uyum Değerleri	Kabul Edilebilir Uyum Değerleri	Birinci düzey	İkinci düzey
χ^2 /sd	$0 \leq \chi^2 /sd \leq 2$	≤ 5	20,247	4,645
RMSEA	$0,00 \leq RMSEA \leq 0,05$	$\leq 0,08$	0,220	0,096
CFI	$0,95 \leq CFI \leq 1,00$	$\geq 0,90$	0,915	0,990
SRMR	$0,00 \leq SRMR \leq 0,05$	$\leq 0,08$	0,055	0,024
GFI	$0,95 \leq GFI \leq 1,00$	$\geq 0,90$	0,759	0,964
AGFI	$0,95 \leq AGFI \leq 1,00$	$\geq 0,90$	0,566	0,900
NFI	$0,95 \leq CFI \leq 1,00$	$\geq 0,90$	0,911	0,987
AIC			436,935	106,390
CAIC	En küçük değere sahip olan model gerçeğe en yakın model		221,194	
ECVI	516,799		0,267	
	1,095			

RMSEA: Yaklaşık Hataların Ortalama Karekökü (Root Mean Square Error of Approximation)

SRMR: Standardize Ortalama Hataların Karekökü (Standardized Root Mean Square)

GFI: İyilik Uyum İndeksi (Goodness of Fit Index)

AGFI: Düzeltilmiş İyilik Uyum İndeksi (Adjusted Goodness of Fit Index)

CFI: Karşılaştırmalı Uyum İndeksi (Comparative Fit Index)

NFI: Normlaştırılmış Uyum İndeksi (Normed Fit Index)

AIC: Akaike Bilgi Kriteri (Akaike Information Criterion)

CAIC: Tutarlı Akaike Bilgi Kriteri (Consistent Akaike Information Criterion)

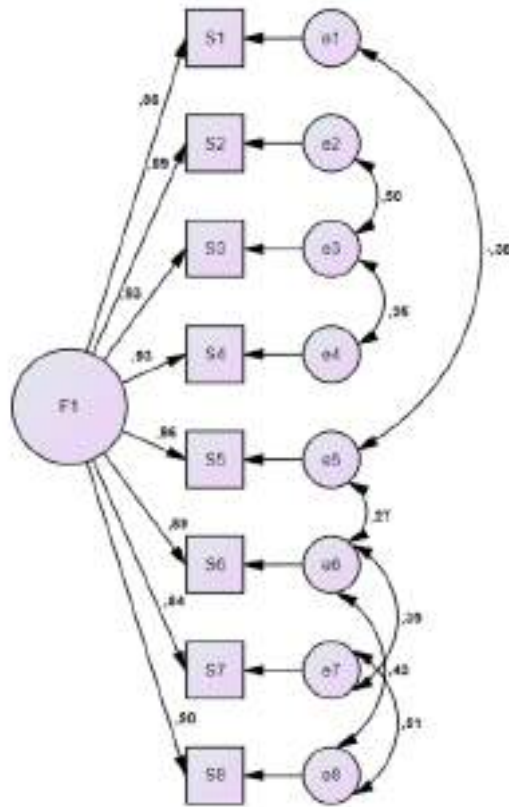
ECVI: Beklenen Çapraz Doğrulama İndeksi (Expected Cross Validation Index)

Ölçeğin taban ve tavan etkisi incelendiğinde, en düşük puan olan 8 puan alanların araştırma grubunun %12,8'ini (n=51), en yüksek puan olan 40 puan alanların ise %2,3'ünü (n=9) oluşturduğu görülmüştür. Taban ve tavan puan alanların dağılımının grubun %20'sini geçmediği belirlendiğinden ölçekte taban ve tavan etkisinin olmadığı kabul edilmiştir.

TARTIŞMA

Geliştirilen veya uyarlanan ölçek “neyi, ne kadar ölçmektedir” ve “ölçmeyi amaçladığı özelliği doğru ölçebilme düzeyi” nedir sorularının yanıtı bir ölçme aracının geçerliğinin ölçüsüdür (24, 25). Çok sayıda geçerlik tipi bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri önem sırasına göre; yapı geçerliği (construct validity), içerik geçerliği (content validity), kapsam geçerliliği (ensuring validity), içsel geçerlik (internal

validity) olarak bildirilmektedir (26). Ölçeğin içerik geçerliğinin ölçüsü olarak, benzer özelliği ölçtüğü bilinen daha önce geliştirilmiş ve geçerliği gösterilmiş başka bir ölçüm aracı aynı anda araştırma grubuna uygulanır ve iki ölçek arasındaki ilişkiye bakılarak değerlendirme yapılır. Değerlendirmede genellikle Pearson korelasyon analizi kullanılır ve elde edilen katsayı “geçerlik katsayısı” olarak alınır ve bu sayının 1'e yakın olması ölçeğin karşılaştırılan testle benzer olduğunu gösterir (14). Bu değer 0,30'un altında olmaması gerektiği bildirilmiştir (14, 27). Bu çalışmada e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği ile bireylerin sağlık konusunda bilgi teknolojilerini kullanmadaki algılanan becerileri değerlendirilmektedir. Bu nedenle bireylerin medya ve teknoloji kullanım düzeyleri bu beceride önemli bir yer tuttuğu düşünülerek, yaşlı bireylerin bu alandaki becerilerini ölçmek üzere geliştirilmiş (15) ve Türkçe'ye



Şekil 1. e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin Doğrulayıcı Faktör Analizi Bağlantı Diyagramı (Standart Katsayılar)
Kikare (χ^2)=60,390; Serbestlik derecesi (sd)=13, $\chi^2 /sd=4,645$; $p<0,001$, RMSEA=0,096

Tablo 7. e-Sağlık Okuryazarlığı ölçeği'nin güvenilirliği

Maddeler	Madde-toplam korelasyonları	Çoklu korelasyonların karesi	Madde silindiğinde güvenilirlik katsayısı	Alt-üst %27'lik grup madde ortalamaları karşılaştırması t değeri; p
Madde 1	0,83	0,72	0,973	1115,14; $p<0,001$
Madde 2	0,88	0,85	0,970	1152,90; $p<0,001$
Madde 3	0,92	0,90	0,968	2548,82; $p<0,001$
Madde 4	0,91	0,86	0,968	1824,17; $p<0,001$
Madde 5	0,93	0,89	0,967	2261,90; $p<0,001$
Madde 6	0,90	0,85	0,969	2713,60; $p<0,001$
Madde 7	0,85	0,78	0,971	1579,55; $p<0,001$
Madde 8	0,91	0,87	0,968	2026,80; $p<0,001$
Hotelling $T^2 =30,441$; $F=4,283$; $p<0,001$				
Cronbach Alfa Katsayısı= 0,973				

uyarlanarak geçerlik ve güvenilirlik çalışması yapılmış (16) “Yaşlıların Teknolojiye Yönelik Tutum Ölçeği” ölçüt geçerliğini test etmek üzere araştırma grubuna eş zamanlı uygulanmıştır. İki ölçeğin toplam puanları arasında belirlenen korelasyon (geçerlik) katsayısı 0,497 olarak belirlenmiş, ölçekler arası korelasyonun orta düzeyde olduğu ve literatürde bildirilen sınır değerlere göre kabul edilebilir olduğu görülmüştür. Bu değerlendirmeye göre e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin ölçüt geçerliğini sağladığına karar verilmiştir.

Ölçeğin kapsam geçerliği Davis Tekniği kullanılarak test edilmiş, ölçekteki her madde için KGİ hesaplanmıştır. KGİ değeri için 0,80 ölçüt olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada her ölçek maddesi için hesaplanan KGİ değeri 0,80-1 arasında dağıldığından kapsam geçerliği ölçütlerini sağladığı kabul edilmiştir.

Kendall'ın uyum testi ve katsayısı, sıralı (ordinal) ölçekte değerlendiriciler arası uyumluluğu değerlendirmek için kullanılmaktadır. Katsayı, 0 (uyumluluk yok) ile 1 (tam uyumluluk) aralığında değer alabilir (28). Uzman görüşlerinin birbiriyle uyum düzeyi incelendiğinde, Kendall'ın uyum katsayısı 0,595 olarak belirlendiğinden kuvvetli düzeyde uyumlu kabul edilmiştir (21). e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin “bağımsız gözlemciler arası uyum” güvenilirliğini sağladığı görülmüştür.

Ölçeğin yapı geçerliğinin belirlenmesi için açımlayıcı ve doğrulayıcı faktör analizi kullanılmış, verilerin faktör analizine uygunluğu KMO-Bartlett's testi ile incelenmiştir. KMO katsayısı için 0,50 ve üstü değerler veri setinin faktör analizi yapmaya uygun olduğunu göstermektedir. Bartlett's testinin p değerinin 0,05'ten küçük olması ise örneklem büyüklüğünün yeterli olduğunu göstermektedir (29). Özgün çalışmada KMO-Bartlett testine yer verilmemiştir (11). Aynı ölçeğin adolesan yaş grubunda Türkçe geçerlik güvenilirlik çalışmasının yapıldığı araştırmada KMO katsayısı (0,75) ve Bartlett Küresellik Testi (204,5; $p<0.001$) ile değerlendirme yapılmış ve faktör analizine uygun olduğu belirlenmiştir

(12). Aynı ölçeğin Çinceye uyarlandığı çalışmada ise KMO değeri, 0,88 ve Bartlett Küresellik Testi'nin anlamlılık değeri ise $p=0,001$ olarak bildirilmiştir (30). Bu çalışmanın sonucunda, KMO katsayısına göre faktör analizi yapmaya uygun ve Bartlett's testinin p değerine göre ise örneklem büyüklüğünün faktör analizine uygun olduğuna ve literatürle uyumlu olduğuna karar verilmiştir.

Faktör analizi, bir ölçeğin birbiriyle yüksek ilişki gösteren maddelerinin daha az sayıda faktörler oluşturup oluşturmayacağını incelemek amacıyla yapılmaktadır. Bu çalışmada özdeğeri biri aşan ve toplam varyansın %84,15'ini açıklayan tek bir faktör elde edilmiştir. Coşkun ve Bebiş adolesanlarda Türkçe geçerlik güvenilirliğini yaptıkları aynı ölçek için faktör yüklerini 0,59-0,86 arasında bildirmiştir (12). Araştırmacılar değişen ve toplam varyansın %67,54'ünü açıklayan üç faktör elde etmişler, ölçeğin madde sayısı az olduğundan tek faktörlü kullanılmasına karar vermişlerdir (12). Orijinal ölçeği geliştiren araştırmacılar ise faktör yüklerinin 0,60-0,84 arasında değiştiğini, toplam varyansın %56,0'ını açıklayan tek bir faktör tespit ettiklerini bildirmişlerdir (11). Koo ve arkadaşları Çince versiyonunda, faktör yüklerinin 0,70 ile 0,87 arasında dağıldığını, toplam varyansın %63,5'ini açıklayan tek faktörlü bir yapı tespit ettiklerini bildirmişlerdir (30). Bu çalışmada faktör yüklerinin 0,75-0,90 arasında değiştiği, varyansın %84,15'ini açıklayan tek bir faktör tespit edilmiş ve orijinal çalışmayla ve Çin'de yapılan çalışmayla uyumlu olduğu görülmüştür.

e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin doğrulayıcı faktör analizinde, model uyum değerleri belirlenmiş, uyumu bozan artık değerler arasında kovaryansı yüksek olanlar arasında yeni kovaryanslar oluşturularak uyum indekslerinin kabul edilebilir sınırlarda olduğu görülmüştür. Doğrulayıcı Faktör Analizinde model uyum indekslerinden; Ki-kare uyum testinin 5 veya altında, RMSEA değerinin 0,08 değerini aşmaması; CFI'nin 0,90 üzerinde olması; GFI'nin çoklu regresyondaki R^2 'ye benzerliğinden dolayı yüksek olması beklenmektedir. SRMR değeri, 0 ile 1 arasında

değişen değerler alabilmektedir ve sıfıra en yakın değer modele daha uygun olarak kabul edilmektedir. Ayrıca en küçük AIC, CAIC ve ECVI değerine sahip olan modelin gerçeğe en yakın model olduğu kabul edilmektedir (22). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, doğrulayıcı faktör analizinde e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin tek faktörlü yapısı doğrulanmıştır.

Ölçeğin güvenirlik analizinde iç tutarlılık için Cronbach alfa katsayısı hesaplanmış ve 0,97 olarak belirlenmiştir. e-Sağlık Okuryazarlığı Likert tipi bir ölçektir ve bu tür ölçeklerde iç tutarlılığı değerlendirmede en çok kullanılan yöntem Cronbach alfa katsayısının hesaplanmasıdır. Bu katsayı ölçeği oluşturan maddelerin homojenliğinin, iç tutarlılığının bir ölçüsüdür. Başka bir ifade ile bu katsayı ölçekte yer alan maddelerin bir yapıyı açıklamak üzere bir bütün oluşturup oluşturmadıkları konusunda bilgi vermektedir. Bu katsayı ne kadar yüksek olursa "bu ölçekte bulunan maddelerin o ölçüde birbirleriyle tutarlı ve aynı özelliğin öğelerini yoklayan maddelerden oluştuğu veya tüm maddelerin o ölçüde birlikte çalıştığı" yorumu yapılır. Cronbach alfa katsayısı 0,80'in üzerinde ise ölçek yüksek güvenirliğe sahip demektir (21). e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin Cronbach alfa katsayısı; Norman ve Skinner tarafından 0,88 (11), Coşkun ve Bebiş tarafından 0,78 (12), Tamer Gencer tarafından 0,86 (13) ve Koo ve arkadaşları tarafından 0,92 (30) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada belirlenen değer ile, 45 yaş üstü yetişkinlerde Türkçe uyarlaması yapılan e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin, Türkiye'de adolesan grupta ve 18-45 yaş arası yetişkin grupta yapılan çalışmaya göre daha yüksek düzeyde güvenilir ve literatürle de uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Madde toplam korelasyonu değerlendirmesi için önerilen (14) yeterli örneklem sayısına (en az 200) sahip bu çalışmada korelasyon katsayılarının 0,83-0,93 arasında dağıldığı görülmüştür. Bu katsayının 0,30'un üstünde olması güvenirlik için olumlu bir durumdur. Bu değer 0,30'un altında olması halinde maddenin ölçekten çıkarılması önerilmektedir. Maddelerin ölçekte bırakılıp bırakılmamasına,

maddenin Cronbach alfa katsayısına etkisine göre karar verilmektedir. Bu çalışmada ölçekten maddeler silindiğinde Cronbach alfa katsayısının 0,96 ile 0,97 arasında değiştiği ve hiçbir maddenin çıkarılmamasıyla daha yüksek bir Cronbach alfa değerine ulaşamadığı, bu nedenle ölçeğin orjinalinde olduğu gibi sekiz madde ile yüksek bir güvenirliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Coşkun ve Bebiş adolesanlarda yaptıkları çalışmada madde toplam puan korelasyon katsayısının 0,24-0,56 arasında (12), Norman ve Skinner 0,51-0,76 arasında (11) ve Koo ve arkadaşları ise 0,71-0,87 arasında (30) dağıldığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada belirlenen korelasyon katsayıları literatürde belirlenenlerden daha yüksektir ve e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin Türkçe versiyonu, 45 yaş üstünde yetişkin grupta yüksek güvenirliğe sahiptir.

Madde ayırt ediciliğine ilişkin bir yaklaşım olan, ölçeğin alt %27 ve üst %27'lik grup ortalamaları farkına dayalı madde analizi, bu iki grupta her maddenin ortalamalarının farkını karşılaştırmaktadır. Bu yaklaşımda, üst gruptaki yanıtlayıcıların ölçeğin ölçmek istediği özelliği olumlu yönde sahip olanları, alt gruptaki yanıtlayıcılar ise ölçeğin ölçmek istediği özelliği olumsuz yönde sahip olanları temsil ettiği kabul edilerek, her bir madde açısından bu iki grup arasında istatistiksel olarak fark olması beklenir. Bu nedenle iki grup arasında fark yok ise o madde, ilgili özelliğe sahip olanları ayırt edemiyor anlamına gelir. Dolayısıyla o maddenin ölçüğe alınması önerilmez. Bu çalışmada ölçekteki sekiz maddenin ortalamalarının alt ve üst %27'lik grup arasında farklılık gösterdiği, tüm maddeler için t değerlerinin pozitif (+) olduğu tespit edilmiş olup, ölçekteki maddelerin tamamının ölçmek istenen özelliği ayırt edici ve geçerli olduğu görülmüştür.

Taban ve tavan etkisinin belirlenmesi ölçek geçerlik ve güvenirlik çalışmaları kapsamında değerlendirilmesi önerilen bir özelliktir. Ölçeklerde bireylerin çoğu tüm sorulara aynı yanıtı verdiğinde ortaya çıkan bir durumdur. Bir ölçekte taban veya tavan etkisinin olması ölçeğin birtakım faktörlere

(yaş, cinsiyet, eğitim durumu vb.) değişime duyarlılığını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle ölçeklerde taban veya tavan etkisinin olmaması veya en küçük düzeyde olması istenmektedir (21). Bu çalışmada e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin taban veya tavan etkisinin olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak; bu çalışmada Norman ve Skinner tarafından geliştirilen e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin 45 yaş üstü yetişkin grupta Türkçe geçerliliği ve güvenilirliği değerlendirilmiş ve ölçekteki maddelerin tamamının dilsel eşdeğerliğe sahip olduğu, kapsam geçerliğinin kuvvetli düzeyde olduğu, yapı geçerliliği bakımından açımlayıcı faktör analizinde açıklanan toplam varyansın yüzde 84,15'ine karşılık geldiği, ölçüt geçerliliği korelasyonunun pozitif yönde anlamlı ve geçerli olduğu görülmüştür. Ölçeğin orijinal halindeki gibi sekiz madde ile yüksek bir güvenilirliğe

sahip olduğu ve toplam Chronbach alfa değerinin 0,97 ile yüksek bir değere sahip olduğu belirlenmiştir. Ölçeğin madde-toplam korelasyonu ve %27'lik alt-üst grup karşılaştırmalarında elde edilen sonuçlar, madde ayırt edicilik gücünün yeterli olduğunu göstermiştir. Ölçekte taban ve tavan etkisinin olmadığı görülmüştür.

e-Sağlık Okuryazarlığı Ölçeği'nin Türkçe formu, 45 yaş üstünde yetişkinlerde, adolesan ve genç yetişkinlerde olduğu gibi, e-Sağlık okuryazarlığı düzeylerini belirlemek amacıyla geçerli ve güvenilir biçimde kullanılabilir. Sağlığı geliştirme çalışmaları kapsamında ve öncesinde toplumdaki e-Sağlık Okuryazarlığı düzeylerini ileri yaş yetişkin ve yaşlılarda belirlemeye ve ilişkili faktörleri incelemeye yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'nın onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:22.07.2020 ve Karar No: 170).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Nielsen-Bohlman L, Panzer AM, Kindig DA. Health Literacy: A Prescription to End Confusion. National Academies Press (US), 2004; 1-58.
2. Ottawa Charter for Health Promotion. Geneva, World Health Organization, 1986. Available from: <https://www.who.int/healthpromotion/conferences/previous/ottawa/en/index1.html> (Erişim tarihi: 1 Eylül 2021).
3. Nur F, Aksakal B. Sağlık Okuryazarlığı Halk Sağlığının Temeli. Sağlık Okuryazarlığı 1 Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 2019: 1-5.
4. Malloy-Weir LJ, Charles C, Gafni A, Entwistle V. A review of health literacy: Definitions, interpretations, and implications for policy initiatives. J Public Health Policy, 2016; 37(3): 334-52.

5. Selden CR, Zorn M, Ratzan S, Parker RM. National Library of Medicine Current Bibliographies in Medicine: Health Literacy. Patrias K, editor. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. Bethesda; 2000. Available from: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf> (Erişim tarihi: 2 Eylül 2021).
6. Chretien KC, Kind T. Social media and clinical care ethical, professional, and social implications. *Circulation*, 2013; 127(13): 1413-21.
7. Birru MS, Monaco VM, Charles L, Drew H, Nije V, Bierria T, et al. Internet usage by lowliteracy adults seeking health information: An observational analysis. *J Med Internet Res*, 2004; 6(3): 25-9.
8. Skinner H, Biscope S, Poland B. Quality of Internet Access: Barrier Behind Internet Use Statistics. *Soc Sci Med*, 2003; 57(5): 875-80.
9. Skinner H, Biscope S, Poland B, Goldberg E. How adolescents use technology for health information: Implications for health professionals from focus group studies. *J Med Internet Res* 2003; 5(4): 1-32. doi: 10.2196/jmir.5.4.e32.
10. Özer Ö, Şantaş B, Budak F. Sağlık web sitelerinin kullanım düzeylerinin incelenmesi: Örnek bir uygulama. *Giresun Üniversitesi İletişim Fakültesi Dergisi*, 2012; 4(1): 128-40.
11. Norman CD, Skinner HA. eHEALS: The eHealth literacy scale. *J Med Internet Res*, 2006; 8(4): 1-7.
12. Coskun S, Bebis H. Psychometric Evaluation of A Turkish Version of The e-Health Literacy Scale (e-heals) in Adolescent. *Gülhane Med J*, 2015; 57(4): 378-38.
13. Tamer Gencer Z. Analysis of Validity and Reliability of Norman and Skinner's E-health scale literacy for cultural adaptation. *İstanbul Üniversitesi İletişim Fakültesi Dergisi*, 2017/1;131-145.
14. Şencan H. Sosyal ve davranışsal ölçümlerde güvenilirlik ve geçerlilik. 1.Baskı. Ankara: Seçkin Yayınevi, 2005.
15. Rosen LD, Whaling K, Carrier LM, Cheever NA, Rokkum J. The media and technology usage and attitudes scale: An empirical investigation. *computers in human behavior*, 2013; 29(6): 2501-11.
16. Ozgur H. Adapting the media and technology usage and attitudes scale to Turkish. *Educational Sciences: Theory and Practice*, 2016; 16(5): 1711-1735. doi:10.12738/estp.2016.5.0085.
17. Kalınkara V, Sarı İ. Yaşlıların Bilgi teknolojileri kullanımı ve yaşam doyumu potansiyel ve engeller, ergonomik yaklaşım. *Journal of Engineering Sciences and Design*, 2018; 6: 1-13.
18. Davis LL. Instrument Review: Getting the most from a panel of experts. *Applied Nursing Research*, 1992; 5(4): 194-7.
19. Karagöz Y. Nonparametrik tekniklerin güç ve etkinlikleri. *Elektronik Sosyal Bilimler Dergisi*, 2010; 9(33): 18-40.
20. Büyükoztürk Ş. Testlerin Geçerlik ve Güvenirlik Analizlerinde Kullanılan Bazı İstatistikler. İçinde: *Sosyal Bilimler İçin Veri Analizi El Kitabı*. 15. baskı. Ankara: Pegem Akademi, 2011.
21. Alpar R. Uygulamalı İstatistik ve Geçerlik-Güvenirlik. 5. Baskı. Ankara: Detay Yayıncılık, 2018.
22. Büyükoztürk Ş. Sosyal Bilimler İçin Veri Analizi El Kitabı: İstatistik, Araştırma Deseni SPSS Uygulamaları ve Yorum. 16. Baskı. Ankara: Pegem A Yayıncılık, 2011.
23. Büyükoztürk Ş, Akgün EÖ, Özkahveci Ö, Demirel F. Güdülenme ve öğrenme stratejileri ölçeğinin Türkçe formunun geçerlik ve güvenilirlik çalışması. *Kuram ve Uygulamada Eğitim Bilimleri*, 2004; 4 (2): 207-39.
24. Karakoç FY, Dönmez L. Ölçek geliştirme çalışmalarında temel ilkeler. *Tıp Eğitimi Dünyası* 2014; 13(40): 39-49.
25. Aksayan S, Gözüm S. Kültürlerarası ölçek uyarlaması için rehber II: Psikometrik özellikler ve kültürlerarası karşılaştırma. *Hemşirelikte Araştırma Dergisi*, 2003; 5: 3-14.
26. Özdamar K. Eğitim, Sağlık ve davranış bilimlerinde Ölçek ve Test Geliştirme Yapısal Eşitlik Modellemesi. 1. Baskı. Eskişehir: Nisan Kitabevi, 2016.
27. Büyükoztürk Ş. Veri Analizi El Kitabı. 17. Baskı. Ankara: Pegem Yayınevi, 2012.
28. Kendall MG, Smith BB. The problem of m rankings. *The Annals of Mathematical Statistics*, 1939; 10 (3): 275- 87.
29. Çokluk Ö, Şekercioğlu G, Büyükoztürk Ş. Sosyal Bilimler için Çok Değişkenli İstatistik: SPSS ve LISREL Uygulamaları. 2. Baskı. Ankara: Pegem Akademi, 2014.
30. Koo M, Norman CD, Hsiao-Mei, C. Psychometric evaluation of a Chinese version of the ehealth literacy scale (eHEALS) in school age children. *Glob J Health Educ Promot*, 2012; 15(1).

Nested-PCR assay for molecular identification of cutaneous leishmaniasis species using kinetoplast DNA gene in Mirjaveh and Reg-e Malek provinces (IRAN)

Mircave ve Reg-e Malek (İran) kentlerinde kutanöz leishmaniasis türlerinin Nested-PCR ile kinetoplast DNA geni kullanılarak yapılan moleküler tanımlanması

Hadi MİRAHMADI^{1,2} (ID), Farzaneh GORGANI¹ (ID), Maliheh METANAT¹ (ID), Soudabeh ETEMADI³ (ID), Seyed Mehdi TABATABAEI⁴ (ID), Mohammad Kazem MOMENI¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: As a global health challenge, especially in Iran, cutaneous leishmaniasis is one of the major health and medical problems in Sistan and Baluchestan Province and plays a significant role in the inhibition of socioeconomic growth of this deprived province. The aim of our study was molecular identification of cutaneous leishmaniasis species using kinetoplast DNA (kDNA) gene in a small part (Mirjaveh and Reg-e Malek) of Sistan and Baluchestan region of Iran.

Methods: This descriptive cross-sectional study was carried out on patients suspected of cutaneous leishmaniasis with epidemiologic information. Samples of the skin lesions and ulcers suspected of cutaneous leishmaniasis were collected from patients with active ulcers, and the collected samples were diagnosed by of parasitologic (direct smears of the lesions and staining them using Giemsa Staining Method) and molecular methods. The specific Polymerase Chain Reaction (PCR) method was applied to the kinetoplast DNA's isolated

ÖZET

Amaç: Özellikle İran'da küresel bir sağlık sorunu olarak kutanöz leishmaniasis, Sistan ve Belucistan eyaletindeki başlıca sağlık sorunlarından biridir ve bu yoksun eyaletin sosyoekonomik büyümesinin önündeki en büyük engellerden biridir. Çalışmamızın amacı, İran'ın Sistan ve Belucistan bölgesinin küçük bir bölümünde (Mircave ve Reg-e Malek), kinetoplast DNA (kDNA) geni kullanılarak kutanöz leishmaniasis türlerinin moleküler tanımlanmasıdır.

Yöntem: Bu tanımlayıcı kesitsel çalışma, kutanöz leishmaniasisten şüphelenilen hastalarda yapılmıştır. Aktif ülseri olan hastaların kutanöz leishmaniasis şüphesi olanlarından deri lezyonları ve ülser örnekleri toplandı ve toplanan örnekler parazitolojik (direkt yayma ve Giemsa Boyama Metodu) ve moleküler yöntemlerle tanı konuldu. *Leishmania* cinsini ve türlerini belirlemek için doğrudan yaymalardan izole edilen kinetoplast DNA'larına spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi uygulandı. Son

¹Zahedan University of Medical Sciences, Research Institute of Cellular and Molecular Sciences in Infectious Diseases, Infectious Disease and Tropical Medicine Research Center, Iran

²Zahedan University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Parasitology and Mycology, Zahedan, Iran

³Sirjan School of Medical Sciences, Department of Laboratory Sciences, Sirjan, Iran

⁴Zahedan University of Medical Sciences, Health Promotion Research Center, Zahedan, Iran



İletişim / Corresponding Author : Soudabeh ETEMADI

Sirjan School of Medical Sciences, Department of Laboratory Sciences, Sirjan, Iran

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

Geliş Tarihi / Received : 04.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 05.10.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.06887

Mirahmadi H, Gorgani F, Metanat M, Etemadi S, Tabatabaei SM, Momeni MK. Nested-PCR Assay for molecular identification of cutaneous leishmaniasis species using kinetoplast DNA gene in Mirjaveh and Reg-e Malek provinces (IRAN). Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 690 - 701

from the direct smears to identify the genus and species of *Leishmania*. Finally, the resulting information was analyzed in SPSS software.

Results: The microscopic test results of 43 (57.9%) patients of the 76 patients suspected of cutaneous leishmaniasis were positive. In a PCR assay, the *Leishmania* kDNA fragment was identified in 50 patients (65.8%). Besides, 44 samples were diagnosed with *Leishmania major* and 6 samples were diagnosed with *Leishmania tropica* using species-specific primers. The agreement between the results of the molecular method and the parasitology method in the samples in Mirjaveh and Reg-e Malek was ($Kappa=0.8$) compelling agreement. There was a significant difference between the results of molecular with the parasitologic results obtained in the samples of cutaneous leishmaniasis in the city of Mirjaveh and the Reg-e Malek ($Pv\leq 0.05$).

Conclusion: According to the present research, cutaneous leishmaniasis prevalence caused by *Leishmania major* in Mirjaveh City in Sistan and Baluchestan Province in Iran was high. Our findings also confirmed the necessity of carrying out direct molecular tests (including direct smears) on the clinical samples of patients for negative results and species identification.

Key Words: *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, PCR, kDNA, Sistan and Baluchestan, Iran

olarak elde edilen bilgiler SPSS yazılımında analiz edildi.

Bulgular: Kütanöz leishmaniasis şüphesi olan 76 hastanın 43 (%57.9)'ünün mikroskopik test sonuçları pozitif idi. 50 hastada (%65,8) PCR ile *Leishmania* kDNA fragmanı belirlendi. Yanı sıra 44 örneğe *Leishmania major*, altı örneğe ise türe özgü primerler kullanılarak *Leishmania tropica* tanısı konuldu. Mirjaveh ve Reg-e Malek'teki örneklerde moleküler yöntem ile parazitoloji yönteminin sonuçları arasındaki uyum ($Kappa=0,8$) zorlayıcı bir uyumdu. Mirjaveh ve Reg-e Malek şehirlerindeki kütanöz leishmaniasis örneklerinde elde edilen parazitolojik sonuçlar ile moleküler sonuçları arasında anlamlı bir fark vardı ($Pv\leq 0.05$).

Sonuç: Yaptığımız araştırmaya göre, İran'da Sistan'ın Mirjaveh şehrinde ve Belucistan eyaletinde *Leishmania major*'un neden olduğu kütanöz leishmaniasis prevalansı yüksekti. Bulgularımız ayrıca negatif sonuçlar ve tür tanımlaması için hastaların klinik örneklerinde doğrudan moleküler testler (doğrudan yaymalar dahil) yapılmasının gerekliliğini doğruladı.

Anahtar Kelimeler: *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, PCR, kDNA, Sistan ve Belucistan, İran

INTRODUCTION

As one of the most important zoonotic diseases in the tropical and subtropical regions, leishmaniasis is caused by various protozoan species of the *Leishmania*. This disease has various clinical manifestations in the form of cutaneous, visceral, and mucocutaneous leishmaniasis in humans and some animals, but the cutaneous and visceral types are prevalent in Iran (1,2). Leishmaniasis is also one of the most important and common endemic diseases

in Iran and the second parasitic disease transmitted by arthropods after malaria. Approximately 20,000 cases of cutaneous leishmaniasis are reported in Iran every year (3).

The identification of the specifications of different species causing leishmaniasis is generally one of the most important principles in controlling and preventing leishmaniasis. Moreover, identifying the dominant strain in a region can serve pharmaceutical studies, preparation of vaccines, and preparation of the antigens required for diagnosis (4). Various

methods such as in vivo and in vitro culture, isoenzyme methods, serologic methods, immunohistochemical methods, and molecular methods are used in the differentiation of the species of *Leishmania* due to the importance of identifying of the species of *Leishmania* and its effect on the prevention, control, and treatment of leishmaniasis. The two genomic fragments of *Leishmania* parasite commonly used in molecular studies are the kinetoplast DNA (kDNA) and the internal transcribed spacer (ITS1) fragment of ribosomal DNA. The kDNA has thousands of minicircles, with each minicircle having a variable section and a conserve section. Therefore, the kDNA is a target for the diagnostic and species identification molecular studies (5,6). Depending on the specific characteristics of the genus, species, and host immune status, clinical forms may vary widely, but are generally seen in three clinical forms: cutaneous, muco cutaneous, and visceral. *Leishmania major* is originally a rodent parasite but can cause zoonotic cutaneous leishmaniasis in humans and *Leishmania tropica* is the causative agent of Anthropontic Cutaneous Leishmania (ACL) and the primary host is infected humans, who are also a major source of infection (7).

PCR technology has been successfully employed in numerous studies. This method diagnoses species-specific infections without the need for culturing (8). *Leishmania* kinoplasts are disc-shaped on the

mitochondrial membrane at the base of the flagellum and consist of large and small DNA loops (maxi-circle and mini-circle kDNA). Existence of duplication and great variety of mini-circle kDNA used for the analysis of genetic and is a target for the identification of *Leishmania* species (9). In this study, presence of the *Leishmania* parasite were determined through the microscopic observation of the Giemsa-stained slides and PCR assays. Afterwards, these methods are compared and the species of *Leishmania* in Mirjaveh City and the Reg-e Malek district of Sistan and Baluchestan Province (Iran) were identified through PCR assays.

MATERIAL and METHOD

Study area

Sistan and Baluchestan Province is located in the southeast of Iran. It is located at latitude 29° 1' 9.4" and longitude 61°27' 2.2" with an elevation of 858 m of sea level. Mirjaveh is one of the cities of Sistan and Baluchestan Province of Iran that consists of Reg-e Malek and central districts. Due to the proximity of this city to the 32nd parallel, which overlaps with the global desert belt, this city is one of the most arid parts of Iran with an arid, hot, Low rain fall and desert climate.



Figure 1. Location of sampling zone (Statistical Center of IRAN, www.amar.org.ir and 8)

Sampling

This cross-sectional study was conducted February 2017 until September 2019 on the patients referred to the health centers of Mirjaveh City and Reg-e Malek in Sistan and Baluchestan Province Iran. A total of 76 patients diagnosed with cutaneous leishmaniasis were subjected to epidemiologic information (personal information, gender, ulcer type, ulcer location, and the number of ulcers) in this study. Diagnosis was carried out by collecting direct smears of the lesions and staining them using Giemsa Staining Method. This end, a small incision was made around the ulcer and a thin smear was isolated from the serous using microscopic slides. In the microscopic analysis, leishman bodies (amastigotes) were searched inside or outside of the macrophages. Total samples (in addition to microscopic experiments) with a specific PCR method were used to identify the Cutaneous leishmaniasis and *Leishmania* species.

Giemsa Staining Method

On a clean dry microscopic glass slide, make a direct smear of the lesions and leave to air dry. Dip the smear into pure methanol for fixation of the smear, leave to air dry for 30 seconds. In the following, flood the slide with 5% Giemsa stain solution for 20-30 minutes.

DNA extraction

The surface of each dry smear was carved using a separate scalpel and was transferred to a microtub under sterilized conditions. Afterwards, 200 µl of a

lysis buffer and Proteinase K solution were added to each sample and each sample was incubated for 15 min 56°C.

The binding buffer was added thereafter. After centrifuging the samples at a high speed, adding isopropanol, and pipetting, the tube contents were transferred to Spin column DynaBio Blood/Tissue Genomic DNA Extraction Kit (Iran). Next, DNA extraction was carried out in accordance with the manufacturer's instructions.

Detection and identification of *Leishmania* species

The fragment kDNA was amplified in a two-step. sequences of the used primers are demonstrated in table 1.

The first PCR recruited CSB2XF and CSB2XR primers and the second PCR used primers 13ZF and LIR (11,12).

The first PCR reaction mixture contained 250 µM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 1.5 µM MgCl₂, 1 U Taq polymerase, 1 µM CSB2XF primer (forward), 1 µM CSB2XR primer (reverse) and 5 µL DNA in a final volume of 25 µL.

The reaction mixtures were incubated in a thermocycler (Flexcycler2, Germany) as follows: initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 59°C for 55 seconds and 72°C for 60 seconds and final extension at 72°C for 5 minutes. The PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel.

Table 1. Primers used for defining the species of *leishmania* in Nested-PCR and their sequences

PCR step	Target	Primer name	Sequence
First step	kDNA	CSB2XF	5`CGAGTAGCAGAACTCCCGTTA3`
		CSB2XR	5`ATTTTTTCGCGATTTTCGAGAACG3`
Second step	kDNA	13ZF	5`ACTGGGGTTGGTAAATAG3`
		LIR	5`TCGAGAACGCCCT3`

The first-PCR product (2 μ L of a 1:5 dilution in ddH₂O) was used as template for the second PCR, in a total volume of 25 μ L and in the same status the first PCR but using 13ZF and LIR as the primers in 30 cycles.

The band size was 570 and 750 bp for *L. major* and *L. tropica*, respectively. Positive control (Accession Number: *L. tropica* (HM234012), *L. major* (KF701191) (13,14).

Statistical analysis

After recording of data, all information and test results, using SPSS version 22 software with descriptive statistics and chi-square test with confidence interval (CI 95%) was analyzed.

$P_v \leq 0.05$ was considered statistically significant. The Cohen's kappa coefficient (κ) was used to obtain agreement between the tests.

This study was approved by the Zahedan University of Medical Sciences Ethics Committee (Date:22.02.2017 and No: IR. ZUMS.REC.1396.119).

RESULTS

Of the 76 suspected cutaneous leishmaniasis samples in the course of a year, leishman bodies were identified inside or outside of the macrophages of 43 samples (56.6%). (Fig 2 and Table 5).

Moreover, of the smear samples collected from Mirjaveh City with PCR assays, 27 samples were diagnosed with *Leishmania major* and 4 were diagnosed with *Leishmania tropica*. Of the 19 samples collected from Reg-e Malek, 17 and 2 samples had *Leishmania major* and *Leishmania tropica*, respectively. It should also be noted that 7 samples could not be diagnosed parasitological, but 7 samples diagnosed molecularly. Figure 3 shows the electrophoresis gel product PCR *Leishmania* isolates with positive and negative control samples using the Nested-PCR method.

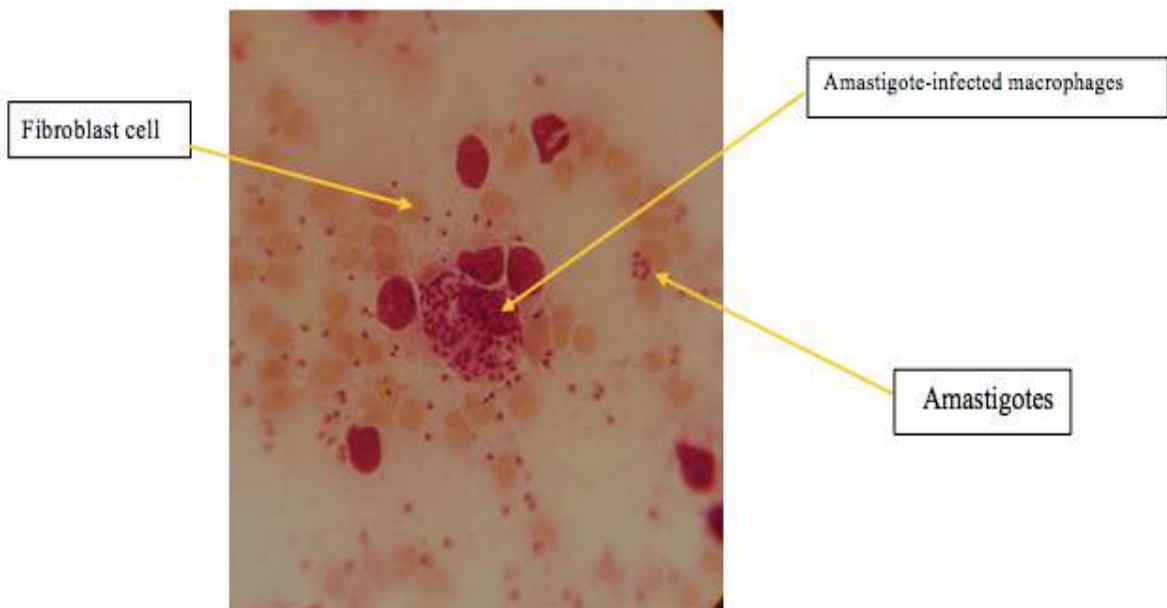


Figure 2. Leishman body (Amastigotes) of cutaneous leishmaniasis cases observed in prepared samples

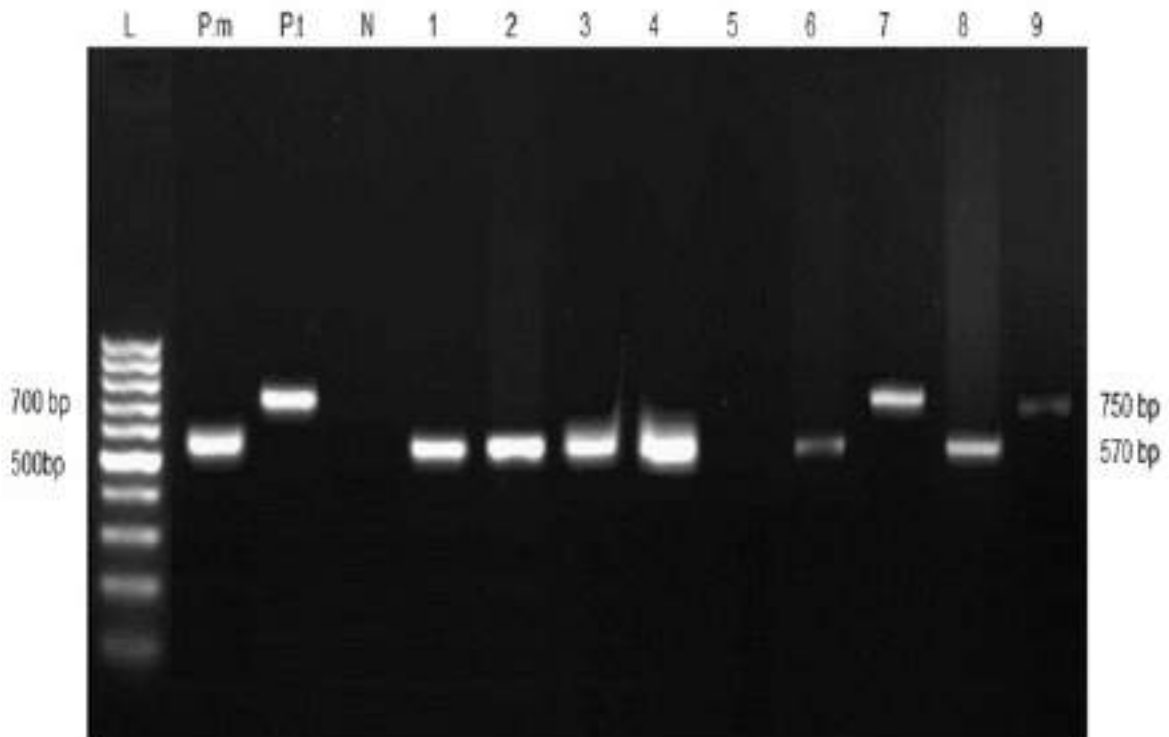


Figure 3. Gel electrophoresis of PCR products of *leishmania* isolates using Nested-PCR technique. 100 bp Size Marker (L), Positive Control *L. major* (P.m), Positive Control *L. tropica* (Pt). Negative Control (N), Patients with *L. major* (1, 2, 3, 4, 6, 8), Patients with *L. tropica* (7,9)

In this study, 39 samples were collected from men (33 (66%) *Leishmania major* and 6 (12%) *Leishmania tropica*, while 11 samples were collected from women (11 (22%) *Leishmania major*. *Leishmania tropica* was not present in the female samples. The frequencies of the *Leishmania* species are classified in Table 2 and Table 3 by location and the number of lesions in the suspected samples. Due to the fact that from each person suspected of cutaneous leishmaniasis, 3 to 4 samples were prepared from different location of lesions and all dry smears were used for parasitological testing and DNA extraction, this method automatically increased the sensitivity of the tests.

The agreement between the results of the molecular method and the parasitology method in the samples in Mirjaveh and Reg-e Malek was (Kappa=0.8) compelling agreement. There was a significant difference between the results of molecular with the parasitologic results obtained in the samples of cutaneous leishmaniasis in the city of Mirjaveh and the Reg-e Malek $P \leq 0.05$. (Table 4)

No significant difference was found between the percentage's species of cutaneous leishmaniasis in Mirjaveh and Reg-e Malek. Also, there was no significant difference in the distribution of species of cutaneous leishmaniasis in the two regions in males and females $P \geq 0.05$. (Table 5).

Table 2. The frequency of *Leishmania* species according to the location of lesions in the cutaneous leishmaniasis cases

<i>Leishmania species</i>	Place of lesion				
	Hand & Foot n (%)	Face n (%)	Nose n (%)	Hand, Foot, Face n (%)	Samples from other parts of body n (%)
<i>L. major</i>	12 (24)	10 (20)	2 (4)	2 (4)	18 (36)
<i>L. tropica</i>	3 (6)	0 (0)	0 (0)	3 (6)	0 (0)
Total	15 (30)	10 (20)	2 (4)	5 (10)	18 (36)

*n: number

Table 3. The frequency of *Leishmania* species according to the number of lesions in the cutaneous leishmaniasis cases

<i>Leishmania species</i>	Number of lesions						
	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	4 n (%)	5 n (%)	6 n (%)	7 n (%)
<i>L. major</i>	15 (30)	12 (24)	6 (12)	4 (8)	4 (8)	0 (0)	3 (6)
<i>L. tropica</i>	3 (6)	2 (4)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	18 (36)	14 (28)	7 (14)	4 (8)	4 (8)	0 (0)	3 (6)

*n: number

Table 4. The agreement rate (Kappa) of the molecular test results by PCR with parasitology method in the samples studied

Diagnostic techniques	PCR		Total	Kappa	Pv
	Positive n (%)	Negative n (%)			
Parasitology	Pos	43 (100)	43	0.808	0.001
	Neg	7 (21.2)	33		
Total		50 (65.8)	76		

*n: number

Table 5. Frequency of *Leishmania* species based on sex and area of study

<i>Leishmania species</i>	Gender		Place	
	Male n (%)	Female n (%)	Mirjaveh n (%)	Reg-e Malek n (%)
<i>L. major</i>	33 (84.6)	11 (100)	27 (85.2)	17 (89.5)
<i>L. tropica</i>	6 (15.4)	0 (0.0)	4 (14.8)	2 (10.5)
Pv		0.516		0.341

*n: number

DISCUSSION

The kDNA of trypanosomatids comprises of catenated molecules minicircle and maxicircle (15). Each minicircle has one to four (150-200 bp) conserved regions which includes repeating regions for both strands, and a variable region usually is a single guide RNA (gRNA) gene (almost 150 bp long), and can be used for detection and exact difference between *Leishmania* species and between strains (16).

Cutaneous leishmaniasis is one of the chief health and medical problems in the deprived areas of Iran. Unfortunately, it has adversely affected the mental, physical, and material dimensions of the patients' lives. Hence, the timely diagnosis and treatment of this disease are vital (17).

The diagnosis of cutaneous leishmaniasis through parasitologic methods such as microscopic tests, direct observation of leishman bodies, and culturing the margins of ulcers have low sensitivity and only determine the parasite genus (18). Therefore, these methods are incapable of identifying the pathogen species. In addition, serologic tests fail to differentiate between the new infections and the old infections because the antibody produced for *leishmania* parasite interferes with the antibodies of trypanosomiasis, tuberculosis, and toxoplasmosis (19).

In recent decades, several molecular methods for the epidemiologic analysis of leishmaniasis have been proposed. PCR technology has been successfully employed in these studies. This technology diagnoses species-specific infections without culturing (18).

According to the findings from different studies, PCR method, which functions using the kDNA gene of *Leishmania* parasite, shows sensitivity in the diagnosis of diseases, especially chronic diseases. Moreover, the kDNA gene is preferred over the ITS1 gene for the diagnosis of *Leishmania* parasite and it can serve as an effective molecular marker for the diagnosis of different *Leishmania* species (20,21).

Hence, the kDNA gene was used in the present study.

This study aimed for the identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in Mirjaveh City and Reg-e Malek. It was concluded that the *Leishmania major* was the prevalent species of *Leishmania* and the number of men suffering from cutaneous leishmaniasis was higher than women. This finding could be attributed to the stronger presence of men in open environments, the fewer pieces of clothing worn by men, the stronger presence of men in the deserted areas, and higher exposure of men to mosquitos.

As regards the number of lesions, 36%, 28%, and 36% of the patients had only one lesion, two lesions, and more than one lesion, respectively. As for the lesion location, 30%, 20%, and 10% of the patients had lesions on their feet/hands, face, and face/feet/hands, respectively. Besides, 40% of the patients had lesions on other parts of their bodies. Hence, it is concluded that the aforesaid organs are among the uncovered parts of the body that are subjected to bloodsucking vectors.

There was a significant difference between the molecular and parasitological findings in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the present study. Considering the importance of detecting negative cases in the diagnosis of the disease, and detecting negative cases of illness can release of people from taking drugs and wasting time and money. Therefore, molecular methods based on functional sequence gene in diagnosis can be a great step in the treatment of disease.

In the present study, no significant differences were found between the results of cutaneous leishmaniasis and the two studied regions and sex. the study area and sex factor were not significantly associated with the infecting *Leishmania* species because samples size was inadequate. On the other hand, the frequency of *Leishmania tropica* was expected to be higher depending on the

region, but this study showed different results.

The findings from the studies by Omidian in Ahwaz (South West Iran) and Yaghubi Ershadi in Yazd) central of Iran), who carried out direct and PCR tests, suggest that these areas are the centers of zoonotic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (22, 23). According to the study by Naseri in Torbat Heydariyeh (Northeast of Iran), The most identified species (*Leishmania tropica*) were using molecular tests (24). Also, Saad Abadi conducted a study in Neishabour City to identify different species of *Leishmania* parasite using the RAPD-PCR technique and reported the presence of *Leishmania tropica* in all samples (25). The results of this study are not consistent with our study with the frequency of *Leishmania major*.

Moreover, in Yaman, Mahdi identified the leishmania species in patients suffering from cutaneous leishmaniasis using the nested PCR method and the ITS-1 gene. Their findings revealed the presence of *Leishmania tropica* in 16 samples (26).

Molecular differentiation in cutaneous leishmaniasis plays an important role in the treatment of patients because the treatment of these people does not depend only on direct examination and clinical signs, and the results of such studies help the process of treatment and control of the disease (27).

A comparative analysis with six different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis showed that sensitivity of different gene targets from highest to lowest is in the order of kDNA-PCR > SSU rRNA-PCR > ITS2-PCR > ITS1-PCR > ME-PCR > HSP70-PCR (28). The results of

this study emphasize the high sensitivity of the kDNA gene target and the kDNA genomic region is the most sensitive for routine diagnosis of leishmaniasis.

The kDNA-PCR method for detect American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Brazil showed that 87.5% diagnosis with this method, while the other methods demonstrated the following percentages of positivity: 62.8% for the Montenegro skin test, 61.8% for parasitology techniques, and 19.3% for in vitro culture (29).

Therefore, the results of the present study do not comply with the findings from the three aforesaid studies with respect to the prevalence of the *Leishmania* species. The prevalence of different *Leishmania* species in different parts of the world is determined by numerous factors such as weather differences, ecological conditions, life style changes, trips, uncontrolled immigration, and the large population of the war refugees.

CONCLUSION

Considering the importance of identifying the parasite species for the epidemiologic analysis of the disease and formulation of control plans, molecular methods are highly sensitive to the parasitologic techniques, especially the microscopic method, in the diagnosis phase. also kDNA-PCR have high sensitivity for diagnosis of cutaneous leishmaniasis (*Leishmania tropica* and *Leishmania major*) because can be used for detection and exact difference between *Leishmania* species and between strains.

ACKNOWLEDGMENT

* This study was financially supported by Zahedan University of Medical Sciences for the financial support (Grant no: 8294) (Thesis code: T/792). This project is from Dr. Farzaneh Gorgani's (infectious specialist student) thesis.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study was approved by the Zahedan University of Medical Sciences Ethics Committee (Date:22.02.2017 and No: IR.ZUMS.REC.1396.119).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Karami M, Doudi M, Setorki M. Assessing epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. *J Vector Dis.*2013; (50): 30-8.
2. Mohebali M, Javadian E, Yaghoobi Ershadi M, Akhavan A, Hajjarian H, Abaei M. Characterization of Leishmania infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. *Health J.*2004; (10): 591-9.
3. Alvar J, Velez I, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one.* 2012; (7): 1-12.
4. Mahmoodi MR, Tavakkol Afshari J, Taghae Shakeri M, Panah Y, Javad M. Molecular identification of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2010; (3): 195-200.
5. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; (8): 419-33.

6. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet P. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008; (2)1: 334-59.
7. Van der Auwera G, Dujardin JC. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:265-94.
8. Lopez M, Inga R, Cangalya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; (49): 348-56.
9. Abdolmajid F, Ghodrattollah SS, Hushang R, Mojtaba MB, Ali MM, Abdolghayoum M, et al. Identification of *Leishmania* species by kinetoplast DNA-polymerase chain reaction for the first time in Khaf district, Khorasan-e-Razavi province, Iran *Trop Parasitol.* 2015;5:50-4.
10. Shahraki F, Esmaelnejad M, Karimiyan Bostani M. Determining the climate calendar of tourism in Sistan-Baluchestan province, Iran. *Rom Rev Reg Stud.* 2014; (2): 87-94.
11. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol.* 1990; (71): 267-75.
12. Noyes H, Chance M, Ponce C, Ponce E, Maingon R. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Exp Parasitol.* 1997; (85): 264-73.
13. Ghasemloo H, Rasti S, Delavari M, Doroodgar A. Molecular diagnosis of clinical isolates of cutaneous leishmaniasis using ITS1 and KDNA genes and genetic polymorphism of *Leishmania* in Kashan, Iran. *Pak J Biol Sci.* 2016; (19): 136-42.
14. Sarkari B, Ahmadpour NB, Moshfe A, Hajjaran H. Molecular evaluation of a case of visceral leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in Southwestern Iran. *Iran J Parasitol.* 2016; (11):126-32.
15. Yurchenko V, Merzlyak E, Kolesnikov A, Martinkina L, Vengerov Y. Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. *J Clin Microbiol.* 1999; (37): 1656-7.
16. Akhouni M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A. *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med.* 2017; (57): 1-29.
17. Nekouie H, Assmar M, Razavi M, Naddaf S. A study on *Leishmania* infection rate among *Phlebotomus* spp. collected from Abardejh district, Iran. *Iran J Vet Res.* 2006; (7): 77-81.
18. Lopez M, Inga R, Cangalya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; (49) :348-56.
19. Rohousova I, Ozensoy S, Ozbel Y, Volf P. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitol.* 2005; (130): 493-9.
20. Fakhar M, Mikaeili F, Hatam G, Habibi P, Karamian M, Motazedian M. A molecular epidemiology survey of cutaneous leishmaniasis in patient referring to parasitology lab at shiraz school of medicine and the importance of PCR assay. *Med J I.R.* 2010; (1): 1-5.
21. Pourmohammadi B, Motazedian M, Hatam G, Kalantari M, Habibi P, Sarkari B. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Iran J Parasitol.* 2010; (5):1-10.
22. Omidian M, Khosravi AD, Nazari M, Rashidi A. The comparison of histopathological findings and polymerase chain reaction in lesions with primary clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis with negative smear. *Pak J Biol Sci.* 2008; (24): 96-100.
23. Yaghoobi-Ershadi MR, Jafari R, Hanafi-Bojd AA. A new epidemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Ann Saudi Med.* 2004; (24) :98-105.

24. Naseri A, Fata A, Rezai A, Hedayatimoghadam M, Berengi F, Akbarzadeh O. Molecular identification of leishmania species in Torbat-e Heydarieh, Khorasan Razavi province, Iran. *Int J Med Res Health Sci.* 2016; (5): 87-92.
25. Saadabadi F, Mohajery M, Poostchi E, Shamsian SAA. Identification of *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in Kharve, Iran. *Rep Biochem Mol Biol.* 2013; (1): 69-72.
26. Mahdi MA, Al-Mekhlafi HM, Al-Mekhlafi AM, Lim YA, Shuaib NOB, Azazy AA. Molecular characterization of *Leishmania* species isolated from cutaneous leishmaniasis in Yemen. *PloS one.* 2010; (5): 28-39.
27. Rodrigues EH, Soares FC, Werkhäuser RP, de Brito ME, Fernandes O, Abath FG, et al. The compositional landscape of minicircle sequences isolated from active lesions and scars of American cutaneous leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2013;6:228.
28. Koltas IS, Eroglu F, Uzun S, Alabaz D. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2016;164:43-8.
29. Marcela M.S, Edite H.Y, Mussya C, Luiza K.O, Rita C., Paulo C. C, José Angelo L. applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of american tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Rev Inst Med Trop.* 2013; 55(6):393-9.

Prenatal ve emzirme döneminde maruz kalınan tiamin eksikliğinin yetişkinlikte davranış, öğrenme ve hafızaya etkileri

Effects of thiamine deficiency exposed during prenatal and lactation on behaviour, learning and memory in adulthood

Betül DANIŞMAN¹ (ID), Güven AKÇAY² (ID), Deniz KANTAR GÖK³ (ID)

ÖZET

Amaç: Tiamin (B1 vitamini), özellikle mitokondride yer alan birçok enzim için kofaktör görevi gören temel bir besindir. Tiamine bağlı bazı enzimler, enerji metabolizmasına ve nükleik asitlerin biyosentezine katılırken bazıları antioksidan mekanizmanın bir parçası olarak görev yapar. Beyin, mitokondriyal ATP üretimine yüksek oranda bağımlı olduğu için tiamin eksikliğine (TE) karşı oldukça savunmasızdır. Hızlı büyümenin gerçekleştiği prenatal ve çocukluk dönemlerinde bu etki daha belirgindir. Bu çalışmada prenatal ve emzirme döneminde TE oluşturulan sıçanların yetişkinlik dönemindeki davranış değişiklikleri incelenmiştir.

Yöntem: Çalışmada sıçanlar anneleri normal diyetle beslenen grup (NN) ve anneleri doğum öncesi ve emzirme süresince tiamin eksik diyetle beslenen grup (TN) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Yetişkinlik döneminde sıçanlara Açık Alan testi, Yükseltilmiş Artı Labirent testi ve Yeni Obje Tanıma testleri uygulanmıştır.

Bulgular: Tiamin eksikliği oluşturulan TN grubunda açık alan testinde girilen kare sayısının ve dış kadranda

ABSTRACT

Objective: Thiamine (vitamin B1) is an essential nutrient that acts as a cofactor for many enzymes, especially in the mitochondria. Some thiamine-linked enzymes participate in energy metabolism and the biosynthesis of nucleic acids, while others act as part of the antioxidant mechanism. As the brain is heavily dependent on mitochondrial ATP production, it is highly vulnerable to thiamine deficiency (TD). This effect is more pronounced in prenatal and childhood periods when rapid growth occurs. In this study, behavioral changes in adulthood of TD-induced rats during prenatal and lactation periods were investigated.

Methods: In the study, rats were divided into two groups as the group whose mothers were fed a normal diet (NN) and the mothers were fed with thiamine deficient diet (TN) during prenatal and lactation periods. Open Field test, Elevated Plus Maze test and New Object Recognition tests were applied to rats in adulthood.

Results: In the thiamine deficient TN group, it was observed that the number of frames entered in the

¹Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik AD., Erzurum

²Hittit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik AD., Çorum

³Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik AD., Antalya



İletişim / Corresponding Author : Betül DANIŞMAN

Kültür Mahallesi, 3805 Sokak, Durukent Sitesi G Blok Kat 8 Daire 25 Antalya- Türkiye

E-posta / E-mail : brrhd02@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 25.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 05.10.2021

geçirilen süre oranının arttığı görülmüştür. Ayrıca TN grubunda yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen süre oranı düşmüştür. Yeni obje tanıma testinde ise ayırım indeksinin TN grubunda azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda prenatal ve emzirme dönemlerindeki TE maruziyetinin uzun dönemde etkilerinin devam edebileceği ve ileriki yaşlarda davranış, öğrenme ve hafıza bozukluklarına sebep olabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Sıçan, öğrenme ve hafıza, davranış, tiamin eksikliği

open field test and the rate of time spent in the outer quadrant increased. In addition, in the elevated plus maze test, the ratio of time spent in the open arm in the TN group was decreased. In the new object recognition test, it was determined that the discrimination index was decreased in the TN group.

Conclusion: In our study, it was observed that the effects of TD during prenatal and lactation periods can continue in the long term and cause behavioral, learning and memory deficits in the later ages.

Key Words: Rat, learning and memory, behavior, thiamine deficiency

GİRİŞ

Davranışların şekillenmesi genetik ve çevresel faktörlerle düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Eğitim, deneyim gibi beslenme de davranışların oluşmasındaki çevresel süreçlerden biridir. Doğum öncesi ve doğumdan sonraki süreçte besin eksikliğinin bilişsel gelişim ve davranışlar üzerindeki etkilerini araştıran pek çok çalışma yapılmış, bu dönemdeki besin eksikliklerinin birçok metabolik ve yapısal işlevleri değiştirerek, beyin gelişimini ve fonksiyonunu olumsuz etkilediği gösterilmiştir (1). Örneğin yetersiz besin alan çocuklarda dikkatsizlik ve kaygının arttığı, ayrıca halüsinasyon gibi psikotik bulguların ortaya çıktığı görülmüştür (2). Bu durumların ileriki yaşamlarında davranışsal, bilişsel ve motor gelişim için risk oluşturabileceği belirtilmiştir. Besin eksikliklerinin önlenmesi için bu erken döneme odaklanmak bireylere ve toplumlara uzun vadeli ve yaygın faydalar sağlamaktadır.

Vitaminler yaşamın devamlılığı ve beyin gelişimi için mutlak gerekli maddelerdir (3). Çoğunlukla vücutta sentezlenemez ve besinlerle dışarıdan alınmak zorundadırlar (3). Normal büyüme ve

doku gelişimi için temel bir vitamin olan tiamin (B1 vitamini) suda çözünebilir, kükürt içeren B vitamini ailesine ait bir vitamindir. Tiamin endojen olarak sentezlenmediği için mevcut tek kaynağı besinlerdir. Vücudun tiamini 30 mg'dan daha fazla depolayamadığı ve yarılanma ömrünün 9-18 gün olduğu bilinmektedir (4). Günlük tüketilen yaklaşık 2.000 kcal için alınması gereken minimum tiamin miktarı 0,66 mg olarak hesaplanmıştır (1). Hamilelik veya emzirme döneminde bu gereksinim 1,4 mg/gün'e kadar çıkmaktadır (4). Gebelik süresince tiamin ihtiyacının arttığı ve aşırı kusmanın tiamin eksikliği (TE)'ne neden olabileceği bilinmektedir (5). Çocuklarda ise gereksinim yaşa bağlıdır ve doğumdan ilk altı aya kadar 0,2 mg, 6 aylıktan 8 yaşa kadar ise 0,6 mg arasında değişir (6).

TE genellikle gözden kaçan fakat önemli bir konudur. Yeterli tiamin seviyeleri ile desteklenmeyen, basit karbonhidratlar şeklinde işlenmiş gıda tüketiminin artması "yüksek kalorili yetersiz beslenme" olarak adlandırılmıştır (7). Gelişmekte olan ülkelerde yüksek beyaz pirinç tüketimi oranları nedeniyle TE yaygın endişe kaynağıdır (6). Evde ezme tekniklerinin yerini endüstriyel pirinç öğütme ve

işlemeye bıraktıkça, kepek içindeki temel besinler (tiamin gibi) azalmaktadır (8). Asya ülkeleri, dünya çapında üretilen pirincin yaklaşık %90'ını tüketerek günlük enerji ihtiyacının tahmini %60'ını karşılar ve sonuç olarak TE ergen popülasyonun %15'inde TE yaygın hale gelmiştir (9). TE, ısı veya kükürt dioksit ile tiamin inaktivasyonu gerçekleşmiş besinlerin alınmasıyla da artabilir (10). Ayrıca kafein açısından zengin yiyeceklerin (kahve, çikolata veya çay gibi) yoğun tüketimi tiamini etkisiz hale getirebilir ve böylece TE oluşabilir (11, 12). Yaşlanma, ekonomik durum, yeme bozuklukları, ebeveyn beslenmesi ve alkol kullanımı tiamin yetersizliğini artıran diğer faktörler arasındadır (3). Emzirme, gebelik ve artan fiziksel aktivite sırasında tiamin ihtiyacının arttığı ve bu ihtiyacın karşılanması gerektiği bildirilmiştir (9). Asemptomatik annelerin emzirme dönemindeki bebeklerinde beriberi gelişme riski artmaktadır (9).

TE'nin kalp, kas, gastrointestinal ve sinir sistemi dâhil olmak üzere birçok organ sisteminde kalıcı hasara neden olabileceği bildirilmiştir (13). Tiaminin beyin biyokimyasında ve zar yapısında birçok hayati işlevi vardır (14). Tiamine bağlı enzimlerin aracılık ettiği enerji metabolizması ve antioksidan sistemi sebebiyle beyin dokusu TE'ye oldukça duyarlıdır (4, 11). Tiamin, sinaptik iletim için gerekli olan aksoplazmik ve sinaptozomal membranlarda da birçok yapısal role sahiptir (14). Metabolik olarak aktif formu olan tiamin pirofosfatın sodyum klorür kanallarının geçirgenliğinde modülatör olarak davranarak membran uyarılabilirliğini değiştirebileceği ve sinir iletiminde rol oynayabileceği bildirilmiştir (3, 13). Ayrıca tiaminin sinaptozom salınımını artırarak sinaptik iletimi kolaylaştırdığı ve eksikliğinin nöronal hasara sebep olabileceği gösterilmiştir (8, 15-17).

TE çocuklarda iştahsızlık, sinirlilik, kas ağrısı, azalmış veya tamamen kaybolmuş derin tendon refleksleri, ataksi, felç ve değişen bilinç düzeyi gibi birçok çeşitli nörolojik belirtilerle ortaya çıkabilir. Duygu-durum değişiklikleri (ajitasyon, kafa karışıklığı ve genel halsizlik) gibi diğer belirtiler, beyinin enerji eksikliği ve nörotransmitter (glutamat, GABA gibi)

sentezindeki değişimden kaynaklanabilir (18). Bu gibi klinik durumlar göz önüne alındığında, özellikle çocuklarda, açıklanamayan herhangi bir ciddi nörolojik belirti veya semptom, TE şüphesini artırmalıdır.

TE diyet ile beslenen veya bir tiamin antagonisti olan piritiamin (PTD) enjeksiyonu veya her ikisinin kombinasyonu yoluyla indüklenen TE sıçan modelleri kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır (19, 20). Sonuç olarak TE olan sıçanların, anormal davranışlar gösterdiği görülmüştür. Örneğin, diyetle indüklenen TE sıçanlarının, fare öldürme davranışı sergilediği bulunmuştur (21). PTD enjeksiyonu yapılmış sıçanlarda ise, beyin bölgelerindeki nöron kaybı ile ilişkili olarak bilişsel ve uzaysal hafıza bozulmuştur (22). Sıçanlarda TE diyet uygulaması sonrası kaçınma testi öğrenme performansları bozulmuştur (23).

Bu bilgiler göz önüne alındığında, prenatal ve emzirme döneminde TE'nin beyin gelişimi ve davranışlar üzerinde uzun vadeli sonuçlara sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, yavru sıçanlarda TE maruziyetinin ileriki yaşlarda motor fonksiyon, anksiyete, öğrenme ve hafıza üzerine etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Tiamin Eksikliği Modeli

Her grup için 4 Wistar sıçan anne alınarak deneye başlanmış ve anneler hamile kaldıkları günden itibaren ayrı kafeslere alınmışlardır. İki anne hamilelik ve emzirme döneminde TE diyet ile beslenirken diğer iki anne normal diyetle beslenmiştir. Anne sıçanlar ortalama 23 günde (20-28 gün aralığında) doğum yapmıştır. Her grupta 10 yavru olmak üzere toplam 20 yavru ile deneylere başlanmıştır. Yavrular üç aylık olduklarında davranış deneylerine alınmışlardır. Bu süreçte hayvanlar ortalama $23\pm 1^\circ\text{C}$ ısıda ve her kafeste beş hayvan olacak şekilde 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüsünde tutulmuştur. Çalışmada kullanılan TE olan diyet Test-Diet® şirketinden satın alınmıştır. Deneyler 9:00 ile 17:00 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Grup NN: Tüm süreç boyunca hem anneler hem de yavrular normal diyet ile beslenmiştir. Yavrular süttten kesildikten sonra anneler çalışmadan çıkartılmıştır.

Grup TN: Anneler doğumdan önce ve emzirme döneminde TE olan diyet ile beslenmiştir ayrıca yavrular 21 günlük emzirme süresi boyunca TE diyet almıştır. Yavrular süttten kesildikten sonra normal yem ile beslenmiştir ve anneler çalışmadan çıkartılmıştır.

Davranış deneylerinin kayıtları için Ethovision XT (Noldus, 2009, Hollanda) video izleme sistemi kullanılmıştır.

Açık Alan Testi

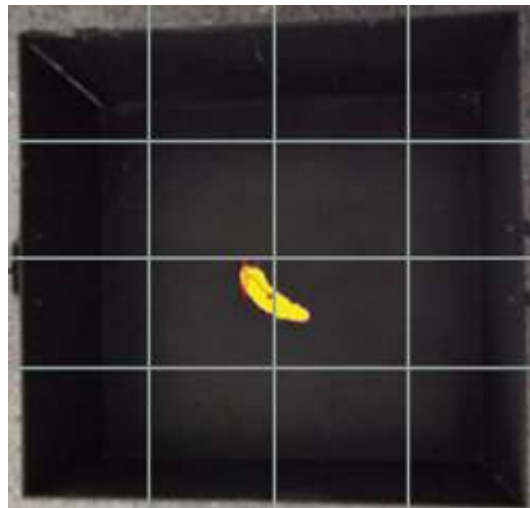
Açık alan deneyleri duvar yüksekliği 40 cm olan, tabanı 80x80 cm ebatlarında kare şeklindeki siyah mat tabanlı düzenekte yapılmıştır. Deney düzeneği 16 küçük kareye bölünmüştür (Şekil 1). Deneyin başlangıcında sıçanlar tek tek bu alanın merkezine bırakılarak, 5 dk boyunca hareketleri video kayıt sistemi ile dijital olarak kaydedilmiştir. Her sıçan için kat edilen toplam mesafe, ortalama hız, girilen kare sayısı ve dış kadranda geçirilen süre oranı yüzde (%) olarak ifade edilmiştir (24).

Yeni Obje Tanıma Testi

Sıçanların görsel tanıma belleğini test eden bu yöntem duvar yüksekliği 40 cm olan, tabanı 40x40 cm

ebatlarında kare şeklinde siyah mat tabanlı açık alan düzeneğinde yapılmıştır. Deneyde kullanılan nesnelere cam yapıda olup, tabana deney hayvanının hareket ettiremeyeceği şekilde sabitlenmiştir (Şekil 2). İlk aşamada sıçanlar 3 dk boyunca açık alan düzeneğine tek tek konularak ortama alışmaları sağlanmıştır. Ortama alışan hayvanlar, iki adet birbiri ile özdeş olan objelerin (A+A) yerleştirildiği düzeneğin içine, 5 dk boyunca nesnelere araştırılmaları için bırakılmıştır. İlk deneyden 24 saat sonra yapılan test aşamasında, nesnelere biri şekil ve boyutları farklı başka bir nesneyle değiştirilmiş ve sıçanların 3 dk boyunca yeni ve tanıdık nesneyi keşfetmeleri için geçirdikleri zaman kaydedilmiş, mekânsal olmayan belleğin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Hayvanların nesnelere 1 cm'den daha fazla yaklaşması, nesnenin keşfedilmesi için harcanan zaman olarak kaydedilip, yazılım programında ölçülebilmesi için hayvanın burnu referans olarak alınmıştır (25). Sıçanların yeni nesneyi tanıdık nesneden ne kadar iyi ayırabildiğinin bir ölçüsü olarak kabul edilen ayırım indeksi hesaplanmıştır.

$$\text{Ayırım indeksi} = \frac{(\text{Yeni nesnede geçirilen süre} + \text{Tanıdık nesnede geçirilen süre})}{(\text{Yeni nesnede geçirilen süre} + \text{Tanıdık nesnede geçirilen süre})}$$



Şekil 1. Açık Alan Testi Deneyi Protokolü



Şekil 2. Yeni Objeye Tanıma Protokolü

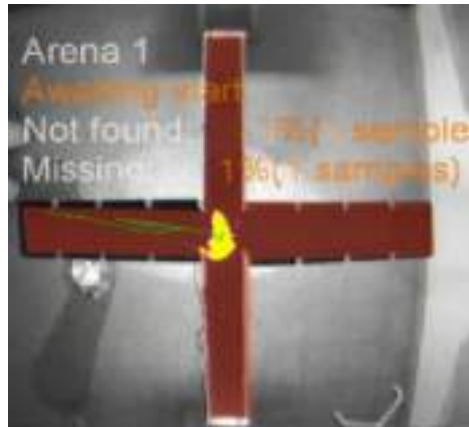
Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yükseltilmiş artı labirent (YAL) testi kemirgenlerde anksiyete ile ilişkili davranışları belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir testtir. YAL testi yerden yüksekliği 40 cm olan artı şeklinde, kol genişliği ve uzunluğu sırasıyla 10 cm ve 50 cm olan, duvar yüksekliği 30 cm olan iki kolu duvarlarla çevrili, diğer iki kolun ise tamamen açık olduğu siyah mat zeminli "+" şeklinde bir düzenekte yapılmıştır (Şekil 3). Her sıçan kolların birleşme noktası olan merkeze bırakılmış ve hareketleri 5 dakika boyunca kaydedilmiştir. Açık ve kapalı kollarda geçirilen zaman ölçülmüş, açık kolda geçirilen oran değerlendirilmiştir (24).

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada verilerin istatistiksel analizi için SPSS

(SPSS for Windows, sürüm 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL) yazılımı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirilmiş ve $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir. Tanımlayıcı istatistik olarak median, maksimum değer, minimum değer, ortalama ve standart sapma kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede bulunmadan önce verilerin normallik sınaması için Kolmogorov-Smirnov testi ve homojenlik için Levene testi yapılmıştır. Parametrik test varsayımları sağlandığında davranış verileri arasındaki anlamlılığın değerlendirilmesi için Independent Samples T Testi, non parametrik koşullarda ise Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar parametrik koşullarda ortalama±standart hata olarak verilmiş, non parametrik koşullarda ise median (minimum-maksimum) değerleri kullanılmıştır.



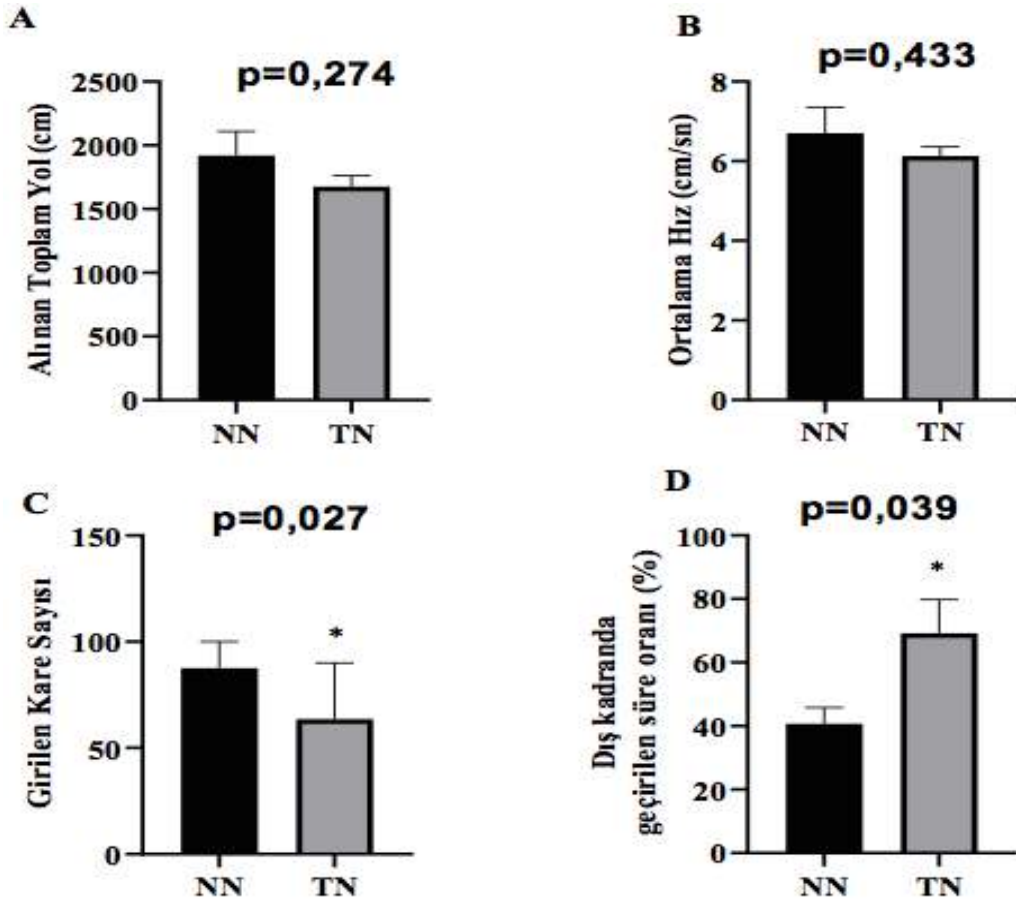
Şekil 3. Yükseltilmiş Artı Labirent Protokolü

Bu çalışma için Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Tarih:29.08.2016 ve Karar No: 71).

BULGULAR

Kemirgenlerde lokomotor aktiviteyi ve anksiyete benzeri davranışları ölçmek için en sık kullanılan testlerden biri olan açık alan testi yapılmıştır. Açık alan testinde lokomotor aktivite için kat edilen toplam mesafe (cm), anksiyete benzeri davranış

için ise dış (çevre) ve iç (merkez) alanda geçirilen zaman ölçülmüştür. Veriler incelendiğinde NN ve TN gruplarında alınan toplam yol (sırasıyla 1920 ±190,82 cm ve 1677,42±83,74 cm) (Şekil 4A) ve ortalama hız (sırasıyla 6,75±0,65 cm/sn ve 6,13±0,66 cm/sn) (Şekil 4B) verilerinde TN grubunda azalma gözlemlenirken istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (sırasıyla $p=0,274$ ve $p=0,433$). TN grubunda (64,88(51,00-90,00)) girilen kare sayısının NN grubuna ((83,16 (51,00-100,00)) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($p=0,027$) (Şekil 4C). Anksiyete parametresi olan dış kadranda



Şekil 4. Deney gruplarının açık alan testi verileri A) Alınan toplam yol (cm), B) Ortalama hız (cm/sn), C) Girilen kare sayısı, D) Dış/iç kadranda geçirilen süre oranı (%). NN ve TN grupları için n=10.

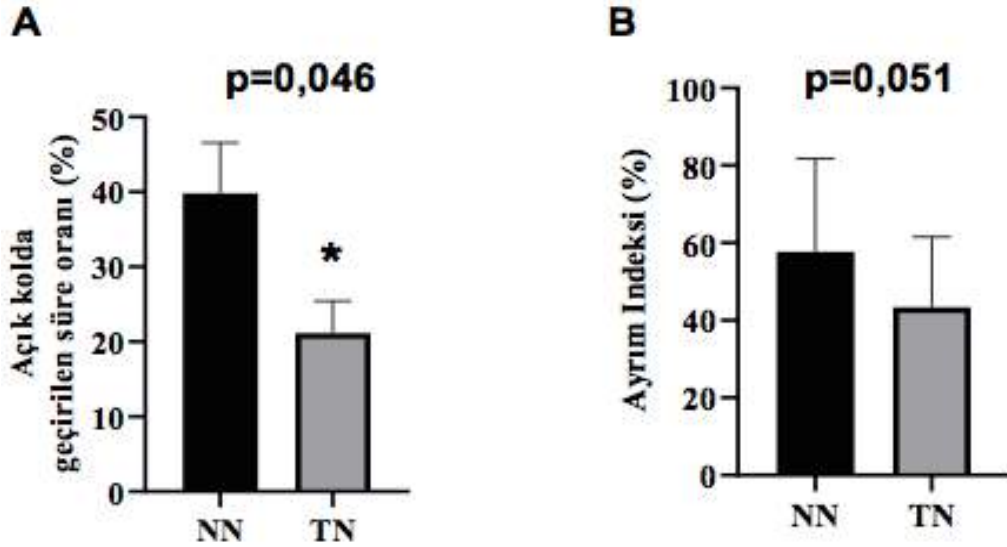
geçirilen süre oranı ise TN grubunda ($69,23 \pm 10,59$) NN grubuna ($40,74 \pm 5,05$) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır ($p=0,039$) (Şekil 4D). Yükseltilmiş artı labirent testinde, TN ($21,14 \pm 4,30$) grubunda NN ($39,79 \pm 6,78$) grubuna göre açık kolda geçirilen süre oranının anlamlı olarak azaldığı

görülmüştür ($p=0,046$) (Şekil 5A). Öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için kullanılan yeni obje tanıma testi sonuçları değerlendirildiğinde ise ayırım indeksinin TN ($43,66(30,02-61,56)$) grubunda NN ($58,71(49,09-81,74)$) grubuna göre sınırdan düştüğü saptanmıştır ($p=0,051$) (Şekil 5B) (Tablo 1).

Tablo 1. Öğrenme Verileri

Grup	NN	TN	t, Z**	p
Alınan Toplam Yol	$1920,15 \pm 190,82$	$1677,42 \pm 83,74$	1,171	0,274
Ortalama Hız (cm/sn)	$6,75 \pm 0,65$	$6,13 \pm 0,66$	0,822	0,433
Girilen Kare Sayısı	83,16 (51,00-100,00)	64,88(51,00-90,00)*	-2,210**	0,027
Dış Kadranda Geçirilen Süre Oranı (%)	$40,74 \pm 5,05$	$69,23 \pm 10,59^*$	-2,429	0,039
Ayırım İndeksi (%)	58,71(49,09-81,74)	43,66(30,02-61,56)	-1,936**	0,051
Açık Kolda Geçirilen Süre Oranı (%)	$39,79 \pm 6,78$	$21,14 \pm 4,30^*$	2,166	0,046

t: Independent T Testi, Z**: Mann Whitney U test, * $p < 0,05$ NN grubuna göre fark



Şekil 5. Deney gruplarının yükseltmiş artı labirent ve yeni obje tanıma testi verileri. A) Açık kolda geçirilen süre oranı, B) Ayırım indeksi (%). NN ve TN grupları için $n=10$.

TARTIŞMA

Tüketilen besinler vücudun metabolik enerji gereksinimini sağlamakla birlikte birçok beyin fonksiyonlarını etkiler. Sağlıklı sinir sistemi gelişimi için gerekli olan besin maddelerin yetersizliği, fiziksel ve zihinsel gelişimleri olumsuz etkileyerek hiperaktivite, huzursuzluk, saldırganlık gibi çok sayıda psikososyal soruna neden olabilmektedir (26). Besin öğelerinin yetersizliği depresif ruh haline yol açtığı gibi bilişsel fonksiyonlarda da bozulmaya sebep olabilir (1, 27).

Tiamin, glikoz, lipidler ve amino asitlerin metabolizması için gerekli olan temel bir vitamindir. Birçok çalışma yetişkinlerde tiamin seviyeleri ile depresyon semptomları arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir (26, 28).

İnsanlarda, TE gıdalardan yetersiz tiamin alımı, düşük emilim, alkol kullanımı veya belirli koşullara bağlı olarak daha yüksek atılım oranlarından kaynaklanabilmektedir. Ciddi derecede tiamin eksikliği olan yeni doğanlarda infantil beriberi gelişme riski yüksektir. Bozukluk, tiamin takviyesi ile kolayca tedavi edilebildiği için gelişmiş ülkelerde nadirdir (29). Ancak, gelişmekte olan ülkelerde TE olan anneler tarafından emzirilen veya TE olan mama ile beslenen bebekler arasında bir endişe olmaya devam etmektedir. Beyin, mitokondriyal ATP üretimine bağımlılığı sebebiyle TE karşı oldukça savunmasızdır (3). Bu durum, yetersiz beslenme ile TE gerçekleşen hızlı büyüme sırasında (yani perinatal dönemler ve çocuklar) daha belirgindir. TE ile ilişkili Wernicke ensefalopatisinden sağ kalan çocuklar (30) şiddetli epilepsi, dil bozukluğu, motor fonksiyon kaybı (değişen derecelerde) ve zeka geriliği (hafiften şiddetliye) dâhil gelişimsel engellerle yaşamaya devam etmektedir (31). Yetişkinlik döneminde de TE'nin farklı yan etkilerinin olduğu görülmüştür. Örneğin 1500'den fazla yaşlı (50-70 yaş) popülasyon üzerinde yapılan bir çalışmada, düşük eritrosit tiamin seviyelerine sahip deneklerin şiddetli depresyon semptomları sergilediğini gösterilmiştir (28). TE

ile majör depresif bozukluğu semptomları arasında doğrudan bir ilişki olduğu, daha önce malnütrisyon öyküsü olan 74 kişiden oluşan popülasyonda ortaya konmuştur (32).

Mevcut bilgiler değerlendirildiğinde çalışmamızda prenatal ve emzirme döneminde TE olan sıçanların ileriki yaşamlarındaki motor aktiviteleri, kaygı düzeyleri, öğrenme ve hafıza performansları araştırılmıştır. Bu sebeple prenatal ve emzirme dönemde TE'ne maruz kalan bireyleri modelleyebilmek için sıçanlar bu süreçlerde TE diyeti ile beslenip, kronik etkileri davranış deneyleri ile incelenmiştir. Lokomotor aktivite, insanlarda kritik bir fizyolojik fonksiyondur. TE nöropatisi olan hastaların sınırlı hareket edebildiği gözlemlenmiştir (3). Ayrıca fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada TE diyeti verildiğinde lokomotor aktivitede azalma görülmüştür (33). Tiamin antagonisti olan amprolium, tek başına yüksek dozda ve uzun süre verildiğinde veya TE diyetiyle kombine edildiğinde farelerin lokomotor aktivitesini azaltmıştır. Modelimizde, tiamin antagonisti eklemeyen sadece TE diyeti kullanılmıştır. Bu yaklaşım, vücuttaki tiamin konsantrasyonunu kademeli olarak azaltarak, daha hafif bir etki yaratmış ve insanlardaki TE durumu için daha iyi bir model oluşturmuştur. Açık alan testinde girilen kare sayısı lokomotor aktivite göstergesi olarak kabul edilmiş ve lokomotor aktivitenin TN grubunda NN grubuna göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde TN grubunda kat edilen toplam mesafe ve ortalama hızdaki azalma lokomotor performansın bozulduğunu göstermiştir. Bu durum, TE'nin lokomotor aktivite üzerindeki olumsuz etkisinin uzun vadede etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmanın bulguları, genç yaşta TE oluşumunun zamanında tedavi edilmediği takdirde ileriki yaşlarda lokomotor eksikliğe yol açabileceğini göstermiştir. Literatürdeki bilgiler çocuklarda TE'nin daha hızlı kendini gösterebildiğini ve vakaların büyük çoğunluğunda, TE olan anneler tarafından emzirilen bebeklerin etkilendiğini vurgulamaktadır. Fattal-Valevski ve ark. TE bulunan gıdaları tüketen

çocuklarda, süt bazlı diyetlerle beslenen cinsiyet ve yaşları aynı olan çocuklara kıyasla dil ve motor gelişim eksikliklerinin olduğunu rapor etmişlerdir (34). TE olan gıdalarla beslenen çocukların akut ve uzun vadeli etkileri üzerine yapılan başka bir çalışmada, hastaların (%36) kalp ve solunum komplikasyonlarından öldüğü ve geri kalan çocukların 9 yaşına kadar zihinsel engel, nörogelişimsel gecikme ve majör motor işlev bozukluğu geliştirdiği bildirilmiştir (31). Ayrıca Harel ve ark., yaşamlarının ilk 24 ayı boyunca 1 aydan fazla TE olan diyete maruz kalan okul öncesi çocukların %50'sinden fazlasının, uygun tiamin alımına sahip çocuklara kıyasla, hareket ve motor beceride zorlandıklarını bildirmişlerdir (35). Bizim verilerimiz bu etkilerin daha uzun vadelerde de kendini gösterebileceği yönündedir.

Tiamin eksikliği, anksiyete bozukluklarında da görülen yorgunluk, iştahsızlık ve bulantı gibi semptomlara neden olmaktadır. 37 günlük TE diyeti ile indüklenen bir TE sıçan modelinde, anksiyete benzeri davranışlar görülmüştür (36). Çalışmamızda prenatal ve emzirme döneminde TE'ne maruz kalan sıçanlarda yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda daha az zaman geçirmeleri ve açık alan testinde dış kadranda geçirdikleri süre oranının artması anksiyete davranışı olarak değerlendirilmiştir. Bu durum TE'nin ileriki yaşlarda hareket performansına benzer şekilde anksiyetik davranışları da tetiklediğini ve uzun süreli bir etkiye sahip olduğunu düşündürmüştür. Son yıllarda, depresyon gibi psikiyatrik bozukluklar dâhil

olmak üzere birçok nörogelişimsel bozukluk için tiamin takviyesi terapötik bir yaklaşım olarak önerilmiştir (3). Örneğin, Ghaleiha ve ark., tiamin eksikliği bulunan majör depresyon hastalarında tiamin takviyesinin etkisini araştırmış ve 6 haftalık tiamin takviyesinin ardından majör depresif bozukluğu olan hastalarda plaseboya kıyasla depresyon semptomlarının önemli ölçüde iyileştiği gözlemlemişlerdir (37).

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda TE ve hafıza bozuklukları arasındaki ilişki olduğu rapor edilmiştir. TE sıçanları pasif kaçınma testinde, Morris su tankı testinde ve T-labirent testinde öğrenmenin bozulmasına sebep olmuştur. Farelerde, hayvanların TE diyeti ile beslendiği dönemde öğrenme ve hafızalarında bozulma gözlenmiş, bu durum TE'nin akut etkisini ortaya çıkarmıştır (38). Çalışmamızda yeni obje tanıma testinde TN grubunun yeni objede geçirdikleri süre oranı azalmış, bu durum TE diyetinin neden olduğu hasarın kalıcı olabileceğini, yetişkinlik döneminde öğrenme ve hafızanın bozulduğunu göstermiş olup, literatürdeki bilgileri destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, prenatal ve emzirme döneminde yetersiz beslenmenin ileriki yaşlarda davranış, öğrenme ve hafıza bozukluklarına sebep olabileceği görülmüştür. Bu sebeple erken döneme odaklanarak oluşabilecek besin eksikliklerinin önlenmesi bireylere ve toplumlara uzun vadeli ve yaygın faydalar sağlayacaktır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:29.08.2016 ve Karar No: 71).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Levitsky DA, Strupp BJ. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *The Journal of nutrition*. 1995;125(suppl_8):2212S-20S.
2. Hoek HW, Susser E, Buck KA, Lumey L. Schizoid personality disorder after prenatal exposure to famine. *The American journal of psychiatry*. 1996.
3. Dhir S, Tarasenko M, Napoli E, Giulivi C. Neurological, psychiatric, and biochemical aspects of thiamine deficiency in children and adults. *Frontiers in psychiatry*. 2019;10:207.
4. Martin PR, Singleton CK, Hiller-Sturmhöfel S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol research & health*. 2003;27(2):134.
5. Gluckman P, Hanson M, Seng CY, Bardsley A. *Nutrition and lifestyle for pregnancy and breastfeeding*: Oxford University Press, USA; 2015.
6. Hiffler L, Rakotoambinina B, Lafferty N, Martinez Garcia D. Thiamine deficiency in tropical pediatrics: new insights into a neglected but vital metabolic challenge. *Frontiers in nutrition*. 2016;3:16.
7. Lonsdale D, Marrs C. High-calorie malnutrition and its impact on health. Thiamine deficiency disease, dysautonomia, and high calorie malnutrition. 2017.
8. Scrimshaw NS, Béhar M. Malnutrition in underdeveloped countries. *New England Journal of Medicine*. 1965;272(4):193-8.
9. Whitfield KC, Smith G, Chamnan C, Karakochuk CD, Sophonneary P, Kuong K, et al. High prevalence of thiamine (vitamin B1) deficiency in early childhood among a nationally representative sample of Cambodian women of childbearing age and their children. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(9):e0005814.

10. Leichter J, Joslyn M. Kinetics of thiamin cleavage by sulphite. *Biochemical Journal*. 1969;113(4):611-5.
11. Lonsdale D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin (e) and its derivatives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2006;3(1):49-59.
12. Hilker DM, Somogyi J. Antithiamins of plant origin: their chemical nature and mode of action. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1982;378(1):137-45.
13. Nardone R, Höller Y, Storti M, Christova M, Tezzon F, Golaszewski S, et al. Thiamine deficiency induced neurochemical, neuroanatomical, and neuropsychological alterations: a reappraisal. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
14. Martin P. Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Current molecular medicine*. 2001;1(2):197-207.
15. Calhau C, Faria A, Keating E, Martel F. Interaction of polyphenols with the intestinal and placental absorption of some nutrients and other compounds. *Polyphenols in human health and disease*: Elsevier; 2014. p. 523-36.
16. Roust LR, DiBaise JK. Nutrient deficiencies prior to bariatric surgery. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2017;20(2):138-44.
17. Butterworth RF. Neurotransmitter function in thiamine-deficiency encephalopathy. *Selected Topics from Neurochemistry*. 1985:377-96.
18. Page MG, Ankoma-Sey V, Coulson WF, Benders DA. Brain glutamate and γ -aminobutyrate (GABA) metabolism in thiamin-deficient rats. *British journal of nutrition*. 1989;62(2):245-53.
19. McRee RC, Terry-Ferguson M, Langlais PJ, Chen Y, Nalwalk JW, Blumenstock F, et al. Increased histamine release and granulocytes within the thalamus of a rat model of Wernicke's encephalopathy. *Brain research*. 2000;858(2):227-36.
20. Flint Jr RW, Hill JE, Sandusky LA, Marino CL. Use of the Pyridoxamine-Induced Thiamine Deficient Animal Model of Korsakoff's Syndrome for Exploratory Research Activities in Undergraduate Physiological Psychology. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education*. 2007;5(2):A35.
21. Onodera K. Abnormal behavior induced by thiamine deficiency in rats: muricide and its behavioral and pharmacological characteristics. *Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica*. 1992;100(1):1-9.
22. Langlais PJ, Savage LM. Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks that correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. *Behavioural brain research*. 1995;68(1):75-89.
23. Nakagawasai O, Tadano T, Nijjima F, Tan-No K, Kisara K. Immunohistochemical estimation of rat brain somatostatin on avoidance learning impairment induced by thiamine deficiency. *Brain research bulletin*. 2000;51(1):47-55.
24. Navarro AAL, Sikoglu EM, Heinze CR, Rogan RC, Russell VA, King JA, et al. Effect of diet on brain metabolites and behavior in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural brain research*. 2014;270:240-7.
25. Rozenaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagevoud R, Malvaez M, Stefanko DP, et al. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *Journal of Neuroscience*. 2010;30(14):5037-46.
26. Özenoğlu A, Gökçe Ü. Açlık ve yoksulluğun çocuklarda saldırganlık ve şiddet davranışları ile ilişkisi. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2015;4(1):162-79.
27. Baker-Henningham H, Hamadani JD, Huda SN, Grantham-McGregor SM. Undernourished children have different temperaments than better-nourished children in rural Bangladesh. *The Journal of nutrition*. 2009;139(9):1765-71.

28. Zhang G, Ding H, Chen H, Ye X, Li H, Lin X, et al. Thiamine nutritional status and depressive symptoms are inversely associated among older Chinese adults. *The Journal of nutrition*. 2013;143(1):53-8.
29. Luxemburger C, White NJ, ter Kuile F, Singh H, Allier-Frachon I, Ohn M, et al. Beri-beri: the major cause of infant mortality in Karen refugees. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;97(2):251-5.
30. Vasconcelos MM, Silva KP, Vidal G, Silva AF, Domingues RC, Berditchevsky CR. Early diagnosis of pediatric Wernicke's encephalopathy. *Pediatric neurology*. 1999;20(4):289-94.
31. Mimouni-Bloch A, Goldberg-Stern H, Strausberg R, Brezner A, Heyman E, Inbar D, et al. Thiamine deficiency in infancy: long-term follow-up. *Pediatric neurology*. 2014;51(3):311-6.
32. Carney M, Williams D, Sheffield B. Thiamine and pyridoxine lack in newly-admitted psychiatric patients. *The British Journal of Psychiatry*. 1979;135(3):249-54.
33. Medeiros RdCN, Moraes JO, Rodrigues SDC, Pereira LM, da Silva Aguiar HQ, de Cordova CAS, et al. Thiamine Deficiency Modulates p38 MAPK and Heme Oxygenase-1 in Mouse Brain: Association with Early Tissue and Behavioral Changes. *Neurochemical research*. 2020;45(4):940-55.
34. Fattal-Valevski A, Azouri-Fattal I, Greenstein YJ, Guindy M, Blau A, Zelnik N. Delayed language development due to infantile thiamine deficiency. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2009;51(8):629-34.
35. Harel Y, Zuk L, Guindy M, Nakar O, Lotan D, Fattal-Valevski A. The effect of subclinical infantile thiamine deficiency on motor function in preschool children. *Maternal & child nutrition*. 2017;13(4):e12397.
36. Ikarashi Y, Iizuka S, Imamura S, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Kanno H, et al. Effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on memory disturbance and behavioral and psychological symptoms of dementia in thiamine-deficient rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2009;32(10):1701-9.
37. Ghaleiha A, Davari H, Jahangard L, Haghghi M, Ahmadpanah M, Seifrabie MA, et al. Adjuvant thiamine improved standard treatment in patients with major depressive disorder: results from a randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical trial. *eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2016;266(8):695-702.
38. Makino M, Takahashi-Ito K, Murasawa H, Pawlak A, Kashimoto Y, Kitano Y. Memantine ameliorates learning and memory disturbance and the behavioral and psychological symptoms of dementia in thiamine-deficient mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2019;183:6-13.

Precision and trueness verification of TSH, Ferritin and Vitamin B12 on Beckman Dxi 800

TSH, Ferritin ve Vitamin B12 testlerinin Beckman Dxi 800 cihazında kesinlik ve doğruluk verifikasyonu

Gökçe Filiz ATIKELER¹ (ID), Nergiz ZORBOZAN² (ID)

ABSTRACT

Objective: In medical laboratories, it is important to verify the precision and trueness studies made by the manufacturer before giving results to the patient. The aim of this study was to evaluate the verification of TSH, ferritin and vitamin B12 tests according to CLSI EP15 A2 guideline.

Methods: In this study verification studies were carried out according to CLSI EP15 A2 guidelines for TSH, vitamin B12, ferritin. PreciControl quality control material were used for precision study. For trueness studies, patient samples were simultaneously assayed with two different immunoassay analyzers (Beckman Coulter DXI 800 and Advia Centaur). Microsoft Excel programme was used for statistical evaluation.

Results: The precision estimate of TSH, vitamin B12, and ferritin for both control levels were lower than the verification value. In the trueness verification study, the estimated percent bias of TSH and vitamin B12 were within the verification limits. The estimated percent bias of ferritin was found beyond the verification limits.

ÖZET

Amaç: Tıbbi laboratuvarlarda, hastaya sonuç verilmeden önce üretici firma tarafından yapılmış olan kesinlik (presizyon) ve gerçeklik (trueness) çalışmalarının doğrulanması önemlidir. Bu çalışmanın amacı, hormon testlerinden TSH, vitamin B12 ve ferritin testlerinin CLSI EP15A2 kılavuzuna göre verifikasyonunu değerlendirmektir.

Yöntem: Çalışmada TSH, vitamin B12, ferritin testleri için verifikasyon çalışmaları CLSI EP15 A2 kılavuzuna göre yapıldı. Kesinlik (presizyon) çalışmasında PreciControl kalite kontrol materyali kullanıldı. Gerçeklik çalışmasında ise hasta örnekleri iki farklı otoanalizörde (Beckman DXI800 ve Advia Centaur) çalışılarak hesaplamalar yapıldı. İstatistiksel değerlendirmeler için Microsoft Excel programı kullanıldı.

Bulgular: Kesinlik verifikasyon çalışmasında TSH, ferritin ve vitamin B12 testleri için hesaplanan değerler verifikasyon değerlerinin altındaydı. Doğruluk çalışmasında ise TSH ve vitamin B12 testlerinin hesaplanan bias değerleri verifikasyon limitleri içerisinde iken, ferritin testinin ise hesaplanan bias değerlerinin verifikasyon limitlerinin dışında olduğu gözlemlendi.

¹Manisa Merkezefendi State Hospital, Department of Biochemistry, Manisa
²Kemalpaşa State Hospital, Department of Biochemistry, İzmir



İletişim / Corresponding Author : Gökçe Filiz ATIKELER

Manisa Merkezefendi Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Manisa - Türkiye
E-posta / E-mail : gokcefil@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 23.11.2020
Kabul Tarihi / Accepted : 11.08.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.69397

Atikeler GF, Zorbozan N. Precision and trueness verification of TSH, Ferritin and Vitamin B12 on Beckman Dxi 800
Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 714 - 719

Conclusion: We found the precision and trueness of Vitamin B12 and TSH measurement methods acceptable in our study, we showed that the precision of the ferritin measurement method was acceptable but its trueness had an unacceptable negative bias.

Key Words: TSH, Vitamin B12, Ferritin, EP15 A2, method verification, precision, accuracy

Sonuç: Çalışmamızda Vitamin B12 ve TSH ölçüm metot performansları kabul edilebilir limitler içerisindedir, ferritin kesinlik çalışması kabul edilebilir limitlerde olmasıyla birlikte doğruluk çalışmasında negatif bias gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: TSH, Vitamin B12, Ferritin, EP15 A2, metot verifikasyonu, presizyon, gerçeklik

INTRODUCTION

Method validation is a process that determines the performance characteristics of clinical laboratory testing measurement procedures (1). According to The International Vocabulary of Metrology (VIM) 3, verification is “provision of objective evidence that a given item fulfils specified requirements” (2). The majority of measurement methods used in laboratory is validated by diagnostic companies (3). Validation is often done in ideal laboratory conditions. However, the performance of the method validated by the manufacturer may not be appropriate for the expected targets due to the differences in conditions in clinical laboratory practice. Bioanalytical verification procedures test whether the performance data obtained by manufacturers during method validation can be reproduced in the environment of an end-user (4).

Clinical laboratories have an important role in patients' admission, discharge and treatment (5). In this context, it is important for both clinicians and patients that laboratory results provide the expected performance. The quality of laboratory services directly affects the quality of health services (6).

Thyroid-stimulating hormone (TSH) is a hormone produced by the thyrotrope cells in the anterior pituitary glands and an important test for diagnosing and managing various thyroid gland disorders. Evaluation of serum TSH concentration is critical in the diagnosis and treatment of thyroid diseases. It is

the best screening tool for thyroid dysfunction. (7). Vitamin B12 is a water-soluble vitamin and needed for cell maturation and DNA replication. Vitamin B12 deficiency can cause megaloblastic anemia and neurological problems (8). Ferritin is an important iron storage protein and for iron homeostasis. It plays a role in various physiological and pathological processes. In clinical medicine, it is mainly used as a serum marker of total body iron stores and reflects iron status of individuals (9). The aim of study is to evaluate the imprecision and bias verification of TSH, ferritin and vitamin B12 measurement procedures according to the clinical & laboratory standards institute (CLSI) guideline EP15-A2 (User verification of performance for precision and trueness; approved guideline, 2nd edition) in Beckman DXI 800 autoanalyzer.

MATERIAL and METHOD

UniCel DxI 800 is a random access Beckman Coulter immunoassay system. It uses magnetic particle separation and indirect chemiluminescent technology. Measurement principle is Dioxetane-based chemiluminescent (Lumi-Phos*) method. The system processes up to 400 tests per hour.

The study was performed in the clinical chemistry laboratory of Izmir Su Hospital in March 2019. Method verification of TSH, ferritin and vitamin B12 tests were performed according to CLSI guideline EP15-A2 (10). TSH, ferritin and vitamin B12 tests were analysed on both Beckman Coulter Unicell DXI 800 and Advia

Centaur immunoassay analyser.

Verification of precision performance

Internal quality control materials were used to evaluate verification of imprecision. Precicontrol 1 and precicontrol 2 were analyzed one run day with three replicate samples at each of two concentrations daily for five days (15 replicates per level). Run data that had to be rejected due to quality control procedures or operational difficulties were discarded and an additional run was performed. The data were collected and transcribed onto an appropriate recording sheet.

Repeatability (within run precision) and within laboratory precision were calculated with formulas according to EP15 - A2. The verification value was calculated when the standard deviation was calculated higher than the standard deviation declared by the manufacturer (σ : manufacturer's declared SD for repeatability, σ_1 : manufacturer's declared SD for within laboratory imprecision).

Repeatability (within run precision): The degree of freedom (V) was calculated as 10 by the formula $V=D*(n-1)$ for five days (D) and three replicates (n). Percentage point (C) of the chi-square distribution [L- The false rejection rate (α)/ the number of concentration levels tested (ℓ)] was determined as 20.48 according to the degree of freedom. Verification value was calculated using verification value= $(\sigma^*C)/\sqrt{v}$ formula.

Within laboratory precision: The degree of freedom (T) was determined for five days and three replicates (n). T values were calculated according to CLSI guideline EP15-A2. C value of the chi-square distribution $(1- \alpha/\ell)$ was determined according to the degree of freedom. Verification value was calculated using verification value= $(\sigma_1^*C)/T$ formula.

Demonstration of Trueness

Patient sample results were compared to another measurement procedure. 20 patient samples were used for trueness study. Samples whose concentrations did not exceed the measuring range of the measurement procedure were included in the study. Appropriate

routine quality control procedures were followed for each measurement procedure. Samples were analyzed within the same run on Advia Centaur and UniCel DxI 800 immunoassay analyzer. The measurements were completed within four hours on the same day.

Trueness estimation was determined by comparing %Bias obtained from patient samples against B (desirable specification for inaccuracy) (7). The difference between each sample result (b_i) for the procedures was calculated. Bias estimation was determined using

$$\%b_i = 100 * (\text{test procedure result}_i - \text{comparison procedure result}_i) / \text{comparison procedure result}_i$$
 formula.

Verification limits for percent bias calculated according to the formulas $B - (t^*s_{(\%b)})/\sqrt{n}$ and $B + (t^*s_{(\%b)})/\sqrt{n}$. Standard deviations of bias ($s_{\%b}$) in percent were calculated according to CLSI guideline EP15-A2. The (100- α) percent point of the t-distribution with n-1 (n= the number of patient samples) degrees of freedom (t) determined as 2,539. The degree of freedom and α value was 19 and %1 respectively.

RESULTS

Repeatability (within run precision) and within laboratory precision study data of TSH, vitamin B12, ferritin measurement procedure were shown in table 1. The manufacturers claimed target values, calculated repeatability (within run precision), within laboratory precision, and verification values data are presented in Table 2.

For both control levels, the estimated repeatability (within run precision) values of TSH, vitamins B12, and ferritin were lower than the verification value.

The within laboratory precision estimate of TSH, vitamins B12, and ferritin for both control levels were lower than the verification value (Table 2).

In the trueness verification study, the estimated percent bias of TSH and vitamin B12 were within the verification limits. The estimated percent bias of ferritin was found beyond the verification limits (Table 3).

Table 1. Repeatability and within laboratory precision experiment data of TSH, vitamin B12 and ferritin measurement procedures

TSH						
Precicontrol 1	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	
Replicate 1	2.84	2.91	2.78	2.81	2.75	
Replicate 2	2.8	2.9	2.88	2.75	2.78	
Replicate 3	2.8	2.88	2.9	2.83	2.83	
Precicontrol 2	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	
Replicate 1	10.11	10.22	10.52	10.1	10.3	
Replicate 2	10.09	10.11	10.41	10.05	10.22	
Replicate 3	10	10.05	10.39	10.01	10.4	
Vitamin B12						
Precicontrol 1	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	
Replicate 1	284	309	292	305	301	
Replicate 2	290	300	295	300	298	
Replicate 3	274	301	300	293	290	
Precicontrol 2	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	
Replicate 1	549	536	533	530	550	
Replicate 2	560	555	558	548	545	
Replicate 3	545	543	545	535	538	
Ferritin						
Precicontrol 1	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	
Replicate 1	70.5	70.6	68.8	69.5	68	
Replicate 2	70	71.9	68.3	69.9	67.2	
Replicate 3	70.2	73	69	70	69	
Precicontrol 2	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	
Replicate 1	444.6	484	501.5	442.6	471	
Replicate 2	442	484.5	500	444	472	
Replicate 3	441.9	489	490.5	445.5	475.4	

Table 2. The manufacturer's claimed target values, calculated repeatability (within run precision), within laboratory precision, and verification values for TSH, vitamin B12 and ferritin measurement procedures

Tests	IQC	S_r	Manufacturer's	Verification	S_1	Manufacturer's	Verification
			claimed	value		claimed	value
			S_r	S_r		S_1	S_1
TSH	PCC1	0.041	0.03	0.043	0.056	0.24	0.252
	PCC2	0.072	0.17	0.243	0.179	0.24	0.219
Vitamin B12	PCC1	5.91	17.9	25.616	9.146	24.6	40.793
	PCC2	9.29	53.4	76.42	9.003	58.12	87.998
Ferritin	PCC1	0.71	0.96	1.374	1.57	1.52	2.364
	PCC2	3.25	12.16	17.402	24.68	19.6	32.708

(IQC: Internal quality control, PCC: Precicontrol, S_r : Within run precision, S_1 : Within laboratory precision)

Table 3. Desirable specification for inaccuracy, bias and verification limits of TSH, vitamin B12 and ferritin measurement procedures

Tests	Desirable specification for inaccuracy	Bias (%)	Verification limits
TSH	7.8	-16.20	(-1.40) - (-17)
Vitamin B12	17.7	-15.74	8.76 - (-26.64)
Ferritin	5.2	-17.59	(-4.79) - (-15.19)

DISCUSSION

Verification of measurement methods are procedures that provide end-users with confidence that measurement methods are suitable for their intended purpose. In the method selection process, laboratories should first determine the required performance according to the legal requirements and/or the medical usefulness requirements of the method. After, a method that claims to meet the desired performance characteristics should be chosen. The laboratories should verify that the manufacturer's claimed imprecision and bias are achieved by their laboratory by the laboratory.

We conducted an imprecision and bias verification experiment for the vitamin B12, TSH, and ferritin measurement procedure performed on the Beckman DXI800 analyzer, which we started to use as a new system in our laboratory. We determined that the estimated repeatability and within laboratory precision values of TSH, vitamin B12 and ferritin tests were lower than the calculated verification values. According to CLSI guideline EP15-A2, if the estimated repeatability values are less than or equal to the verification value, data is accepted consistent with the manufacturers' claim for repeatability, and the claim is verified. Based on the data we obtained, we verified the precision performance characteristics of TSH, vitamin B12 and ferritin measurement methods.

The total error consists of random and systematic components. The random error is described qualitatively as precision and can be measured quantitatively as SD. Systematic components are described qualitatively as accuracy and measured quantitatively as bias (4).

The choice of the reference measurement procedure in the accuracy study is important for the interpretation of the experimental results. If the new procedure is not a revision of the same manufacturer's previous procedure or the application of the manufacturer's previous procedure to a new device, it is not appropriate for the laboratory to demonstrate the trueness with the manufacturer's claim. If the trueness experiment is performed using a different measurement procedure, it is recommended to determine a medically allowable bias between the results obtained with the new procedure and the comparative procedure. The determined bias should use as the basis for demonstrating the trueness. The measurement procedure we compared in our trueness experiment was different from the measurement procedure we used. We determined the verification limits using the desired biological variation values for TSH, ferritin, and B12, rather than the bias value declared by the manufacturer. We think that evaluating the trueness between different procedures ensures us to evaluate the relationship between the procedures and the ability of our laboratory to produce equivalent results with different procedures (10).

The estimated percent bias values of TSH and B12 tests were within the verification limits we calculated. We have thus confirmed that the TSH and B12 measurement procedures demonstrate a percent bias consistent with the manufacturer's claim. We determined that the estimated percent bias value of the ferritin test was beyond the verification limit. Test results of the ferritin measurement method in Beckman DXI were lower than that of Siemens Advia Centaur.

Kristensen et al. evaluated four immunological test systems in their study, including Beckman DXI and Siemens Advia Centaur. The bias of the ferritin measurement procedure was found beyond the manufacturer's target bias. The bias of the ferritin measurement method was determined as -13.8% for the Beckman Unicel automatic analyzer and -8.7% for the Siemens Advia Centaur. In the evaluation made in the study, the bias obtained for both measurement methods were beyond the desired bias limits (11). According to the CLSI guideline EP15-A2, if it is detected that the estimated percent bias is outside the verification limits, it is recommended to contact the manufacturer for

assistance (10). In this direction, we contacted the manufacturer and planned to repeat the study after suggestions and necessary interventions were made.

As a result, while we found the precision and trueness of vitamin B12 and TSH measurement methods acceptable in our study, we showed that the precision of the ferritin measurement method was acceptable but its trueness had an unacceptable negative bias. Our study shows analytical verification results for commonly used immunoassay tests that are clinically important for Beckman DXI800. We believe that the results of our study and the approaches we take based on the results we have obtained will be useful to laboratory managers.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Nichols JH. Verification of method performance for clinical laboratories. *Adv Clin Chem*, 2009;47:121-137.
- BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, IUPAP, ISO, OIML. The international vocabulary of metrology—basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edn. JCGM 200:2008. [http:// www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html](http://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html)
- Braga F, Panteghini M. Verification of in vitro medical diagnostics (IVD) metrological traceability: responsibilities and strategies. *Clin Chim Acta*, 2014;432:55-61.
- Theodorsson E. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis*, 2012;4(3):305-20.
- Forsman RW. Why is the laboratory an after thought for managed care organizations? *Clin Chem*, 1996;42:813-6.
- Lippi G, Simundic AM, Mattiuzzi C. Overview on patient safety in healthcare and laboratory diagnostics. *Biochem Med*, 2010;20:131-43.
- Walsh JP. Managing thyroid disease in general practice. *Med J Aust*, 2016;205(4):179-84.
- Karmi O, Zayed A, Baraghehi S, Qadi M, Ghanem R. Measurement of vitamin B12 concentration: A review on available methods. *IIOAB J*, 2011;2:23-32.
- Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM. Ferritin for the clinician. *Blood Rev*, 2009;23(3):95-104.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): User verification of performance for precision and trueness. Approved Guideline, eds 2. EP15-A2. Wayne, Pennsylvania, 2003.
- Kristensen G, Rustad P, Berg J, Aakre K. Analytical bias exceeding desirable quality goal in 4 out of 5 common immunoassays: Results of a native single serum sample external quality assessment program for cobalamin, folate, ferritin, thyroid-stimulating hormone, and free t4 analyses. *Clin Chem*, 2016; 62(9): 1255-63.

Apilarnil protects the LPS induced endotoxemic heart

Apilarnil LPS ile indüklenen endotoksemik kalbi korur

Aslı OKAN¹ (ID), Emin KAYMAK¹ (ID), Arda Kaan ÜNER² (ID), Sibel SİLİCİ³ (ID), Züleyha DOĞANYİĞİT¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Endotoxemia is a serious complication that is featured by hypotension, weak tissue perfusion and multiple organ failure that is among the top factors that lead to mortality in hospitalized patients. Apilarnil (drone bee brood) is a honeybee product that has biologically active characteristics. Apilarnil contains 25 - 35% dry matter, 9 - 12% protein, 6 - 10% carbohydrates, 5 - 8 lipids, 3% ash, and other unidentified substances. Additionally, its chemical composition includes vitamins (vitamin A, beta carotene, B1, B6, PP, and choline), minerals (calcium, phosphorus, sodium, zinc, manganese, iron, copper, and potassium), and essential amino acids that cannot be synthesized by humans or other animal organisms. Endotoxemia-induced cardiotoxicity is reported in the recent evidence. In this study, it was aimed to determine whether apilarnil, a bee product, has a protective effect on heart tissue in the case of endotoxic shock, which is one of the major causes of intensive care units, by histopathological and immunohistochemical evaluation of TNF- α and BNP in the heart tissue.

Methods: 32 *Sprague dawley* male rats were randomly divided into four equal groups as control, apilarnil administered group (0.8 g/kg), lipopolysaccharide (LPS)

ÖZET

Amaç: Endotoksemi, hastanede yatan hastalarda mortaliteye neden olan faktörlerin başında gelen hipotansiyon, zayıf doku perfüzyonu ve çoklu organ yetmezliği ile karakterize ciddi bir komplikasyondur. Apilarnil (drone arı kuluçkası), biyolojik olarak aktif özelliklere sahip bir bal arısı ürünüdür. Apilarnil %25-35 kuru madde, %9 - 12 protein, %6 - 10 karbonhidrat, 5 - 8 lipid, %3 kül ve diğer tanımlanamayan maddeler içerir. Ek olarak, kimyasal bileşimi vitaminleri (A vitamini, beta karoten, B1, B6, PP ve kolin), mineralleri (kalsiyum, fosfor, sodyum, çinko, manganez, demir, bakır ve potasyum) ve insanlar veya diğer hayvan organizmaları tarafından sentezlenemeyen esansiyel amino asitleri içerir. Son kanıtlarda endotoksemimin neden olduğu kardiyotoksikite rapor edilmiştir. Bu çalışmada, bir arı ürünü olan apilarnilin, yoğun bakım ünitelerinin önemli nedenlerinden biri olan endotoksik şok durumunda kalp dokusunu koruyucu etkisinin olup olmadığının kalp dokusunda histopatolojik ve TNF- α ve BNP immunoreaktivitesindeki değişimler ile araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 32 adet *Sprague dawley* erkek sıçan rastgele kontrol, apilarnil uygulanan grup (0.8 g/kg), lipopolisakkarit (LPS) grubu ve apilarnil ile birlikte LPS

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

²Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Yozgat

³Erciyes University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Nutral Therapy Co. Erciyes Technopark, Kayseri



İletişim / Corresponding Author : Züleyha DOĞANYİĞİT

Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yozgat - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 20.05.2022

Kabul Tarihi / Accepted : 25.06.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.78200

Okan A, Kaymak E, Üner AK, Silici S, Doğanyigit Z. Apilarnil protects the LPS induced endotoxemic heart
Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 720 - 729

group, and apilarnil together with LPS administered group. Immunohistochemical evaluation was performed to determine the differences in the expression of TNF- α and BNP in the heart tissue.

Results: Edema, hemorrhage, and infiltration was observed in the LPS group compared to the control group and groups receiving apilarnil. It was observed that this damage decreased significantly in the group treated with LPS and apilarnil. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and brain natriuretic peptide (BNP) expressions were significantly increased in the LPS group, and co-administration of LPS and apilarnil suppressed these increased expression levels.

Conclusion: Our data indicate that the protective effects of apilarnil may have a therapeutic effect on heart damage caused by LPS by the anti-inflammatory and antioxidant properties of the components found in apilarnil.

Key Words: LPS, Apilarnil, BNP, TNF- α , bee product

verilen grup olmak üzere dört eşit gruba ayrıldı. Kalp dokusunda TNF- α ve BNP ekspresyonundaki farklılıkları belirlemek için immünohistokimyasal değerlendirme yapıldı.

Bulgular: Kontrol grubu ve apilarnil alan gruplara göre LPS grubunda ödem, kanama ve infiltrasyon gözlemlendi. LPS ve apilarnil ile tedavi edilen grupta bu hasarın önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. LPS grubunda tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve beyin natriüretik peptit (BNP) ekspresyonları önemli ölçüde arttı ve LPS ve apilarnilin birlikte uygulanması bu artan ekspresyon seviyelerini baskıladı.

Sonuç: Verilerimiz, apilarnilin koruyucu etkilerinin, apilarnilin içerdiği bileşenlerin antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri sayesinde LPS'nin neden olduğu kalp hasarı üzerinde terapötik bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: LPS, Apilarnil, BNP, TNF- α , arı ürünü

INTRODUCTION

Endotoxemia is a serious complication that is featured by hypotension, weak tissue perfusion and multiple organ failure which is among the top factors that lead to mortality in hospitalized patients (1). While a lot of strategies have been advanced to understand and treat the pathophysiology of endotoxemia induced by endotoxins, especially LPS (2), it is still one of the most significant problems at intensive care units. Some important events develop in sepsis pathophysiology. The first of these is that monocyte, macrophage, neutrophil, and endothelium cells play an important role in initiating and sustaining response against sepsis (3, 4). Other significant events in sepsis pathophysiology are inflammation and coagulation (5). By the time inflammation starts,

excessive and uncontrolled increase in the formation of mediators such as cytokines, reactive oxygen, and nitrogen species contributes to the pathophysiology of sepsis (6, 7). The endotoxin that is released during the fast growth of the cell or cell destruction is the key molecule that starts the series of events in sepsis/endotoxemia (8). LPS is a glycolipid component of the cell membrane of gram (-) bacteria, and LPS has a harmful effect that leads to septic shock and death on some organs including the heart. Endotoxemia-induced cardiotoxicity is described by overabundant accumulation of reactive oxygen species (ROS), membrane lipid damage, induction of DNA and protein and unsuitable intracellular redox balance (9).

TNF- α plays an important role in the described of cardiovascular diseases and sepsis-induced cardiac function disorders. While it was initially described

as only an LPS - based macrophage product, there is evidence showing that heart myocytes themselves in addition to LPS produce significant amounts of TNF- α corresponding to ischemia (10). Although many natriuretic peptides are secreted from the heart because of dysfunction in the heart, the most sensitive and up to date among these BNP (11). BNP is a hormone that plays a role in some functional changes, particularly volume change and it is a sensitive marker of dysfunction in the heart (12-14). Due to their functions in the pathogenesis of cardiovascular diseases, this study also aimed to immunohistochemically determine the expression levels of TNF- α and BNP in heart tissue.

It is seen in recent years that alternative treatment options in addition to medical treatment have gained increasing significance, especially in the field of human medicine. Apilarnil (drone bee brood) is a honeybee product that has biologically active characteristics. It is obtained by collecting and lyophilizing male bee larvae that are harvested in the 7-day larva stage before the honeycomb cells are closed. It has a homogenous and milk-like consistency, yellowish color and sour taste. Apilarnil contains 25 - 35% dry matter, 9 - 12% protein, 6 - 10% carbohydrates, 5 - 8 lipids, 3% ash and other, unidentified substances (15, 16). Additionally, its chemical composition includes vitamins (vitamin A, beta carotene, B1, B6, PP, and choline), minerals (calcium, phosphorus, sodium, zinc, manganese, iron, copper, and potassium) and essential amino acids that cannot be synthesized by humans or other animal organisms. It was reported that it is a rich source of coenzyme Q10 and contains alpha tocopherol (17). There are various studies on the effects of apilarnil on gastrointestinal diseases, respiratory tract diseases and especially sexual functions (18-21). In this study, we aimed to histologically and immunohistochemically determine whether apilarnil has a protective effect on heart tissue in cases of endotoxemia, which is one of the greatest problems of intensive care units at hospitals.

MATERIAL and METHOD

Chemicals

Lyophilized apilarnil purchased from Nutral Therapy Company (Erciyes University Technopark, Kayseri, Turkey) was used for experiments. LPS (*Escherichia coli* LPS, serotype 0127: B8) was obtained from Sigma Aldrich. The LPS and apilarnil doses to be applied to the rats were determined based on the information in the literature (18, 22, 23). As the number of studies on the biological activity of apilarnil in rats is limited, this study would also be a dose determination study, and the dose range was kept broad in a way to cover the doses proposed in previous studies on other animal groups (18, 22).

Animals and Experimental Protocols

The study used adult male *Sprague dawley* rats that were bred at the DEKAM at Erciyes University. The water and food needs of the rats that were kept in cages were met through the normal course of the day at 21 °C and with a 12-hour light/ dark cycle. The number and breed of the animals to be used in the study and the doses to be applied were determined based on the information in the literature.

For the study, 32 adult male *Sprague dawley* rats were randomly divided into 4 equal groups.

Group 1: (Control group): The group was given only physiological serum (SF) (0.9% NaCl) by 1 mL intraperitoneally,

Group 2: LPS: 30 mg / kg / bw dose 1 mL intraperitoneally,

Group 3: 0.8 g / kg apilarnil 1 mL by oral gavage (every day for 10 days),

Group 4: 0.8 g / kg apilarnil 1 mL by oral gavage (every day for 10 days), LPS (30 mg / kg / bw) on the 10th day 60 minutes after apilarnil administration, six hours after LPS administration, the rats were sacrificed (23), and their heart tissues were collected for histological and immunohistochemical examinations.

Histological Analysis

After the heart tissue that was collected was put into formaldehyde, it was fixated for 2 days in parallel to the size of the tissue, and the tissue was kept under running water overnight following fixation (25). The heart tissues were then embedded in paraffin blocks with the method of routine histological follow up. Samples of 5 μ - thick cross- sections taken from these blocks onto slides were firstly deparaffinized for histochemical staining, and they were stained with hematoxylin & eosin. The tissues were subjected to histochemical analyses under an Olympus BX53 light microscope.

Immunohistochemical Analysis

To determine the differences in the expression of TNF- α and BNP in the heart tissue, marking was performed with the avidin-biotin-peroxidase method (24). Briefly, after deparaffinization and rehydration by passing through gradual alcohol series of 5 μ m cross - sections, 5% citrate buffer (pH: 6.0) was used for regaining antigens. Then the sections were treated with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) to prevent endogenous peroxidase activity. Serum block was applied to prevent non-specific staining. After that, the cross-sections were kept at 4 °C overnight by primary antibodies (TNF- α and BNP separately). After the washing process, biotinylated secondary antibodies, avidin- biotin enzyme and DAB chromogens were applied, respectively. Then

sections were counterstained with Gill hematoxylin, dehydrated with increasing gradual alcohol series, xylol and mounted in entellan. The images that were obtained by a digital camera (DP71 model) under an light microscope (Olympus BX51 model) were analyzed by using the image j software for expression level differences.

Statistical Analysis

SPSS 22 was used for the statistical analyses. For the intergroup comparisons of the obtained expression values, the parametric test one - way ANOVA was utilized, while post - hoc Tukey's test was used for multiple comparisons.

This study was approved by the Erciyes University Animal Experiments Local Ethics Committee (Date:09.05.2018, Number: 18/063).

RESULTS

Histological Analysis

The general structure of the heart tissue was observed by hematoxylin & eosin staining. While a healthy heart tissue was observed in the control group and the groups that were given apilarnil, occasional structural irregularities, hemorrhage and edematous areas were seen in the group that was given LPS. Close to normal heart tissue was observed in the group that were given apilarnil in addition to LPS (Figure 1).

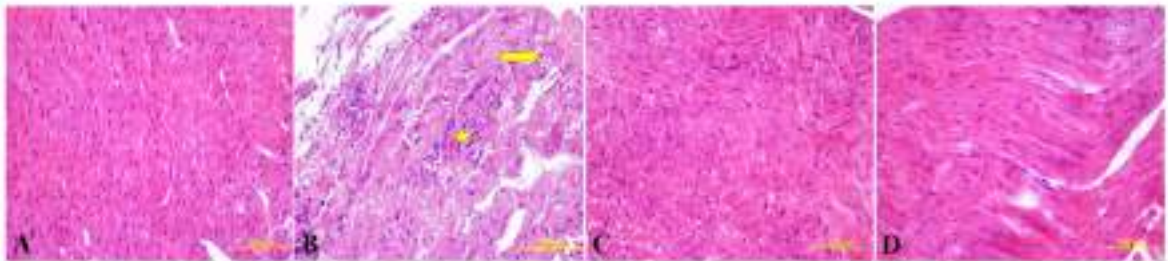


Figure 1. Histological analysis of heart tissues of study groups (H&E). Control group (A), LPS group (B), the group given 0.8 mg/kg dose of Apilarnil (C) and the group given LPS+0.8 mg/kg dose of Apilarnil (D). Magnification rate: x 400.

Immunohistochemical Analysis

Table 1 shows that the TNF- α and BNP immunoreactivity results increased in the LPS group significantly in comparison to the control group ($p=0.001$). While these expression levels in the group where the only apilarnil was applied were like

those in the control group, similar results were also observed in the groups given apilarnil in addition to LPS (Figure 2, 3 and 4). It is seen that the apilarnil applied alongside LPS reduced the damage induced by LPS.

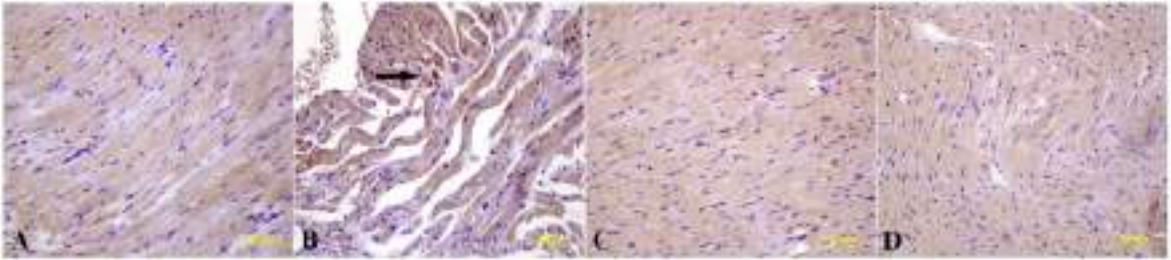


Figure 2. Immunohistochemical analysis of TNF- α at heart tissues of study groups. TNF- α images of the Control group (A), LPS group (B), the group given 0.8 mg/kg dose of Apilarnil (C) and the group given LPS+0.8 mg/kg dose of Apilarnil (D). The arrow shows the stained areas. Magnification rate: x 400.

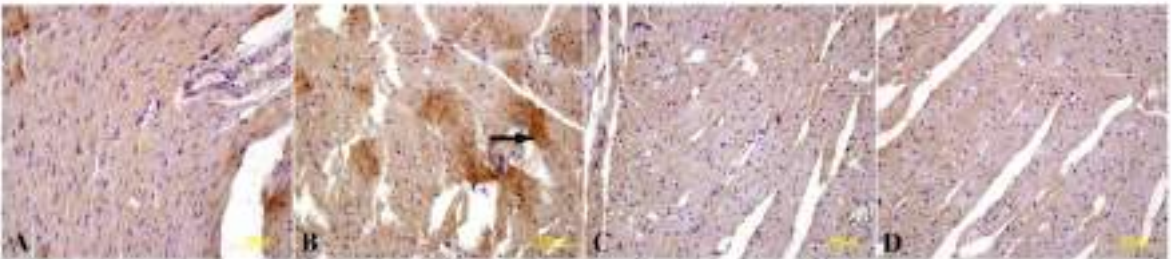


Figure 3. Immunohistochemical analysis of BNP expression at heart tissues of study groups. Control group (A), LPS group (B), the group given 0.8 mg/kg dose of Apilarnil (C) and the group given LPS+0.8 mg/kg dose of Apilarnil (D). The arrow shows the stained areas. Magnification rate: x 400.

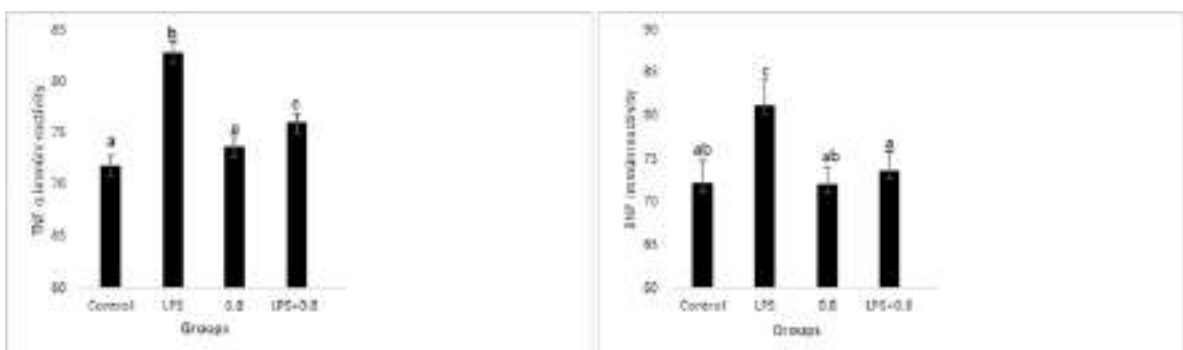


Figure 4. TNF- α and BNP immunoreactivity data shown on histogram graph are expressed as mean \pm SEM. The data are expressed as mean \pm standard deviation. $p < 0.05$ was accepted as statistically significant. There was no significant difference among the groups indicated with the same letters (a- b- c).

Table 1. Immunoreactivity results of TNF- α and BNP

Groups	Control	LPS	0.8mg/kg Apilarnil	LPS+0.8mg/kg Apilarnil	p
TNF- α	71.82 \pm 1.48 ^a	82.81 \pm 4.28 ^b	73.69 \pm 2.68 ^a	76.00 \pm 5.10 ^c	0.001
BNP	72.24 \pm 2.54 ^{ab}	81.22 \pm 2.91 ^c	72.15 \pm 1.96 ^{ab}	73.67 \pm 2.27 ^a	0.001

Data are expressed as mean \pm standard deviation. $p < 0.05$ was considered significant. There was no significant difference between groups containing the same letter (a-b-c).

DISCUSSION

Endotoxic shock a syndrome involving multiple organ dysfunction and especially cardiovascular diseases. It should be kept in mind that cardiovascular diseases continue to be the main reasons for morbidity and mortality in the world (25). The pathophysiology of endotoxemia involves the formation of inflammatory mediators such as TNF- α , interleukin-1 (IL-1), IL-2 and IL-6 (26). The cardiovascular changes that are observed during a hyperdynamic septic event are usually characterized by normal to high cardiac output, low systemic vascular resistance, intense hypotension, and deep peripheral vasodilatation (27). The myocardial levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 increased in animals treated with LPS in comparison to controls (28).

Data obtained from scientific studies show that cytokines are mediators of cardiovascular disease (29-31). Endotoxemia is characterized by actuation of the immune system and increased the production of a few cytokines such as TNF- α and c-interferon in the circulation (32). TNF- α is a proinflammatory cytokine that plays a role in sepsis-related myocardial dysfunction (31). It is well-known that TNF- α is an important inducer of myocardial depression during sepsis (28). The proinflammatory cytokines IL-1, IL-6, and TNF were measured in rat serum and myocardial tissue, and it was shown that all these three cytokines significantly increased after administering LPS (33). Asgharzadeh et al. (34) investigated the effects of repeated LPS exposure in male rats on inflammatory markers, oxidative stress balance, and cardiac and

renal fibrosis and found the serum TNF- α and IL-6 concentrations in the group that was given LPS significantly higher in comparison to the control group. Additionally, in the heart tissues of the group treated with LPS, inflammatory cell infiltration, fiber irregularity, edema and broadened blood vessels were observed in the left ventricle. In our previous study, LPS treatment increased TNF- α , IL-6 and IL-1 β in rat liver tissue, while both LPS and apilarnil administration reduced this increase (25). In another study evaluated serum TNF- α and IL-1 β levels and showed that these levels were higher in the animals in the LPS group in comparison to those in the control group (35). Considering the results of our study, in agreement with the results in the literature, histopathological changes such as hemorrhage, edema and structural irregularities were observed in the LPS group, and it was shown that these changes were alleviated by administering apilarnil alongside LPS. Likewise, when the expression of TNF- α in the heart tissue was examined immunohistochemically, while the results in the control group and the groups that were given apilarnil were similar, it was observed that LPS administration increased TNF- α expression significantly, and this increase was significantly suppressed in the group that were given apilarnil in addition to LPS.

As a significant biomarker, BNP concentrations in the serum also increase alongside increased hemodynamic stress or ventricular cavity in heart hypertrophy and heart failure (36-38).

Gao et al. (39) conducted a study on BNP expression in rat myocardial tissue after acute cardiac dysfunction

and the role of BNP in the diagnosis of cardiac dysfunction in forensic medicine and observed that the positive staining degree of BNP increased through the time that passed during cardiac dysfunction. BNP expression had a significant increase based on increased time in cardiac dysfunction by Western blot and real-time PCR. Dong et al. (40) measured serum BNP levels by the ELISA method. In comparison to the control group, the BNP levels in the MI groups were significantly higher. In the results of this study, in agreement with those in the literature, it was observed that the BNP expression levels increased significantly in the group that was given LPS, while these levels were suppressed significantly in the group that were given apilarnil alongside LPS. However, the expression level of BNP in the apilarnil-only group was like the control.

Apilarnil, a bee product that attracts the attention of researchers in recent years, has shown positive effects on reproductive functions (18, 19, 21). It has also been reported to be used successfully against gastrointestinal diseases and respiratory diseases in South Africa (20). The literature review did not reveal any study on the cardioprotective effects of apilarnil, so, our study is the first one in this respect. However, studies on other bee products showed the cardioprotective effects of these products. For example, Malaysian Propolis (MP) was shown to have a cardioprotective activity against isoproterenol-induced oxidative stress by its direct cytotoxic radical cleansing activities. Histopathological analyses revealed edema and infiltration in the heart tissue, and propolis application prevented these negative changes. ROS, such as superoxide anions and hydroxyl radicals are cleansed by the antioxidants found in propolis (41). Alyane et al. (42) proposed as a result of their study that propolis has a positive effect on human health based on the protection of heart tissue in patients who are given doxorubicin and according to the literature on biomedicine.

Shen et al. (43) suggested that using *Schisandra chinensis* bee pollen extract (SCBPE) as a functional

food may provide a scientific basis in preventing MI. It is generally accepted that oxidative stress plays a significant role in the pathogenesis of MI. Excessive production of ROS may affect cell membrane characteristics and lead to oxidative damage in lipids and proteins that may turn them dysfunctional (44). For this reason, treatment with antioxidants may be a powerful strategy in preventing heart damage and myocardial function disorders in acute MI patients (45).

The results of the study by Doganyigit et al. (23) demonstrated that propolis application may have a protective effect against changes in both genomic stability values and methylation profiles, and it minimized the tissue damage caused by an increase in MDA and LPS.

Wang et al. (46) reported that application of ethanol extracts Chinese propolis (EECP) and ethanol extracts poplar buds (EEPB) in mice with endotoxemia alleviated histopathological changes in the lungs and provided significant protective effects by suppressing LPS-stimulated inflammatory cytokines such as IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α , IL-12, and p70. Malekinejad et al. (47) reported that the histopathological and biochemical changes caused by paclitaxel were repaired by application of royal jelly. Paclitaxel histologically led to hemorrhage, congestion, edema, and necrosis in heart tissue, and the application of royal jelly reversed these negative changes. Sugiyama et al. (48), showed that 10H2DA is one of the components of royal jelly with anti-inflammatory effects, and it may be a candidate as a therapeutic drug for inflammatory and autoimmune diseases connected to the production of NF- κ B and IL-6.

As a result of this study, we concluded that apilarnil application showed a cardioprotective effect by reducing tissue damage induced by LPS and suppressing the increase in TNF- α and BNP expressions. We believe that this effect was caused by the anti-inflammatory and antioxidant properties of the components found in apilarnil. However, more detailed studies on this topic are needed.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study was approved by the Erciyes University Animal Experiments Local Ethics Committee (Date:09.05.2018 and No:18/063).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Howe LM. Novel agents in the therapy of endotoxic shock. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000; 9:1363-72.
2. Wilhelm EA, Jesse CR, Roman SS, Nogueira CW, Savegnago L. Hepatoprotective effect of 3-alkynyl selenophene on acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. *Exp Mol Pathol*, 2009;87:20-6.
3. Appelmelk, Ben J., and William A. Lynn. The cause of sepsis: bacterial cell components that trigger the cytokine cascade, Septic shock. Toronto:WB Saunders company, 2000.
4. Pugin J. Toll-like receptors, Evolving concepts in sepsis and septic shock. *Springer*, 2001:27-44.
5. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, 2003;101:3765-77.
6. Lohuis JA, Verheijden JH, Burvenich C, van Miert AS. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 1. Changes in body temperature and reticulo-rumen motility, and the effect of repeated administration. *Vet Q*, 1988;10:109-16.
7. Liu, Shu Fang, and Asrar B. Malik. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006; 290(4):622-45.
8. Fıŷgın NT. Sepsis. *J of Exp Clin Med*, 2004;21.
9. Sebai H, Sani M, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N. Cardioprotective effect of resveratrol on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat. *Drug Chem Toxicol*, 2011;34:146-50.
10. Neethling WM and Hodge AJ. The effect of diazepam on myocardial function and coronary vascular tone after endotoxemia in the isolated rat heart model. *Inflamm Res*, 2010;59:907-13.
11. Karakılıç E, Karaca M, Bozkurt Ŗ, Coŷkun F, Sivri B. BNP Nedir Acil Serviste Beyin Natriüretik Faktör BNP Kullanımı. *Akademik Acil Tıp Dergisi*, 2005;3:7-10.
12. Cowie MR and Mendez GF. BNP and congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*, 2002;44:293-321.
13. McCullough PA and Sandberg KR. Sorting out the evidence on natriuretic peptides. *Rev Cardiovasc Med*, 2003;4:13-9.

14. Meune C, Fulla Y, Martins E, Bergmann JF, Devaux JY. B-type natriuretic peptide for the diagnostic and prognostic assessment in cardiology Its interest and perspectives of application. *Presse Med*, 2003;32:181-5.
15. Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, Almeida-Muragian L. Quality and standardisation of royal jelly. *JAAS*, 2009;1:1-6.
16. Stangaciu S. Apitherapy. Internet Course Notes, 1999:286.
17. Hryniewicka M, Karpinska A, Kijewska M, Turkowicz MJ, Karpinska J. LC/MS/MS analysis of alpha-tocopherol and coenzyme Q10 content in lyophilized royal jelly, beebread and drone homogenate. *J Mass Spectrom*, 2016;51:1023-9.
18. Altan Ö, Yücel B, Açıkgöz Z, Seremet C, Kösoglu M, Turgan N, Özgönül AM. Apilarnil reduces fear and advances sexual development in male broilers but has no effect on growth. *Br Poult Sci*, 2013;54:355-61.
19. Bolatovna K, Rustenov A, Eleuqalieva N, Omirzak T, Ukhanov UK. Improving reproductive qualities of pigs using the drone brood homogenate. *Bio Med*, 2015;7:2.
20. Meda A, Lamien CE, Millogo J, Romito M, Nacoulma OG. Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. *J Ethnopharmacol*, 2004;95:103-7.
21. Yucel B, Acikgoz Z, Bayraktar H, Seremet C. The effects of apilarnil (drone bee larvae) administration on growth performance and secondary sex characteristics of male broilers. *J Anim Vet Adv*, 2011;10:2263-6.
22. Andritoiu CV, Ochiuz L, Andritoiu V, Popa M. Effect of apitherapy formulations against carbon tetrachloride-induced toxicity in Wistar rats after three weeks of treatment. *Molecules*, 2014;19:13374-91.
23. Doğanyığıt Z, Kıp FÖ, Silici S, Deniz K, Yakan B, Atayoglu T. Protective effects of propolis on female rats' histopathological, biochemical and genotoxic changes during LPS induced endotoxemia. *Phytomedicine*, 2013;20:632-9.
24. Doğanyığıt Z, Okan A, Kaymak E, Pandır D, Silici S. Investigation of protective effects of apilarnil against lipopolysaccharide induced liver injury in rats via TLR 4/HMGB-1/NF-κB pathway. *Biomed Pharmacother*, 2020;125:109967.
25. Zhang T, Yan T, Du J, Wang S, Yang H. Apigenin attenuates heart injury in lipopolysaccharide-induced endotoxemic model by suppressing sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling pathway. *Chem Biol Interact*, 2015;233:46-55.
26. Filiz AI, Ozturk A, Kurt Y, Sucullu I, Akin ML, Yıldız M. The effects of immunosuppressive agents on inflammatory response in septic rats. *Cent Eur J Med*, 2010;5:683-90.
27. Zhang T and Feng Q. Nitric oxide and calcium signaling regulate myocardial tumor necrosis factor-alpha expression and cardiac function in sepsis. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010;88:92-104.
28. Weil BR, Herrmann JL, Abarbanell AM, Manukyan MC, Poynter JA, Meldrum DR. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells is associated with improved myocardial function during endotoxemia. *Shock*, 2011;36:235-41.
29. Gokkusu C, Tulubas F, Unlucerci Y, Ozkok E, Umman B, Aydin M. Homocysteine and pro-inflammatory cytokine concentrations in acute heart disease. *Cytokine*, 2010;50:15-8.
30. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schömig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*, 1995;92:748-55.
31. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation*, 1996;93:704-11.
32. Lange LG and Schreiner GF. Immune mechanisms of cardiac disease. *N Engl J Med*, 1994;330:1129-35.
33. Plaschke K, Do TQM, Uhle F, Brenner T, Weigand MA, Kopitz J. Ablation of the Right Cardiac Vagus Nerve Reduces Acetylcholine Content without Changing the Inflammatory Response during Endotoxemia. *Int J Mol Sci*, 2018;19(2):442.

34. Asgharzadeh F, Bargi R, Hosseini M, Farzadnia M, Khazaei M. Cardiac and renal fibrosis and oxidative stress balance in lipopolysaccharide-induced inflammation in male rats. *ARYA Atheroscler*, 2018;14(2):71-7.
35. Asgharzadeh F, Bargi R, Beheshti F, Hosseini M, Farzadnia M, Khazaei M. Thymoquinone prevents myocardial and Perivascular Fibrosis Induced by Chronic Lipopolysaccharide Exposure in Male Rats: Thymoquinone and Cardiac Fibrosis. *J Pharmacopuncture*, 2018;21(4):284-93.
36. Beeri R, Chaput M, Guerrero JL, Kawase Y, Yosefy C, Abedat S, et al. Gene delivery of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase inhibits ventricular remodeling in ischemic mitral regurgitation. *Circ Heart Fail*, 2010;3:627-34.
37. Nader L, Lahoud L, Chouery E, Aftimos G, Bois P, Farès NA. B-type natriuretic peptide receptors in hypertrophied adult rat cardiomyocytes. *Ann Cardiol Angeiol*, 2010;59:20-4.
38. Yoon PO, Lee MA, Cha H, Jeong MH, Kim J, Jang SP, et al. The opposing effects of CCN2 and CCN5 on the development of cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*, 2010;49:294-303.
39. Gao WM, Cao ZP, Mi L, DU ZB, Maeda H, Zhu BL. Expression of BNP in rat myocardial tissue after acute cardiac dysfunction. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 2013;29:86-90.
40. Dong X, Wang C, Zhang J, Wang S, Li H, Kang Y, et al. Cholecystokinin Expression in the development of postinfarction heart failure. *Cell Physiol Biochem*, 2017;43:2479-88.
41. Ahmed R, Tanvir EM, Hossen MS, Afroz R, Ahmmed I, Rumpa NE, et al. Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of malaysian propolis in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017; 2017:5370545.
42. Alyane M, Kebsa LB, Bousenane H, Rouibah H, Lahouel M. Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak J Pharm Sci*, 2008;21:201-9.
43. Shen Z, Geng Q, Huang H, Yao H, Du T, Chen L, et al. Antioxidative and Cardioprotective effects of *Schisandra chinensis* bee pollen extract on isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *Molecules*, 2019;24:1090.
44. Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit*, 2009;15:209-19.
45. Bagatini MD, Martins CC, Battisti V, Gasparetto D, da Rosa CS, Spanevello RM, et al. Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. *Heart Vessels*, 2011;26:55-63.
46. Wang K, Zhang J, Ping S, Ma Q, Chen X, Xuan H, et al. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus canadensis*). *J Ethnopharmacol*, 2014;155:300-11.
47. Malekinejad H, Ahsan S, Delkhosh-Kasmaie F, Cheraghi H, Rezaei-Golmisheh A, Janbaz-Acyabar H. Cardioprotective effect of royal jelly on paclitaxel-induced cardio-toxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci*, 2016;19:221-7.
48. Sugiyama T, Takahashi K, Tokoro S, Gotou T, Neri P, Mori H. Inhibitory effect of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid on LPS-induced IL-6 production via reducing IkappaB-zeta expression. *Innate Immun*, 2012;18:429-37.

Oxytocin administration improves DNA damage and total oxidative stress parameters in vincristine and cisplatin-induced cortical neuron toxicity

Oksitosin uygulaması vinkristin ve sisplatin kaynaklı kortikal nöron toksisitesinde DNA hasarını ve toplam oksidatif stres parametrelerini iyileştirir

Betül ÇİÇEK¹ (ID), Ali TAGHİZADEHGHALEHJOUGHİ² (ID), Serkan YILDIRIM³ (ID), Gizem ESER³ (ID), Mustafa GÜL⁴ (ID), Mecit KANTARCI⁵ (ID), Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU⁶ (ID)

ABSTRACT

Objective: Oxytocin (OXT) has been reported to have promising therapeutic potential due to its antioxidant properties in vincristine (VCR) and cisplatin (CP) induced peripheral neuropathy in both *in vivo* and *in vitro* studies. The cerebral cortex is responsible for sense, perception, and memory. Damage to these parts of the brain can lead to impairment of central nervous system functions. However, the effectiveness of OXT in toxicity caused by vincristine and cisplatin in cortical neurons has not been reported. In this study, we aimed to investigate the effects of OXT in VCR and CP-induced cortical neuron cell culture toxicity via biochemically measuring TAS-TOS levels and immunohistochemically determining 8-OHdG expression.

Methods: Cortical neuronal cells were exposed to different concentrations of VCR and CP, and also after the neuronal cells were exposed to OXT (1 µM) for 5 minutes, VCR and CP concentrations were

ÖZET

Amaç: *In vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalarda oksitosin (OXT)'in antioksidan özelliği sayesinde vinkristin (VCR) ve sisplatinin (CP) neden olduğu periferik nöropatide umut verici terapötik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir. Serebral korteks duyu, algı ve hafıza gibi işlevlerden sorumlu olan beyin bölgesidir. Beynin bu bölgesinin hasar görmesi merkezi sinir sistemi işlevlerinin bozulmasına neden olabilir. Buna rağmen, kortikal nöronlarda VCR ve CP'nin neden olduğu toksisitede OXT'nin etkinliğini bildiren herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışmada *in vitro* olarak VCR ve CP'nin neden olduğu kortikal nöron toksisitesinde OXT'nin etkilerini biyokimyasal olarak TAS-TOS düzeylerini ölçerek ve immünohistokimyasal olarak 8-OHdG ekspresyonunu belirleyerek araştırmayı amaçladık.

Yöntem: Kortikal nöron hücrelerine VCR ve CP'ye ayrı ayrı ve farklı konsantrasyonlarda uygulanırken aynı zamanda 5 dakika boyunca OXT'ye (1 µM) maruz bırakıldıktan sonra, hücrelere ayrı ayrı ve farklı

¹Erzincan Binali Yıldırım University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Erzincan

²Bilecik Şeyh Edebalı University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Bilecik

³Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Toxicology, Erzurum

⁴Atatürk University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Erzurum

⁵Atatürk University, Faculty of Medicine, Department of Radiology, Erzurum

⁶Atatürk University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Erzurum



İletişim / Corresponding Author : Ali TAGHİZADEHGHALEHJOUGHİ

Bilecik Şeyh Edebalı University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology,
Bilecik - Türkiye E-posta / E-mail : ali.tgzd@bilecik.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 08.04.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 09.03.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.70846

Çiçek B, Taghizadehghalehjouhi A, Yıldırım S, Eser G, Gül M, Kantarcı M, Hacimüftüoğlu A. Oxytocin administration improves DNA damage and total oxidative stress parameters in vincristine and cisplatin-induced cortical neuron toxicity Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 730 - 739

applied to the cells. Cell viability was determined using the MTT method. TAC and TOS were measured for antioxidant/oxidant activity. The expression of 8-OHdG was investigated as an indicator of oxidative DNA damage.

Results: Administration of OXT before CP and VCR exposure was able to protect against neuronal cytotoxicity. TAS levels increased positively correlated with in cells exposed to OXT+ VCR and OXT+ CP, while TOS levels and DNA damage (8-OHdG levels) negatively correlated.

Conclusion: OXT alleviated the toxic effects of VCR and CP-induced cortical neuron toxicity by increasing the TAS levels, while decreasing TOS levels and DNA damages. According to the results of this study, OXT has the potential to be used protective agent for anticancer agents induced toxicity. However, further studies are needed to clarify mechanisms of action of OXT.

Key Words: Oxytocin, vincristine, cisplatin, cortical neuron, DNA damage, oxidative stress

konsantrasyonlarda VCR ve CP uygulandı. Hücre canlılık testi, MTT yöntemi kullanılarak yapıldı. Antioksidan/oksidan aktiviteyi belirlemek için TAC ve TOS düzeyleri ölçüldü. 8-OHdG ekspresyonu, oksidatif DNA hasarının bir göstergesi olarak incelendi.

Bulgular: Kortikal nöron hücrelerine VCR ve CP uygulaması doz bağımlı olarak sitotoksositeye neden olurken nöron hücrelerine VCR ve CP maruziyetinden önce OXT uygulaması nöronal sitotoksositeye karşı koruma sağladı. TAS seviyeleri, OXT+VCR ve OXT+CP'ye maruz kalan hücrelerde pozitif korelasyon gösterirken, TOS seviyeleri ve DNA hasarı (8-OHdG seviyeleri) negatif korelasyon gösterdi.

Sonuç: OXT, VCR ve CP'nin kortikal nöronlarda neden olduğu toksisiteyi TAS düzeyini artırarak, TOS düzeyi ve DNA hasarını azaltarak gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre OXT antikanser ajanların neden olduğu toksisitede protektif ajan olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Ancak, OXT'nin etki mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Oksitosin, vinkristin, cisplatin, kortikal nöron, DNA hasarı, oksidatif stres

INTRODUCTION

Oxytocin (OXT), a nine-amino-acid nano peptide hormone, is released from the hypothalamus (supraoptic and paraventricular nucleus) (1). While the best-known functions of OXT are uterine smooth muscle contraction and lactation, OXT has been demonstrated major roles in the growth and viability of endothelial, nerve, and glial cells in recent years. Also, OXT has a major role in endocrine and paracrine activities including neuromodulation (2,3). Abnormalities in OXT signaling pathways are

relevant to many disease etiologies. OXT neuronal activities have been found significantly increased at the early stage of sepsis and cancer patients to initiate immune defense, thereby playing the role of immune surveillance (4,5). At the same time, exogenous OXT administration is very effective in improving oxidative stress by its antioxidant capacity. The antioxidant properties mechanisms of OXT work by preventing lipid peroxidation and oxidative apoptosis thanks to tyrosine and tryptophan residues in its structure (6). This may explain the capacity of OXT to act as a "natural

medicine” protecting against stress conditions and many illnesses (1). The unique properties of OXT we mentioned above, suggest that OXT maybe improve adverse conditions that could cause neuronal toxicity.

Anticancer drugs have been widely used for years, but the most important feature that distinguishes anticancer drugs from other drugs is the frequency and severity of side effects at therapeutic doses (7). Vincristine (VCR) and cisplatin (CP) are the most common chemotherapy methods in cancer treatment by targeting the proliferation of tumor cells and their ability to metastasize (8,9). VCR interferes with tumor cell proliferation through binding the β -subunit of tubulin and inhibiting microtubule formation (8), while CP forms deoxyribonucleic acid (DNA) -platin adducts to impede cancer cells proliferation (9). VCR and CP are not specific to cancer cells and VCR and CP also cause oxidative stress in normal healthy cells lead to multiple organ toxicity (10,11). The pathophysiology of the neurotoxicity caused by VCR and CP are not fully known. However, VCR and CP accumulate irreversibly in neurons and increase free radicals causing lipid, protein, and DNA damage, lead to chronic pain in the peripheral nerves, irreversible nerve damage, memory retrieval, and mood disorders. Many studies are carried out to reduce the side effects caused by VCR and CP by using antioxidant substances together with VCR and CP (12,13). Zhu et al. demonstrated OXT is beneficial for VCR-induced chronic pain and decreases nerve damages (14), while Bilmez et al. showed that OXT is a protective agent with antioxidant properties in cisplatin-induced ototoxicity (15).

With this background, we hope to contribute to the attempts for improving related to VCR and CP-relevant cancer treatment protocols by using OXT. Therefore, oxidative damage was determined biochemically with TAS-TOS analysis, immunohistochemically with 8-OHdG expression.

MATERIAL and METHOD

Cell culture and application of the drugs

Frozen cortical neuron cells were obtained from the Pharmacology Department of Medical Faculty of Atatürk University (Erzurum, Turkey). Firstly, after thawing cryotubes were centrifuged (5 min, 1200 rpm). The cells were cultured in a neurobasal medium supplemented with 10% FBS, 2% B27, and 0.1% antibiotics (penicillin, streptomycin, and amphotericin B) at 37 °C in 5% CO₂ (16). The cells were seeded at a density of (2×10^5 cells/well) and then exposure to OT (1 μ M) (17) for 5min, various concentrations of VCR (0.5, 1 and 2 μ g/ml) (18) and CP (5, 10, 15 μ g/ml) (19) were applied to primary cortical neurons for 24 hours.

MTT assay

The cortex neuronal cells viability assay was performed by using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) cell proliferation kit (Sigma, USA) (1). At the end of the exposure, MTT solution (5 mg/ml, 10 μ l = 10% of total good volume) was added to each well and incubated at 37 °C for 4 h. The medium was then carefully removed and the formazan crystals dissolved with 100 μ L of DMSO for 5 min. Thereafter, the absorbance was measured at 570 nm by a microplate reader (20).

TAC and TOS analysis

The total antioxidant capacity (TAC) and total oxidant status (TOS) were evaluated spectrophotometrically utilization of Erel methods by modifying with TAS and TOS commercial kit (Rell Assay Diagnostics, Gaziantep, Turkey) (21,22). The results of TAC and TOS were indicated as μ mol Trolox Eq/L and μ mol H₂O₂ Eq/L respectively. TAC method based on the measurement of the antioxidant impact of the sample against the free radical reactions, which is begun by the generated produced hydroxyl radical. The alteration of absorbance at 660 nm is dependent on the total antioxidant level of the sample (21). At the same time, the TOS method based on the

measurement of oxidant molecules in the sample oxidizes the ferrous iron chelator complex into ferric ion. The color density is associated with the total amount of oxidant molecules available in the sample and can be assessed at 530 nm (22).

TAC and TOS analysis

Cortical neuron cells were cultured in a chamber tissue culture glass slides and were administrated with agents at 75% confluence for 24 h. Once the chamber was removed, slides were rinsed with phosphate buffer, then the cells were fixed by 2% paraformaldehyde and permeabilized in methanol. Then slides were rinsed with phosphate buffer again % serum was used as a blocking agent. The primary antibody of 8-OHdG was incubated overnight. Then incubation with an appropriate biotinylated secondary antibody. 3,3'-diaminobenzidine (DAB) was used as a chromogen for staining and hematoxylin for counterstaining. Slides were examined with confocal microscopy and evaluated as having none (-), very light (+), mild (++), moderate (+++), severe (++++), very severe (+++++) necropsy according to the histopathological findings (16).

RESULTS

MTT assay results

Cells viability assay was used to analyze the metabolic activity. It evaluates the degradation of tetrazolium salts facilitated by mitochondrial dehydrogenases. The quantity of surviving cells is proportional to the formed formazan product. To investigate the effect of OXT on cell viability in cortex neuron culture, cortical neuron cells were treated with OXT (1 μ M) for 5 min and also with common anticancer drugs, VCR (0.5, 1 and 2 μ g/ml) and CP (5, 10, 15 μ g/ml) (Figure 1). The highest survival rate was at a concentration of OXT (1 μ M) which was determined as 95% whereas the viability rate of the highest concentration of CP (10 μ g/ml) and VCR (2 μ g/ml) were 80% and 81% respectively ($p < 0.05$) (Figure 1). The combination of CP and VCR with OXT shows better results compared with the individual CP and VCR results. The viability rate of OXT combination with high dose VCR (2 μ g/ml) and CP (10 μ g/ml) were 86% ($p > 0.05$). The highest survival rate among OXT combination was %92 (OXT 1 μ M + VCR 0.5 μ g/ml).

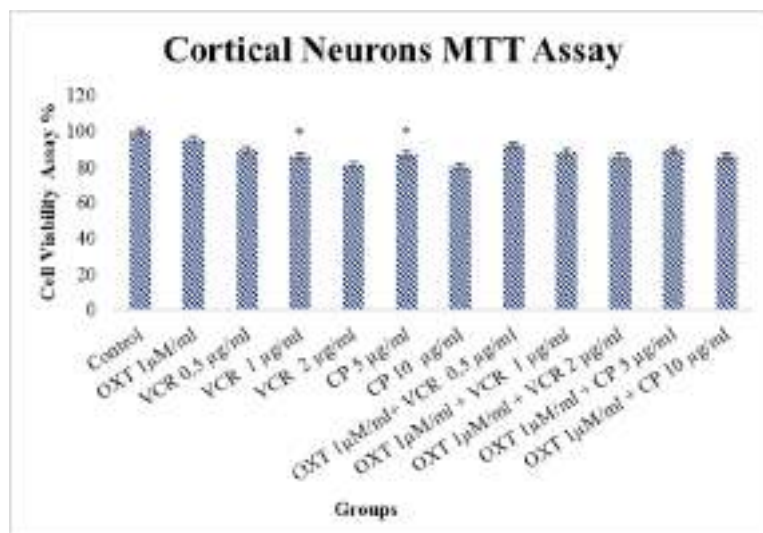


Figure 1. In vitro viability percentages of OXT (1 μ M), VCR (0.5, 1 and 2 μ g/ml) and CP (5, 10, 15 μ g/ml) on primary cortex neurons (n=6/group).

* Significant differences at $p < 0.05$ compared with the control group; ** Significant differences at the $p < 0.001$ compared with the control group. (OXT: Oxytocin, VCR: Vincristine, CP: Cisplatin)

Total antioxidant capacity (TAC) assay results

TAC assay was performed after 24 h exposure to CP, VCR, and OXT (Figure 2). TAC was decreased in a concentration-dependent manner following exposure to pure CP and VCR. The highest antioxidant capacity among pure drugs were measured at the lowest concentration of both VCR (0.5 µg/ml) and CP (5 µg/ml) groups (5.8 and 5.6 Trolox equiv./mmol/L respectively) ($p>0.05$) and the lowest antioxidant capacity was observed in the two concentrations of VCR 2 µg/ml and CP 10 µg/ml respectively ($p<0.05$).

Total oxidant status (TOS) assay results

TOS assay was performed following 24 h exposure to CP, VCR, and OXT (Figure 3). TOS has increased following exposure to both CP and VCR this elevation in oxidant status was concentration-dependent ($p<0.05$). The highest oxidant rate was seen at the CP concentration of 10 µg/ml and was determined by changes in the 4.2 H₂O₂ equiv./mmol/L. Oxidant status in all concentration groups did not show a significant difference compared to control group values ($p>0.05$).

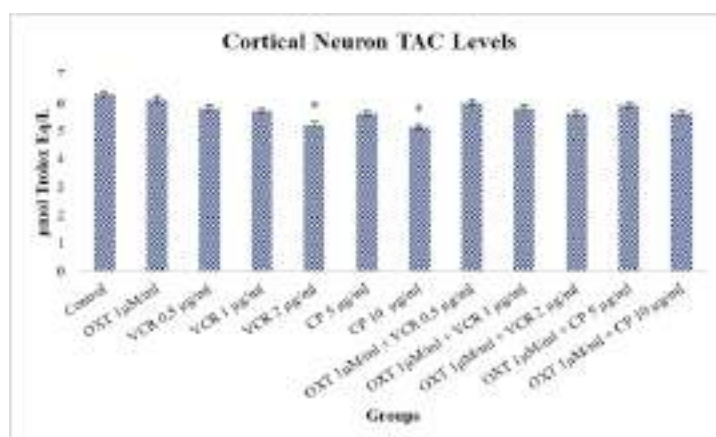


Figure 2. In vitro TAC capacity effects of OXT (1 µM), VCR (0.5, 1 and 2 µg/ml) and CP (5, 10, 15 µg/ml) on primary cortex neurons (n=6/group).

* Significant differences at $p<0.05$ compared with the control group; ** Significant differences at the $p<0.001$ compared with the control group. (OXT: Oxytocin, VCR: Vincristine, CP: Cisplatin)

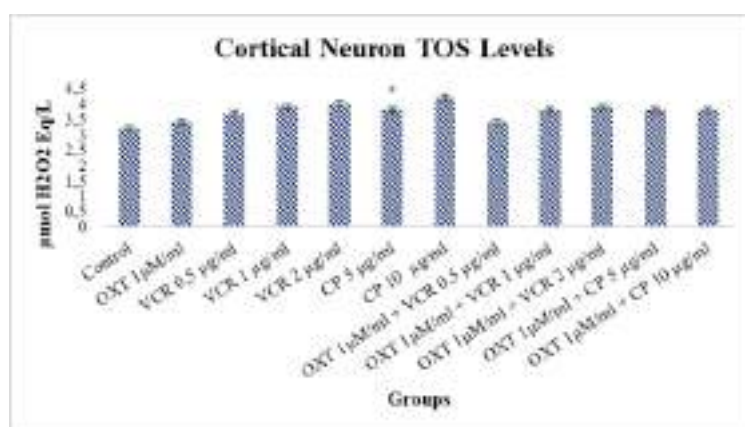


Figure 3. In vitro capacity effects of OXT (1 µM), VCR (0.5, 1 and 2 µg/ml) and CP (5, 10, 15 µg/ml) on primary cortex neurons (n=6/group).

* Significant differences at $p<0.05$ compared with the control group; ** Significant differences at the $p<0.001$ compared with the control group. (OXT: Oxytocin, VCR: Vincristine, CP: Cisplatin)

Results of immunohistochemical investigation of 8-OHdG for cortex neuron culture

Immunohistochemically, 8-OHdG staining was used to determine the DNA damage in the primary cortex neuron culture. When cortex neuron culture was examined, 8-OHdG expression was not determined in neurons in the control and OXT 1 μ M groups (Figure 4a-b). In the VCR 0.5 μ g/ml group, while necrosis was determined in a small number of neurons, a very mild level of 8-OHdG expressions was detected in neuron cytoplasm (Figure 4c). In the VCR μ g/ml group, intermediate levels of necrosis and 8-OHdG expressions in neuron cytoplasm were determined (Figure 4d). In the VCR 2 μ g/ml group, necrosis and severe levels of 8-OHdG expressions were found in a large number of cells (Figure 4e). In the CP 5 μ g/ml group was observed necrosis in some neurons and moderate 8-OHdG expressions in neurons cytoplasm (Figure 4f). In the CP 10 μ g/ml group showed necrosis and severe 8-OHdG expressions in numerous neurons

cytoplasm (Figure 4g). In the CP 15 μ g/ml group, severe levels of necrosis and 8-OHdG expressions were determined in neurons (Figure 4h). In the VCR 0.5 μ g/ml + OXT 1 μ M groups were shown that necrosis in a few neurons and a very mild level of 8-OHdG expressions in neurons (Figure 4i). In the VCR 1 μ g/ml + OXT 1 μ M groups, necrosis was observed in one or two neurons and a mild level of 8-OHdG expressions was showed neuron cytoplasm (Figure 4j). In the VCR 2 μ g/ml + OXT 1 μ M groups, necrosis and moderate levels of 8-OHdG expressions were detected in neurons (Figure 4k). In the CP 5 μ g/ml + OXT 1 μ M groups, multiple necroses and a mild level of 8-OHdG expressions were determined in neurons (Figure 4l). In the CP 10 μ g/ml + OT 1 μ M groups, was determined necrosis in some neurons and moderate level 8-OHdG expression in neuron cytoplasm (Figure 4m). In the CP 15 μ g/ml + OXT 1 μ M groups, necrosis in some neurons and severe level 8-OHdG expression in neuron cytoplasm were detected.

Table 1. 8-OHdG -positive stained cells in cortical neuron cells in culture

	Necrosis in cortical neuron culture	8-OHdG in cortical neuron culture
Control group	-	-
OXT 1 μ M group	-	-
VCR 0.5 μ g/ml group	+	++
VCR 1 μ g/ml group	+++	+++
VCR 2 μ g/ml group	++++	++++
CP 5 μ g/ml group	++	++
CP 10 μ g/ml group	+++	++++
CP 15 μ g/ml group	+++++	+++++
VCR 0.5 μ g/ml + OXT 1 μ M group	+	+
VCR 1 μ g/ml + OXT 1 μ M group	++	++
VCR 2 μ g/ml + OXT 1 μ M group	+++	+++
CP 5 μ g/ml + OXT 1 μ M group	+	++
CP 10 μ g/ml + OXT 1 μ M group	++	+++
CP 15 μ g/ml + OXT 1 μ M group	+++	++++

None (-), very light (+), mild (++), moderate (+++), severe (++++), very severe (+++++)

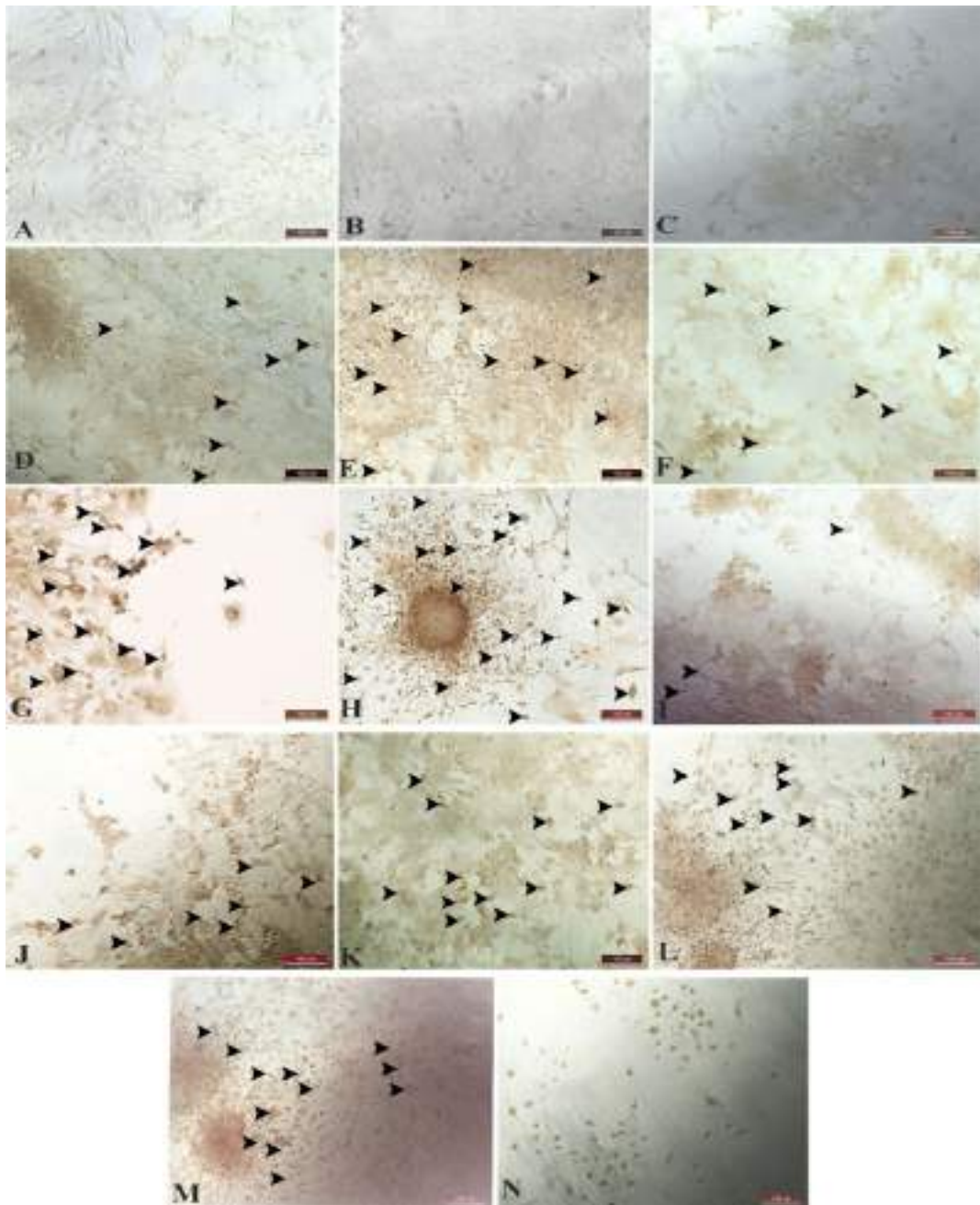


Figure 4. 8-OHdG expression in primary cortex neuron cells. a,b) Control and OXT 1 μM groups: 8-OHdG expression is negative; c) VCR 0.5 $\mu\text{g/ml}$ group: 8- OHdG expression at mild levels in neurons; d) VCR 1 $\mu\text{g/ml}$ group: Moderate 8-OHdG expression in neurons (arrow heads); e) VCR 2 $\mu\text{g/ml}$ group: Severe 8- OHdG expression in neurons (arrow heads); f) CP 5 $\mu\text{g/ml}$ group: Moderate 8-OHdG expression in neurons (arrow heads); g) CP 10 $\mu\text{g/ml}$ group: 8- OHdG expression at severe levels in neurons (arrow heads); h) CP 15 $\mu\text{g/ml}$ group : Very severe 8-OHdG expression in neurons (arrow heads); i) VCR 0.5 $\mu\text{g/ml}$ + OXT 1 μM groups: very mild 8-OHdG expression in neurons (arrow heads); j) VCR 1 $\mu\text{g/ml}$ + OXT 1 μM groups: 8- OHdG expression at mild levels in in neurons (arrow heads); k) VCR 2 $\mu\text{g/ml}$ + OXT 1 μM groups: moderate 8-OHdG expression in neurons (arrow heads); l) CP 5 $\mu\text{g/ml}$ + OXT 1 μM groups: mild 8-OHdG expression in neurons (arrow heads); m) 8-OHdG expression at moderate levels in neurons; n) Severe 8-OHdG expression in neurons (arrow heads). IHC-P, Bar: 100 μm

DISCUSSION

VCR and CP have different side effects on the brain (12-15). As the cerebral cortex is responsible for sensation, perception, memory, association, though, toxicity caused by VCR and CP in these parts of the brain may explain the impairments of these central nervous system functions (23, 24). OXT has been highlighted as a powerful antioxidant property in many previous neurological scientific studies (14,15).

The present study was to identify the protective effect of OXT against VCR and CP-induced cortical neuron culture. The histological technique was used for confirming the protective effect of OXT on in vitro cortical neuron cells. Some preclinical studies have reported that OXT has a protective effect on peripheral neuropathy caused by VCR and CP. Zhu et al. showed that VCR caused degeneration of neurites of primary DRG neurons in vitro and after administration of OXT, neurites' length enhanced (14). Akman et al. declare that CP induces an increase in lipid peroxidation and decreases glutathione level in rats' plasma. Also, CP reduced the amplitude in the electromyographic recording taken from the sciatic nerves of rats. However, the treatment of OXT significantly improved the electromyographic alteration and improved antioxidative capacity (25). The researcher did not give any information about the effects of OXT in VCR and CP-induced toxicity in cortical neurons. We found that the highest doses of VCR and CP (2 µg/ml and 10 µg/ml respectively) induce the highest toxicity to neurons. However, administration of OXT five minutes before the VCR and CP treatment dramatically and significantly prevented neurons from toxicity (Figure 1). Consistent with our study, Wing et al showed that induced pluripotent stem cell-derived cortical were treated with VCR and CP resulted in a decrease in cell viability as a mechanism for neurotoxicity (26). The literature proposes that different mechanisms are responsible for the neurotoxicity caused by VCR and CP, but oxidative damage stands out among them (27). Vashistha et al. findings showed that reduced glutathione and increased thiobarbituric acid reactive species levels are associated with VCR- induced neuropathic pain (28). Abdel-Wahab et al. demonstrated that the

antioxidant status of the brain is importantly inhibited evidenced by the decrease in the TAC, the level of glutathione, as well as the activities of catalase and superoxide dismutase in the brain upon applying with CP (13). In our study, the amounts of TOS levels in cortical neuron culture of the CP at 10 µg/ml group were found the highest while TAS levels were found lowest. We also determined significantly elevated TOS and decreased TAS level at 2 µg/ml VCR concentration in cortical neuron culture (Figure 2 and 3). These results support the hypothesis that the mechanism of VCR and CP-induced neurotoxicity is associated with oxidative stress. Suppression of the antioxidant status may be a result of the enhanced production of oxidants as mentioned earlier. OXT reduces ROS in the brain membranes, inhibits low-density lipoprotein oxidation, and prevents lipid peroxidation (14,15). Lefter et al. reported the neuroprotective effects of OXT following the valproic-acid autistic rat model most probably by increasing the antioxidant enzyme and decreasing lipid peroxidation (6). Recently, Erdoğan et al. reported that OXT significantly improved lipid peroxide levels along with motor performance, electrophysiological and histopathological changes in a rat model of vincristine-induced neuropathy (29). In our study, (Figure 2 and 3) pure 1 µM OXT did not show any significant increase in TAC and also TOS in cortical neuron culture comparison to the control group. On the contrary, OXT combination with the cancer drugs showed a significant increase in TAC in cortical neuron culture comparison to the control group ($p<0.05$), however, attenuated the increase in TOS significantly at 10 µg/ml concentration of CP presenting the antioxidant effects of OXT. Also elevated free oxygen radicals interact with DNA and result in the production of 8-OHdG, which is responsible for DNA damage (30). In vivo model of peripheral neurotoxicity caused by VCR, an increase in the levels of 8-OHdG was observed to cause oxidative stress, oxidative DNA damage, and also VCR prevents neuronal survival (31). Moreover, Sakat et al. showed that CP treatment-induced immunopositivity of 8-OHdG in spinal ganglion cells (32). In the present study, VCR and CP applied group demonstrated a remarkable increase in 8-OHdG levels were compared to the control groups. According

to these results, it is thought that oxidative stress induced by VCR and CP elevates the 8-OHdG mediated DNA methylation possibly because of decreasing the activities of antioxidant enzymes. Although several studies are linking VCR and CP tissue toxicity to 8-OHdG, limited studies were associating the increase of 8-OHdG with neuronal cell culture. Besides, no information was found that OXT inhibited the increase of 8-OHdG in cortical neuron culture. However, it has been reported that OXT diminishes DNA damage in the comet assay of peripheral blood lymphocytes by *in vitro* exposure to H₂O₂ (33). These data support our study that OXT alleviates the expression of 8-OHdG,

which increases as a result of toxicity caused by VCR and CP, in cortical neuron culture through its antioxidant effects. Our microscopic investigation of cortical neuron culture reveals immunohistochemistry findings consistent with our TAS-TOS analysis results.

In conclusion, VCR and CP lead to oxidative damage in cortical neuron culture, and these changes induce significant immunopathological damages. OXT has been demonstrated to prevent the toxic effects of VCR and CP-induced neuronal toxicity. Further studies are needed to fully determine the effects of OXT against VCR and CP-induced toxicity on the neuron.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Carter CS, Kenkel WM, MacLean EL, Wilson SR, Perkeybile AM, Yee JR, et al. Is oxytocin "Nature's Medicine"? *Pharmacol Rev*, 2020; 72(4): 829-61.
2. Jones C, Barrera I, Brothers S, Ring R, Wahlestedt C. Oxytocin and social functioning. *Dialogues Clin Neurosci*, 2017; 19(2): 193-201.
3. Wagner U, Echterhoff G. When does oxytocin affect human memory encoding? The role of social context and individual attachment style. *Front Hum Neurosci*, 2018; 12: 349-60.
4. Merz T, Denoix N, Wigger D, Waller C, Wepler M, Vettorazzi S, et al. The role of glucocorticoid receptor and oxytocin receptor in the septic heart in a clinically relevant, resuscitated porcine model with underlying atherosclerosis. *Front Endocrinol*, 2020; 11: 299-307.
5. Lerman B, Harricharran T, Ogunwobi OO. Oxytocin and cancer: An emerging link. *World J Clin Oncol*, 2018; 14;9(5):74-82.
6. Lefter R, Ciobica A, Antioch I, Ababei DC, Hritcu L, Luca AC. Oxytocin differentiated effects according to the administration route in a prenatal valproic acid-induced rat model of autism. *Medicina*, 2020; 56(6), 267-82.
7. Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist*, 2019; 2(2), 141-60.
8. Karahalil B, Yardım-Akaydin S, Baytas SN. An overview of microtubule targeting agents for cancer therapy. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2019; 70(3), 160-72.
9. Awuah SG, Riddell IA, Lippard SJ. Repair shielding of platinum-DNA lesions in testicular germ cell tumors by high-mobility group box protein 4 imparts cisplatin hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017; 114, 950-5.
10. Aldossary SA. Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomed Pharmacol*, 2019; 12: 7-15.

11. Geisler S. Vincristine-and bortezomib-induced neuropathies-from bedside to bench and back. *Exp Neurol*, 2021; 336:113519.
12. Starobova H, Vetter I. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Front Mol Neurosci*, 2017; 10: 174-95.
13. Abdel-Wahab WM, Moussa FI. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. *Drug Des Devel Ther*, 2019; 13: 1155-62.
14. Zhu J, Li Y, Liang J, Li J, Huang K, Li J, et al. The neuroprotective effect of oxytocin on vincristine-induced neurotoxicity in mice. *Toxicol Lett*, 2021; 340: 67-76.
15. Bilmez ZEB, Aydin S, Şanlı A, Altıntoprak N, Demir MG, Erdoğan BA, et al. Oxytocin as a protective agent in cisplatin-induced ototoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016; 77(4): 875-9.
16. Varmazyari A, Taghizadehghalehjoughi A, Sevim C, Baris O, Eser G, Yildirim. Cadmium sulfide-induced toxicity in the cortex and cerebellum: in vitro and in vivo studies. *Toxicol Rep* 2020; 7: 637-48.
17. Benavente MA, Bianchi CP, Imperiale F, Aba MA. Antiproliferative effects of oxytocin and desmopressin on canine mammary cancer cells. *Front Vet Sci* 2016; 3, 119: 1-6.
18. Santana-Bejarano UF, Bobadilla-Morales L, Mendoza-Maldonado L, Torres-Anguiano, E, Brukman-Jiménez SA, Barba-Barba CC, et al. In vitro effect of curcumin in combination with chemotherapy drugs in Ph+ acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncol Lett*, 2019; 17(6):5224-40.
19. Shiassi Arani F, Karimzadeh L, Ghafoori SM, Nabiuni M. Antimutagenic and synergistic cytotoxic effect of cisplatin and honey bee venom on 4T1 invasive mammary carcinoma cell line. *Adv Pharmacol Sci*, 2019; 7581318;1-9.
20. Taghizadehghalehjoughi A, Cicek B. Momordica and Pycnogenol Can Tolerate Imazamox Induced Toxicity in L929 Cells Line: In Vitro Study. In *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings* 2018; 25(2): 1584-8.
21. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, 2004; 37: 277-85.
22. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 2005; 38: 1103-11.
23. Agirman G, Broix L, Nguyen L. Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Lett*, 2017; 591(24): 3978-92.
24. Stone JB, DeAngelis LM. Cancer-treatment-induced neurotoxicity—focus on newer treatments. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016; 13(2), 92-105.
25. Akman T, Akman L, Erbas O, Terek MC, Taskiran D, Ozsaran A. The preventive effect of oxytocin to cisplatin-induced neurotoxicity: an experimental rat model. *Biomed Res Int*, 2015; 2015:167235.
26. Wing C, Komatsu M, Delaney SM, Krause M, Wheeler HE, Dolan ME. Application of stem cell derived neuronal cells to evaluate neurotoxic chemotherapy. *Stem Cell Res*, 2017; 22: 79-88
27. Kerckhove N, Collin A, Condé S, Chaletex C, Pezet D, Balayssac D. Long-term effects, pathophysiological mechanisms, and risk factors of chemotherapy-induced peripheral neuropathies: a comprehensive literature review. *Front Pharmacol*, 2017; 8; 86-103.
28. Vashistha B, Sharma A, Jain V. Ameliorative potential of ferulic acid in vincristine-induced painful neuropathy in rats: an evidence of behavioral and biochemical examination. *Nutr Neurosci*, 2017; 20(1); 60-70.
29. Erdoğan MA, Taşkıran E, Yiğittürk G, Erbaş O, Taşkıran D. The investigation of therapeutic potential of oxytocin and liraglutide on vincristine-induced neuropathy in rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020; 34: e22415.
30. Fenga C, Gangemi S, Teodor M, Rapisarda V, Golokhvast K, Docea AO, et al. 8-Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to low-dose benzene. *Toxicol Rep*, 2017; 4: 291-5.
31. Yardim A, Kandemir FM, Ozdemir S, Kucukler S, Comakli S, Gur C, et al. Quercetin provides protection against the peripheral nerve damage caused by vincristine in rats by suppressing caspase 3, NF-κB, ATF-6 pathways and activating Nrf2, Akt pathways. *Neurotoxicology*, 2020; 81: 137-46.
32. Sakat MS, Kilic K, Akdemir FNE, Yildirim S, Eser G, Kiziltunc A. The effectiveness of eugenol against cisplatin-induced ototoxicity. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2019; 85: 766-73.
33. Stanić D, Plečaš-Solarović B, Petrović J, Bogavac-Stanojević N, Sopić M, Kotur-Stevuljević J, et al. Hydrogen peroxide-induced oxidative damage in peripheral blood lymphocytes from rats chronically treated with corticosterone: The protective effect of oxytocin treatment. *Chem-Biol Interact*, 2016; 256: 134-41.

Salmonella Typhimurium and *Salmonella* Hessarek in wild birds

Vahşi kuşlarda *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Hessarek

Elçin GÜNAYDIN¹ (ID), Özlem KARDOĞAN² (ID), Gülsen GONCAGÜL³ (ID), Yavuz ÇOKAL⁴ (ID),
Pınar MURSALOĞLU KAYNAR⁵ (ID)

ABSTRACT

Objective: Sporadic *Salmonella* outbreaks were also documented in wild birds, although wild birds are the well-known carriers of salmonellosis. In this study, we investigated the causative agents of two death events of sparrows and black headed gulls occurring in the Çorum City Landfill and Bartın Port, respectively, between mid-autumn and winter of 2017-2018.

Methods: Septicemic salmonellosis was suspected based on necropsy findings of dead sparrows and black-headed gulls. In this context, isolation and identification was done according to conventional cultural method for the tissue samples (liver, spleen, heart) and ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (Annex D) for small intestine samples, and serotyping were carried out according to Kauffman White Scheme.

Results: One of the two mortality events was seen in the Bartın Port. *S. Typhimurium* was found to be the causative agent of black-headed gulls' (*Larus ridibundus*) death. The other mortality event observed in sparrows (*Passer domesticus*) was determined in the Çorum City Landfill. *S. Hessarek* was determined to be responsible of the septicemic bacteremia of sparrows.

ÖZET

Amaç: Vahşi kuşlar, bilinen salmonelloz taşıyıcıları olmasına rağmen sporadik *Salmonella* salgınları da rapor edilmiştir. Bu çalışmada, 2017-2018 sonbahar ortası ile kış aylarında, sırasıyla Çorum İli Çöp Depolama Alanı ve Bartın Limanı'nda meydana gelen serçe ve kara başlı martıların iki ölüm olayının nedeni olan etken araştırılmıştır.

Yöntem: Ölü olarak bulunan serçe ve kara başlı martıların nekropsi bulgularına dayanarak septisemik salmonellosisten şüphelenilmiştir. Bu bağlamda konvansiyonel kültürel yöntemle dokulardan (karaciğer, dalak, kalp) ve ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (Annex D) ile ince barsak örneklerinden izolasyonu, tanımlanması ve Kauffman White Şeması ile de serotiplendirmesi yapılmıştır.

Bulgular: İki ölüm vakasından biri Bartın Limanı'nda görülmüştür. *S. Typhimurium* kara başlı martıların (*Larus ridibundus*) ölümlerinin etkeni olarak tespit edilmiştir. Serçelerde (*Passer domesticus*) gözlenen diğer ölüm olayının Çorum İli Çöp Depolama Alanı'nda olduğu bildirilmiştir. Serçelerin septisemik bakteriyemiasinden *S. Hessarek*'in sorumlu olduğu belirlenmiştir.

¹Kastamonu University, Veterinary Faculty, Department of Microbiology, Kastamonu

²Veterinary Control Central Research Institute, Poultry Disease Diagnosis Laboratory, Ankara

³Uludağ University, Mennan Pasinli Equine Vocational School, Bursa

⁴Onyedi Eylül University, Bandırma Vocational School, Balıkesir

⁵Hitit University, Alaca Avni Çelik Vocational School, Çorum



İletişim / Corresponding Author : Elçin GÜNAYDIN
Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kastamonu - Türkiye
E-posta / E-mail : elcingunaydin@kastamonu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 28.10.2022
Kabul Tarihi / Accepted : 14.11.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.34538

Günaydın E, Kardoğan Ö, Goncagül G, Çokal Y, Mursalolu Kaynar P. *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Hessarek in wild birds
Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 740 - 747

Conclusion: In both cases, where the death cases observed were the places which had a close interaction with urban civilization. According to informations, while black-headed gulls were adapted to feeding on urban waste and showed tendency to scavenge for food at rubbish tips and sewage outfalls in the Bartın Port, sparrows fed from the Çorum City Landfill to obtain food during migration season. Circulation of *S. Hessarek* in Çorum where commercial layer flocks existed and *S. Typhimurium*, a zoonotic pathogen in the Bartın Port were thought not to be ignored for poultry and human health. The epidemiology of both agents should be examined in wild birds.

Key Words: *S. Typhimurium*, *S. Hessarek*, sparrow, black-headed gull

Sonuç: Her iki durumda da ölüm vakalarının görüldüğü yerler kent yaşamı ile yakın etkileşim içinde olan yerlerdir. Edinilen bilgilere göre Bartın Limanı'nda kara başlı martıların kentsel atıklarla beslenmeye adapte olup, çöplüklerde ve kanalizasyon çıkışlarında yiyecek arama eğilimi gösterdikleri, serçelerin göç mevsiminde yiyecek bulmak için Çorum İli Çöp Depolama Alanı'ndan beslendikleri bilgisine ulaşılmıştır. Ticari yumurtacı sürülerinin bulunduğu Çorum'da *S. Hessarek* ve Bartın Limanı'nda zoonotik bir patojen olan *S. Typhimurium*'un sirkülasyonunun kanatlı ve insan sağlığı açısından göz ardı edilmemesi gerektiğini düşündürmüştür. Her iki etkenin de vahşi kuşlarda epidemiyolojisi incelenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *S. Typhimurium*, *S. Hessarek*, serçe, kara başlı martı

INTRODUCTION

In last decades, wildbirds were well documented as a source of different zoonotic pathogens (1, 2). Particularly, enteric bacterial pathogens such as *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, pathogenic *Escherichia coli* and viral pathogens such as Influenza virus, West Nile virus carriage of wild birds were reported worldwide as well in Turkey (3-7).

As enteric pathogen, *Salmonella* are found in the intestine. *Salmonella* present in wild birds for two reasons. In the first situation, *Salmonella* is adapted to the host and constitute it self as a part of the intestinal flora due to feeding habits of raptors, and sheeding in feces. In this case wild birds shed the microorganism permanently however they are not infected but the candidate of carriers. In the second situation, as a result of the environmental contamination, *Salmonella* exist in the feces for a short time (8, 9).

Although all birds are susceptible to *Salmonella* infections and wild birds are known as to be the

Salmonella carriers (10), particularly, *Salmonella* Typhimurium. Also, *S. Typhimurium* was documented to be the causative agent of salmonellosis outbreaks in wild birds (10-12). Surprisingly, *S. Hessarek* was also reported in septicemic salmonellosis outbreaks of starlings and song trushes (13, 14). In sporadic *Salmonella* death events associated with wild birds, large numbers of susceptible birds are affected at bird feeders and feeding stations (12). Wild birds tend of being infected with enteropathogens due to their behaviours and feeding habits (15). Additionally, wild birds get them via scavenging on waste dumps and sewage sludge or from surroundings that have been contaminated by humans (15). Their flight ability to cover long distances during annual movements, they disperse the disease via feces and contaminated surface water and environment and also disperse the infections to both other animals and humans (10).

In this study, it was aimed to determine the causative agent of the dead events of wild birds with the suspicion of septicemic salmonellosis according to necropsy.

MATERIAL and METHOD

Case definition of wild birds

Between 2017-2018, a total of 45 wild birds including seven black-headed gulls (*Larus ridibundus*), 38 house sparrows (*Passer domesticus*) was transferred to the laboratory of the history of acute deaths by cold chain (Table 1).

Sparrows

The area involved in mortality events called the Çorum City Landfill (40° 45' 37.908"N, 34° 57' 18.2268") where 38 sparrows (*Passer domesticus*) were found. The period where the death events observed was coincided with the migration session mid-autumn and winter. Many migratory birds was observed to have a break during migration in order to feed themselves from Çorum City Landfilled (Table 1).

Black-headed gulls

The area involved in mortality events called the Bartın Port (41° 41' 3.951"N, 32° 13' 32.7648") where seven black-headed gulls (*Larus ridibundus*) were found. We were informed that the black-head gulls fed from trash and sewage outfalls in the port when the mortalities were detected (Table 1).

Microbiological examination

Tissue samples (hearth, spleen, liver) were inoculated on 5% Blood Agar (Oxoid, CM0055), MacConkey Agar (Oxoid, CM0007), Brilliant Green Agar (Oxoid, CM0263) and aerobically incubated

at 37°C (16). Each intestine samples of sparrows and black-headed gulls were examined according to ISO 6579:2002/Amd -1:2007 (Annex D)(17). Each minced intestine samples were added to 225 ml of buffered peptone water (BPW, Oxoid CM509) after preenrichment at 37 (±1) °C for 16-18 hours, 1 ml and 0.1 ml of each preenrichment culture were inoculated into each Mueller Kaufmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (Oxoid; CM1048) and Modified Semi Solid Rappaport Vassiliadis Medium (HiMedia, M1428), respectively. Mueller Kaufmann Tetrathionate-Novobiocin broth (Oxoid; CM1048) and Modified Semi Solid Rappaport Vassiliadis Medium (HiMedia, M1428) enrichment cultures were incubated at 37°C and 41.5°C, respectively. After enrichment, a loopful of inocula were streaked on each Brilliant Green Agar (Oxoid, CM0263) and XLD agar (Oxoid, CM0469). Pure cultures were prepared from the suspected *Salmonella* colonies in Brain Hearth Infusion broth (Oxoid; CM1135). In order to identify the pure cultures of suspected colonies, biochemical assays were used: Triple Sugar Iron (Oxoid, CM0277), urea hydrolysis (Oxoid, CM0053B), H₂S, indole production, ONPG (β-galactosidase; Oxoid, DD0013), lysine decarboxylase (Oxoid, CM038) and Voges Proskauer (Oxoid, CM0043) tests (17). Polyvalent and monovalent specific somatic and flagellar antisera (Statens Serum Instut, Denmark) were used to confirm and serotype all identified *Salmonella* spp. isolates according to Kauffmann-White scheme (18).

Table 1. Main informative parameters and definitions of the studied areas and wildbird species

Area	Common name	Wild bird species	Number of examined wild birds
Bartın Port 41° 41' 3.951"N, 32° 13' 32.7648"	Black-headed gull	<i>Larus ridibundus</i>	7
Çorum City Landfilled 40° 45' 37.908"N, 34° 57' 18.2268"	Sparrow	<i>Passer domesticus</i>	38
TOTAL			45

RESULTS

Gross macroscopic findings

Except three sparrows, the remaining was suitable for diagnostic examination. The main necropsy findings in 35 sparrows were poor body condition, splenomegaly, absence of fat deposits, pectoral muscle atrophy. In addition to these findings, severe hemorrhage in the proventriculus and in the intestine was observed in 11 sparrows. Moderate hepatomegaly, multifocal pinpoint foci of necrosis in the internal organs (heart, spleen, liver) was observed in 17 sparrows. Multifocal encephalitis was seen in five sparrows. Multifocal pinpoint foci of necrosis in the internal organs (heart, spleen, liver), and severe hemorrhage in the proventriculus and in the intestine were observed in seven black-headed gulls. Four out of seven expressed splenomegaly (at least twice normal size). These findings in both two death events in Çorum and Bartın guided us to suspect *Salmonella* originated bacterial septicemia as the cause of deaths.

Microbiological examination results

According to macroscopic lesions in the internal organs, tissue samples (spleen, liver, heart) of sparrows and black-headed gulls were examined for the presence of *Salmonella*. As emphasized before, thirty-five out of 38 sparrows was suitable for the macroscopic examination. Of the examined tissue samples of 35 sparrows, *Salmonella* spp. was isolated from all tissue samples. Eighteen out of 35 minced intestine samples of sparrows *Salmonella* spp. was isolated. All *Salmonella* spp. isolated sparrows were identified as *S. Hessarek* after serotyping. All black-headed gulls' intestine samples were found to harbour *Salmonella* spp. In addition to this, *Salmonella* spp. was isolated from seven spleen, four heart, five heart samples of black-headed gulls. All of the *Salmonella* spp. from black-head gulls were identified as *S. Typhimurium*. As a result, *S. Hessarek* and *S. Typhimurium* were decided to be the responsible agents of the death events for sparrows and black-headed gulls, respectively.

DISCUSSION

Salmonella carriage of wild birds was well documented (2, 6). Malekian et al. (7) discovered 36%, 30%, 26%, and 23% *Salmonella* positive in black headed gulls, slender billed gulls, starlings, and rooks, respectively, in landfills near Isfahan City, Iran (7). In general, these bacteria are not dangerous to the wildbirds, although certain salmonellosis outbreaks that caused the death of bird colonies in the United States have been reported (10). In a study conducted between 1985-2004 on wild bird mortality events in the United States, of the 3,472 total events, 5.4% were determined as avian wildlife *Salmonella*-related mortality events. *Salmonella* serovars including *S. Typhimurium* (n=96), subsequently 4,5,12:i-monophasic (n=7), *S. Litchfield* (n=1), *S. Rubislaw* (n=1), *S. Uganda* (n=1) were reported to be determined in the study (10). *Salmonella* serovars especially *S. Typhimurium* are commonly found in the intestine of wild birds. They appear to be relatively resistant to salmonellosis however may serve as effective carriers of *Salmonella*. Therefore they are the source of infection for other animals and humans (1, 2, 12).

Gulls are the omnivorous wild birds termed as opportunistic scavengers which feed at sites where the raw sewage released (19). They are recognized to be *Salmonella* carriers. Serovar diversity among the gulls was variable, however *S. Typhimurium* was seen the most commonest serovar among the studies (20). In our investigation, *S. Typhimurium* was isolated from each of the seven black-headed gulls that were transferred to the laboratory with a recent history of acute mortality between midautumn and winter from the Bartın Harbour. In our study, death events observed in black-headed gulls were coincided with the annual migratory season (3). Their ability to fly freely and cover long distances pruned them to disperse *Salmonella* via feces. Although they are known to be the carriers

of *Salmonella* and not affected, in our study seven *Larus ribibundus* were found to be death. In the United States, proportional mortality among the wild birds between 1985-2004 were taken into account, *Salmonella*-related death events were determined in *Larus delawerensis* was declared to be 10.8% (19). *Salmonella* is quite frequently carried by gulls, but this is rarely linked to any manifestation of disease. Nevertheless, clinical salmonellosis in larids is occasionally recorded as a substantial cause of gull morbidity and mortality (as lethargy, fluffed-up plumage, difficult swallowing, enteritis, and neurological signs including incoordination) (19).

During migration, they roost for the purpose to obtain feed. We assumed that decreased fish population in the Black Sea at last five years force the gulls to feed from sewage outfalls, urban waste and garbage (3). Gulls eat small terrestrial animals such as rodents (particularly voles), kitchen scraps (remains of meat, fish, baked goods, rice, etc.), although they are less likely to eat plants (grains, cherries) (15). Seagulls and people have a tight interaction as a result of sharing same coasts and people feeding them, which also increases the spread of bacteria between two species (9, 11, 20). Dolejská et al. (21) showed significant similarities with clinical isolates from Australia, suggesting their human origin. We can not interpret our *S. Typhimurium* isolates as a result of a close interaction with the human population in our study because we did not compare the human origin and wildbirds origin *S. Typhimurium* isolates. However, one of the reason of the death events might be interaction with human population. Also, *Salmonella* Typhimurium phage type DT40, DT56 variant and DT 160 accounted for an important cause of mortality events in wild birds such as garden birds greenfinches and house sparrows between 1993 to 2003 in England and Wales (22). In further studies we decided to determine the phage types. The circulation of similar phage types of *S. Typhimurium* during migration might be one of the other reason of the death events.

Between midautumn and winter 2017-2018, we were informed about 38 sparrows that was found dead in the Çorum City Landfill. And then, conventional cultural examination was performed from spleen, liver, heart and intestine of the dead sparrows for the presence of *Salmonella* spp. A hundred percentage of the *Passer domesticus* were found to harbour *S. Hessarek*. This was the second report of *S. Hessarek* from wild birds in Çorum, Turkey. Dakman et al. (23) reported *S. Hessarek* A,B,C,D,E,F from the liver samples of dead starlings that was transferred to the laboratory in 2015 and the same researchers declared *S. Hessarek* G strain from the liver samples of dead starlings that was transferred to the laboratory, in 2010. Starlings (*Sturnidae*) and Song Thrushes (*Turdus philomelos*) has apparently affected from *S. Hessarek* due to high specificity and pathogenicity of the agent for these bird species, however other susceptible species of birds are known, including the house sparrows (*Passer domesticus*), the Eurasian blackbird (*Turdus merula*) and White Wagtail (*Motacilla alba*) was also reported to be affected (13, 24). In sparrows death event, *S. Hessarek* circulation in the same city should not be ignored due to being the localisation of large commercial layer flocks and pullets. The city landfill of Çorum was the attraction point for sparrows due to abundant food supplies. The feeding habits related to garbage have largely been pose the risk of microbiological infection on sparrows. And also, when they rest during migration to find feed, sparrows might have gained this pathogen from city landfill. City landfills are one of the essential elements of urban civilisation. The possibility of transmitting infectious agents to both humans (garbageman) and other animals is a very serious public health issue, especially during the migration season when the uncontrollable flights of the migrant birds and their usage of urban garbage dumps as a place to find food (25-28). They take pathogens from the contaminated food there or contaminating these areas if they are the carriers

of *Salmonella*, are a problem (7, 8, 12, 25, 26)

Consequently, in our study, *Salmonella* might have been acquired after exposure to human altered environments, particularly to those related to garbage and sewage (9). In two different acute dead events occurred in the Bartın Port and Çorum City Landfill, *S. Typhimurium* and *S. Hassarek*

were isolated, respectively. *Salmonella* can survive in the environment for long periods (29). Hence, as zoonotic pathogen *S. Typhimurium* in the Bartın harbour and possible potential epidemic of *S. Hassarek* in Çorum which is a localisation of commercial layer flocks should not be ignored.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Tessier C, Atiana LP, Lagadec E, Le Minter G, Denis M, Cardinale E. Wild fauna as a carrier of *Salmonella* in Reunion Island: Impact on pig farms. *Acta Trop*, 2016; 158, 6-12.
2. Navarro-Gonzalez N, Wright S, Aminabadi P, Gwinn A, Suslow TV, Jay-Russell MT. Carriage and subtypes of foodborne pathogens identified in wild birds residing near agricultural lands in California: a repeated cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol*, 2020; 86(3), e01678-19.
3. Karagüzel A, Köksal I, Baki A, Ucar F, Gök İ, Cirav Z. *Salmonella* and *Shigella* carriage by gulls (*Larus* sp.) on the east Black Sea Region of Turkey. *Microbios*, 1993; 74 (299), 77-80.
4. Reed KD, Meece JK, Henkel JS, Shukla SK. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin Med Res*, 2003; 1(1), 5-12.

5. Sigirci BD, Celik B, Halac B, Kahraman BB, Bagcigil AF, Ak S. Characterization of faecal Enterococci from wild birds in Turkey and its importance in antimicrobial resistance. *J Hell Vet Med*, 2021; 72(3), 3015-22.
6. Ramos R, Cerdà-Cuéllar M, Ramírez F, Jover L, Ruiz X. Influence of refuse sites on the prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in seagulls. *Appl Environ Microbiol*, 2010; 76(9), 3052-6.
7. Malekian M, Shagholian J, Hosseinpour Z. Pathogen presence in wild birds inhabiting landfills in central Iran. *Ecohealth*, 2021; 18(1), 76-83.
8. Čížek A, Literák I, Hejlíček K, Treml F, Smola, J. *Salmonella* contamination of the environment and its incidence in wild birds. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1994; 41(5), 320-7.
9. Tizard I. Salmonellosis in wild birds. *Semin Avian Exotic Pet Med*, 2004; 13(2), 50-66.
10. Hall AJ, Saito EK. Avian wildlife mortality events due to salmonellosis in the United States, 1985-2004. *J Wildl Dis*, 2008; 44(3), 585-93.
11. Pennycott TW, Mather HA, Bennett G, Foster G. Salmonellosis in garden birds in Scotland, 1995 to 2008: Geographic region, *Salmonella enterica* phage type and bird species. *Vet Rec*, 2010; 166, 419-21.
12. Tizard IR, Fish NA, Harmeson J. Free flying sparrows as carriers of salmonellosis. *Can Vet J*, 1979; 20(5), 143-4.
13. Velarde R, Porrero MC, Serrano E, Marco I, García M, Téllez S, et al. Septicemic Salmonellosis caused by *Salmonella* Hessarek in wintering and migrating song thrushes (*Turdus Philomelos*) in Spain. *J Wildl Dis*, 2012; 48, 113-21.
14. Magistrali C, Latini M, Manuali E, Neri C, Panzieri C, Bazzucchi V, et al. Cases of salmonellosis from *S. Hessarek* in European Starling (*Sturnus vulgaris*) in the center of Italy. *Sanita` Pub Vet*, 2008, 49.
15. Steigerwald EC, Igual JM, Payo-Payo A, Tavecchia G. Effects of decreased anthropogenic food availability on an opportunistic gull: evidence for a size-mediated response in breeding females. *Ibis*, 2015; 157(3), 439-48.
16. Fowl typhoid and pullorum disease. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.11_FOWL_TYPHOID.pdf, [Date Accessed : 10.01.2020].
17. ISO 6579:2002/Amd 1. Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. Geneva: International Organization for Standardization. 2007.
18. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* Serovars, 2007. https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf, [Date Accessed : 10.01.2020].
19. Fenlon DR. Seagulls (*Larus* spp.) as vectors of salmonellae: an investigation into the range of serotypes and numbers of salmonellae in gull faeces. *J Hyg (Lond)*, 1981; 86(2), 195-202.
20. Hubálek Z. Pathogenic microorganisms associated with gulls and terns (*Laridae*). *J Vertebr Biol*, 2021; 70(3), 21009-1.
21. Dolejská M, Masaříková M, Dobiášová H, Jamborova I, Karpiskova R, Havlicek M, et al. High prevalence of *Salmonella* and IMP4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on five Islands, Australia. *J Antimicrob Chemother*, 2016; 71: 63-70.
22. Lawson B, Howard T, Kirkwood JK, Macgregor SK, Perkins M, Robinson RA, et al. Epidemiology of salmonellosis in garden birds in England and Wales, 1993 to 2003. *Ecohealth*, 2010; 7(3), 294-306.
23. Dakman A, Yapıcıer ÖŞ, Yaşarer A, Güleç M. First isolation of *Salmonella* Hessarek from *Sturnus vulgaris* in Turkey: A Case Report. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2017; 23 (2), 343-6.

24. Singer N, Weissman Y, Yom-Tov Y, Marder U. Isolation of *Salmonella* hessarek from starlings (*Sturnus vulgaris*). *Avian Dis*, 1977; 21, 117.
25. Sharp JCM, Reilly WJ, Linklater KA, Inglis DM, Johnston W S, Miller JK. *Salmonella* monteideo infection in sheep and cattle in Scotland, 1970-81. *J Hyg (Lond)*, 1983; 90(2): 225-32.
26. Cardoso MD, Santos AFDM, Rodrigues MDS, Pribul BR, Grael AS, Pedroso VM, et al. *Salmonella* spp. profiles isolated from seabird samples from the Brazilian coast. *Prev Vet Med*, 2021;193:105413.
27. Iveson JB, Shellam GR, Bradshaw SD, Smith DW, Mackenzie JS, Mofflin RG. *Salmonella* infections in Antarctic fauna and island populations of wildlife exposed to human activities in coastal areas of Australia. *Epidemiol Infect*, 2009. 137(6): 858-70.
28. Gómez-Laguna J, Hernández M, Creus E, Echeita A, Otal J, Herrera-León S, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs. *Vet J*, 2011; 190: 176-8.
29. Literák I, Cizek ALOIS, Smola J. Survival of salmonellas in a colony of common black-headed gulls *Larus ridibundus* between two nesting periods. *Col Waterbirds*, 1996; 19(2), 268-9.

Baş biti enfestasyonlarının etkin kontrolü için uluslararası tavsiyeler

International recommendations for an effective control of head louse infestations

Kosta Y. MUMCUOĞLU¹ (ID), Richard J. POLLACK² (ID), David REED³ (ID), Stephen BARKER⁴ (ID), Shirley GORDON⁵ (ID), Ariel Ceferino TOLOZA⁶ (ID), Maria Ines PICOLLO⁶ (ID), Ayşegül TAYLAN ÖZKAN⁷ (ID), Olivier CHOSIDOW⁸ (ID), Birgit HABEDANK⁹ (ID), Joanna IBARRA¹⁰ (ID), Terri L. MEINKING¹¹ (ID), Robert VANDER STICHELE¹² (ID)

ÖZET

Baş biti enfestasyonları, en gelişmiş olanlar da dâhil olmak üzere çoğu ülkede halk sağlığını ilgilendiren bir sorun olmaya devam etmektedir. Makalede sunulan tavsiyeler, bu parazitin prevalansını azaltmak amacıyla baş biti kontrolünde farklı otoritelerin, kurumların, endüstrinin ve kamunun rollerini ve etkilerini vurgulamayı ve bilgilendirmeyi amaçlamaktadır. Sağlık yetkililerini, bu tür enfestasyonların doğru şekilde tespit edilmesi; mevcut ve yeni pedikülositler, tıbbi cihazlar, repellentler, bit ve yumurta giderici ürünlerin değerlendirilmesi amacıyla daha etkili yöntemler izlemeye teşvik etmeyi umuyoruz. Pedikülositler ve tıbbi cihazlar, kullanım talimatlarında doğrulanabilir

ABSTRACT

Head louse infestations continue to be a concern of public health in most countries, including the most developed ones. The present recommendations are intended to inform and stress the role and impact of the different authorities, institutions, industry, and the public in the control of head lice in order to reduce the prevalence of this parasite. We encourage health authorities to pursue more effective methods to correctly identify such infestations, and evaluate existing and new pediculicides, medical devices, louse repellents, and louse- and nit-removal remedies. Pediculicides and medical devices must have verifiable claims in the instructions for use and should be tested

*Bu makale İngilizce olarak International Journal of Dermatology dergisinde (Mumcuoglu KY, Pollack RJ, Reed DL, et al. International recommendations for an effective control of head louse infestations. Int J Dermatol. 2021;60(3):272-280. doi:10.1111/ijd.15096; <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ijd.15096>) yayınlanmış olup Dergi Editörlüğünün izniyle makalenin yazarlarından Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN ve Prof. Dr. Kosta Y. MUMCUOĞLU tarafından Türkçe'ye tercüme edilmiştir.

¹The Hebrew University-Hadassah Medical School, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Parasitology Unit, Jerusalem, Israel

²Harvard University, Environmental Health and Safety, Cambridge, MA, USA

³University of Florida, Florida Museum of Natural History, Gainesville, FL, USA

⁴University of Queensland, School of Chemistry and Molecular Bioscience, Discipline of Parasitology, Brisbane, Australia

⁵Florida Atlantic University, Christine E. Lynn College of Nursing, Boca Raton, FL, USA

⁶Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas, Buenos Aires (CIPEINCITEFA/ CONICET), Buenos Aires, Argentina

⁷TOBB University of Economics and Technology, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey

⁸Department of Dermatology, AP - HP, Hopital Henri Mondor, UPEC, Creteil, Paris, France

⁹Umweltbundesamt – German Environment Agency, Berlin, Germany

¹⁰Community Hygiene Concern, Milton Keynes, UK

¹¹Global Health Association of Miami, Miami, FL, USA

¹²Ghent University, Heymans Institute of Pharmacology, Gent, Belgium



İletişim / Corresponding Author : Kosta Y. MUMCUOĞLU

The Hebrew University-Hadassah Medical School, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Parasitology Unit, Jerusalem, Israel E-posta / E-mail : kostasm@ekmd.huji.ac.il

Geliş Tarihi / Received : 07.05.2022

Kabul Tarihi / Accepted : 14.11.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.78872

Mumcuoğlu KY, Pollack RJ, Reed D, Barker S, Gordon S, Toloz A, Piccolo MI, Taylan Özkan A, Chosidow O, Habedank B, Ibarra J, Meinking TL, Vander Stichele R. Baş biti enfestasyonlarının etkin kontrolü için uluslararası tavsiyeler Türk Hij Den Biyol Derg, 2021; 79(4): 748 - 761

açıklamalara sahip olmalı ayrıca aktif bileşenlere ve formüle ürünlere karşı bitlerin direnç seviyelerinin mevcut durumunu belgelemek için periyodik olarak test edilmelidir. Bit yaygınlığının salgın düzeyine ulaştığı iddiaları ortaya atıldığında, gerçek yaygınlık düzeyinin kanıtlanması amacıyla çocuklar periyodik aralıklarla objektif olarak değerlendirilmelidir. Sağlık hizmeti sunanlar ve toplum geneli için düzenlenen sürekli eğitimlerle bitlerin biyolojisi, önlenmesi ve kontrolü konusundaki yanlış bilgilerin düzeltilmesi sağlanabilir. Ebeveynler, çocuklarını baş biti açısından düzenli olarak kontrol etmeli ve gerektiğinde tedavi etmelidir. Sağlık yetkilileri, vakaları ve yaygınlığı azaltmada bir araç olarak kullanılan ancak bilimsel gerekçesi olmadığı gibi çocukların sağlığı ve huzuruna da ters etki yapan “sirkeye geçit yok- no-nit politikası” tarzında çocukları okuldan uzaklaştırmaya dayalı politika ve uygulamaların ortadan kaldırılması için mücadele etmelidir.

Anahtar Kelimeler: Baş biti, tedavi, kontrol

periodically to document current levels of resistance by lice to the active ingredients and to the formulated products. Where the prevalence of lice is claimed to be epidemic, children should be periodically evaluated objectively to document the actual level of prevalence. Continuing education for health providers and the general population promises to correct misinformation regarding the biology, prevention, and management of lice. Parents should regularly inspect their children for head lice and treat as necessary. Health authorities are encouraged to eliminate policies and practices that rely upon school exclusion as a means to reduce incidence and prevalence, e.g., the ‘no-nit’ policy which lacks scientific justification, and are counterproductive to the health and welfare of children.

Key Words: Head louse, treatment, control

GİRİŞ

Baş biti, *Pediculus humanus capitis* De Geer, 1767 (Anoplura: Pediculidae) sadece kanla beslenen insan kafa derisinde bulunan zorunlu ektoparazit bir böcektir (1-3).

Baş biti enfestasyonu (pediküloz) dünyanın her yerinde esas olarak çocuklar arasında görülür. Genel olarak, enfeste olanlar çok da ciddi semptomlar göstermezler. Bununla birlikte, enfeste bireylerin bir kısmı, doğrudan bitin kan emmesine karşı vücudun tepkisinden kaynaklanan kayda değer sağlık sorunları gösterirler. Baş biti enfestasyonunun ana ve genellikle de tek (ancak illa da görülmesi gerekmeyen) belirtisi olan kafa derisinin kaşınması işte veya okulda konsantrasyon veya uyku kaybına neden olabilir ayrıca aşırı kaşınma sekonder cilt enfeksiyonu ve lenfadenopati riski de oluşturur (4). Birçok kişide baş

biti - veya bu küçük zararlılara maruz kalma korkusu - klinik olmaktan çok duygusal ve psikolojik bir problem olarak kendini gösterir.

Baş biti yaygınlığı arttığında ve bu zararlıları önleme ile ortadan kaldırmaya yönelik bakış açıları, politikalar ve uygulamalar, insanlar için enfestasyonun kendisinden daha büyük riskler oluşturduğunda bir halk sağlığı sorunu haline gelir (5).

1960’ların ortalarından bu yana dünya çapında baş biti enfestasyonu prevalansının arttığı veya artışta olduğuna dair iddialar, yıllık yüz milyonlarca vakanın sıklığına dair veriler değerlendirilerek Dünya Sağlık Örgütü tarafından gözden geçirilmiştir (6,7). Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) uzun süredir ABD’de yıllık 6-12 milyon vaka prevalansı olduğunu tahmin etmektedir (6,8). Çünkü birçok ülkede (ABD dahil) baş biti enfestasyonunun bildiri zorunlu değildir, bu

nedenle yukarıda belirtilen tahminler en iyi ihtimalle şüpheli olarak değerlendirilmelidir.

İsrail, Danimarka, İsveç, Birleşik Krallık, Fransa, ABD, İran ve Avustralya'da baş biti enfestasyonu prevalansının arttığı bildirilmiştir (9-15). Bu epidemiyolojik çalışmalar, farklı mevsimlerde, çok farklı popülasyonlar arasında (yaş ve cinsiyet dahil), farklı inceleme yöntemleri (gözle incelemeye karşın bit tarağı ile) kullanılarak ve enfestasyonu tanımlamak için farklı ölçütlere (örn. canlı bite karşın cansız sirke) dayandırılarak yürütülmüştür. Bu çalışmalardaki standardizasyon eksikliği, belirli bir zaman aralığındaki mevcut yaygınlığının yanı sıra herhangi bir bit önleme stratejisinin sonuçlarının yorumlanması konularında kafa karışıklığına yol açmaktadır.

Baş biti, normalde enfeste bir kişinin saç başka bir kişininle doğrudan temas ettiğinde yeni bir konağa taşınır. Çocukların birbirleriyle ve ebeveynler ile çocuklar arasındaki sosyal ve ailevi temas, paylaşılan araç-gereçten (tarak, fırça, havlu, giysi, çarşaf gibi) daha olası enfestasyon yollarıdır. Baş biti bulaşı risk faktörlerinin aile başına düşen çocuk sayısı, yatak paylaşma sıklığı, yerel adetler ve sosyal temas türleri, toplum temelli sağlık sisteminin eksikliği (örneğin okul sağlık hizmetleri) ve ailenin sosyoekonomik durumundan etkilendiği düşünülmektedir. Baş biti en çok kreşe ve ilkokullara giden çocuklar arasında yaygındır; hane halkı üyeleri arasında da özellikle biti olan çocukların anneleri ve kardeşleri arasında yüksek prevalans kaydedilmiştir. Kız çocuklarına erkeklerden 2-10 kat daha sık enfestasyon teşhisi konur ve en sık 4-13 yaş arası çocuklar etkilenir (16-18).

Altıncı Uluslararası Phthiraptera (Bit) Konferansında (23-29 Haziran 2018 tarihlerinde Brno, Çek Cumhuriyeti'nde) bir araya gelen bit uzmanları, dünya çapında baş biti prevalansını düşürmeye ve belirli tedavilere karşı direnç gelişiminin ortaya çıkışını ve yayılmasını azaltmaya yönelik politikaları etkileme ve çıkartma yetkisine sahip olanlar da dahil olmak üzere tüm paydaşları teşvik etme umuduyla baş biti enfestasyonunun kontrolü için uluslararası

kılavuzların güncellenmesini önerdiler. Sonuç olarak, halk sağlığı ve bit uzmanlarından oluşan geniş bir ekip, bu belgenin temelini oluşturan bir dizi hedef ve öneri üzerinde tartışıp fikir birliğine vardılar.

SAĞLIK OTORİTELERİ İÇİN ÖNERİLER

Piyasaya Yeni Çıkacak Pedikülositler

Yalnızca çocuklara veya çevreye zarar vermeyen kanıta dayalı etkili ürünler piyasaya sürülmelidir (20). Yeni bir pedikülositin pazara sunulması ancak formülasyonunun güvenilirliği ve etkililiğinin kapsamlı bir değerlendirmesine dayanabilir. Piyasada hali hazırda kullanımda olan aktif bileşenli bir pedikülosit, farklı konsantrasyonlarda, farklı kimyasallarla kombine halde veya farklı dozajlarda tescil edilmesi amacıyla sunulduğunda tamamen farklı sonuçlar elde edilebilir (21,22). Bu nedenle, her bir formülasyon iyi tasarlanmış çalışmalarda ayrı ayrı test edilmelidir. Baş biti tedavisine ilişkin kanıtların geçmişi irdelendiğinde, bu çalışmaların çoğu yüksek bias riski taşıdığı görülmektedir (23).

Tüm yeni ürünler, ister yeni kimyasallara, isterse formülasyonları veya kullanımları veya alternatif etki biçimleri (örneğin, büyüme düzenlemesi, boğulma, kitin inhibisyonu, mikrobiyal etki, vb.) açısından belirgin farklılıklar gösteren halihazırda onaylanmış aktif bileşenlere dayansın, önce laboratuvarında vücut biti kolonileri veya ex vivo bit numuneleri üzerinde test edilmelidir; bununla birlikte, ex vivo testlerin bile sadece olası etkinliğin bir göstergesi olduğu ve klinik kullanımdaki etkinlik için bir kılavuz olarak güvenilmemesi gerektiği bilinmelidir.

Tüm aday ürünler, en az bir kez, kör, randomize ve kontrollü bir değerlendirmenin minimum standartlarına göre test edilmeli ve tercihen aynı ülkede kullanılan etkili bir pedikülosit veya diğer baş biti tedavi yöntemlerinden birisiyle karşılaştırılmalıdır (24). Aday ürün, en az 50 baş biti bulaşmış (Bilimsel çalışmalar için dahil etme ve hariç tutma kriterlerini en üst düzeyde karşılayan ve önemli sayıda canlı biti olan) birey üzerinde test edilmelidir. Ayrıca çalışma

sonunda canlı bitleri tespit etmek için geçerli bir yöntem kullanılmalıdır ki ancak böylece güvenilir çalışma sonuçları sağlanabilir.

Bir ürün yalnızca daha az etkili olan başka bir üründen iyi olmakla kalmamalıdır. Ürün mevcut endemiteyi sürdürmek için değil, toplumdaki baş biti prevalansını düşürebilmek için yüksek bir etkinliğe sahip olmalıdır. Salgınların kontrol altına alınabilmesi için ürünlerin minimum etki seviyesinin %85 olması gerektiğine inanıyoruz. Şiddetli yan etkiler (neredeyse hiç) bulunmamalı, hafif yan etkiler ise %5'ten daha az sıklıkta olmalıdır.

Yeni ürünler insanlarda soluma, cilt emilimi ve ağızdan yutma ile ilgili standart toksikoloji verileriyle test edilmelidir. Formülasyon yanıcı ise, standart parlama noktası ve yanma testi verileri de temin edilmelidir.

Vücut biti laboratuvar kolonileri (*Pediculus humanus humanus*) başlangıç in vitro değerlendirmeleri için uygun test denekleri olarak hizmet edebilir (25). Bir deneme formülasyonu uygulaması sonrasında hayatta kalan vücut bitleri, aynı ürünün klinik tedavide baş bitini ortadan kaldırmadaki başarısızlığının habercisidir. Bununla birlikte, bu model organizmalarla laboratuvarde elde edilen başarıya dayanarak sahada veya baş bitlerine karşı kullanıldığında da aynı sonucun elde edileceği öngörülemez.

Her durumda, ex vivo etkinlik çalışmaları bölgesel olarak yapılmalıdır (mümkün olduğunda önerilen kullanımın bulunduğu ülke içinde). Böyle bir ex vivo etkinlik çalışması, herhangi bir formülasyon için sadece bir koşulu (örn., bir maruziyet süresi) analiz etmek amacıyla tasarlanmalıdır. Bu kapsamda en az 100 erişkin veya üçüncü evre baş biti ile 50 tedavi uygulanmayan bitin kontrol grubu olarak alındığı bir çalışmayla değerlendirilmelidir ki bu gözlenen tedavi oranı açısından oldukça dar bir güven aralığı sağlayacak minimum örnek sayısıdır.

Başka Bir Ülkede Klinik Olarak Test Edilmiş Pedikülosit

Dirençli baş biti türlerinin farklı bölgesel prevalansı göstermesi nedeniyle bir bölgede etkili olan pedikülosit başka bir bölgede o kadar etkili olmayabilir. Pedikülositin sunulması planlanan yeni pazarda da yeniden ex vivo ve/veya klinik etkinlik çalışmaları yapılması gereklidir. Örneğin, baş bitinin daha sık görüldüğü gelişmekte olan ülkeler yerine klinik araştırmaların gelişmiş ekonomiye sahip ülkelere yapılması uygulamasından kaçınılmalıdır. Ürünler, yalnızca pazarlanması hedeflenen ülkeye ekonomik olarak benzer bir ülkede klinik değerlendirme yapılması durumunda onaylanmalıdır.

Mevcut Pedikülositlerin Test Edilmesi

Pedikülositler, üretim ve depolamadan kaynaklanabilecek kalite farklılıklarından kaçınmak için "iyi üretim uygulamaları (GMP- good manufacturing practice)"na göre üretilmelidir.

Zamanla aktif bileşenine ve/veya formülasyonuna karşı duysuz (dirençli) bitlerin ortaya çıkması ve yayılması nedeniyle, mevcut pedikülositler sahada görülen gerçek etkinlik düzeylerinin belgelenmesi amacıyla, her beş yılda bir ex vivo testlerle veya klinik çalışmalarla yeniden değerlendirilmelidir (26).

Bitler, piretrin ve piretroid insektisitlere yanı sıra malathion gibi organofosfatlara ve ayrıca karbamat insektisitlere karşı oldukça yaygın ve farklı seviyelerde direnç geliştirmişlerdir (27-35). Çoklu direnç gösteren bitlerin inatçı enfestasyonları için ivermektin düşünülebilir (36).

Bununla birlikte, artık birçok ülkede nörotoksik kimyasalların yerini alan alternatif materyal veya yöntemlerin kullanımıyla artık bu sorun büyük ölçüde aşılmaktadır. Bu alternatif yöntemler bitlere karşı nörotoksik insektisitlerin aktivitesini inhibe eden metabolik yollardan etkilenmeyen bir tür fiziksel aktivite sergilemektedirler.

Doğal Ürünler ve Tıbbi Cihazlar

Bitki özütü remedileri ve bit önleyici cihazlar (sıcak hava, vakumlama veya elektrikli taraklar gibi) piyasaya sunulmadan önce pedikülositlere benzer şekilde değerlendirilmelidir. Bitlerin mekanik

yöntemlere direnç geliştirmesi daha az olası olduğundan, kimyasal olmayan bu ürünlerin periyodik olarak değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmayabilir.

Herhangi bir ürünün reklamında, bu ürünün bir ilaç (farmosötik ürün) veya tıbbi bir cihaz olarak lisanslı olup olmadığı bariz bir şekilde gösterilmelidir. Bir ürün yalnızca saç taramasına yardımcı olarak kullanılmak amacıyla tasarlanmışsa (yani, bitleri veya yumurtalarını öldürmek için herhangi bir mekanizmaya sahip değilse), bu husus açıkça belirtilmelidir. “Saç hijyeni için” ya da “bit temizleyici”, “sirke-gevşetici” veya “istenmeyen saç istilacılarından kurtarır” gibi belirsiz imalar, birçok ülkede pediküloz ürünlerinin reklamlarını düzenleyen mevzuatın lafzı değilse bile ruhuna aykırı olabilir. Mevzuat düzenlemeye yetkili makamlar, bu tür yanıltıcı terminoloji ve reklamların önlenmesi amacıyla kendi yönetmeliklerini hazırlamaya teşvik edilmelidir.

Bit Kovucular (Repellentler)

Pedikülozlerde olduğu gibi, pazara sunulmadan önce bit repellent adayı ile ideal olarak randomize, çift kör, klinik bir çalışma yapılmalıdır. Böyle bir klinik araştırmaya, en az 100 enfekte olmayan birey (aynı ailenin birden fazla üyesini de içerebilir) katılmalıdır. Değerlendirme, bu tür çalışmaların tasarımı ve yürütülmesi konusunda deneyimli bir araştırmacı tarafından yapılmalıdır (37).

Sirke¹ Giderme Amaçlı Ürünler

Sirke (içi boş/cansız bit yumurtaları) giderici ilaçlar öncelikle sirkeler bulunan saçlar üzerinde *ex vivo* olarak, mekanik traksiyon yöntemleri kullanılarak denenmeli sonrasında da saçında sirke veya yumurta bulunan en az 50 kişi üzerinde yapılan klinik deneylerde test edilmelidir. Bu amaçla, yaklaşık 10 cm²'lik eşit miktarda sirke veya yumurta içeren saçlı iki alan, test ve kontrol bölümleri olarak seçilebilir. Saçın bir bölümü sirke giderici ürünle tedavi edilirken, kontrol bölgesine ise su, şampuan veya saç kremi uygulanmalıdır. Deneyin sonunda, saçın iki bölgesindeki sirke sayısı karşılaştırılmalıdır. Eğer bu amaçla bir tarak kullanılıyorsa, aynı tarak

aday ürün için de benzer bir şekilde kullanılmalıdır. Bitlerin yumurtalarını saç tellerine tek tek tutturmak için kullandığı bir nevi çimentomsu yapı dışı bitler tarafından üretilen biyolojik bir maddedir. Bu nedenle bu madde üzerine etki eden herhangi bir ürün, her seferinde yeniden test edilmeksizin herhangi bir ülkede kullanılabilir.

Bit Tarakları ve Diğer Tespit Yöntemleri

Bitleri ve yumurtaları/sirkeleri saçtan çıkarmak için ince dişli bir tarak (bit tarağı) kullanılması, enfestasyonu hafifletmesinin yanı sıra tanı için de uygun bir yöntemdir. İnce dişli bir tarağın etkinliği kısmen tarağın tasarımına ve tarağı kullanan kişinin tecrübesine bağlıdır. Tarama, baş bitlerini ortadan kaldırmanın tek yolu veya ek bir uygulama olarak kabul edilebilir. 0.20-0.30 mm aralıklı dişlere sahip olan bir bit tarağı, özellikle bit enfestasyonunun ilk teşhisine yardımcı olmak ve bir pediküloz ile tedavinin başarısını doğrulamak açısından etkilidir. Bir sirke tarağı (0.09-0.19 mm aralıklı dişlerle) ise yumurta ve sirkelerin çıkarılması için gereken çekişi sağlar. İnce taraklarla taramadan önce ıslak saça bol saç kremi uygulanması, saçın taranmasını ve bitlerin çıkarılmasını kuru taramaya nazaran daha kolay hale getirir. Yöntem kısa ve orta uzunluktaki saçlarda daha etkili olabilir. Doğru taraklar ve talimatlarla desteklenen motive ebeveynler tarafından sistematik olarak uygulanırsa, pedikülozite geçerli bir alternatif olarak sunulabilir (30,38).

İki veya daha fazla tarağın karşılaştırıldığı çalışmaların sonuçları, tespit ve temizleme cihazları olarak taraklar arasında önemli farklılıklar olduğunu doğrulamıştır (39-41). Bu verilere dayanarak, etkinlikleriyle ilgili iddiaları doğrulamak için bit taraklarıyla da *in vivo* test analizleri yapılmalıdır.

Kullanım Talimatı

Pedikülozite, diğer formülasyonlar veya fiziksel cihazlar için olsun, ambalajlardaki ve bilgi broşürlerindeki kullanım talimatları, ürünün pazarlandığı ülkenin gereksinimlerine uygun olmalı ayrıca ana dili ve sosyo-ekonomik durumu ne olursa

¹ Sirke: İçinde embriyo bulunmayan boş yumurta kabuğu/çeperi, “nit” kavramı yerine kullanımı tercih edilmiştir.

olsun kullanıcılarca anlaşılabilir olmalıdır. Doğru kullanımı gösteren piktogramlar (resimli- şekilli açıklamalar), dil becerileri ne olursa olsun tüketicilere yardımcı olabilir. Genellikle belirsiz dozaj talimatları verilir ve bazen ürün paketinin muhtevası talimatlarda belirtilen gereksinim miktarını karşılamak için çok azdır (25).

Ambalaj üzerinde kanıtlanabilir iddialara dair açıklamalar bulunmalıdır; örneğin, yumurtalar üzerindeki sınırlı etkisini ve dolayısıyla yumurtadan yeni çıkmış ergin bitleri öldürmek için tedavinin tekrarlanması gereksinimini vurgulamak gibi. Ek tedavinin sadece ilk tedavi etkili olmadığında tekrarlanması gerektiğini söylemek yeterli değildir. Ürünün nasıl uygulanacağı, saçlı deride ne kadar süre kalacağı, nasıl temizleneceği, tedavi(leri)nin ne zaman tekrarlanması gerektiği, ürünün etkili olup olmadığını tüketicinin nasıl anlayacağı, tedavi boyunca veya sonrasında ek bir araç olarak bit tarağının ne kadar süreyle ve ne sıklıkla kullanılması gerektiği açıkça belirtilmelidir. Kontrendikasyonlar, yan etkiler, tehlikeler (örneğin yanıcılık) ve daha fazla bilginin nasıl elde edileceği her üründe yer almalıdır.

Tıbbi Analiz Kurumları İçin Mevzuat

Ulusal Yetkili Otoritelerin bir ürünün *in vivo* ve *in vitro* etkinliğinin test edilmesini özel ve akademik kurumlara devretmesi halinde yeterli rehberlik hizmeti ve mevzuat düzenlemesi sağlanmalıdır.

Okul Hemşireleriyle Çocukların Düzenli Muayenesi

Bit enfestasyonu ile ilgili çok sayıda şikayetin olduğu anaokullarında ve okullarda, sağlık yetkililerinin okul hemşireleri ve deneyimli gönüllülerin yardımıyla taramalar düzenlemesi ve ebeveynlere uygun tavsiyelerde bulunması önerilir. Bu, toplum üzerindeki baskıyı hafifletebilir. Bu tür taramalar yalnızca hemşirelere bit biyolojisi, geçerli tanı, tedavi ve kontrol yöntemleri hakkında uygun bir eğitim verildiğinde yapılmalıdır. Ayrıca, bu tür hemşirelere büyüteç benzeri uygun cihazlar ve tarama araçları sağlanmalı, bu araç-gerecin kullanımı konusunda eğitim verilmeli ve ardından kör/

kodlanmış bit, yumurta ve saçla ilişkili yaygın kalıntı türleri (kepek, mantar vb) kullanılarak yeterlilikleri değerlendirilmelidir.

Ulusal Pediküloz Komitesi

Ülke genelinde kanıta dayalı bit yönetimine ilişkin politika ve uygulamalara rehberlik etmesi için ulusal danışma komitelerinin oluşturulması teşvik edilmektedir. Böyle bir komite, pediatristler, dermatologlar, epidemiyologlar, tıbbi entomologlar, halk sağlığı uzmanları, ebeveynler, hemşireler, sosyal hizmet uzmanları ve ilaç endüstrisi temsilcilerinden oluşabilir. Komite, dikkati öncelikle önleme ve kontrol stratejilerini değerlendirmeye odaklanabilir, akademik ve klinik kurumların faaliyetlerini koordine edebilir, bilgi yayabilir ve insidans, prevalans ve dirençle ilgili raporları sağlayabilir veya bu raporlar için bir nevi gözden geçirip onaylayıcı olarak hizmet edebilir.

Pediküloz Temini

Kamu sağlık kuruluşları, gerektiğinde, etkili ve sübvansiyonlu pediküloz temini üstlenebilir.

Eğitim

Kamu sağlık kurumları ve ulusal komitenin, uygun bilginin halkın erişebileceği şekilde dağıtımını üstlenmesi önerilir. Bu yöndeki çabalar şunları içerebilir: sağlık çalışanları ve okul yetkilileri için sürekli eğitim ayrıca toplum geneli için temel bilgiler. Bilgi kaynakları (basılı, internet tabanlı veya radyo-televizyonda kamu hizmeti duyuruları olarak sağlanan) hedef kitlelere uygun dillerde ve anlama düzeylerinde sunulmalıdır.

SAĞLIK HİZMETİ SUNUCULAR

Sağlık hizmeti sunucuların temel amacı, baş biti enfestasyonu ile baş etmek için çocuk bakım personeli yanı sıra ebeveynleri de donatmak olmalıdır. Doktorlar, hemşireler ve eczacılar gibi sağlık çalışanları, etkili bit karşıtı stratejiler ve ürünler hakkında yeterince bilgi sahibi olmalı ve gelişmeler doğrultusunda kendini yenilemelidir. Okul hemşireleri, ailelere bilgi vererek

ve fazla sayıda şikayet olan kurumları araştırarak baş biti sorununu proaktif olarak ele almalıdır. Ayrıca, okul hemşiresi tedaviyi yönetmekte zorlanan ailelere destek olabilir. Eczacılar, yalnızca ulusal komite ve sağlık yetkililerinin etkili olduğunu düşündükleri pedikülositleri önermelidir.

ÜNİVERSİTELER VE DİĞER ARAŞTIRMA KURUMLARI

Akademik kurumlar, sağlık çalışanlarına kaynak hazırlamak ve eğitim sağlamak, temel duyarlılık araştırmalarının yanı sıra pedikülositlerin etkinliği ve bölgesel/yerel baş biti popülasyonlarında direncin evrimi ve halk sağlığı programlarının etkinliği üzerine çalışmalar yürütmek için fon alabilir.

EBEVEYNLER

Ebeveynler, normal saç bakımının bir parçası olarak ya da haftada/iki haftada bir çocuklarını baş biti enfestasyonu açısından nasıl en uygun bir şekilde inceleyecekleri konusunda rutin olarak bilgilendirilmelidir. Bit enfestasyonu, tedavi başarısızlıkları ve ürünlerin yan etkileri hakkında ebeveynlerden sağlık yetkililerine ve/veya bölgedeki sağlık sunuculara gelen geri bildirimler, ürünlerin sürveyansı ve yerel baş biti kontrolünün iyileştirilmesine yardımcı olacaktır. Eğitimli ebeveynler, profesyonel gözetim altında, kreşlerde, okullarda veya diğer toplum bazlı programlarda -bu kurumlara giden çocukların ebeveynleri veya velileri tarafından izin verilmesi koşuluyla- çocukları muayene edebilirler.

İLAÇ ENDÜSTRİSİ

İlaç endüstrisi, bilimsel kanıta dayalı uygulama prosedürlerini gösteren, toksikolojik ve ekotoksikolojik riski düşük, bitlere karşı etkili ürünleri satışa sunmalıdır. Üreticiler, özellikle yeni kimyasal bileşikler içeren fiziksel olarak etkili ve daha az direnç görülen pedikülositleri piyasaya sürmeyi

hedeflemelidirler. Ayrıca sentetik kimyasal bileşikler kullanma konusunda bazen isteksiz davranan kişiler tarafından bitki özütlerine dayalı ürünler genellikle daha rahat kabul edilebilir. Şirketler, şampuan formülasyonlarından ziyade daha etkili olan ve yanıcı olmayan formattaki losyon veya jel formülasyonları (uygulama sırasında suyla çok seyreltilmedikleri birçok tedavide gözlendiği üzere) geliştirmelidirler. Tedavi gören ve tedavi edilen kişi tarafından solunabilecekleri ve bu nedenle daha az güvenli oldukları için basınçlı sprey tarzı formülasyonlardan kaçınılmalıdır. Şirketler ayrıca etkili ve güvenli repellentlerin ve bit taraklarının yanı sıra sirkeleri (içi boş yumurta) gidermede etkili ürünlerin geliştirilmesini de araştırmalıdır. Üreticiler, ürünlerinin hem etkinliği hem de güvenliği hakkında destekleyici veriler yayınlamalıdır.

GENEL ÖNERİLER

Baş Biti Enfestasyonunun Tanısı

Baş biti enfestasyonu tanısı, kişinin saçlı derisinde canlı bir bit bulunmasına dayanmalıdır (5). İnce dişli bir tespit tarağı, baş biti için numune almanın etkinliğini artırır (42-44). Islak taramanın kuru taramadan veya muayeneden daha etkili bir tanı prosedürü olduğu kanıtlanmıştır (45).

'Sirke (nit)' terimi boş yumurta kabuğunu ifade etmelidir (46). Yumurtadan çıkmamış olan embriyo henüz canlı ve hala gelişmekte olabilir veya döllenmediği için canlı olmayabilir veya yaralanma, genetik anomali veya tedavi sonucu ölmüş olabilir. Yeterli bir büyüteç ve tecrübeye sahip olmadıkça, herhangi bir yumurtanın canlılığı hakkında yorum yapmak veya saçtaki herhangi bir nesnenin bit yumurtası olduğu sonucuna varmak hem pratik hem de mantıklı değildir.

Canlı bir bit yoksa, bit yumurtası (sirkeler) olduğu varsayılan nesnelere bulunması, kişide aktif bir bit enfestasyonu olduğu sonucuna varmak için yeterli bir kanıt değildir. İsrail'de 15.000'den fazla çocuğun bit tarağı ile muayenesi, çocukların %11-19'unun canlı

bit ve yumurtalarla, diğer %22-30'unun ise yalnızca sirkelerle enfeste olduğunu ortaya koymuştur (10). Çocukların yaklaşık %80'inde daha önce geçirilmiş bir bitlenme belirtisi olarak kafa derisinden 2-5 cm uzaklıkta sirkeler bulunmaktaydı ki bu da son 2-5 ay içinde başarıyla tedavi edilen enfestasyonların kanıtıydı (16). Bu veriler doğrultusunda baş biti enfestasyonu tanısı yalnızca sirkelerin varlığına dayandığında, üç çocuktan biri yanlış bir şekilde enfeste olarak nitelendirilebilir ve detaylı bir inceleme yapılmaksızın tedavi için eve gönderilebilir.

Ölü yumurtaları ve boş yumurta kabuklarını pedikülositlerle tedavi etmek gereksizdir ve pedikülosit tedavisi saçtaki sirkeleri ortadan kaldıramaz. Bu nedenle, sirkelerin devam eden varlığı ne tedavi başarısızlığı olarak yorumlanmalı ne de tedavinin sürdürülmesinin temeli olmalıdır.

Geleneksel olarak, birçok sağlık çalışanı ve ebeveyn, "güvenlik" amacıyla hata yapmayı ve devam eden tedavilerini yalnızca sirke varlığına dayandırmayı savunmaktadır. Bu tür bir mantık sıklıkla tekrarlanan tedavilere ve (hatayla) tedavilerin etkisiz olduğu sonucuna varılmasına yol açmaktadır.

ABD'de yapılan bir çalışmada, incelenen okul çocuklarının %1,6'sında bit, %3,6'sında bit olmaksızın sirke/yumurta vardı. Başlangıçta yalnızca sirke ve yumurtalarla (ancak canlı bitleri olmayan) başvuran çocuklar 14 gün sonra yeniden incelendiğinde, yalnızca %21'inde canlı bitler bulundu (47). Sirkelerin bulunması eski bir enfestasyonu işaret ediyor olabilir, buna karşın, mevcut veya gelecekte bulaşacak bir bit enfestasyonunu öngöremez.

Canlı bitler saptanmaması halinde, çocuk enfeste olarak kabul edilmemeli ve bu bulgulara dayanarak tedavi edilmemeli veya herhangi bir aktiviteden kısıtlanmamalıdır. Sadece yumurta ile başvuran çocuklar her ihtimale karşı sonraki gün ve haftalarda tekrar muayene edilmelidir. Bu incelemeler sırasında canlı bir bit bulunursa, bu çocuğun saçındaki canlı bir yumurtadan türemiş olabileceği gibi aktif bir bit enfestasyonu olan başka bir kişiyle yakın temasından

da edinilmiş olabilir.

Bit Araştırma Yöntemleri

Baş biti, saçın doğrudan görsel muayenesi ile saptanabilir. Saç, el, tarak ve başka aletler yardımıyla ayrılabilir. Küçük boyutları ve enfestasyonun sadece birkaç bitten oluşma eğilimi nedeniyle, doğrudan görsel muayeneye (taramadan) güvenmek, genellikle aktif enfestasyonu gözden kaçırmak demektir. İsrail'de enfeste olan çocukların %78'inin saçlı derisinde 10'dan az bit, %18.7'sinde 11-20 bit ve sadece %3.3'ünde 20'den fazla bit bulunmuştur (16). Herhangi bir zamanda kafa derisindeki bitlerin çoğu nimflerdir (48), 1-2 mm uzunluğundaki boyutları nedeniyle büyüteç yardımı olmadan onları görmek daha zordur. Ayrıca, muayene eden kişi tarak yerine saçta bakmaya daha fazla zaman harcadığından, doğrudan gözle muayenede tarakla muayeneye göre sadece sirkesi olan çocukların yüzdesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle, yanlış pozitif bir enfestasyonu teşhis etme şansı, elle muayene edildiğinde daha yüksektir ve muayene eden kişi sirke bulma konusunda deneyimliyse bu oran daha da fazladır.

Bir bit veya sirke tarağı, bitleri ve yumurtalarını saçtan etkin bir şekilde "filtreleyerek" teşhis sürecini önemli ölçüde kolaylaştırır. Kuru saçta kullanılan bit tarağının elle muayeneye göre 4-5 kat daha etkili ve iki kat daha hızlı olduğu bildirilmiştir (43-44). Bit tarağı ile 10-20 kez taramanın bitin tespitinde yeterince etkili olduğu kabul edilmektedir (49,50).

Buna karşın kuru tarama, bütün çocuklar için ne pratik ne de etkili bir araçtır. Uzun, kıvrıkcık, afro veya örgülü saçlarda taraklar zorlanır. Bu, tarağın kullanımını engeller ve çocuğa rahatsızlık verebilir. Saçı ıslatma, saç kremi uygulama ve ardından normal bir tarak veya fırça kullanarak dolaşıklıkları açma işlemi, saçı düzleştirmek ve taranmasını kolaylaştırmak için kullanılabilir (45,51). Uzun ve kıvrıkcık/afro saçlarda bitlerin tespiti daha zor olduğu için, muayene daha uzun sürmelidir.

Okulda Teşhis Konulduktan Sonra Alınması Gereken Önlemler

Bitli çocuklar, ebeveynlerine çocuğun muayene edilmesini ve gerekirse hemen (örneğin aynı gün) tedavi edilmesini öneren bir mektupla, gün sonunda eve gönderilmelidir. Enfestasyon muhtemelen birkaç gün hatta haftalardır devam ediyor olabildiğinden, bit veya sirke varlığı nedeniyle çocukların okuldan uzaklaştırılması önerilmemektedir. Ebeveynlere, farklı tedavi seçenekleri konusunda açıklamalar sunan, hangi pedikülozitin veya diğer tedavi yöntemleriyle en iyi sonucu nasıl alacağı gibi konularda soruları bulunması durumunda kime danışabileceğini belirten bir broşür verilmelidir. Ebeveynlerden ilk tedavi seansının ne zaman yapıldığı, gerekirse ardışık seansların ne zaman yapılacağı ve hangi ürünün kullanıldığı ile ilgili bir anket doldurmaları istenebilir. Çocukların ertesi gün okula dönmelerine izin verilmelidir. İdeal olarak, okul hemşiresi dönüşte ve mektubun gönderilmesinden sonraki 10. günde bitleri kontrol edebilir ve tedavi başarılı olana kadar takip muayeneleri yapabilir.

Tedavi

Pedikülozitle tedavi

Sadece sağlık otoriteleri tarafından özel olarak onaylanmış bit tedavisi ürünleri kullanılmalıdır. Kullanım talimatları dikkatlice okunmalı ve takip edilmelidir. Tedaviye başlangıç zamanını not etmek ve saç talimatlarında belirtilen tam süre boyunca tedavi etmek özellikle önemlidir.

Ailenin bir üyesinin enfeste olduğunun tespit edilmesi durumunda, diğer tüm aile üyeleri kapsamlı şekilde muayene edilmeli, ancak sadece enfeste olanlar tedavi edilmelidir. Bu tedaviler mümkünse aynı gün ve aynı anda yapılmalıdır. Tek seferde uygulanan ürünler için, tedavi edilen kişiler 1. gün ve 10. günde tekrar muayene edilmelidir. İki turda uygulanan ürünler için, tedavi edilen kişiler son tedaviden bir gün sonra tekrar incelenmelidir (genellikle 7. gün ile 10. gün arasında gerçekleşir).

Canlı bit bulunmaması halinde, saçlarda sirkeler hala görülse de tedavi başarılı sayılabilir. Sonucu doğrulamak ve kafa derisinde hayatta kalan birkaç biti bulmanın zorluğu nedeniyle tedaviden 10 gün

sonra tekrar ek inceleme önerilir. Canlı bitler hâlâ mevcutsa tedaviye devam edilmelidir, ancak farklı bir etken madde veya öldürme mekanizmasına sahip bir bit önleyici ilaç kullanılmalıdır (22,27). Bitler, konaktan uzakta nadiren bir gün kadar hayatta kalabilir (Mumcuoğlu, kişisel gözlem). Bu nedenle, enfekte bireyle temas eden giysi, havlu, yatak takımı, tarak ve fırçalar, en az iki gün kullanılmadan bırakılarak veya en az 50°C'de 30 dakika yıkanarak veya kurutularak bitlerden arındırılabilir (52).

Bit tarağı ile tedavi

Bit tarağının sistematik olarak 10 gün boyunca kullanımı, bu sırada yumurtadaki bit embriyosu gelişimini tamamladığı için enfestasyonu sağaltabilir. İster teşhis isterse tedavi amaçlı olsun hem ıslak tarama hem de bitleri saptamanın doğru uygulanması için eğitime gereksinim vardır. Bu uygulama şampuan ve saç kremi ile özel saç yıkama talimatları, özel taraklar ve özel tarama prosedürleri kullanılarak 0., 4., 8. ve 12. günlerde taramayı kapsar (30).

Sıcak hava ile tedavi

Kimyasal olmayan ürünler etkili baş biti enfestasyonu tedavisi sağlayabilir. Sıcak hava cihazıyla yapılan bir in vivo çalışmada, tedaviden sonra yumurtadan çıkan bitlerin %80,1'i ve yumurtaların %98,0'ı ölmüştür (49). Böyle bir cihaz hem eğitimli operatörler hem de uygun eğitim materyalleri sağlanan acemi kullanıcılar tarafından verimli bir şekilde kullanılabilir (53). Cihaz, kafa derisinin yanmasını veya saçın kavrulmasını önleyici entegre güvenlik özellikleri açısından tasarlanmıştır. Bu güvenlik önlemleri, standart saç kurutma makinelerinde, kıvrırma ve düzleştirme maşalarında bulunmamaktadır.

Sirke/Yumurta ve Uzaklaştırıcı Ürünler

Dişi bit genellikle yumurtalarını kafa derisine yakın bir yere bırakır ve onları hızlı sertleşen çimento benzeri bir madde ile saça tutturur. Yaklaşık bir hafta (6-10 gün) sonra yavrular yumurta kabuğunu çatlatarak dışarı çıkar. 12 günden eski herhangi bir yumurta artık yumurta olmaktan çıkmıştır (ve bu

nedenle bir sirkedir) veya ölü bir embriyo içerir. Her iki durumda da bunlar sadece kalıntıdır. Eski bir enfestasyonu gösterirler, ancak mevcut bir enfestasyona dair herhangi bir kanıt sağlamazlar.

Ölü yumurtalar ve yumurta kabukları (sirkeler) en az 8 ay boyunca saçta sıkıca bağlı kalabilir. İnsan saçı dibinden ayda yaklaşık 1 cm uzar. Böylece yapıştırılmış olan sirke saç uzadıkça kafa derisinden uzaklaşır. Sirkeler kafa derisinden uzaklaştıkça daha belirgin hale gelir. Koyu saçların sağladığı kontrast, tespit edilme olasılığını artırır. Son tedaviden birkaç ay sonra “yumurta” saptanması, enfestasyonun yanlış yorumlanmasına veya ‘yanlış pozitif teşhise’ yol açar. Genel olarak, kafa derisinden 1 cm’den daha uzakta bulunan bit yumurtalarının yaşama olasılığı düşüktür, ancak bazı araştırmacılar kafa derisinden daha uzakta canlı yumurtalar bulmuşlardır.

Ölü yumurtalar ve boş yumurta kabukları daha fazla bite yol açamayacağı veya bir enfestasyonu sürdürmeyeceği için tedaviye katkı sağlamak amacıyla onları çıkarmaya gerek yoktur. Yine de ölü ve çatlamış yumurtaların varlığı, bunların önemsiz olduğunu değerlendiremeyen kişilerde kafa karışıklığına neden olabilir ve bu kalıntılar başkaları tarafından estetik olarak hoş karşılanmayabilir. Bazı okul yetkilileri, saçında bu tür kalıntılar olan çocukların uzaklaştırılması veya başka bir şekilde damgalanmasına sebep olan aşırı kısıtlayıcı politikalar uygulamaya devam etmektedirler.

Yumurtaları ve sirkeleri mekanik olarak çıkarmak zaman alıcı ve zor olabilir. Saçları su, şampuan veya saç kremi ile ıslatmak, saçı ve tarağı kayganlaştırır ve böylece tarama işlemini kolaylaştırır. Üreticiler tarafından bazı formüle edilmiş ürünlerin yumurtaları veya yumurtaları saçta yapıştıran yapıştırıcıyı çözdüğü iddia edilse de bu iddiaları destekleyecek veriler yetersizdir.

Bazı topluluklarda, bitleri (ve yumurtalarını) ortadan kaldırmak ve yerleşmelerini önlemek için çocuğun saçları kısa kesilebilir veya saç derisi tıraş edilebilir. Bu yöntemlerin kısa vadede ve muhtemelen sadece birkaç gün kadar kısa bir süre için etkisi olsa

da daha kötüsü gereksiz ve yararsız bir utanç ve damgalama durumu ile sonuçlanabilir.

İlaç Tedavisi

Bir kişinin baş biti tedavisinde kullanılacak herhangi bir formülasyon ürünü, bu özel kullanım için ulusal sağlık otoritesi tarafından gözden geçirilmiş ve onaylanmış olmalı, ayrıca ürün etiketi ile tutarlı bir şekilde uygulanmalıdır. İnsanlara bu süreçten geçmemiş başka hiçbir insektisit, pestisit veya kimyasal madde uygulanmamalıdır. Toksik ve yanıcı yapıları nedeniyle petrokimyasal yakıtlar (benzin, gazyağı, parafin yağı ve dizel gibi) asla bit tedavisinde kullanılmamalıdır.

Bit önleyici tedaviler, yalnızca canlı bitler mevcut olduğunda uygulanmalıdır. Profilaktik, önleyici veya olası tedaviler için kullanımları uygun değildir. Tekrar tekrar kullanıldığında muhtemel yan etkileri ortaya çıkacağı için kaçınılmalıdır ve bu ayrıca hızlı bir pedikülosit direnci gelişimine de yol açabilir. Baş biti, bir kişinin kafa derisinden ayrıldığında neredeyse her zaman yaklaşık bir gün içinde doğal olarak öldüğünden, cansız objelere (örneğin giysiler, mobilyalar, halılar veya arabanın veya evin içi) pestisit uygulanmasının hiçbir gerekçesi yoktur. Antibiyotikler, baş bitinin önlenmesi veya kontrolü için etiketlenmemiş veya onaylanmamıştır ve bu amaçla kullanılmamalıdır.

Profilaksi

Düzenli incelemeler

Bit tarağı olsun ya da olmasın, çocuğun saç derisinin periyodik muayeneleri, bitlerin varlığını, erişkinler ve yumurtaları çok daha fazla sayıya ulaşmadan önce ortaya çıkarabilir. Bitleri hızlı ve etkili bir şekilde kontrol altına almak, böylece diğer kişilerin maruz kalma şansını azaltabilir.

Repellentler

Biberiye, sitronella ve piperonal gibi uçucu yağlar, vücut bitlerinin laboratuvar kolonilerine karşı repellent (kovucu/uzaklaştırıcı) olarak test edilmiştir (54). Plasebo kontrollü bir klinik çalışmada, sitronella formülasyonunun çocukların başlarına topikal olarak uygulandığında bit kovucu olarak etkin olduğu

gösterilmiştir (37).

Diğer koruyucu önlemler

Doğrudan kafa kafaya temas, baş biti ile enfeste bir kişiden enfeste olmayan bir kişiye bit bulaşımının açık arayla en olası yoludur. Sınıf zeminleri, saç fırçaları ve şapkalar, bitlerin taşınması veya paylaşılması için bir bulaş aracı olarak epidemiyolojik öneme sahip değildir. Cansız bir objede bulunan canlı bir baş biti veya yumurtasının başka bir kişiyi enfekte etme olasılığı son derece düşüktür (54-56).

“NO-NİT (SİRKEYE GEÇİT YOK)” POLİTİKASI

“No-nit” politikası, canlı, ölü veya boş (yumurtadan çıkmış) herhangi bir yumurtanın o çocuk veya diğer çocuklar için bir risk işareti olduğunu varsayar. Bu politika (Halen ABD, Kanada ve Avustralya’nın bazı bölgelerinde yaygındır), enfeste bir bireyin saçındaki tüm bitler, yumurtalar ve sarkeler temizlenene kadar çocuğun okuldan, kamptan veya çocuk bakım evi gibi ortamlardan uzaklaştırılmasını gerektirir.

“No-nit” politikası, ebeveynlerin, çocuklarının saç derisindeki her sirkeyi (veya genellikle bit yumurtası ile karıştırılan diğer kalıntıları) temizlemesini gerektirir. Bu yaklaşım, saatler boyunca ve sıkıcı bir şekilde sirke toplamaya, pedikülositlerle tekrarlanan tedavilere, çocuğun okuldan uzaklaştırılmasına ve

muhtemelen de en az bir ebeveynin işe gidememesine neden olabilir. Bu haksız süreç, çocuğa gereğinden fazla sıkıntı verebilir ve çocuk ile ebeveyn arasındaki anlaşmazlığı besleyebilir. Sirke temizleme süreci ile hedefe ulaşılması oldukça zordur. Tüm görünür sarkeler saçlardan çıkarılsa bile, birkaç tanesi saklı kalabilir. Bitlerin ve yumurtaların sayısı azaldıkça, kalanları bulmak daha zor ve zaman alıcı olacaktır (samanlıkta iğne arama hikayesi). Çocukların bir kamptan, anaokulundan veya okuldan uzaklaştırılması tıbbi veya halk sağlığı açısından değer taşımadığı gibi çocuğun özgüvenine zarar verebilir ve ebeveynlerine gereksiz yükler getirebilir (57).

“No-nit” politikasının etkinliği, farklı branşlardan bilim insanları (5,47,58,59) ile Hastalık Kontrol Merkezi, Amerikan Pediatri Akademisi ve Ulusal Okul Hemşireleri Birliği de dahil olmak üzere çeşitli kurumlar tarafından sorgulanmıştır. Avustralya’da, Ulusal Sağlık ve Tıbbi Araştırma Konseyi’nin okuldan uzaklaştırmayı zorunlu kılan Bulaşıcı Hastalıklar Yönergeleri, baş biti hariç tutulacak şekilde değiştirilmiştir (5). Ayrıca, zorunlu dışlama politikalarının bitlerin bulaşmasını azaltmada etkili olduğunu gösteren hiçbir ikna edici veri yoktur. Bu nedenle, “no-nit” politikası adaletsizdir, kanıta dayalı bilimden ziyade yanlış inanışlara dayanmaktadır ve sürdürülmemelidir.

TEŞEKKÜR

Bu belgenin eleştirel incelemesinde katkısı bulunan aşağıdaki bilim insanlarına teşekkür etmek istiyoruz: Mr. Ian F. Burgess (Insect Research & Development Limited, Cambridge, UK), Dr. Sarah E. Bush (Department of Biology, University of Utah, Salt Lake City, UT, USA), ve Ms. Katie Shepherd (The Shepherd Institute for Lice Solutions, West Palm Beach, FL, USA).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Alexander JOD. Arthropods and Human Skin. Berlin: Springer- Verlag, 1984.
2. Habedank B. Lice - Biology, medical importance and control. In: Aspöck H (Ed.): Sick through Arthropods. Denisia 2010; 30: 191-212. [In German]. https://www.zobodat.at/pdf/DENISIA_0030_0191-0212.pdf (Last accessed on 10.01.2020).
3. Schaub GA, Kollien AH, Balczun C. Lice as vectors of bacterial diseases. In: Mehlhorn H. (Ed.), Arthropods as Vectors of Emerging Diseases. Parasitol Res Monogr 2012; 3: 255-74.
4. Mumcuoglu KY, Klaus S, Kafka D, M Teiler, J Miller. Clinical observations related to head lice infestation. J Amer Acad Dermatol, 1991; 25: 248-52.
5. Pollack RJ, Kiszewski AE, Spielman A. Overdiagnosis and consequent in management of head louse infestations in North America. Pediatr Infect Dis J, 2000; 19: 689-93.
6. Gratz N. Human Lice, Their Prevalence and Resistance to Insecticides. Geneva: WHO, 1997. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/63791/WHO_CTD_WHOPE5_97.8.pdf [accessed on 9 February 2020].
7. Taplin D, Meinking TL. Pyrethrins and pyrethroids for the treatment of scabies and pediculosis. Semin Dermatol, 1987; 6: 125-35.
8. CDC. Treating and preventing head lice [www document], 2019. <https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm171730.htm> [accessed on 9 February 2020].
9. Speare R, Buettner PG. Head lice in pupils of a primary school in Australia and implications for control. Int J Dermatol, 1999; 38:285-90.
10. Mumcuoglu KY. Prevention and treatment of head lice in children. Paediatr Drugs, 1999;1: 211-8.
11. Rasmussen AM, Larsen KS. A questionnaire on head lice (*Pediculus capitis*). Report 12-1999 (in Danish). Danish Pest Infest Lab, 1999;37.
12. Downs AM, Stafford KA, Coles GC. Head lice: prevalence in schoolchildren and insecticide resistance. Parasitol Today, 1999; 15: 1-4.
13. Burkhart CG, Burkhart CN. Clinical evidence of lice resistance to over-the-counter products. J Cutan Med Surg, 2000; 4: 199-201.
14. Roberts RJ, Casey D, Morgan DA, Petrovic M. Comparison of wet combing with malathion for treatment of head lice in the UK: a pragmatic randomised controlled trial. Lancet, 2000; 356:540-4.
15. Moradiasl E, Habibzadeh SH, Rafinejad J, et al. Risk factors associated with head lice (Pediculosis) infestation among elementary school students in Meshkinshahr County, North West of Iran. Int J Pediatr, 2018; 6: 7383-92.
16. Mumcuoglu KY, Miller J, Gofin R, Adler B, Ben-Ishai F, Almog R, et al. Epidemiological studies on head lice infestation in Israel. I. Parasitological examination of children. Int J Dermatol, 1990; 29: 502-6.
17. Govere JM, Speare R, Durrheim DN. The prevalence of pediculosis in rural South African schoolchildren. South Afr J Science, 2003; 99: 21-3.
18. Willems S, Lapeere H, Haedens N, Pasteels I, Naeyaert JM, Maeseneer JD. The importance of socio-economic status and individual characteristics on the prevalence of head lice in schoolchildren. Eur J Dermatol 2005; 15: 387-92.
19. Mumcuoglu KY, Barker SC, Burgess IF, et al. International guidelines for effective control of head louse infestations. J Drugs Dermatol, 2007; 6: 409-14.
20. ten Bosch L, Habedank B, Siebert D, Mrotzek J, Viöl W. Cold tmospheric pressure plasma Comb - A physical approach for pediculosis treatment. Int J Environ Res Public Health 2019; 16: 19.
21. Mumcuoglu KY, Miller J. The efficacy of pediculicides in Israel. Isr J Med Sci, 1991; 27: 562-5.

22. Burgess I. Human lice and their management. *Adv Parasit*, 1995; 36: 271-342.
23. Vander Stichele RH, Dezeure EM, Bogaert MG. Systematic review of clinical efficacy of topical treatments for head lice. *BMJ*, 1995; 311: 604-8.
24. Barker SC, Burgess I, Meinking TL, Mumcuoglu KY. International guidelines for clinical trials with pediculicides. *Int J Dermatol*, 2012; 51: 853-8.
25. Habedank B. Kopflausmittel mit Tilgungswirkung für den Infektionsschutz. *Umwelt und Mensch Informationsdienst* 2017; 26: 31-35. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/360/publikationen/umid_01_2017_05.pdf [accessed on 9 February 2020].
26. Combescot-Lang C, Vander Stichele RH, Toubate B, et al. Ex vivo effectiveness of French over-the-counter products against head lice (*Pediculus humanus capitis* De Geer, 1778). *Parasitol Res*, 2015; 114: 1779-92.
27. Chosidow O, Chastang C, Brue C, Bouvet E, Izri M, Monteny N, et al. Controlled study of malathion and d-phenothrin lotions for *Pediculus humanus* var *capitis*-infested school children. *Lancet*, 1994; 344(8939-8940): 1724-7.
28. Rupes V, Moravec J, Chmela J, Ledvinka J, Jelenková J. A resistance of head lice (*Pediculus capitis*) to permethrin in Czech Republic. *Cent Eur J Public Health*, 1995; 3: 30-2.
29. Yoon KS, Gao JR, Lee SH, Clark JM, Brown L, Taplin D. Permethrin-resistant human head lice, *Pediculus capitis*, and their treatment. *Arch Dermatol*, 2003; 139: 994-1000.
30. Hill N, Moor G, Cameron MM, Butlin A, Preston S, Williamsom MS, et al. Single blind, randomised, comparative study of the Bug Buster kit and over the counter pediculicide treatments against head lice in the United Kingdom. *Brit Med J*, 2005; 311: 384-6.
31. Kristensen M, Knorr M, Rasmussen AM, Jespersen JB. Survey of permethrin and malathion resistance in human head lice populations from Denmark. *J Med Entomol*, 2006; 43: 533-8.
32. Durand R, Millard B, Bouges-Michel C, et al. Detection of pyrethroid resistance gene in head lice in schoolchildren from Bobigny, France. *J Med Entomol*, 2007; 44: 796-8.
33. Clark JM. Determination, mechanism and monitoring of knockdown resistance in permethrin-resistant human head lice, *Pediculus humanus capitis*. *J Asia Pac Entomol*, 2009; 12: 1-7.
34. Gellatly KJ, Krim S, Palenchar DJ. Expansion of the knockdown resistance frequency map for human head lice (Phthiraptera: Pediculidae) in the United States using quantitative sequencing. *J Med Entomol*, 2016; 53: 653-9.
35. Eremeeva ME, Capps D, Winful EB, Warang SS, Braswell SE, Tokarevich NK, et al. Molecular markers of pesticide resistance and pathogens in human head lice (Phthiraptera: Pediculidae) from rural Georgia, USA. *J Med Entomol*, 2017; 254: 1067-72.
36. Chosidow O, Giraudeau B, Cottrell J, Izri A, Hofmann R, Mann SG, et al. Oral ivermectin versus malathion lotion for difficult-to-treat head lice. *N Engl J Med*, 2010; 362(10): 896-905.
37. Mumcuoglu KY, Magdassi S, Miller J, Ben-Ishai F, Zentner G, Helbin V, et al. The repellency of a citronella formulation for the human head louse, *Pediculus humanus capitis*. *Isr Med Assoc J*, 2004; 6: 756-9.
38. Plastow L, Luthra M, Powell R, Wright J, Russell D, Marshall MN. Lice infestation: bug busting vs. traditional treatment. *J Clin Nurs*, 2001; 10: 775-83.
39. Kurt O, Tabak T, Kavur H, Muslu H. Comparison of two combs in the detection of head lice in school children. *Turkish Parasitol J*, 2009; 33: 50-3.
40. Jahnke C, Bauer E, Hengge UR, Feldmeier H. Accuracy of diagnosis of *Pediculus capitis*. Visual inspection vs wet combing. *Arch Dermatol*, 2009; 145: 309-13.
41. Gallardo A, Toloza A, Vassena C, Picollo MI, Mougabure-Cueto G. Comparative efficacy of commercial combs in removing head lice (*Pediculus humanus capitis*) (Phthiraptera: Pediculidae). *Parasitol Res*, 2013; 112: 1363-6.

42. Ibarra J. How to detect head lice: the changing emphasis of health education. *Health at School* ,1988; 3: 109-12.
43. Mumcuoglu KY, Friger M, Ioffe-Uspensky I, Ben-Ishai F, Miller J. Louse comb versus direct visual examination for the diagnosis of head louse infestations. *Pediatr Dermatol*, 2001; 18: 9-12.
44. Balcioglu IC, Burgess IF, Limoncu ME, Şahin MT, Özbel Y, Bilaç C, et al. Plastic detection comb better than visual screening for detection of head louse infestation. *Epidemiol Infect*, 2008; 136: 1425-31.
45. Lapeere H, Naeyaert J-M, De Bacquer D. Diagnostic value of screening methods for head lice. In: Lapeere H, ed. Development of an evidence-based management of pediculosis capitis and scabies. Gent, Belgium: Ghent University Hospital, 2007: 121-140 (PhD dissertation) <http://hdl.handle.net/1854/LU-810574> [accessed on 9 February 2020].
46. Maunder JW. The appreciation of lice. *Proc R Inst Great Britain*, 1983; 55: 1-31.
47. Williams LK, Reichert A, MacKenzie WR, Hightower AW, Blake PA. Lice, nits, and school policy. *Pediatrics*, 2001; 107: 1011-5.
48. Buxton PA. The louse: an account on the lice which infest man, their medical importance and control, 2nd edn. London: Arnold, 1946.
49. Goates BM, Atkin JS, Wilding KG, Birch KG, Cottam MR, Bush SE, et al. An effective nonchemical treatment for head lice: a lot of hot air. *Pediatrics*, 2006; 118: 1962-70.
50. Toloza A, Laguna F, Ortega-Insaurralde I, Vassena C, Risau-Gusman S. Insights about head lice transmission from field data to mathematical modelling. *J Med Entomol* ,2018; 55: 929-37.
51. Ibarra J, Fry F, Wickenden C, Olsen A, Vander-Stichele RH, Lapere H, et al. Overcoming health inequalities by using the Bug Busting 'whole-school approach' to eradicate head lice. *J Clin Nurs*, 2007; 16(10): 1955-65.
52. Izri A, Chosidow O. Efficacy of machine laundering to eradicate head lice: recommendations to decontaminate washable clothes, linens, and fomites. *Clin Infect Dis*, 2006; 42, e9-e10.
53. Bush SE, Rock AN, Jones SL, Malenke JR, Clayton DH. Efficacy of the Louse Buster, a new medical device for treating head lice (Anoplura: Pediculidae). *J Med Entomol*, 2011; 48: 67-72.
54. Canyon DV, Speare R, Muller R. Spatial and kinetic factors for the transfer of head lice (*Pediculus capitis*) between hairs. *J Invest Dermatol*, 2002; 119: 629-31.
55. Canyon DV, Speare R. Indirect transmission of head lice via inanimate objects. *Open Dermatol J*, 2010; 4: 72-6.
56. Takano-Lee M, Edman JD, Mullens BA, Clark JM. Transmission potential of the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Int J Dermatol*, 2005; 44: 811-6.
57. Mumcuoglu KY, Meinking TA, Burkhart CN, Burkhart CG. Head louse infestations: the "no nit" policy and its consequences. *Int J Dermatol*, 2006; 45: 891-6.
58. Price JH, Burkhart CN, Burkhart CG, Islam R. School nurses' perceptions of and experiences with head lice. *J Sch Health*, 1999; 69: 153-8.
59. Dolianitis C, Sinclair R. Optimal treatment of head lice: is a no nit policy justified? *Clin Dermatol*, 2002; 20: 94-6.

How to detect SARS-CoV-2: A brief review about molecular diagnosis techniques

SARS-CoV-2 nasıl tespit edilir: Moleküler tanı teknikleri hakkında kısa bir inceleme

Ahmet ÇARHAN¹ (ID), Ender ŞİMŞEK¹ (ID), Özen ÖZENSOY GÜLER¹ (ID)

ABSTRACT

A new type of coronavirus (SARS-CoV-2) was detected in patients with acute respiratory disease in 2019. SARS-CoV-2 is a virus that can cause fever, dry cough, shortness of breath, anorexia, fatigue and sore throat, which can be transmitted through respiration and has started to spread around the world and has become a global problem. The disease caused by SARS-COV-2 has been named Coronavirus Disease 2019 (Covid-19) by the World Health Organization (WHO). According to the WHO, Covid-19 is a pandemic and it is stated that humanity has not experienced such an epidemic in the last hundred years. The coronavirus originated from bats and was transmitted to human through unknown animals in Wuhan province of China in December 2019. On January 2021, 96.658.420 confirmed cases and 2.092.062 deaths have occurred in the world. There is a growing need in the detection of SARS-CoV-2. A number of problems and difficulties are observed in the diagnosis and treatment of Covid-19. Chest tomography and molecular tests are used to detect SARS-CoV-2. The molecular techniques used are PCR-based and non-PCR-based methods. Usually detection of SARS-CoV-2 is based on PCR, but isothermal nucleic acid amplification tests have also been promising alternatives. Currently,

ÖZET

Yeni tip koronavirüs (SARS-CoV-2) 2019 yılında akut solunum yolu hastalığı olan hastalarda tespit edilmiştir. SARS-CoV-2'nin sebep olduğu en önemli semptomlar; ateş, kuru öksürük, nefes darlığı, iştahsızlık, yorgunluk ve boğaz ağrısıdır. Solunum yoluyla bulaşabilen ve tüm dünyaya yayılmaya başlayan bu virüs küresel bir sorun haline gelmiştir. Bu virüsün sebep olduğu hastalığı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından Covid-19 adı verilmiştir. DSÖ'ye göre Covid-19 bir pandemidir ve insanlığın son yüz yıldır böyle bir salgın yaşamadığı belirtilmiştir. Yarasalardan köken alan bu virüs Aralık 2019'da Çin'in Wuhan eyaletinde insana bulaşmıştır. Bu virüsten kaynaklı 2021 Ocak'ta, tüm dünyada 96,658,420 onaylanmış vaka ve 2,092,062 ölüm meydana gelmiştir. Bu durum ise, bu virüsün tespit edilebilmesinin önemini her geçen gün arttırmaktadır. SARS-CoV-2'nin tanı ve tedavisinde birtakım sorunlar ve zorluklar gözlenmektedir. Bu hastalığı tespit edebilmek için klinik olarak göğüs tomografisi, röntgen ve moleküler testler kullanılmaktadır. Kullanılan moleküler teknikler, PCR tabanlı ve PCR tabanlı olmayan yöntemlerdir. Genellikle SARS-CoV-2'nin tespiti PCR yöntemine dayanmaktadır, ancak izotermal nükleik asit amplifikasyon testleri de bu tür enfeksiyonların tanısı

¹Ankara Yıldırım Beyazıt University, Department of Medical Biology, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Özen ÖZENSOY GÜLER

Ankara YBÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Binası Bilkent Yolu 3. Km Bilkent Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 02.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 07.09.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.87533

Çarhan A, Şimşek E, Özensoy Güler Ö. How to detect SARS-CoV-2: A brief review about molecular diagnosis techniques
Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 762 - 775

qRT-PCR is a golden assay and it is widely used although many alternative assays have been developed for recent years. The current testing capacity and availability can not meet the unprecedented global demands for rapid, reliable and widely accessible molecular diagnosis. In addition, there is a need for a comprehensive strategy compare the molecular techniques used in the field. Since in this review we aim to give a summary of molecular diagnosis techniques to detect Covid 19.

Anahtar Kelimeler: Covid-19, molecular techniques, pandemia, PCR, SARS-COV-2

için umut verici alternatifler olmuştur. Mevcut tanı seçenekleri arasında, qRT-PCR testinin kullanımı altın standart bir test olarak düşünülmektedir. Ancak bu yöntemin de test kapasitesi ve kullanılabilirliği, hızlı, güvenilir ve yaygın olarak erişilebilir moleküler tanı için küresel talepleri karşılayamamaktadır. Bu derlemede, SARS-CoV-2 virüsünün hızlı tespiti ve kolay teşhisi için moleküler tanı tekniklerinin kullanımına dair bir çalışma sunulmuştur.

Key Words: Covid-19, moleküler teknikler, pandemi, PCR, SARS-COV-2

INTRODUCTION

In this review we aim to evaluate the several molecular techniques to detect SARS-CoV-2 with limitations and predominances such as RT PCR, immunoassay techniques for antibody detections. But as we all know from the current status in the world that the most commonly used laboratory detection method for the clinical diagnosis of SARS-CoV-2 is real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

What is Covid-19?

Coronaviruses are a large family of viruses, and certain types of this family pose a threat to human health. Orthocoronavirinae, subfamily of coronaviruses, consists of 4 genera: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus and Deltacoronavirus (1). α and β coronaviruses usually infect mammals and human while γ and δ coronaviruses infect birds (2).

SARS-CoV-2 belongs to β coronaviruses (2). The first human coronavirus belonging to the Coronaviridae family, severe acute respiratory

syndrome coronavirus, was identified in 2003. So far, the identified human corona viruses are: HCoV-229E, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV, NL63, Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-Cov-2). Among these, SARS-CoV, MERS-Covand SARS-CoV-2 caused pandemics (3, 4). SARS-CoV-2 is associated with SARS-CoV and MERS-CoV (5). Although the mortality rate is higher in SARS (about 10%) and MERS (about 40%), the spread of SARS-CoV-2 is much higher compared to predecessors (6). The disease caused by SARS-CoV-2 has been named Coronavirus Disease 2019 (Covid-19) by the WHO (3, 4). According to the World Health Organization (WHO), Covid-19 is a pandemic and it is stated that humanity has not experienced such an epidemic in the last 100 years (7).

SARS-CoV-2 originated from bats and was transmitted to human through unknown animals in Wuhan province of China in December 2019 (1). The chronology related to the spread of Covid-19 is presented in the Table 1.

Tablo 1. Covid-19 situation in worldwide

Date	Case	Reference
26 December 2019	First case in Wuhan Central Hospital	67
31 December 2019	Most of the cases occurred in the Huanan Seafood Market	1
1 January 2020	Seafood market was closed	1
7 January 2020	New type of coronavirus was isolated.	68
5 March 2020	96,000 cases have been reported in 87 countries. Number of cases has started to increase in countries such as South Korea, Italy and Iran.	1
10 March 2020.	In Turkey, the first cases were seen in Covid-19.	67
15 March 2020	SARS-CoV-2 has spread to 34 provinces and cities in China, the disease has been reported in five continents and additionally 144 countries.	6

When the coronaviruses are examined with an electron microscope, there are protrusions on the surface with a crown appearance (Figure 1) (8). SARS-CoV-2 is an enveloped positive-sense single-stranded RNA virüs with diameter 50-200 nm (7).

The life cycle of SARS-CoV-2 begins with the binding of the S protein on the virus to the ACE2 receptor. After binding to the receptor, S protein undergoes conformational change. Viral membrane

fusion towards the cell membrane is facilitated and the SARS-CoV-2 RNA is sent into the cell. RNA is translated with viral replicas, pp1a and pp1ab. The product obtained is then cut with viral proteinases. Polymerases produce subgenomic mRNAs, then they are translated into viral proteins. Viral proteins and RNA combine in ER and golgi apparatus. They are released out of the cell by vesicles (Figure 2) (9).

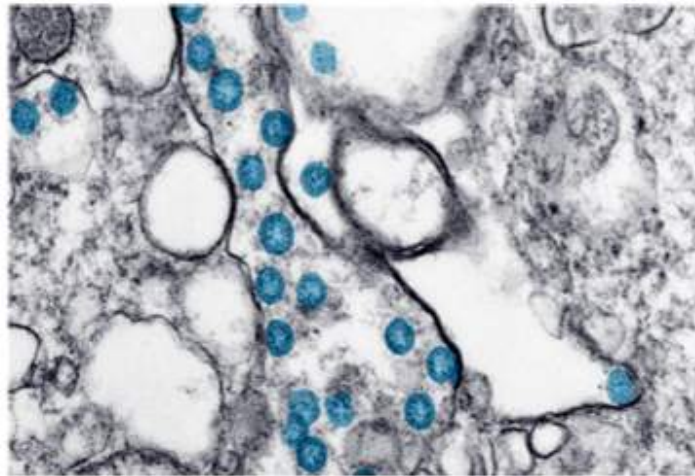


Figure 1. SARS-CoV-2 morphology (8).

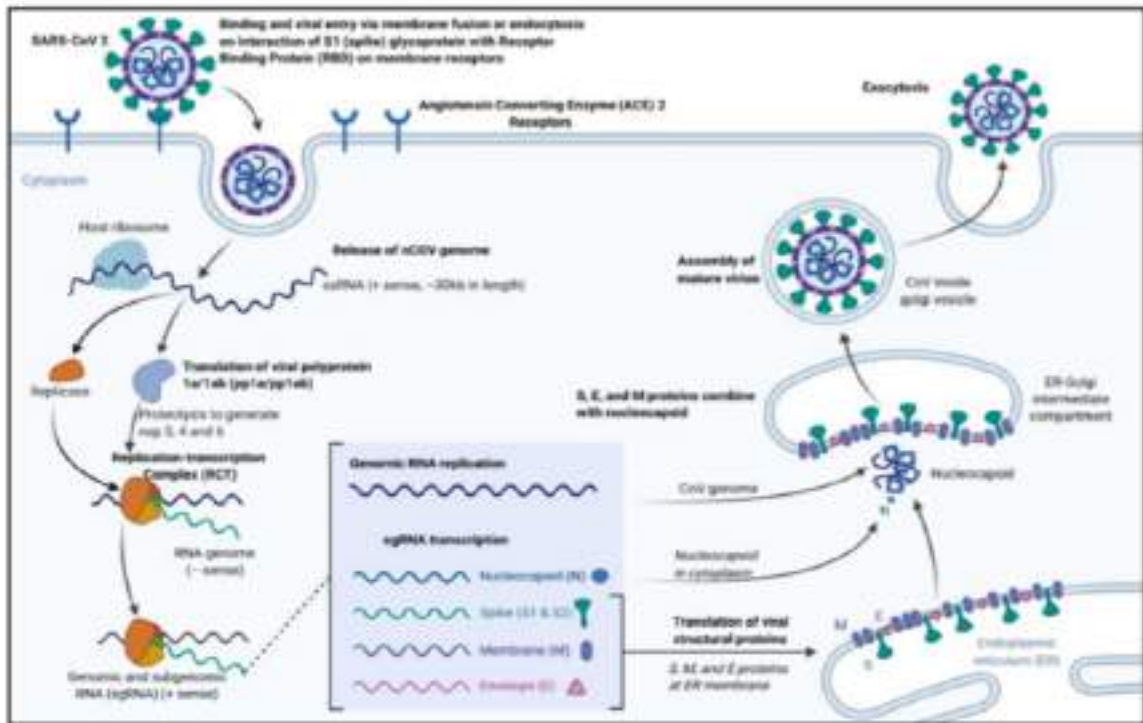


Figure 2. The life cycle of SARS-CoV-2 (7).

Structurally, it has four protein branches; nucleocapsid protein (NP), spike protein (SP), envelope protein (EP) and membrane protein (MP) (Figure 3) (7).

SP is considered as an important target for neutralizing antibodies and vaccines. SARS-CoV-2 infects human respiratory epithelial cells through the ACE2 receptor (10). SP protein plays a central role in the transmission of SARS-CoV-2. SP is a glycoprotein consisting of two subunits, S1 and S2. The SP is the main target for neutralizing antibodies and vaccines. S1 has the receptor binding domain (RBD) responsible for recognising and binding by the host cell receptor ACE2. The receptor binding domain consists of 424 to 494 amino acids. This domain connects with ACE2. S protein has two cleavage regions, at arginine R667 and R797. Proteases such as cathepsin L, trypsin, and elastase can disrupt this region. This cleavage in S protein is important for binding to ACE2 and

membrane fusion. The S2 subunit contains the essential components for membrane fusion (7, 11). Changes in S protein cause host coronavirus diversity (10).

NP is a phosphoprotein and it forms a nucleocapsid which can be detected in serum samples (7). It plays a role in the replication of viral RNA and cellular response as a host for the infection. In some species, the N protein increases the production of virus-like particles (5).

EP is the smallest main protein that plays a role in pathogenesis (7). While EP is expressed abundantly during replication, it is expressed in a small part of the virion envelope. EP protein is localized in the ER, Golgi apparatus and ER-Golgi apparatus intermediate compartments. The EP is associated with the M protein, contributing to the viral order, promoting the release of virions with the hydrophobic transmembrane domain (10).

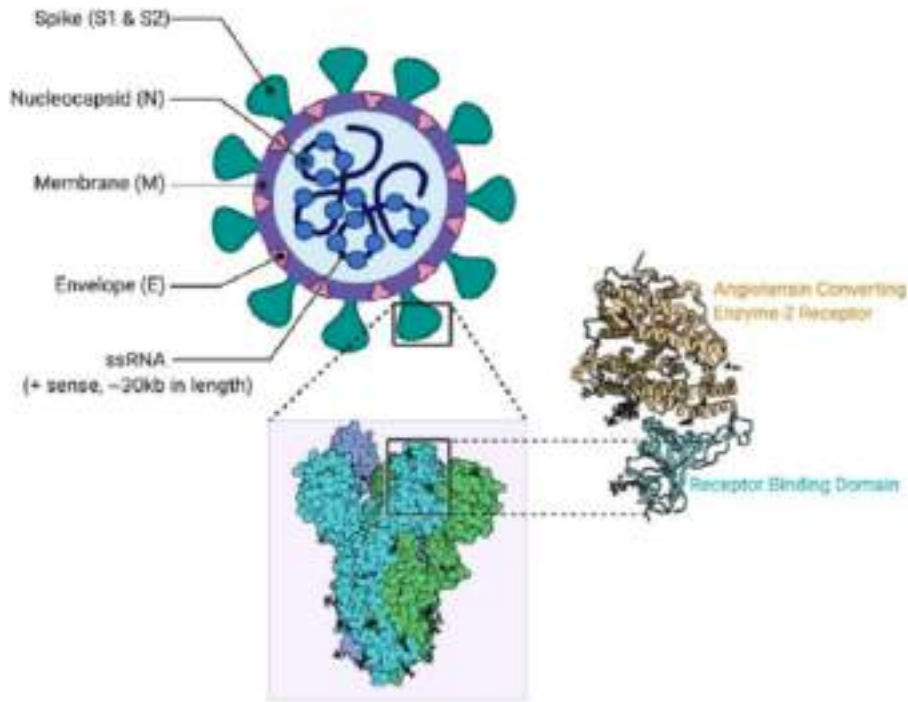


Figure 3. The Structure of SARS-CoV-2 virus and ACE2 protein (7).

MP is the most abundant protein in the SARS-CoV-2 structure (7) and have a central role in the assembly of cell membranes to form new virüs particles. SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV M proteins are located around the Golgi apparatus. Studies have shown that MP plays a role in excluding some host membrane proteins from the viral envelope (10).

SARS-CoV-2 contains ~30,000 nucleotides. The genome encodes 27 proteins containing RNA-dependent-RNA polymerase (RdRP) and E, M, N, S proteins (Figure 4). RdRP plays an important role in viral replication, involves in maintaining genome

integrity and is one of the main targets in anti-SARS treatments. The SARS-CoV-2 RdRP gene has been shown to be highly similar to the bat coronavirus, RaTG13 RdRP gene (8, 12). 5'-noncoding region and an ORF1a/b-coding region are the other parts in the genome. Polyprotein encoded from the ORF1a/b region can be cut with proteinases to generate RdRP and helicase, which are involved in virüs replication, transcription and translation (2). SARS-CoV-2 mutates very quickly as there are deficiencies in the error correction mechanisms (13, 14).

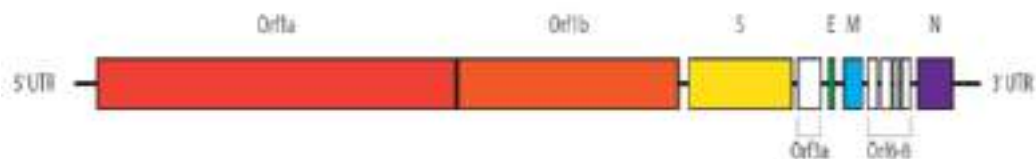


Figure 4. SARS-CoV-2 genome (15).

The Detection of SARS-CoV-2

The important issue in the diagnosis of SARS-CoV-2 is to take samples from the patient properly and quickly. It is recommended to collect and test sputum/bronchoalveolar lavage fluid samples (BAL) for the detection of SARS-CoV-2 (16).

Wang et al. conducted a study using different types of clinical samples for the detection of SARS-CoV-2. In this study, nasopharyngeal swab samples were used to confirm clinical diagnosis. The lower respiratory tract samples have been tested positive for the virus. They showed that SARS-CoV-2 samples were found 32% in oropharyngeal swab samples and 63% in nasal swab samples. In addition, virus was also detected in fecal samples. This suggests that the disease may be systemic (17). Wölfel et al. noted that the virus was easily isolated from throat and lung samples, but was not isolated from fecal samples despite high virus RNA concentration (18). Tang et al. reported that the viral load was high in the upper and lower respiratory tract in the early stages of the disease. They suggested that the use of nasopharyngeal and oropharyngeal swab samples would be more appropriate. Anal and blood samples were positive for the virus in the late stage of the disease. Therefore, they claim that the disease can transmit from the oral route to the fecal route (19).

The symptoms observed in Covid-19 patients are similar too the respiratory diseases. Therefore, they are not specific and cannot be used for diagnosis. According to the general definitions of National and International Health Authorities (NIH), the most common symptoms of Covid-19 are fever, cough, sore throat, general weakness and muscular pain. The incubation period of this disease is on average 2-14 days.

In this review we aim to evaluate the detection techniques of SARS-CoV-2 infection categorized as clinical findings and subsequent laboratory tests.

The Clinical Findings of the Covid-19 Patients

Covid-19 is a respiratory disease and clinicians

can use chest imaging or X ray techniques to diagnose people who have Covid-19 symptoms, while awaiting RT-PCR results or when RT-PCR results are negative, and the person still has Covid-19 symptoms. Chest tomography (CT) and X-ray techniques are used to diagnose. (3, 8).

So people need to know quickly whether they are infected of SARS-CoV-2 or not because of this suspicion appropriate treatment and self-isolating are more crucial to inform close contacts.

Chest Tomography

Chest Tomography (CT) is an imaging method used to detect a number of chest diseases (20). Abnormal CT scans are used to detect SARS-CoV-2 in patients with negative molecular diagnosis. CT imaging shows infiltrates, ground-glass opacities and subsegmental consolidation (1). CT gives crucial information about the stages and severity of the disease.

Molecular techniques such as quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) and Isothermal amplification methods are carried out as an alternative or combinatory approach to CT scan (5).

Tomography and X ray Techniques

X-rays or scans produce an image of the organs and structures in the chest. X-rays radiography use radiation to produce a 2-D image by a radiographer. Computed tomography (CT) scans use a computer to merge 2-D X-ray images to convert them into a 3-D image. This techniques require highly specialised equipment by a specialist radiographer.

Subsequent Laboratory Tests

a) qRT-PCR

The diagnosis of SARS-CoV-2 is confirmed by detection of viral RNA. Generally, high purity RNA is isolated by commercially available kits. However, kits are expensive and prolong analysis time. Eliminating the RNA isolation step can increase laboratory efficiency and reduce test costand time (21).

Marzinotto et al. have developed a method to bypass RNA isolation step in the detection.

They treated the SARS-CoV-2 RNA sample with ProteinaseK and bypassed the RNA extraction step by performing heating-cooling before amplification. They demonstrated that higher amounts of viral RNA were obtained compared to the commercially kits. In addition, 100 µL of sample is sufficient to isolate RNA with this method, while 200 µL of sample is required in classical RNA isolation methods (21).

Won et al. isolated RNA from the pharyngeal swab samples with TRIzol™ and then detected them by PCR. This method used for reducing the cost and provided a biosafety advantage. TRIzol™ inactivated viral particles in infectious samples and reduced biosafety measures (22).

Smrylaki et al. eliminated the RNA extraction step by lysing the samples with detergent and heat inactivating. As a result, they stated that SARS-CoV-2 detection can be performed using simpler protocols without the use of extraction kits (23).

A protocol that does not require RNA extraction and lasts only 5 minutes was developed by Ladha et al. They proposed a method of single-step and column-free RNA isolation. They suggested that this method is applicable to the SARS-CoV-2 RT-qPCR test protocol. In the study, the solutions were used to lyse the virus and QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen, US) demonstrated similar results as the FDA approved RNA extraction kits (24).

In brief, the protocols without RNA extraction can provide cost benefits, reduce the time in lab, increase the number of test.

Polymerase Chain Reaction (PCR) has high sensitivity and specificity in identifying viral infections (3,8). Quantitative Real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) is a method used to detect many viruses and gives opportunity for early diagnosis compared to conventional PCR methods (3). qRT-PCR is currently regarded as the gold standard for diagnosing in SARS-CoV-2 (25).

Since pandemic, many qRT-PCR kits have been developed for SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab samples, alveolar lavagefluid, sputum and blood

samples. This method is used in many fields such as mRNA expression studies, copy number measurements in genomic and viral DNA/RNA and expression studies (4, 26).

The main difference between qRT-PCR and conventional PCR is quantification of nucleic acid measurements (27). Since the conventional PCR can only amplify the DNA up to 2000 nucleotides but at the same time RT-PCR or qPCR can amplify DNA as well as quantify the amount of DNA as well. Product measurement is performed in realtime using fluorescent probes/dyes in qRT-PCR (28). Fluorescent probes/dyes used in qRT-PCR bind to the target region and emit fluorescence during amplification. This fluorescent signal is read by the instrument. There are many different qRT-PCR protocols used for SARS-CoV-2, but not all of these protocols target the same regions of the genome. Many protocols target the conservative domain of N protein to obtain consistent results.

It is stated that qRT-PCR can not detect SARS-CoV-2 in the early stages of infection and may produce false negative results. Therefore, primer and probe design are very important in qRT-PCR. The primers used in the PCR are single-stranded DNA molecules that bind to specific regions in the genome during the amplification process. The sensitivity and specificity of the primers used in the detection of SARS-CoV-2 are very important. The higher the sensitivity of the primers, the less viral RNA is required and the less false negative rate decreases. After the design of the primers and probes, the test conditions are optimized (7, 15).

Van Elden et al. developed a qRT-PCR method based on Taq-Man probe for the N gene and detected coronavirus in only 28% of 261 clinic specimens with patients suffering from a cold/pneumonia (28).

Corman et al. analyzed the viral genome sequence of SARS-CoV-2 using a set of primers and probes. As a result of the study, they identified three conserved areas: RdRP gene located in the open reading frame ORF1ab, E gene and N gene. It is stated that RdRP and

E gene have higher sensitivity than N gene (29).

Chu et al analyzed samples using the primer for the N and ORF1b genes, and they found that the experiment for the N gene was 10 times more sensitive than the ORF-1b gene for detecting positive clinical samples (30).

A highly specific qRT-PCR experiment was developed by Tib-MolBiol. And does not cross-react with other coronaviruses. The Rd gene was used for validation, while the E gene was used for screening purposes (31).

Chan et al. developed three different qRT-PCR tests targeting RdRp / Helicase (Hel), S and N genes. Of these three tests, RdRp /Hel had the lowest detection limit. The RdRp / Hel test did not cross-react with cell culture and other pathogenic viruses in clinical samples. As a result of their study, they claimed that the RdRp/Hel test may improve the Covid-19 laboratory diagnosis (32).

Cepheid has developed an Xpert®Xpress SARS-CoV-2 test on the qRT-PCR. The test targets the N and E regions of the viral genome and results with in 30 minutes. The test can be performed on the nasopharyngeal, nasal, oropharyngeal swab samples and nasal aspirates (33). The performance of Xpert®Xpress SARS-CoV-2 test was evaluated with clinical nasopharyngeal swab samples. The positive agreement percentage (PPA) of the test was 97.8%, and the negative agreement percentage (NPA) was 95.6% (34).

Lieberman et al tested 169 nasopharyngeal swab samples which qRT-PCR which was performed on ABI 7500 real-time PCR devices using N1, N2 and RP primers. They compared their developed method with other four tests on the market (Cepheid, DiaSorin, HologicPanther and RocheCobas). Among these tests, CepheidXpertXpress and their method found to be the most sensitive (35).

The Rutgers Clinic Genomic Laboratory has developed more practical qRT-PCR test (TaqPath Covid-19 Combo Kit) using saliva samples (36).

In addition, groups from some countries used the

same regions in the diagnosis. China has developed primers and probes targeting both the ORF1ab and N gene. The University of Hong Kong proposed RT-PCR for the N gene and the ORF1b test as a control of this test. The Thai Ministry of Public Health has suggested targeting the N gene. The National Institute of Infectious Diseases of Japan proposed a method that targets the ORF1a and S gene by nested RT-PCR method, and the S gene by RT-PCR. The U.S. CDC has developed primers to target the N gene (25). The studies performed in those institutions have not available yet.

However, qRT-PCR method is applicable with high cost materials longer reaction times, with high-tech laboratory equipments. Therefore, shorter analysis times, easily applicable and inexpensive costs will be an important step in combating SARS-CoV-2. Therefore, isothermal nucleic acid amplification technique is also a promising approach for SARS-CoV-2 detection. The processing time of this method is shorter and it doesn't require a thermocycler (3, 7). Non-PCR-based approaches are also another alternative method to detect coronavirus RNA (3).

In our country, local real-time PCR kits have been developed based on the protocols published by international reference centers and it has been widely used throughout the country (37). Another PCR kit at national level is produced by Spinarayscientific (38).

The Sentebiolab Senteligo™ SARS-CoV-2 (COVID-19) Multiplex qPCR Detection Kit is an in vitro national diagnostic test, based on real-time polymerase chain reaction technology. It tests for the presence or absence of ribonucleic acid (RNA) of SARS-CoV-2 coronavirus, specifically, in lower and upper respiratory tract samples from patients suspected of SARS-CoV-2 viral infection (39).

Another application entitled with Respiratory Pathogens Panel, stands out among the Real Time PCR diagnostic kits produced by Anatolia Geneworks under the brand "Bosphore". This panel is strategically important for detecting infections whose symptoms are similar to each other and for

appropriate treatment. It is recommended by health authorities that the possibilities of other respiratory pathogens be evaluated for the patient to be tested with suspicion of novel coronavirus. In the content of Bosphore Respiratory Pathogens Panel Kits that detects 33 viruses and bacteria from a single sample of respiratory samples, Coronavirus 229E, Coronavirus OC43, Coronavirus NL63 and Coronavirus HKU1 are already included. (40).

b) Antibody Tests

SARS-CoV-2 antibody tests can detect whether an individual has developed antibodies against SARS-CoV-2 or not. The tests help identify people infected with SARS-CoV-2 (38).

The antibody tests for SARS-CoV-2 detect the presence of IgA, IgM, or IgG antibodies produced by B cells (41). Tests used to detect SARS-CoV-2 antibodies are ELISA, neutralization tests and chemiluminescent immunological tests. However, there is still no standard method for detecting SARS-CoV-2 antibodies (41).

The IgM and IgG response to SARS-CoV-2 can occur 3-6 days after the onset of symptoms. Up to three weeks almost all patients are seroconverted and antibodies persist for at least two months, IgG is more persistent, but the exact duration of immunity for both immunoglobulins is not yet known (42, 43).

Antibody tests offer significant advantages compared to other methods due to the rapid test results and the ability to be performed outside the laboratory (44).

It was first suggested by Zhu et al. That SARS-CoV-2 can be detected by antibody tests (45). Bastos et al. Performed a meta-analysis of approximately 40 trials to compare antibody tests with each other. In this study, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), lateral flow immunoassay (LFIA) and chemiluminescent immunoassay (CLIA) methods were compared. It has been reported that the method with the highest sensitivity is CLIA and the method with the lowest sensitivity is LFIA (46).

Antibody tests show which individuals are immunized and what It should be used in parallel with analyzes for nucleic acid detection to determine the uptake. Frequent, large-scale serological testing helps determine which part of the population may be immune to SARS-CoV-2 and which individuals can rejoin the workforce (47).

c) Antigen Tests

According to the time consuming and rate availability of SARS-CoV-2 detection, PCR tests require hours or days to get results in a special laboratory. But antigen tests can be revealed in about 15 minutes. Antibody testing determines whether you had SARS-CoV-2 in the past and now have antibodies against the virus (48)<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>.

Apart from the most widely used real time RT-PCR analysis for the diagnosis of SARS-CoV-2, Isothermal amplification, CRISPR and next generation sequencing (NGS) analyzes are also used (49).

Isothermal amplification is an alternative method that allows constant temperature amplification and eliminates the need for thermal cyclers (36). It gives opportunity to investigate 2-3 regions using 4-6 primers will help us to increase the positivity rate in lab diagnosis. Therefore, new techniques were required other than RT-PCR (26). RT-PCR and/or qRT-PCR methods are used to detect RNA viruses (50). LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) method is an isothermal nucleic acid amplification with high efficiency (24). LAMP accelerates nucleic acid amplification with both DNA polymerase and 4 to 6 specific primers. In this technique, reverse transcription and amplification are used simultaneously (15, 31, 51,52,53). It is allowed to read the amplification reaction with pH-dependent color change (32). For this reason, LAMP method allows easy identification directly with color change (50). Amplification becomes visible with the use of magnesium pyrophosphate or fluorescent dyes.

The method has high sensitivity and specificity and is widely used for amplification of DNA and RNA. Moreover, it is fast and cost effective. Therefore, performing the LAMP test may work to reduce the detection cost of the coronavirus (24). Even though the background signal is low, optimizing primers and reaction conditions take time (8). In the RT-LAMP method, four region-specific primer sets are required to increase sensitivity. RT-LAMP is a promising candidate for Covid-19 detection, as it required sheating and visual inspection (36).

Thai et al. developed a reverse Transcription LAMP (RT-LAMP) test that can be observed by real-time measurement on a photometer to detect SARS-CoV-2. RT-LAMP is an amplification method that reproduces nucleic acid with high efficiency and speed with its special design six primer set that recognizes eight different sequences of the target region. RT-LAMP experiment showed 100 times more sensitivity than RT-PCR. The sensitivity and specificity of the RT-LAMP test were found to be 100% and 87%, respectively. The test procedure was simple and amplification was carried out at 63°C. The result was obtained in less than 1 hour (53).

Yu et al. developed the Isothermal LAMP based method for Covid-19 (iLACO) detecting the RNA or cDNA of the SARS-CoV-2 virus by isothermal amplification of LAMP and the duration is 20-30 minutes at 65°C. The sensitivity of the method was found to be comparable to the Taqman based qRT-PCR method. The method is capable of detecting synthesized RNA equivalent to 10 copies of SARS-CoV-2. Reaction time varies between 15-40 minutes depending on virus load (49).

Zhang et al. detected SARS-CoV-2 purified on cell lysis or RNA using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique. Moreover, this technique performed equally well to the RT-qPCR test using RNA samples purified from respiratory swabs collected from Covid-19 patients in Wuhan, China. It has been determined that the primers used in this study have higher detection capacity and can detect several hundred copies (54).

El-Tholoth et al. tested loop-mediated isothermal amplification (Covid-19 LAMP) and two-stage isothermal amplification (Covid-19 Penn-RAMP). Both methods can detect colorimetric or fluorescence. In that study, it was observed that Covid-19 LAMP and Covid-19 RT-PCR showed equal performance. When testing purified targets SARS-CoV-2 RAMP has 10 fold better sensitivity than the other techniques. Similarly, 100 times better sensitivity than the other techniques when testing rapidly prepared sample mimics (4).

The ID Now- Covid-19 test developed by Abbott can detect SARS-CoV-2 in 5 minutes. It performs qualitative detection of RNA from the virus using isothermal nucleic acid amplification technology. According to the PCR experiments, the Abbott ID NOW test had detection limits 10 to 100 times higher (55). Recently, the test which is performed with an easy-to-use device has been approved by FDA EUA (7).

Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) is an in vitro amplification process carried out under isothermal conditions. It is a two-step amplification process. The first step is denaturation and the second step is amplification due to a polymerase which is performed isothermally. This technique has been developed as a multiplex process called multiple real-time nucleic acid sequence-based amplification (RT-NASBA). RT-NASBA has proven to be 10-100 times more sensitive than Multiplex RT-PCR (56). There are many kinds of literature to examine the different diagnostic approaches used by academic labs and clinicians to diagnose COVID-19 disease since the identification of SARS-CoV-2 till now (57).

Chantratita et al. developed a test called NASBA. An RT-LAMP test of SARS-CoV showed 100 times more sensitivity than RT-PCR. NASBA-Beacon on the NucliSens® EasyQ Analyzer was found 10 times more sensitive than RT-PCR TaqMan (ABI7000) and RT-PCR based hybridization probe (LightCycler) (58).

In addition to these, digital pcr (dPCR) based tests have been developed for the detection of SARS

- CoV - 2. In this technique, samples are portioned under microliters and reproducible measurements are made by measuring low DNA concentrations. dPCR is used in detecting low copy number viruses in SARS-CoV-2 detection, measuring viral load, monitoring virus concentration, detection of viral mutations and evaluation of anti-SARS-CoV-2 drugs (58,59,60).

The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas (CRISPR-associated proteins) technology could be an effective approach to target viral RNA. This system has applications in humans against viral infections and is effective to eliminate these infections. The CRISPR-Cas system is under investigation so that SARS-CoV-2 can be diagnosed quickly. It is thought that CRISPR-Cas-based methods can diagnose SARS-CoV-2 infection within a few hours. Besides its diagnostic capability, the CRISPR-Cas system can also be useful in antiviral therapy (61).

With next-generation sequencing, the sequence of close to a million base pairs can be determined in a single experiment. This method is also used in the detection of viral strains. It provides very fast detection of viruses. This method is also an efficient technology that can be used in the detection of SARS-CoV-2. The US Food and Drug Administration (FDA) granted emergency use of Illumina for next-generation sequencing (NGS) use in the detection of SARS-CoV-2 in June. Next generation sequencing methods are candidates for potential use for high-volume screening processes (62).

Various biomarkers, including lymphocyte count, neutrophil-lymphocyte ratio, CRP, troponin T, D-dimer, LDH, procalcitonin, IL-6, and ferritin, are important in predicting disease progression and mortality, although they are not defining markers in the diagnosis of SARS-CoV-2. These laboratory tests play a vital role in identifying patients at risk of complications and guiding treatment interventions (63,64).

Bilkent University's National Nanotechnology Research Center (UNAM) has developed a nanotechnology-based system. This system is an optically based diagnostic and diagnostic system that changes the color of the glow in the presence of viruses, thus detecting viruses with high selectivity. In this system, pathogens are detected with 99% confidence with in 10 seconds by dynamically receiving a fluorescent signal through a pathogen detection chip developed specifically for a biosensor device. Unlike the commonly used PCR tests, the system is not based on sample replication, but on detecting the presence or absence of the virüs with advanced optical methods (65). There is recently another study is revealed by Deniz et al about Covid-19 patients enzyme levels who they suggest some other approaches for this infection (66).

CONCLUSION

Covid-19 has a crucial rate on mortality which becomes a pandemic that affects the whole world. The most important step in responding to this pandemic is early diagnosis. Laboratory techniques are important to prevent the spread and infection caused by the Covid-19 pandemic. To prevent the infection caused by SARS-CoV-2 from spreading to humans, it is important to use effective methods in the diagnosis.

So far, many studies have been conducted to develop better diagnostic tests for SARS-CoV-2. There is currently no standard treatment option for this disease, so it still poses a serious threat to the world. Development of new diagnostic tests continues globally. With the studies conducted, the genome structure of the virus will be better elucidated and much more effective methods will be used for diagnosis and treatment. Consequently, there will be more discussions and it will be presented more different test methods occurring to detect SARS-CoV-2 in the near future.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank to Dr. Emine Terzi and Dr. Beyza Ecem Öz Bedir for their invaluable contribution during the paper process.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

KAYNAKLAR

1. Singhal T. A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Indian J Pediatr*, 2020 Apr;87(4):281-6.
2. Yang P, Wang X. COVID-19: a new challenge for human beings. *Cell Mol Immunol.*, 2020 May;17(5):555-7.
3. Shen M, Zhou Y, Ye J, Al-Maskri AA, Kang Y, Zeng S, Cai S. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J Pharm Anal*, 2020 Apr 1;10(2):97-101.
4. El-Tholoth M, Bau HH, Song J. A single and two-stage, closed-tube, molecular test for the 2019 novel coronavirus (COVID-19) at home, clinic, and points of entry. *Anal Chem*, 2021 Sep 28;93(38):13063-71.
5. Kannan SP, Ali PS, Sheeza A, Hemalatha K. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019)-recent trends. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020 Feb 1;24(4):2006-11.
6. Shi Y, Wang G, Cai XP, Deng JW, Zheng L, Zhu HH, et.al. An overview of COVID-19. *J Zhejiang Univ Sci B*.2020 May 1:1.
7. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). 2021 Apr 20. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 32150360.
8. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VY, et.al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS nano*, 2020 Mar 30;14(4):3822-35.
9. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res*, 2020 Jul 1;24:91-8.
10. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; 579, 265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3-7.
11. Shi Y, Wang G, Cai XP, Deng JW, Zheng L, Zhu HH, et.al. An Overview of COVID-19. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2020 May;21(5):343-60.
12. Xu X, Liu Y, Weiss S, Arnold E, Sarafianos SG, Ding J. Molecular model of SARS coronavirus polymerase: implications for biochemical functions and drug design. *Nucleic Acids Res*, 2003 Dec 15;31(24):7117-30.
13. Mori M, Capasso C, Carta F, Donald WA, Supuran CT. A deadly spillover: SARS-CoV-2 outbreak. *Expert Opin Ther Pat*, 2020 Jul 2;30(7):481-5.
14. Oberemok VV, Laikova KV, Yurchenko KA, Fomochkina II, Kubyshekin AV. SARS-CoV-2 will continue to circulate in the human population: an opinion from the point of view of the virus-host relationship. *Inflamm. Res*, 2020 Jul;69(7):635-40.
15. <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-fact-sheets/200410-RT-PCR.pdf>. (27.01.2021).
16. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections-the state of the art. *Emerg Microbes Infect*, 2020 Jan 1;9(1):747-56
17. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *Jama*, 2020 May 12;323(18):1843-4
18. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et.al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 2020 May;581(7809):465-9.

19. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *J Clin Microbiol*, 2020 May 26;58(6): e00512-20.
20. Singh S, Kalra MK, Khawaja RD, Padole A, Pourjabbar S, Lira D, et.al. Radiation dose optimization and thoracic computed tomography. *Radiol Clin*, 2014 Jan 1;52(1):1-5.
21. Marzinotto S, Mio C, Verardo R, Pipan C, Schneider C, Curcio F. A streamlined approach to rapidly detect SARS-CoV-2 infection, avoiding RNA extraction. *Disease Markers*, 2020, Article ID 8869424, 5 pages, 2020.
22. Won J, Lee S, Park M, Kim TY, Park MG, Choi BY, et.al. Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp Neurobiol*, 2020 Apr 30;29(2):107.
23. Smyrlaki I, Ekman M, Lentini A, de Sousa NR, Papanicolaou N, Vondracek, et.al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat Commun*, 2020 Sep 23;11(1):1-2.
24. Ladha A, Joung J, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Zhang F. A 5-min RNA preparation method for COVID-19 detection with RT-qPCR. *MedRxiv*, 2020 Jan 1. v.20200405 (2020). <https://static1.squarespace.com/static/5b7c640be2ccd1703a3da4d3/t/5e8bcd0923fb224b2f3b1356/1586220297644/Ladha+et+al+-+RNA+QE+Extraction.pdf>.
25. Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev. Med. Virol.* 2020 May;30(3): e2106.
26. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005 Mar 1;5(2):209-19.
27. Loftis AD, Reeves, WK. (2012). Principles of real-time PCR. In Chengming W, Bernhard K, Mark DF eds. *Veterinary PCR Diagnostics*. Sharjah. Bentham Science, 2012: 3-17.
28. Van Elden LJ, Anton M AM, Van Alphen F, Hendriksen KA, Hoepelman AI, Van Kraaij MG, et.al. Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 2004 Feb 15;189(4):652-7.
29. Corman V, Bleicker T, Brünink S, Drosten C, Zambon M. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. *World Health Organization*, Jan. 2020 Jan 17;17.
30. Chu DK, Pan Y, Cheng SM, Hui KP, Krishnan P, Liu Y, et.al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem*, 2020 Apr 1;66(4):549-55.
31. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 2020 Jan 23;25(3):2000045.
32. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, et.al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol*, 2020 Apr 23;58(5).
33. <https://www.cepheid.com/coronavirus>. (27.01.2021).
34. <https://www.fda.gov/media/136314/download>. (27.01.2021).
35. Lieberman JA, Pepper G, Naccache SN, Huang ML, Jerome KR, Greninger AL. Comparison of commercially available and laboratory-developed assays for in vitro detection of SARS-CoV-2 in clinical laboratories. *J. Clin. Microbiol*, 2020 Jul 23;58(8).
36. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et.al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. 2020.
37. Korukluoğlu G, Altaş AB, Coşgun Y. Ülkemizdeki kullanılan tanı kitleri ve özellikleri. Çiçek C, editör. *Mikrobiyoloji ve COVID-19*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.63- 73
38. Hall VJ, Foulkes S, Charlett A, Atti A, Monk EJM, Simmons R, et al. SARS-CoV-2 infection rates of antibody-positive compared with antibody-negative health-care workers in England: a large, multicentre, prospective cohort study (SIREN). *Lancet*, 2021 Apr 17;397(10283):1459-69.
39. (<https://sentebiolab.com.tr/corona-virus-taniki-tespit-kiti-test-kiti/>)
40. <http://www.anatoliagenetworks.com/en/index.asp>
41. Kopel J, Goyal H, Perisetti, A. (2021, January). Antibody tests for COVID-19. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 2021;(34(1)):63-72.
42. Long, QX., Liu, BZ., Deng, HJ. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 26, 845-848 (2020).
43. Baraniuk C., Covid-19 antibody tests: a briefing *BMJ* (2020) Jun 24;369:m2284. doi: 10.1136/bmj.m2284.

44. Jin Y, Wang M, Zuo Z, Fan C, Ye F, Cai Z, et.al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *Int J Infect Dis*, 2020 May 1;94:49-52.
45. Zhao R, Li M, Song H, Chen J, Ren W, Feng Y, et.al. Early detection of SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 patients as a serologic marker of infection. *Clin Infect Dis*, 2020 May 1.
46. Maple PA, Sikora K. How useful is COVID-19 antibody testing-a current assessment for oncologists. *Clin. Oncol*, 2021 Jan 1;33(1): e73-81.
47. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et.al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 2020 Jan 24.
48. Bastos ML, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui LP, Johnston JC, et.al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2020 Jul 1;370.
49. Semen Z, Ekici S, Malas B. Covid-19 İçin Moleküler Tanı Yöntemlerine Genel Bakış. *Vet Farm Toks Dern Bult*, 2021;11(2):72-9.
50. Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, et.al. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform *Clin Chem*, 2020 Jul 1;66(7):975-7.
51. Gonzalez-Reiche AS, Hernandez MM, Sullivan MJ, Ciferri B, Alshammery H, Obla A, et.al. Introductions and early spread of SARS-CoV-2 in the New York City area. *Science*, 2020 Jul 17;369(6501):297-301.
52. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et.al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*, 2020 Oct 15;71(16):2027-34.
53. <https://www.fda.gov/media/134922/download>. (27.02.2021).
54. Thai HT, Le MQ, Vuong CD, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol*, 2004 May 1;42(5):1956-61.
55. Zhang Y, Odiwuor N, Xiong J, Sun L, Nyaruaba RO, Wei H, Tanner NA. Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA using colorimetric LAMP. *MedRxiv*, 2020 Jan 1.
56. Cradic K, Lockhart M, Ozbolt P, Fatica L, Landon L, Lieber M, Yang D, Swickard J, Wongchaowart N, Fuhrman S, Antonara S. Clinical evaluation and utilization of multiple molecular in vitro diagnostic assays for the detection of SARS-CoV-2. *Am J Clin Pathol*, 2020 Jul 7;154(2):201-7.
57. Islam KU, Iqbal, J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020;10.
58. Chantratita W, Pongtanapisit W, Piroj W, Srichunrasmi C, Seesuai S. Development and comparison of the real-time amplification based methods-NASBA-Beacon, RT-PCR Taqman and RT-PCR hybridization probe assays-for the qualitative detection of SARS coronavirus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2004 Sep 1;35:623-9.
59. Çarhan A, Ercan E, Yalçınkaya T. Dijital PZR ve kullanım alanları. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2016 Jun 1;73(2).
60. Tan C, Fan D, Wang N, Wang F, Wang B, Zhu L, Guo Y. Applications of digital PCR in COVID-19 pandemic. *View*, 20200082.
61. Kumar P, Malik YS, Ganesh B, Rahangdale S, Saurabh S, Natesan S, Srivastava A, Sharun K, Yatoo MI, Tiwari R, Singh RK. CRISPR-Cas system: An approach with potentials for COVID-19 diagnosis and therapeutics. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020;10.
62. First NGS-based COVID-19 Diagnostic. *Nat Biotechnol*, July 2020;38: 769-778.
63. Kumar R, Nagpal S, Kaushik S, Mendiratta S. COVID-19 diagnostic approaches: different roads to the same destination. *Virusdisease*, 2020 Jun;31(2):97-105.
64. Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, Lipworth BJ, Hellmuth JC, von Bergwelt-Baildon M, Klein M, Weinberger T. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*, 2020 Jul 1;146(1):128-36.
65. <https://w3.bilkent.edu.tr/www/diagnovir/>. (27.01.2021).
66. Deniz S, Uysal TK, Capasso C, Supuran CT, Ozensoy Guler O. Is carbonic anhydrase inhibition useful as a complementary therapy of Covid-19 infection? *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2021 Dec;36(1):1230-1235. doi: 10.1080/14756366.2021.1924165. PMID: 34074197.
67. Hasöksüz M, Kiliç S, ve Saraç F. Coronaviruses and SARS-CoV-2. *Turk J Med Sci*, 2020(50): 549-56.
68. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020.

Pandemi süreci kapsamında biyolojik ve kimyasal silahlar ve alınacak tedbirler

Evaluation of biological and chemical weapons in the scope of the pandemic process and the measures to be taken

Ali Gürkan ARSLAN¹ (ID), Özlem BARIŞ² (ID)

ÖZET

Biyolojik saldırı veya biyoterörizm; bir tarafın politik, ideolojik, ekonomik vb. sebeplerle hastalık etkeni biyolojik ajanları kullanarak tüm canlılarda hastalık oluşturması veya ölüme sonuçlandırmasıdır. Zehirli okların kullanıldığı ilkel dönemlerden başlayarak 2001 yılında ABD'ye karşı şarbon sporlarının kullanılmasına kadar çok çeşitli şekillerde biyolojik saldırı düzenlenmiştir. Kimyasal saldırılar biyolojik saldırılar kadar köklü olmasa da eskiden beri kullanılmakla birlikte asıl tarih sahnesine çıktığı dönem 19. yüzyılda modern kimya endüstrisinin gelişmesiyle olmuştur. Özellikle Dünya savaşlarının cereyan ettiği dönemde kimyasal saldırılar sonucunda birçok insanın yaralanmasına, kalıcı hasara ve ölüme sebep olmuştur. Doğal salgın hastalıkların sebep olabileceği pandemi ise bir etkenin veya hastalığın çok geniş bir alanda yayılmasıdır. Bu yayılma ile birlikte yayılma gösterilen bölgede panik, kargaşa ve kaos ortamı oluşur. Covid-19 pandemisine sebep olan virüs en güncel örnektir. Yeni tip koronavirüs, Çin'in Wuhan kentinden çıkarak önce Çin'de yayılım göstermeye başlamış, sonrasında İran, İtalya ile birlikte Avrupa kıtasına ve Amerika kıtasıyla birlikte

ABSTRACT

Biological attack or bioterrorism is one of the sides to cause disease or death in all living things by using biological causative agents of disease due to reasons such as political, ideological and economic. There were many biological attacks from the primitive ages when poisoned arrows were used to the use of anthrax spores in 2001 against USA. Although chemical attacks are not as deep-rooted as biological attacks, they have been used for a long time, but the period when they came to the stage of history was the 19th century with the development of the modern chemical industry. Chemical attacks caused injuries, permanent damage and death to many people especially during the period of World wars. The pandemic that can be caused by natural epidemic diseases is the spread of a factor or disease in a very wide area. With the spread of disease; panic, unrest and chaos environment occurs in the spreading area. Coronavirus (Covid-19), which causes the current pandemic, is the most recent example. Coronavirus out broke in Wuhan, China, and started to spread in China first, and then Iran, and had an impact on Italy as well as European continent and around the world with the American continent. It infected

¹Jandarma Genel Komutanlığı Hizan Komando Taburu, Bitlis
²Atatürk Üniversitesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Erzurum



İletişim / Corresponding Author : Ali Gürkan ARSLAN
Soğukpınar Mah. Behzat Bulvarı 23. Sok. No: 23/3 Tokat - Türkiye
E-posta / E-mail : aligurkanarslan@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 05.05.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 29.09.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.41017

Arslan AG, Barış Ö. Pandemi süreci kapsamında biyolojik ve kimyasal silahlar ve alınacak tedbirler.
Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 776 - 783

de dünya çapında etki göstermiştir. Milyonlarca insana bulaşmış, yüzbinlerce kişi vefat etmiş, küresel boyutta çevresel, sosyal, psikolojik ve ekonomik sorunlara neden olmuştur. Yakın tarihte influenzaya bağlı, birbirinden farklı pandemi süreçleri yaşanmış, milyonlarca insan vefat etmiş olmasına rağmen gerekli hazırlıklar yapılmadığı için devletler yeni tip koronavirüse karşı etkin ve verimli bir savunma gösterememiştir. Biyolojik saldırı ve doğal salgınlar aynı etki ve özelliklere sahip olduğundan olası bir biyolojik saldırıda devletlerin nasıl bir karşılık göstereceği tahmin edilememektedir. Mevcut pandemi sürecindeki gibi hazırlıksız yakalandığı durumda ortaya çıkacak muhtemel sonuçlar kuşku vericidir. Bu çalışmada biyolojik saldırılar ve doğal salgınlar ele alınmış ve olası bir saldırı veya yeni bir afete karşı nasıl tedbir alınacağı değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik silah, kimyasal silah, pandemi, Covid-19, koronavirüs

millions of people, hundreds of thousands of people died, and caused environmental, social, psychological and economic problems on a global scale. Recently, different pandemic processes related to influenza have been experienced, but states have not been able to demonstrate an effective and efficient defense against the new type of coronavirus since the necessary preparations were not made despite the death of millions of people. Since biological attack and natural epidemics have the same effects and characteristics, it is not possible to predict how the states will respond in a possible biological attack. As in the current pandemic process, the possible consequences that will arise when caught unprepared are doubtful. In this study, it is evaluated how biological agents and natural epidemics are similar to each other and how to take measures against a possible attack or a new disaster.

Key Words: Biological weapon, chemical weapon, pandemic, Covid-19, coronavirus

GİRİŞ

Yüzyıllar boyunca evrensel olarak önemli bir sorun olan bulaşıcı hastalıklar aynı etkilerini hala sürdürmektedir. Covid-19 pandemisi sürecine sebep olan yeni tip koronavirüs de bunun bir göstergesidir. Aralık 2019'da Çin'de SARS-CoV-2 şeklinde adlandırılan, yeni bir koronavirüs ile bağlantılı bir pnömoni (zatürre) salgını rapor edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü, 11 Şubat 2020'de bahsedilen virüsün neden olduğu bu hastalığı, Koronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19) olarak adlandırmıştır (1). Dünya Sağlık Örgütü tarafından 11 Mart 2020'de COVID-19 salgını, pandemi olarak ilan edilmiştir (2).

Pandemi sürecine ve etkilerine biyolojik ve kimyasal silahlar da sebep olabilir. Pandemiye sebep olan salgın hastalık ile biyolojik saldırı hemen hemen

aynı etkilere ve özelliklere sahiptir ve aralarındaki farkı anlamak neredeyse imkansızdır.

Kimyasal ve biyolojik silahların tarihi oldukça eskiye dayanmasına rağmen Ülkemizde KBRN veya NBC ile alakalı ilk çalışma 2002 yılında LEVENT KENAR'ın "Bir NBC atağı karşısında ülkemiz için 'Ulusal NBC Savunma ve İlk Yardım Sistemi'nin oluşturulması" başlıklı doktora tezidir. Biyolojik ve kimyasal ajanların önemi kavranarak bu tarihten itibaren farklı çalışmalara konu olmuştur.

Bu çalışmanın amacı "Türkiye'de Biyolojik ve Kimyasal Silahlara Karşı Alınan Önlemler ve Yaklaşım Algoritması" başlıklı tezimizden yararlanarak kimyasal ve biyolojik silahların etkileri ile salgın hastalıkların meydana getirdiği pandemi süreci arasındaki benzerliği ve alınması gereken tedbirleri değerlendirmektir.

PANDEMİ VE COVID-19

Pandemi; bir rahatsızlık veya hastalığın, enfeksiyon faktörünün ya da sağlıkla bağlantılı bir sorunun kıta büyüklüğünde bir alanda yayılması, bununda ötesinde dünya gibi çok geniş bir bölgede yayılım göstermesidir (3).

İnfluenza pandemileri, 16.yy'dan beri 10-50 yıl arasında değişen aralıklarla şiddeti ve etkisi değişerek tekrarlanmıştır. 20.yy da influenzaya bağlı üç pandemi yaşanmıştır. 21.yy da ilk influenza pandemisi ise DSÖ tarafından 2009 yılında ilan edilmiştir (Tablo 1). Bu virüs, 2009 yılının Nisan ayında Meksika'dan başlayıp dünya çapında hızla yayılarak bir pandemiye sebep olmuştur. Pandeminin birinci dalgası olarak kabul edilen ilk 5 ay içinde yaklaşık 200.000 vaka ve 1800 ölüm bildirilmiştir (4).

Pandemiye sebep olan COVID-19 virüsü toplum seviyesindeki etkisi virüsün virülansına (hastalık oluşturma yeteneğine), bulaştırmacılığına, kişilerin bağışıklık seviyesine ve temasına, toplumlar arası ulaşım özelliklerine, risk etmenlerinin varlığına, sunulan sağlık hizmetlerine ve iklim koşullarına bağlı olarak değişmektedir (4). COVID-19, yaşa göre de değişkenlik göstermektedir. 60 yaş üzerindeki kişiler ile yüksek tansiyon, kalp ve akciğer rahatsızlığı, kanser veya diyabet gibi önceden kronik hastalığı bulunan bireyler diğerlerine nazaran daha ağır atlatmaktadır. Çocuklar ve ergenlerde ise bugüne

kadar elde edilen kanıtlar, çocukların ve ergenlerin ağır hastalığa yakalanma olasılıklarının daha düşük olduğunu, ancak bu yaş gruplarında hala ciddi vakalar ve ölümlerin olabileceğini göstermektedir (5).

Bu yeni virüsün kuluçka süresi 5-6 gündür fakat bu süre 14 güne kadar esneyebilir. Virüse maruz kalan kişilerin çoğunluğu hafif ya da orta derecede hastalık geliştirir ve hastaneye bile yatmadan iyileşmektedir. Klinik semptomları spesifik değildir. Yaygın semptomlar ateş, kuru öksürük ve yorgunluktur. Nefes almada güçlük veya nefes darlığı, göğüs ağrısı, konuşma veya hareket fonksiyonlarında kayıp ciddi belirtilerdir ve derhal tıbbi yardım istenmelidir (6).

Ayrıca Güneydoğu İngiltere'de hızla yayılan COVID-19'a neden olan virüsün yeni bir varyantı keşfedildi. Mutasyon, bir organizmanın veya virüsün genetik kod dizisindeki herhangi bir değişikliktir. Bu değişiklikler, hangi proteinlerin üretildiğini veya bir patojenin davranışını etkileyebilir. Virüsler kendi içinde sık sık mutasyona uğradığından bu durum endişe verici değildir. Genellikle viral genetik kodda yeni bir varyanta veya suşa yol açan değişikliğin virüsün davranışları üzerinde hiçbir etkisi yoktur hatta onu daha az zararlı hale getirebilir. Bununla birlikte mutasyon bazen de virüsü daha bulaşıcı hale getirebilir, daha ciddi hastalığa neden olabilir. En tehlikeli durum ise aşılarda daha az etkili hale getirebilme ihtimalidir (7).

Tablo 1. 20 ve 21. yy'da yaşanan dört pandeminin özellikleri (4)

	İspanyol Gribi	Asya Gribi	Hong Kong Gribi	İnfluenza A(H1N1) 2009
Yıl	1918	1957-1958	1968-1969	2009-2010
Çıkış Bölgesi	Belirsiz	Güney Çin	Güney Çin	Kuzey Amerika
İnfluenza A virüs alt tipi (hayvan genetik girişi/rekombinasyon olayı)	H1N1 (bilinmiyor)	H2N2 (kuş)	H3N2 (kuş)	H1N1 (domuz)
Temel vaka üreme sayısı (R0)	1,2-3,0	1,5	1,3-1,6	1,1-1,8
Tahmini vaka fatalite hızı	%2-3	<%0,2	<%0,2	%0,02
Dünya çapında atfedilen tahmini mortalite	20-50 milyon	1-4 milyon	1-4 milyon	100-400 bin
Etkilenen yaş grupları	Genç erişkinler	Tüm yaş grupları	Tüm yaş grupları	Çocuklar ve genç erişkinler

DSÖ verilerine göre Covid-19 virüsü 01.05.2021 tarihi itibarıyla dünya genelinde 150.989.419 vaka ve 3.173.576 ölüme Türkiye de ise 4.820.591 vaka ve 40.131 ölüme sebep olmuştur. DSÖ ve Sağlık Bakanlığının yayınladığı verilere göre de sayılar gün geçtikçe artış göstermektedir. DSÖ istatistiklerine göre virüsün ölüm oranı %2,1'dir (8).

BİYOTERÖRİZM

Düşmanca saldırı amaçlı kullanılan, planladığı gruplarda çoğalma yeteneğine göre değişiklik göstermek üzere canlılarda (insan, hayvan veya bitkiler) hastalık veya ölüme yol açması hedeflenen, yapısı fark etmeksizin tüm canlı organizmalar veya onlardan üretilmiş enfekte materyal, biyolojik silah olarak tanımlanmıştır (9).

Biyoterörizm veya biyolojik savaş; mikroorganizmalar ve mikrobiyal, bitkisel veya hayvansal orijinli toksinlerin canlılarda hastalık oluşturmak ve ölüme sebebiyet vererek, toplumda panik ve afet durumu oluşturmak amacıyla kasıtlı kullanımınıdır (10). Ölümcül, kolayca elde edilebilen ve düşük maliyet ile büyük miktarlarda üretilen, aerosol formda stabil olan, kolayca geniş alanlara yayılabilen ve insandan insana bulaşan bakteriyel patojenler biyolojik savaş veya biyoterörizm ajanı olarak kullanılabilirler (11).

Fizyolojik etkileri sebebiyle insanları ve diğer canlıları ağır yaralamak, fonksiyonlarını bozmak, öldürmek gibi temel özelliklere sahip, toksisite seviyesi yüksek ve dış etmenlere dayanıklı olan toksik kimyasal maddeler ise kimyasal silah olarak tanımlanırlar (12).

Kimyasal ajanların üretimi, depolanması ve kullanımı sebep oldukları hastalıklardan korunmak kadar kolay ve ucuz değildir. Kimyasal ajanların boyutları biyolojik ajanlar gibi küçük olmadığından kullanılıp kullanılmadığını anlamak uzun sürmez. Birçoğunun kendine özgü tadı, kokusu ve rengi vardır. Kimyasal ajanları biyolojik ajanlardan ayıran en önemli özellik ise kimyasal ajanların kuluçka süresinin olmamasıdır. Biyolojik ajanlar kadar yüksek

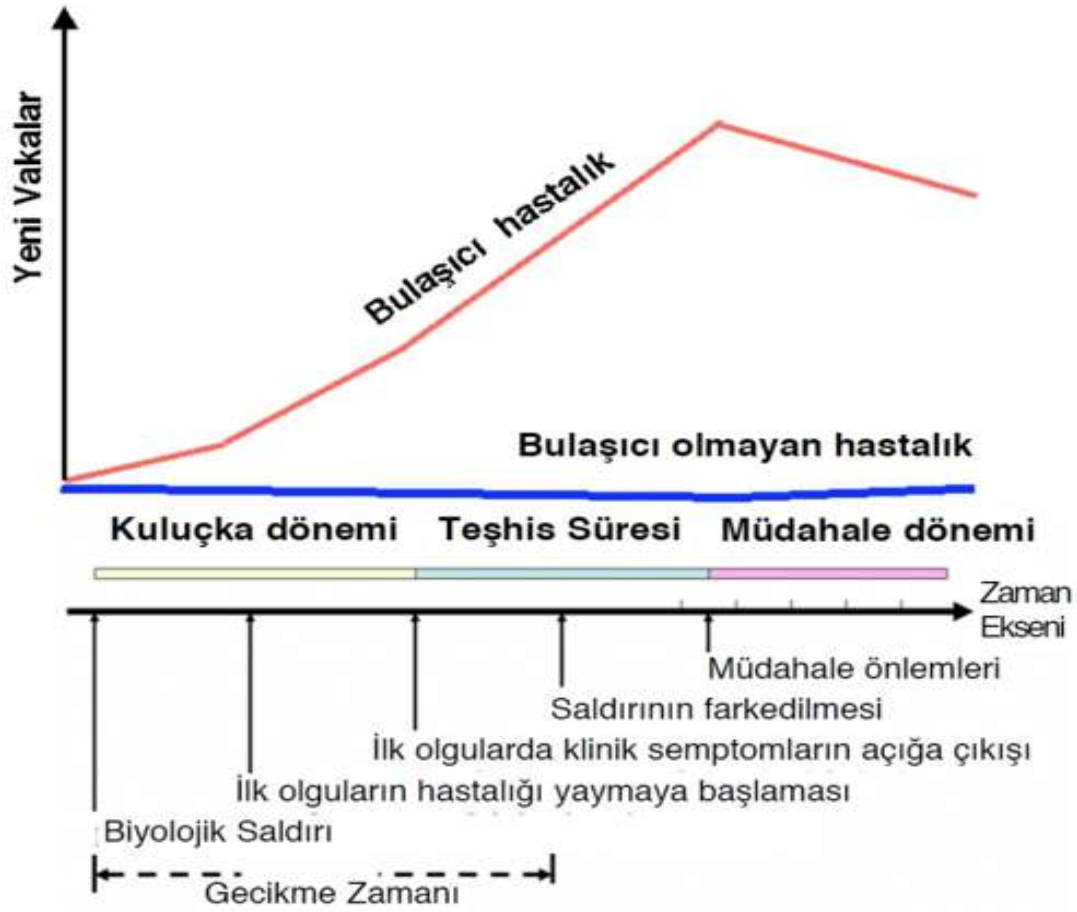
ölüm (mortalite) ve hastalık (morbidite) kabiliyetine sahip değildir. Kimyasal ajanlar ile yapılan saldırı doğal salgınlarla karıştırılmazlar (13).

Biyolojik silah ajanlarının ise üretimi, depolanması, taşınması ve kullanımı daha kolay fakat sebep oldukları hastalıkları önlemek ve tedavi etmek zor ve pahalıdır. Yüksek hastalık (morbidite) ve ölüm (mortalite) kapasitesine sahiptir. Oldukça düşük maliyetle üretilebilirler. Hatta bu nedenle biyolojik ajanlar için "Fakir Ülkelerin Atom Bombası" tabiri kullanılmaktadır. Biyolojik ajanlar tatsız, kokusuz ve renksiz oldukları için fark edilemezler, bu sebeple silah ajanının kullanılıp kullanılmadığına karar vermek zordur. Biyolojik ajanın türüne ve etkinliğine bağlı kalmak üzere kuluçka süresi çok kısa bir süreden başlayarak birkaç aya kadar çeşitlilik gösterdiğinden, ajana maruz kalan kişilerde özel ve belirgin semptomlar oluşuncaya kadar farkına varılamaz. Bunun yanı sıra biyolojik saldırı mı yoksa doğal salgın mı olduğuna karar vermek güçleşir (Şekil 1).

Biyolojik silah olarak virüsler olumlu özelliklerinin dışında, üretim ve depolama için daha üstün teknolojik bilgi ve donanım ihtiyacı duyar. Hücre içi yaşam kriterinden dolayı çoğunlukla dış çevreye dayanıksız olurlar. Bulaşıcılık ve üreme özelliği sebebiyle kullanan taraf açısından da yayılımlarını kontrol altına almak zordur. Bazı biyolojik ajanlara yönelik etkin bir aşı ve tedavi mevcut değildir (14).

Biyolojik tehditler; biyolojik ajanların ve uygun olmayan laboratuvar yöntemleri gibi koşulların oluşturduğu tehditlerin bütünü olarak tanımlanabilir. Bu tanım; doğal kaynaklı hastalıkları, yeryüzünde bulunan, insanlara bulaşma ihtimali olan biyolojik ajanları, muhteviyatında biyolojik ajan bulunan silahları, biyolojik ajanlar ile gerçekleştirilen terör saldırılarını kapsamaktadır (15).

Biyolojik ajan, kontamine olmuş bir insan veya canlı/cansız herhangi bir taşıyıcı yoluyla farklı bölgelere yayılarak planlananın üzerinde bir etki gösterebilir. İnsanlar üzerindeki kaos ve panik etkisiyle birlikte sağlık sistemini olumsuz etkiler. Dolayısıyla pandemi süreci ile asıl benzerlik



Şekil 1. Bulaşıcı hastalığın zamana bağlı olgu sayısı ile tanı ve müdahale zamanları (10)

gösteren ve farkedilmeden kitle imha silahı olarak kullanılabilir ajan biyolojik ajanlardır.

Biyolojik ajanlar çok eski dönemlerde zehirli ok, battaniye, ceset ve hayvan leşleri ile kaynakların kirletilmesi şeklinde kullanılmıştır. Mesela 14. yy'da Tatarlar, Kırım (Kaffa) savaşında veba hastalığından ölen kişileri mancınıkla karşı tarafa atarak bir salgın hastalık başlatmaya çalışmışlardır. Amerika kıtasında, 18. yüzyılda Fransızlar ile yerliler arasındaki savaşta ise İngilizler, çiçek hastalığı olan kişilerin kullanmış olduğu battaniye ve diğer eşyaları Amerikan yerlilerine vererek bir salgını başlatmışlardır (16).

Almanya I. Dünya Savaşı'nda, Japonlar ise II. Dünya Savaşı'nda biyolojik silahlar üretip kullanmışlardır. 1984 yılında Oregon restoranlarında salatalara *Salmonella typhimurium* bulaştırarak biyolojik saldırı düzenleyen Rajneeshee tarikatı ile 1995 yılında Tokyo metrosunda sarin gazı ile eylem gerçekleştiren Aum Shinrikyo tarikatı, biyolojik ve kimyasal silahların terörist amaçla kullanılabilirliğini göstermiştir (16).

Tarihsel süreci bir bütün olarak değerlendirdiğimizde, biyolojik silahların devletler ve terör örgütleri tarafından rahatlıkla kullanıldığı, diğer devletler karşısındaki eksikliklerini kapatmak için uygun yöntem olarak görüldüğü aşikardır. Bunun en önemli etkeni ise fark edilmeden kullanılabilmesidir.

SONUÇ

Pandemi, insanlar için hayati öneme sahip eylemleri ve toplumun olağan yaşamındaki akışı etkilemektedir. Bu etki sebebiyle ekonomik kayıplara ve zorluklara neden olmaktadır. İş ve eğitim kurumlarındaki devamsızlığın en önemli nedenlerinden biri olan pandemi, şiddetinin algılanışına bağlı olarak, işe devamsızlık kamu düzeninin bozulmasına neden olabilir. Pandemiye sebep olabilecek bir sonraki salgının veya biyolojik saldırının hangi özelliklere sahip olduğu, ne zaman, nerede ve nasıl gerçekleşeceği belli değildir (3).

Biyolojik saldırı veya pandemiye karşı etkin bir önleme için saldırı olmadan veya salgın başlamadan önce belirlenen kurum ve kuruluşların mantıklı ve gerçekçi bir şekilde örgütlenmeleri ve koordine olmaları, çok iyi eğitilmiş ve tecrübeli istihbarat birimleri, güvenlik güçleri ve sağlık çalışanları, uygun şekilde kayıt altına alınan istatistikler gerekir (17). Bu bilinçle Sağlık Bakanlığı önderliğinde pandemi ve mevcut tehlikeler dikkate alınarak, pandemi planını oluşturmak için 11-12 Temmuz 2005 tarihinde bir toplantı icra edilmiştir. Kapsamlı planlama ve koordinasyonun hayati öneme sahip olduğunun farkına varılarak yapılan hazırlıklar kağıt üzerinde kalmamalı, düzenli ve düzensiz aralıklarla mevcut durum denetlenmelidir.

Sağlık Bakanlığının 13588366 sayılı Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi konulu genelgesinde bildirilen bildirim zorunlu bulaşıcı hastalık grupları ve ajanları, bildirim algoritmasına uygun şekilde bildirilmelidir. Bu genelge ile verilen ihbar ve bildirim görevi yerine getirilerek erken saptama sayesinde ülke genelinde uygun tedbirler alınabilecek, doğru ve zamanında yapılacak müdahale ile olası kötü sonuçların ortaya çıkması önlenecektir.

Acil servislerde biyolojik ve kimyasal saldırı ile pandemiye sebep olan salgın hastalığa yakalanan hastalara yapılacak ilk yardım, tedavi ve dekontaminasyon işlemlerine yönelik standartlar hazırlanmalıdır. Bütün sağlık kuruluşlarında acil

servislerin önüne dekontaminasyon alanları kurulmalı, bu alanlar ilk hasta kabul yeri olarak kullanılmalıdır (18). Hatta burada günümüz teknolojisinden de faydalanarak gerekli teçhizatla ve materyalle sağlık çalışanı olmadan hastaların ateşi ölçülebilmelidir. Pandemi süreci bittikten sonra dahi acil servise maskesiz hasta alınmamalıdır. Sağlık Bakanlığı bünyesinde oluşturulacak kurumlar ile tüm il ve ilçelerde mülki amir başkanlığında oluşturulacak kurullar birbiri ile koordineli şekilde eğitim, önleme ve tedavi konularını tek merkezden yönetmelidir. Her kurumun üzerine düşen görev, açık ve anlaşılır şekilde önceden belirlenerek herhangi bir aksaklığa sebebiyet verilmemelidir. Sağlık çalışanlarına verilecek eğitim ve yapılacak tatbikat üst seviyede sürekli canlı tutulmalıdır.

Mikrobiyolojik bir ajana karşı insanları hazırlıklı hale getirmek için aşılamanın uygun şekilde yapılması gerekmektedir. Biyoterörizm tehlikesi ile karşı karşıya kalan devletler, vatandaşlarını korumak amacıyla aşı programları üzerinde çalışmakta ve geliştirmektedir. Günümüzde kullanılan mevcut aşılardan çoğunluğu, rekombinant DNA teknolojisine göre üretilmektedir. Türkiye’de kullanılan aşılardan çoğunluğu da yurtdışından temin edilmektedir (19). Son 10 yılda yaşanan olaylar sonrası ülkemize giren yabancı uyruklu insan sayısı dikkate alındığında, geçmişte yürütülen aşılama programını sekteye uğradığı kuvvetli bir ihtimaldir. Bununla birlikte aşının gereksiz olduğunu düşünerek hem kendine hem çocuğuna aşı yaptırmayan bireylerde bulunmaktadır. Sağlık Bakanlığı konunun üzerinde hassasiyetle durarak gerekli çalışmaları yapması, ayrıca aşı yaptırmayan bireylere karşı gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir.

Biyolojik saldırı için belirlenmiş önlem, savunma ve eğitimler pandemi süreci için de geçerlidir. Yaklaşık 1 yıldır dünyada ve ülkemizde Covid-19 virüsünün oluşturduğu tablo ve buna karşı verilen uğraş biyolojik ajan ile yapılacak saldırıda ülke olarak bize ne kadar yük getireceğini göstergesidir. Dolayısıyla pandemi sürecinde görev alan birim ve kurumlar aynı şekilde

biyolojik ve kimyasal saldırıda da görevlendirilmelidir. Eğitimler bu kapsamda düşünülerek verilmeli, pandemi süreci ile biyolojik ve kimyasal saldırılara ortak bir payda da birleşerek müdahale edilmelidir. Hiçbir şey artık eskisi gibi olmayacaksa da pandemi süreci alınacak önlemlere uyulduğu takdirde aşılabilecek bir afet durumudur. Covid-19 kapsamlı bir tatbikat olarak bile düşünülebilir. Pandemi sürecinde görev alan tüm kurumlar ve personel, mevcut pandemi sürecinde kazanılan bilgi birikim ve tecrübesini, meydana gelebilecek muhtemel olaylarda daha etkin kullanacaktır. Bugüne kadar hazırlanan bilgi, belge ve dokümanlar gözden geçirilerek hatalar düzeltilmeli, eksiklikler tamamlanmalıdır.

Sağlık ordumuzun eğitimi bir yana, ilkokul çağında hatta okul öncesi eğitimde salgın hastalıklar ve biyolojik saldırı konusunda ebeveynler de dahil olmak üzere herkese gerekli eğitimler verilmelidir. Sosyal medya ve televizyon yardımıyla eğitici ve öğretici yayınlar yapılarak tüm bireyler bilinçlendirilmelidir. Kamu spotu ve tartışma programları kullanılmalı, gazetelerde biyolojik saldırılar ile salgın hastalıklar yayınlanarak insanların dikkati çekilmelidir. Sağlık Bakanlığı, AFAD vb. kurumlar ile sivil toplum kuruluşları biyolojik ajanlar ve salgın hastalıklar konusunda bilgilendirici broşür ve sunum hazırlanmalıdır. Sadece eğitimle kalmamalı, belirli periyotlarla tatbikatlar yapılmalıdır (18).

Biyolojik ve kimyasal saldırı ile salgın hastalıklar konusunda temel önlem eğitim olsa da asla tek başına yeterli değildir. Müdahalede bulunacak görevli

personel öncelikli olacak şekilde tüm vatandaşlar için gerekli olan malzeme (maske, dezenfektan, biyosensör vb.) sağlanabilmelidir. Bu malzemelerin üretimi ve geliştirilmesi için AR-GE faaliyetlerinin önemi kavranarak yatırım yapılmalıdır. Uzun ve kısa ölçekli planlar hazırlanarak başlangıçta acele önlemler alınmalı sonrasında geniş çaplı tedbirler uygulanmalıdır. Bu tedbirler öncelikle tehlikeli olduğu düşünülen riskli bölgelerde alınmalı, ilerleyen süreçte birey bazına kadar inilmelidir (18).

Biyolojik ajanlar ile yapılacak saldırıya yeni bir boyut kazandıracak gelişmeler de yaşanmaktadır. İnsan genom projesinin tamamlanmasının ardından bu projeye ilişkili olarak geliştirilen farklı projeler çalışılmaya başlanmıştır. Bu projelerden birisinde insanlarda ırk ve kişi özelliklerine ilişkin genetik değişiklikler çalışılmaktadır. Bu genetik değişiklikler sayesinde, bir ilacın farklı ırklarda farklı etkiler oluşturabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla gelecek yüzyılda insanların genetik profilleri çıkarılabilecek ve bu bilgiler ışığında kişiye özel tedaviler uygulanabilecektir (20). Diğer yandan buna benzer bir proje sayesinde sadece belirli ırkları ve yaş aralığını hedef alabilecek biyolojik ajanların da yapılabileceği iddia edilmektedir. Mevcut Covid-19 virüsünün yaşlılarda daha ağır seyretmesi ve ölüm oranının fazlalığı dikkate alındığında konunun hassasiyeti daha iyi kavranmaktadır. Belirli grupları etkileyebilecek biyolojik ajan üretimi spekülasyon gibi değerlendirilse de konuyla alakalı bilimsel gelişmeler ve faaliyetler özenle takip edilmelidir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>, (Erişim Tarihi: 14.03.2021).
2. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-11-march-2020>, (Erişim Tarihi: 14.03.2021).
3. Bulaşıcı hastalıklarla mücadele rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. <https://khgmsaglikhizmetleridb.saglik.gov.tr/TR-48633/bulasici-hastaliklar-ile-mucadele-rehberi---genelge-2018-22.html>. (Erişim Tarihi: 18.03.2021).
4. Pandemik İnfluenza Ulusal Hazırlık Planı, Ankara 2019. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/bulasicihastaliklar-haberler/ulusal-pandemi-hazirlik-plani.html>. (Erişim Tarihi: 20.03.2021).
5. Q&As on COVID-19 and related health topics. WHO. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub>. (Erişim Tarihi: 23.03.2021).
6. Coronavirus Symptoms. WHO. https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3 (Erişim Tarihi: 14.03.2021).
7. There's a new strain of COVID-19 - should we worry? GAVI. <https://www.gavi.org/vaccineswork/theres-new-strain-covid-19-should-we-worry/> (Erişim Tarihi: 15.03.2021).
8. Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. WHO. <https://covid19.who.int/>. (Erişim Tarihi: 02.05.2021).
9. Public health response to biological and chemical weapons. WHO Guidance 2004 Chapter3. <https://www.who.int/csr/delibepidemics/biochemguide/en/>. (Erişim Tarihi: 15.03.2021).
10. Kılıç S. Biyolojik Silahlar ve Biyoterörizm. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2006; 63(1): 1-20.
11. Kılıç S. Biyolojik Silah Olarak Bakteriler: "Kategori A Ajanlar". Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2006; 63(2): 21-46.
12. Karayılanoğlu T, Saygı Ş, Baykal B, Kenar L. Kimyasal atakta tıbbi savunma ve pestisitler. Ankara, GATA Basımevi, 2003.
13. Takafuji ET, Kök AB. The chemical warfare threat and the military healthcare provider. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Borden Institute, Washington D.C, 1997: 111-28.
14. Eitzen EM. Use of biological weapons. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Borden Institute, Washington D.C, 1997: 437-50.
15. Biyolojik Tehdit ve Tehlikeler. AFAD. <https://www.afad.gov.tr/kbrn/biyolojik-tehditler>. (Erişim Tarihi: 01.03.2021).
16. Christopher GW, Chieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM. Biological warfare, a historical perspective. JAMA, 1997; 278(5): 412-7.
17. Baysallar M, Kenar L. Biyoterörizm ve dekontaminasyon yönetimi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2006; 63(3): 115-28.
18. Arslan AG. Türkiye'de Biyolojik Ve Kimyasal Silahlara Karşı Alınan Önlemler ve Yaklaşım Algoritması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kriminalistik Anabilim Dalı, 2017.
19. Wein LM, Craft DL, Kaplan EH. Emerging response to an anthrax. Proceedings of The National Academy of Science of the USA. 2003; 100: 4346-51.
20. Rifkin J. Biyoteknoloji yüzyılı. 1. Baskı. İstanbul: Evrim yayınevi, 1998.

Yangı (iltihap, inflamasyon) süreçlerinde otakoidler

Autacoids in the inflammation

Serkan KEMER¹ (ID), Sefa METİN¹ (ID), Gökçe SURAL¹ (ID), Emine DEMİREL YILMAZ¹ (ID)

ÖZET

Otakoidler normal fizyolojik yanıtları ortaya çıkarmak için çeşitli uyarılarla hücrelerden lokal olarak salınan ve çok kısa sürede etkinliklerini kaybeden, organizmada birbirine yakın komşu hücreler arasında yerel iletişimi sağlayan maddelerdir. Sentezlerinde, salınmalarında veya iletilmelerinde ortaya çıkabilecek dengesizlikler, yangı, alerji, aşırı duyarlılık ve iskemi reperfüzyon hasarı gibi patolojik durumlara önemli ölçüde katkıda bulunur. Fizyolojik ve patolojik süreçlerin tümünde görev alan bu haberci moleküller, yangıda da çok önemli roller üstlenirler. Yangının farklı aşamalarında ya da türlerinde görev alan otakoidler, hem tetikleyici hem de düzenleyici olarak iş görürler. Bu maddeler, yangıya katılan hücrelerin iletişim ağına aracılık ederek organizmanın hasarlı/yabancı/zararlı etkeni ortadan kaldırmasını sağlarlar. Otakoidler, bağışıklık hücrelerinde depo halinde bulunabileceği gibi; yangı uyarısıyla aktivitesi ve ifadesi artan enzimler aracılığıyla da sentezlenebilmektedir. Kimyasal yapılarına göre, gaz (NO, H₂S, CO); yağ (prostaglandinler, lökotrienler, lipoksinler, PAF); peptid (anjyotensinler, kininler, P maddesi, endotelinler, natriüretik peptidler); amin (histamin, serotonin) ve protein (sitokinler)

ABSTRACT

Autacoids are substances that released locally from cells with various stimuli to elicit normal physiological responses and lose activity in a very short time providing local communication between adjacent cells in the organism. Disproportion in their synthesis, release or transmission contribute significantly to pathological conditions such as inflammation, allergy, hypersensitivity, and ischemia-reperfusion injury. These messenger molecules participate in all physiological and pathological processes, and assume very important roles in inflammation. Autacoids, which take part in different stages or types of inflammation, work both as a trigger and as a regulator. These substances mediate the communication network of the cells involved in the inflammation, enabling the organism to eliminate the damaged/foreign/harmful factor. Either autacoids can be found in immune cells as storage or enzymes whose activity or expression increase with inflammatory stimulus can also synthesize them. According to their chemical structure, autacoids are classified in groups of gaseous (NO, H₂S, CO), lipid (prostaglandins, leukotrienes, lipoxins, PAF), peptide (angiotensins, kinins, Substance P, endothelins, natriuretic peptides), amine (histamine, serotonin) and protein autacoids

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AD., Ankara



İletişim / Corresponding Author : Serkan KEMER

Ankara Üni. Tıp Fakültesi, Hacettepe Mah. Adnan Saygun Cad. Altındağ, Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 07.06.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 11.08.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.66742

Kemer S, Metin S, Sural G, Demirel Yılmaz E. Yangı (iltihap, inflamasyon) süreçlerinde otakoidler. Turk Hij Den Biol Derg, 2022; 79(4): 784 - 801

olarak ayrılan otakoidler; yangıda bir çok hücreden salgılanabilmektedir. Akut ve kronik yangının hem görev alan otakoid çeşitleri hem de bunları sentezleyen inflamatuvar hücreler bakımından da çeşitli farkları bulunabilmektedir. Ancak bu moleküllerin süreç boyunca, hangi hücreden ne kadar salgılandığı, gerçek zamanlı olarak henüz ortaya konamamıştır. Akut evrede nötrofil ve makrofaj hâkimiyeti altında salgılanırlarken kronik evrede yangı tipine göre lenfositler ve makrofajlar salgı görevini devralmaktadır. Yangı tedavisinde bu maddelerle ilgili olarak enzim inhibitörleri, reseptör antagonistleri agonistleri ya da analogları, birçok ilaç kullanılmakla birlikte daha seçici, etkinliği yüksek ve yan etkileri daha az yeni ilaçların geliştirilmesi için yoğun çalışmalar sürmektedir. Bu derlemede yangıda görev alan otakoidler; hücrel kaynakları ve yangı süreçleri bağlamında ele alınmış ve yangıda ilaç hedefi olarak konumları incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Otakoidler, yangı, ilaç etkileri

(cytokines) and they can be secreted from many cells in the inflammation. There are various differences in acute and chronic inflammation in terms of both the types of autoacoids involved and the inflammatory cells that synthesize them. However, how much of these molecules are secreted from each cell during the process has not been revealed in real time yet. While they are secreted under the dominance of neutrophils and macrophages in the acute stage, lymphocytes and macrophages take over the secretory function according to the type of inflammation in the chronic stage. Despite the use of many drugs as enzyme inhibitors, receptor antagonists / agonists or analogues in the treatment of inflammation, intensive studies are underway to develop new drugs, which will be more selective, highly effective and have less side effects. The aim of this review was to discuss autacoids involved in inflammation in the context of participating cells and inflammatory processes and to evaluate their situation as a drug target in inflammation.

Key Words: Autacoids, inflammation, drug effects

GİRİŞ

Otakoidler organizmada hücreler arası uyarı iletiminde yer alan, birinci haberci moleküllerin bir çeşididir. Diğer birinci haberci moleküllerden (hormonlar, nörotransmitterler) farkları; yarı ömürlerinin çok kısa olması ve bu nedenle yalnızca birbirine yakın komşu hücreler arasında, iletişimi sağlamalarıdır. Yerel olarak üretilip, salıverildikleri ve sınırlı bir alanda, kısa süreli etki gösterip, yıkıdıkları için; “yerel hormon” (lokal hormon) olarak da adlandırılmaktadırlar. Otakoidler kimyasal yapılarına göre gaz, yağ, peptid, amin ve protein otakoidler olarak, sınıflandırılmaktadır. Yangı süreçlerinde rol alan birçok otakoid, yangıya katılan hücreler arasındaki eşgüdümlü bütüncül iletişim ağını düzenlemektedir.

Yangı (iltihap, inflamasyon), organizmayı hasarlı/yabancı/zararlı etkenlerden koruyan bağışıklık sisteminin uyarılmasıyla, ortaya çıkmaktadır. Mikroorganizmalar, kimyasal maddeler, fiziksel etkenler ya da bağışıklık sisteminin yabancı saydığı organizmanın kendi yapı taşları; bağışıklık sistemini uyarabilirler. Bağışıklık “doğuştan bağışıklık sistemi” ve “edinilmiş bağışıklık sistemi” olarak ikiye ayrılmaktadır. “Doğuştan bağışıklık sistemi” vücuda giren patojenlere verilen seçici olmayan savunma cevabıdır ve bellek oluşturmaz. “Edinilmiş bağışıklık sistemi” ise patojenlere karşı verilen seçici savunma cevaplarını içerir ve etkene karşı bağışıklık hafızası oluşturur (1).

Hem “doğuştan bağışıklık sistemi”nin hem de “edinilmiş bağışıklık sistemi”nin başlangıcında, “akut yangı” ortaya çıkarken; “iyileşme” (rezolüsyon)

sağlanamaması ya da tekrarlayan akut yangı ataklarının etkeni ortadan kaldıramaması sonucu “kronik yangı” gelişebilmektedir. Genellikle infeksiyonlar ve inflamatuvar hastalıklarda karşımıza çıktığını düşündüğümüz yangı aslında pek çok patolojiye eşlik etmektedir. Hipertansiyonda, aterosklerozda, kalp yetmezliğinde, dejeneratif sinir hastalıklarında, depresyonda, diyabette ve kanserde de yangı söz konusudur. Hatta bu patolojilerde yangının neden mi, yoksa sonuç mu olduğu tartışılmaktadır (2). Öte yandan, akut ve kronik yangıda, katılan hücreler tarafından sentezlenip salıverilen otakoidler; hem yangının tetiklenmesini sağlamakta, hem de süreç boyunca hücrelerin işlevlerini düzenlemektedir.

YANGIDA GÖREV ALAN OTAKOİDLER

Yerel etkili otakoidler aracılığıyla; endotel, trombositler, parankim ve bağışıklık hücreleri birbirleriyle; henüz tam olarak bilemediğimiz bir iletişim ve etkileşim ağı kurarak, hasarlı/yabancı/zararlı etkeni ortadan kaldıracak; yangı cevabını oluştururlar. Yangı bölgesinde bulunan çeşitli hücrelerde; hem otakoidleri sentezleyen enzimlerin, hem de etkiledikleri reseptör ve efektörlerinin aktiviteleri ve ifadeleri, yangı süreci boyunca değişebilmektedir. Bu nedenle yangıda görev alan otakoidlerin kaynaklandığı ya da etkilediği hücreler kesin olarak bilinmemektedir.

NİTRİK OKSİT (NO)

NO; çok çeşitli biyolojik işlevlerde rol oynayan, L-argininden “nitrik oksit sentaz” (NOS) aracılığıyla sentezlenen; gaz yapıda bir otakoiddir. Farklı üç NOS enzimi tarafından (endotelial NOS: eNOS, nöronal NOS: nNOS, indüklenen NOS: iNOS) sentezlenen NO; hücre zarlarını kolayca geçer ve birçok molekülle tepkimeye girdikten sonra, saniyeler içinde biyoetkinliğini kaybeder. Fizyolojik koşullarda yapısal eNOS ve nNOS’un az miktarda ve kısa süreli NO üretimi, hedef hücrelerde nitrozilasyon tepkimesi ile “çözünür (soluble) guanilil siklaz”ı (sGS) uyararak, siklik guanozin monofosfat (cGMP) artışına neden olur ve etkilerden cGMP artışına bağlı aktive olan

Protein kinaz G sorumludur. Patolojik koşullarda ise iNOS aracılı fazla miktarda ve uzun süreli sentezlenen NO “oksidatif stres” (OS) varlığında artmış süperoksit radikali ile tepkimeye girerek, peroksinitrit radikali gibi çok güçlü “reaktif azot bileşikler” (RNS) oluşturur (3). Hedef moleküllerde “nitrozasyon ve nitrasyon” tepkimeleri ile işlev bozukluğuna yol açan bu durum, “nitrozatif stres” (NS) olarak adlandırılır (4).

Kardiyovasküler sistemde endotelden salıverilen NO, hem dinlenim hem de uyarılmış durumunda damar tonusunu, geçirgenliğini, kan akımını ve kan hücrelerinin işlevlerini düzenlenmesine katkıda bulunur (5). Nöronlarda üretilen NO, santral ve periferik sinirlerin işlevlerinde önemli rollere sahiptir (6). Endotel, epitel, monosit, makrofaj, nötrofil, dentritik, mast ve NK hücreleri tarafından sentezlenip salıverilen NO akut ve kronik yangıda rol oynamaktadır. Akut yangıdaki vazodilasyondan büyük ölçüde endotel kaynaklı NO sorumludur. Kronik yangıda NS nedeniyle, eNOS kaynaklı NO’nun biyoetkinliğinin azalması söz konusudur ve bu durum “endotel işlev bozukluğu”na yol açabilir. Yangıda bağışıklık hücreleri tarafından aşırı miktarda üretilen süperoksit radikali ve NO tarafından oluşturulan RNS, bağışıklık sistemimizin yabancı etkenleri öldürmek için kuşandığı, öldürücü silahlarından biridir. Bağışıklık hücreleri patojenleri, hücre dışında ya da fagosite ederek hücre içinde, RNS aracılığıyla öldürürler. Öte yandan bu güçlü silah, kronik yangıda ya da otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, kendi hücrelerimize de yönelebilir (7).

HİDROJEN SÜLFÜR (H₂S)

Organizmanın gaz otakoidlerinden biri olan H₂S, L-sistein’den sentezlenmekte ve hedef hücrede sülfidasyon tepkimeleriyle etkisini göstermektedir. Endotel, eozinofil, makrofaj, trombositler tarafından üretilen H₂S hem doğrudan hem de diğer otakoidleri etkileyerek, yangıya katkıda bulunmaktadır. H₂S’nin antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antiviral etkinlikleri tanımlanmıştır. H₂S, granülositlerin hayatta kalmasını sağladığından nötrofillerin aktivitesini uzatmaktadır.

H2S lökosit adezyonunu azaltarak ve nötrofil apoptozunu artırarak yangının iyileşmesine de katkıda bulunmaktadır (8).

KARBONMONOKSİT (CO)

CO, hemoglobin metabolizması sırasında, Hem'in "Hem oksijenaz" (HO) enzimiyle biliverdin'e dönüşümü sırasında üretilen bir gaz otakoiddir. Memelilerde indüklenir HO-1 ve yapısal HO-2 olmak üzere iki tip HO vardır. Üretilen CO, hücre zarlarını kolayca geçebilir ve hedef hücrede sGS uyarıp, hücre içinde cGMP artışıyla işlevleri değiştirir. Eritrosit, monosit, makrofaj, trombosit ve mast hücreleri tarafından sentezlenebilen CO'nun trombosit aktivasyonunu, OS'yi, lökosit adezyonunu azalttığı ve inflamasyonu düzenlediği gösterilmiştir (9). CO'nun yara iyileşmesini hızlandırdığı da bilinmektedir.

ARAKİDONİK ASİD METABOLİTLERİ

Arakidonik asit, zar fosfolipitlerinden Fosfolipaz A2 enzimi aracılığıyla sentezlenen, çoklu doymamış yağ asididir. Yangı mediyatörleri, kimyasal ve fiziksel travmalar Fosfolipaz A2 enzimini aktive ederek, arakidonik asitin sentezlenmesine yol açarlar. Arakidonik asitten farklı enzimlerle [siklooksijenaz (COX), 5-lipoksijenaz (5-LOX), 12-lipoksijenaz (12-LOX), 15-lipoksijenaz (15-LOX), monoksijenaz (MOX), araşidonil etanol aminfosfolipaz D2 (AEA-PLD2), gliserol lipaz (GL)] ve nonenzimatik olarak OS'le çeşitli biyoaktif maddeler sentezlenmektedir (10).

COX ENZİMİ ÜRÜNLERİ

COX enzimleri (COX-1 ve COX-2) aracılığıyla arakidonik asitten prostaglandinler (PG) sentezlenmektedir. COX-1 yapısal, COX-2 ise indüklenir enzimlerdir ancak COX-2 yapısal bulunduğu dokular ve COX-1 indüklediği durumlar olabilir. COX enzimleriyle önce PGG₂ ve PGH₂ oluşmakta ardından hücreye özgü prostaglandin sentezleyen enzimlerle PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ ve TxA₂ ortaya çıkmaktadır. Böylece Prostaglandin (PGI₂) endotelde TxA₂ trombositlerde; PGE₂ ve TxA₂ aktive makrofajlarda daha baskın ürün olarak sentezlenmektedir.

Yangıda indüklenen COX-2, ürünlerin ana kaynağıdır. Bu ürünlerden bazıları yangının başlangıcında proinflamatuvar etkinlik gösterirken, bazıları yangı iyileşmesi (rezolüsyon) sırasında antinflamatuvar etkinlik gösterebilirler. Yangıda rol oynayan en önemli prostanooid PGE₂'dir ve fizyolojik şartlarda üreme, gastrointestinal bütünlük, kan basıncı gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde görev alır. Etkilerini EP1-2-3-4 reseptörleri aracılığıyla gösteren PGE₂, yangıda damarlarda geçirgenlik artışı ve gevşeme yaparak kızarıklık ve ödem oluşumuna yol açar. Ek olarak, PGE₂ lökosit infiltrasyonunu artırır, T lenfosit gelişiminde rol oynar ve B lenfositlerinin antikör salgılayan plazma hücrelerine farklılaşmasını önleyerek immünolojik cevabı bastırır. İyileşme döneminde ise, yangı alanındaki makrofajların M2 makrofaj yönüne farklılaşmalarını tetikler (11).

Kardiyovasküler homeostazisin düzenlenmesinde önemli görevleri olan PGI₂, etkilerini IP reseptörleri aracılığıyla gösterir. Ana kaynağı damar endoteli olan PGI₂, güçlü damar gevşetici etkisinin yanında, trombosit agregasyonu ve lökosit adezyonunu da inhibe eder. PGI₂, dendritik hücre olgunlaşmasına ve bağışıklık hücrelerine sunum için antijen alımına müdahale ederek immün cevabın baskılanmasına katkıda bulunur.

PGD₂ hem santral sinir sistemi hem de periferik dokularda sentezlenir. Sinir sisteminde uyku, ağrı algısı gibi fonksiyonların düzenlenmesinde görev alır. Periferik dokuda esas olarak mast hücreleri tarafından salgılanır. Dendritik hücreler ve Th2 hücreleri de PGD₂ salgılayabilirler. DP1 ve DP2 olmak üzere iki reseptörü bulunan PGD₂, Tip-1 alerjik cevabın oluşmasında görev alır. PGD₂, DP2 reseptörü aktivasyonu ile Th2 lenfositlerin kemotaksisini ve göçünü indükler.

TxA₂ trombositlerde sentezlenen ana metabolitidir ve TP reseptörü aracılı ile etkisini gösterir. Yangıda salgılanan TxA₂ vazokonstriksiyon ve platelet agregasyonuna neden olur.

5-LOX ENZİMİ ÜRÜNLERİ

5-LOX enzimi aracılığıyla Lökotrien A₄ (LTA₄),

B_4 (LTB_4), sisteinil lökotrienler Lökotrien C_4 (LTC_4), D_4 (LTD_4) ve E_4 (LTE_4) oluşur. Reseptörleri BLT1, BLT2, CysLT1, CysLT2, OXE ve FPR2/ALX'dir. LTB_4 , T lenfositleri, nötrofiller, eozinofiller, monositler ve mast hücreleri için güçlü bir kemoatraktandır (12). LTB_4 ayrıca nötrofillerin ve eozinofillerin aktivasyonuna ve monosit-endoel yapışmasına katkıda bulunur. Lökotrienler vazokonstriksiyona, bronkospazma ve artmış damar geçirgenliğine de yol açarlar.

LİPOKSİNLER

Lipoksinler (LX) birkaç enzimin rol aldığı süreçte farklı hücreler arasında üretilirler. Sentezlerinde 15-LOX, 5-LOX, 12-LOX, LXA_4 ve LXB_4 hidrolaz enzimleri rol alabilir. LXA_4 ve 15-epi-LX'ler G proteinine kenetli reseptör olan FP2/ALX, FPR3, GPR32, CYP4F2-3 yoluyla çoklu hücrel cevapları ortaya çıkarırlar. Bu reseptör monositler, T hücreleri, makrofajlar, sinoviyal fibroblastlar ve bağırsak epiteli gibi çeşitli hücrelerde ifade edilmektedir. LX'ler anti-inflamatuar olup nötrofil, eozinofil ve monositlerin yangı bölgesine göçünü engellerler (13). ALX aktivasyonu NADPH oksidazı inhibe ederek, nötrofillerin süperoksit anyon üretimi azaltır. LX'ler yangı iyileşmesi ve doku tamiri için gerekli monositlerin infiltrasyonunu da teşvik ederler. Makrofajlar, yangı bölgesinden apoptotik nötrofillerin temizlenmesi için LX'ler tarafından uyarılır. Bunun yanında, LX'ler fibrotik cevaba karşı koyarlar. Bir dizi faktör tarafından indüklenen fibroblastların ve mesanjyial hücrelerin proliferasyonunu azaltarak dokunun yeniden modellenmesini ve iyileşmesini sağlarlar.

DİĞER YAĞ ASİDLERİ

Arakidonik asitten 12-LOX aracılığıyla sentezlenen Hepoksilin A_3 (HxA_3) ve Hepoksilin B_3 (HxB_3) yangıda nötrofillerden salgılanarak nötrofil kemotaksisini ve damar geçirgenliğini artırmaktadır (14).

İzoprostanlar, arakidonik asidin OS'de nonenzimatik metabolizması sonucunda oluşurlar. Bu nedenle OS biyobelirteci olarak düzeyleri ölçülmektedir. Öte yandan, yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan başka aktif maddeler de tanımlanmıştır.

Bu maddelerin bazıları yangıyı körüklerken bazıları da yangıyı baskırlar (15).

Endojen kanabinoid sisteminde yer alan anandamid ve 2-AG etkilerini kanabinoid CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinden gösterirler. Lenfosit, makrofaj, nötrofil ve mast hücrelerinde CB2 reseptörü bulunmaktadır ve yangıdaki etkilerinden sorumlu tutulmaktadır. Anandamid ve 2-AG'ün akut ve kronik yangıyı azaltıcı etkileri vardır. Makrofajlardan IL-6 Th1 hücrelerinden interferon-gama ($IFN-\gamma$) ve interlökin-12 (IL-12) salgılanmasını azaltırken Th2 hücrelerinden IL-4 salgılanmasını arttırırlar. B ve T lenfosit proliferasyonunu baskırlar. Yangıda PGE_2 ve NO üretimini azaltırlar (16).

Omega-3 (ω -3) çoklu doymamış yağ asitleri (PUFAs) metabolitleri olan resolvinler, protektinler ve maresinler'in antiinflatuar etkileri vardır. Lenfosit proliferasyonunu, sitokin salgılanmasını, adezyon moleküllerinin ifadesini ve doğal öldürücü hücre aktivitesi baskırlar. Resolvinlerin çeşitli kronik inflammatuar hastalıklarda azalmış veya bozulmuş üretimleri bu maddelerin kronik yangıdaki önemine işaret etmektedir. Resolvin E1 ve E2 nötrofillerin dokuya olan göçünü azaltarak anti-inflamatuar etkinlik gösterir. Ayrıca LTB_4 uyarısını da azaltır. Protektin ailesinin ana üyesi olan Protektin1 (PD1), Th2 hücrelerinde sentezlenir. PD1, T lenfosit göçünü, tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF α) ve interferon- γ ($IFN-\gamma$) uyarısını azalttığı halde T lenfosit apoptozunu arttırır (17).

PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR (PAF)

Fosfolipid yapıda olan PAF, nötrofil, eozinofi, bazofil, monosit, endotel, mast hücreleri ve trombositlerden salgılanır. PAF etkilerini G proteinine kenetli PAF reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir. Nötrofillerin endotel adezyonunu uyarır. Monosit ve makrofajlarda IL-1B, IL-6, IL-8, TNF α gibi sitokinlerin yapımını arttırır. Trombosit agregasyonuna, vazokonstriksiyona ve bronkospazma neden olur. Düşük derişimde ise, vazodilatasyon ve permeabilite artışı yapabilir. Ayrıca kronik yangıda da rol almaktadır (18).

ANJİYOTENSİNLER

Anjiyotensinler, “Renin Anjiyotensin Sistemi”nde (RAS) sentezlenen peptidlerdir. RAS sistemik ve yerel (doku ve hücre) olarak işlemekte ve temel olarak kan basıncını, kan volümünü ve sıvı-elektrolit dengesini düzenlemektedir (19). Sistemik RAS, böbreklerden salgılanan Renin’in Anjiyotensinojen, Anjiyotensin-1 (Ang.I) sentezlemesiyle tetiklenir. Yerel doku ya da hücre RAS’larında ise sistem kendi maddeleri sentezleyebilmektedir. Ang.II, Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) aracılığıyla Ang.I’den oluşur. Ang.1 ve Ang.2’den farklı anjiyotensinler [Ang.3, Ang.4, Ang(3-7), Ang(2-10), Ang(1-9), Ang(1-7), Ang(1-12), Ang A, Alamandin] sentezlenmektedir. Anjiyotensinler ve renin; G proteinine kenetli $AT_{1,2,4}$, Mas, MrgD ve PR reseptörlerini uyararak etki gösterir. RAS aktivasyonu sonucu gözlediğimiz etkilerden baskın olarak bulunan Ang.II ve AT_1 reseptörleri sorumludur. Ang.II, AT_1 uyarısıyla vazokonstriksiyona, kan basıncında artışa ve su-tuz tutulmasına neden olur. ADE2 aracılığıyla sentezlenen Ang(1-7) ile Mas reseptör aktivasyonu ise AT_1 ’in tersi etkiler göstermektedir (20).

RAS yangıda da rol almaktadır. Makrofajlar, dentritik hücreler ve T lenfositler renin, ADE, AT_1 reseptörlerini ifade ederler. Ang.II lökositler, endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücreleri üzerinde proinflamatuvar sitokinlerin, adezyon moleküllerinin, kemokinlerin ve matris metaloproteinazların transkripsiyonunu indükleyerek proinflamatuvar etkinlik gösterir. Ang.II lenfositlerin proliferasyonunu ve göçünü lökositlerde “reaktif oksijen bileşenleri” (ROS) üretimini doğrudan uyarabilir. Ayrıca, IFN- γ artışına ve IL-4 azalmasına neden olarak Th1 fenotipine farklılaşmayı indükler (21). Ang.II, dentritik hücrelerin göçünü, olgunlaşmasını ve antijen sunma yeteneğini artırır. AT_1 uyarısı mezengial hücrelerde ve damar düz kasında oksidatif hasarı, apoptozu ve yangıyı tetikleyebilir.

AT_2 reseptörü, fetal dokularda daha yüksek oranda ifade edilir ve doğumdan sonra azalır. Ancak vasküler yaralanma iskemisi gibi stres koşullarında ifadesi

artar. AT_2 reseptörü, genel olarak AT_1 uyarısının tersi etkilere neden olur. İnsan monositlerinde AT_2 uyarısı proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak, antiinflamatuvar etkinlik göstermiştir (22).

KİNİN PEPTİDLER

Kinin peptidlerden bradikinin plazma kallikreini etkisiyle “yüksek moleküler ağırlıklı kininojen”den sentezlenirken kallidin doku kallikreini etkisiyle “düşük moleküler ağırlıklı kininojen”den sentezlenmektedir. Kinin peptidlerin Kininaz-1 ile metabolizması sonucu, aktif ürünler des-Arg-Bradikinin ve des-Arg-Kallidin açığa çıkmaktadır. Kininaz-2 (ADE) ile yıkımda ise inaktif ürünler oluşmaktadır. Kinin peptidler etkilerini G proteini kenetli B1 ve B2 reseptörleri aracılığıyla gösterirler. Bradikinin endotelden NO ve PGI_2 salgılanmasına yol açarak, arterlerde vazodilatasyona neden olur. Venlerde ise doğrudan veya $PGF_{2\alpha}$ sentezi ile kasıcı etki gösterir. Yangıda ise, bradikinin yangının beş ana bulgusunun oluşmasından sorumlu tutulmaktadır (23). Doku hasarı sonrası gelişen yangı süreçlerinin gelişiminden ve sürdürülmesinde görev almaktadır. Çok güçlü aljezik etkisinin yanında doku tamiri ve iyileşmesinde rol oynamaktadır.

P MADDESİ (SP)

SP etkilerini G proteini kenetli Nörokinin-1-2-3 (NK1, NK2, NK3) reseptörleri üzerinden gösterir. Yangıdaki etkilerinden ise, NK1 reseptörleri sorumludur. Makrofaj, eozinofil, lenfositler tarafından üretilen SP; kemoatraktandır, ayrıca IL-2 ve IFN γ sentezini artırır. Doğal öldürücü hücrelerde IFN γ salgılanmasında artışa neden olur. Mast hücrelerinde histamin salgılanması SP uyarısıyla artar. Eozinofillerde süperoksit radikalinin salgılanmasını artırır. Makrofajlardan IL-1, TNF α , IL-6 ve PGE2 salıverilmesine neden olur. Nötrofillerde degranülasyonu, kemotaksiyi ve fagositozu uyarır süperoksit radikali, IL1B ve TNF α salıverilmesini artırır (24).

ENDOTELİNLER

Endotelinlerin üç farklı tipi bulunmaktadır (ET-1-2-3) ve G proteinine kenetli ETA ve ETB reseptörleri

aracılığıyla etki gösterirler. Endotelinlerin güçlü vazokonstriktör ve proinflatuar etkinlikleri vardır. ET-1, esas olarak endotel tarafından salgılanmakla birlikte lökosit ve makrofajlarda da sentezlenebilmekte ve proinflatuar özellikler göstermektedir. ET-1 akut yangıda ilk vasküler cevap olan ani vazokonrüksiyondan sorumludur. ET-1 endotelde ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), VCAM-1(vascular cell adhesion molecule 1) ve E-selektin gibi adezyon moleküllerinin ifadesini de arttırarak yangı alanına nötrofillerin infiltrasyonunu kolaylaştırır. ET-1 süperoksit anyon üretimini ve TNF-a, IL-1 ve IL-6 gibi proinflatuar sitokinlerin salgılanmasını arttırmaktadır. Alveoler makrofajlar, lökositler ve fibroblastlarda yüksek düzeyde sentezlenen ET-1'in sepsiste, viral ve bakteriyel pnömonide rol oynadığı düşünülmektedir (25).

NATRIÜRETİK PEPTİTLER (NP)

NP; atriyal natriüretik peptit (ANP), B (beyin) tipi natriüretik peptit (BNP), C tipi natriüretik peptid (CNP), Ürodilatin, Guanilin, Üroguanilin olmak üzere farklı izoforma sahip peptitlerdir. NP'in ana işlevi, renal sodyum atılımını arttırarak, ekstrasellüler sıvı hacmini azaltmaktır. NP'nin NPR-A, NPR-B ve NPR-C reseptörleri katalitik aktivite gösteren reseptör grubundan olup, guanilaz siklaz aktivitesine sahiptir. ANP'nin polimorfonükleer nötrofillerdeki süperoksit radikal üretimini, LTB4 sentezini ve CD11 (cluster of differentiation-11) ifadesini arttırdığı gösterilmiştir. Makrofaj fagositozunun uyarılması ve ROS üretimi ile proinflatuar etki gösterirken makrofajlarda lipopolisakkarit ile uyarılmış NO, TNF α ve IL-1 salıverilmesini inhibe ederek, antiinflatuar etki de gösterir. E-selektin, ICAM ve VCAM gibi adezyon moleküllerinin ve kemotaktik proteinlerin ifadelerini azaltır (26). BNP nötrofillerde ROS oluşumunun baskılayarak, antiinflatuar etki gösterir. BNP, LPS ile indüklenen IL-6 ve TNF α 'nın ifadesini azaltırken; IL-10'un ifadesini arttırmaktadır. BNP, sepsis ve septik şoklu hastalarda mortalite artışı ile de ilişkilendirilmiştir. Kan BNP düzeyleri ayrıca kardiyovasküler hastalıklarda biyobelirteç olarak

kullanılmaktadır. CNP'nin insan endotel hücrelerinde IFN γ kaynaklı proinflatuar gen ifadesini azalttığı, vasküler inflamasyonu engellediği gösterilmiştir (27).

HİSTAMİN

Histamin L-histidin'den "histidin dekarboksilaz" enzimi aracılığıyla sentezlenir. Histamin mast hücreleri, bazofiller, epidermis, bazı nöronlar ve midede enterokromafine benzeyen hücrelerde yüksek miktarda bulunur. Travma, ısı, IgE aracılı immün reaksiyonlar, anafilatoksinler, SP, IL-1 ve IL-8; histamin salgılanmasını uyarabilirler. Histamin etkilerini, G proteini kenetli dört reseptörü (H1,2,3,4) üzerinden gösterir. H1 reseptör uyarısı damar geçirgenliğini, NO ve prostasiklin sentezini arttırır. H1 ayrıca sitokinlerin üretimini düzenlenmesine, Th1 lenfositlerinin aktivasyonuna ve humoral bağışıklığın azalmasına yol açmaktadır. H2, H1'in aracılık ettiği bazı etkileri antagonize eder. Nötrofil ve bazofil kemotaksisini ve aktivasyonunu azaltır ve nötrofillerde lökotrien sentezinin inhibisyonuna neden olur. Dentritik hücrelerde ve monositlerde H2 aktivasyonu, IL-10 sentezinin artışına IL-12 ve TNF α sentezinin inhibisyonuna yol açar. H4 reseptörleri aktivasyonu, mast hücrelerinin ve eozinofillerin kemotaksisine neden olur. H4 dentritik hücreler ve T lenfositlerde IL-6, TNF α , TGF β , IL-8 sekresyonunu ve adezyon moleküllerinin (P-Selectin, E-Selectin, ICAM-1) ifadesini arttırır (28).

SEROTONİN

Serotonin, L-triptofandan sentezlenir ve 5-hidroksitriptamin (5-HT) olarak da bilinir. Vücutta gastrointestinal sistemdeki enterokromafin hücrelerde (%95), beyinde ve trombositlerde yüksek miktarda bulunur. Serotonin, yedi grup reseptörlere (5-HT₁₋₇) sahiptir. Bunlardan 5-HT₃ iyon kanalı, diğerleri G proteinine kenetli reseptörlerdir. Trombositler aktive olduklarında, yangı alanına depoladıkları serotoninini salgırlarlar. Nötrofillerde 5-HT_{1A, 1B, 2} reseptörleri bulunur, ancak serotoninin nötrofillerin ROS salıvermesi, dokuya göçü ve fagositoz yeteneği üzerine olan etkileriyle ilgili olarak, çelişkili sonuçlar

vardır (29). Serotonin makrofajlarda bulunan 5-HT_{1A},
1E, 2A, 3A, 4, 7 reseptörleri aracılığıyla, düşük IFN γ
düzeylerinde fagositozu artırırken, yüksek IFN γ
düzeylerinde fagositozu ve TNF α salgılanmasını inhibe
etmektedir. T hücrelerinde bulunan 5-HT_{1A}, 1B, 2A, 2C, 3A, 7
reseptörleri aktivasyonu, bu hücrelerin sağkalımını ve
aktivasyonunu arttırmaktadır (30).

SİTOKİNLER

Sitokinler, başta bağışıklık hücreleri olmak üzere
birçok hücre tarafından salgılanabilen, protein yapıda
maddelerdir. Fizyolojik ve patolojik durumlarda
önemli roller üstlenen sitokinler; otokrin, parakrin,
endokrin etki gösterebilirler. Sitokinler İnterferon
(IFN), İnterlökin (IL), Kemokin, Tümör nekrozis faktör
(TNF), Transforming growt faktör (TGF) ailelerini ve
hematopoetinleri kapsamaktadır (31). **IFN ailesi:**
IFN α 1, 2, 4-8, 10, 14, 16, 17, 21; IFN β ; IFN γ ; IFN κ ;
IFN λ 1-3; IFN ω . **IL ailesi:** IL-1 α , β ; 2-7; 9-11; 12A, B;
13; 15; 17A, B, C, F; 18-25; 27; 31; 33; 34; 36 α , β , γ ; 37.
Kemokin ailesi: CCL-1-5, 7-9, 11-28; CX3CL; CXCL-1-
11, 12 α , β , γ , δ , ϵ , φ ; 13-17; XCL-1-2. **TNFailesi:**
4-1BB ligand, APRIL, BAFF, CD30 ligand, CD40 ligand,
CD70, Ectodysplasin A1, Fas ligand, LIGHT, TNFSF1/
lymphotoxin- α /TNFB, TNFSF3/lymphotoxin- β ,
lymphotoxin B2 α 1 heterotrimer, OX-40 ligand, RANK
ligand, TL6, TL1A, TRAIL, TNF membrane form/TNF α ,
TNF shed form, TWEAK. **TGF ailesi:** TGF α , B1, B2,
B3. **Hematopoetinler:** eritropoetin, granülosit koloni
stimüe edici faktör (G-CSF), granülosit-makrofaj
koloni stimüe edici faktör (GM-CSF), makrofaj koloni
stimüe edici faktör (M-CSF) (32).

Hem akut, hem de kronik yangı süreçlerinde
sitokinler önemli etkiler gösterirler. Sitokinler,
yangının tüm aşamalarında ve çeşitlerinde, “yangıyı
körükleyen” (**pro-inflamatuar:** IFN α , IFN β , IFN γ ,
IFN ω , IFN κ , IFN γ , IFN λ 1-3, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-11,
IL-17A-F, IL-18, IL-25, IL-31, IL-33, IL-36 α , IL-36 β ,
IL-36 γ , IL-37, TNF α , TNFB, BAFF, APRIL) ve “yangıyı
söndüren” (**anti-inflamatuar:** IL-10, IL-12, IL-19, IL-
20, IL-22, IL-23, IL-24, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-
35) işlevler üstlenebilirler (33).

YANGIYA KATILAN HÜCRELER

Endotel Hücreleri: Hem fizyolojik hem de
patolojik durumlarda, damar tonusunu (kan akımı,
kan basıncı) ve geçirgenliğini, anjiyogenezi, hücre
proliferasyonunu, trombosit agregasyonunu, kan
pıhtılaşmasını ve fibrin parçalanmasını düzenlerler.
Kapladıkları alan ve salgıladıkları aktif maddeler göz
önüne alındığında, bu hücreler vücudun en büyük
parakrin, otokrin ve endokrin salgı bezi konumundadır.
Endotel hücreleri yangıda, salgıladıkları aktif
maddelerle (NO, H₂S, PGI₂, PGE₂, PAF, 15-HETE, 13-
HODE, Ang.2, Endotelinler, CNP, Histamin, IL-1-6-
8-11, G-CSF, GM-CSF, Eritropoetin, Netrin-1, TDGF,
E-LAM-1, ICAM-1, ICAD-2, VCAD, Ürokinaz, Protein-C,
Fibrinolektin, Heparin, Trombospondin, Antitrombin-
III, A-2 Makroglobulin, F-9 Bağlayıcı Protein, F-5,8
Aktivatörü, Plazminojen Aktivatör, Pazminojen
Aktivatör İnhibitörü, Tromboplastin Doku Faktörü,
Monosit Prokoagülan İnhibitörü) lökosit, trombosit ve
damar düz kasi işlevlerini kontrol ederler (34).

Trombositler: Yangıda hızla bölgeye göç
ederek, trombosit-lökosit agregatları oluşturup,
nötrofil degranülasyonunu ve fagositozunu
arttırırlar (35). Aktive trombositler; IgG opsonize
bakterilere bağlandığında ROS, antimikrobiyal
peptitler, defensinler, kinosidinler ve proteazları
serbestleştirerek; bakterileri doğrudan öldürebilirler.
Trombosit faktörü 4, NO, H₂S, CO, PGE₂, TxA₂, Lipoksin
A₄, Lipoksin B₄, PAF, histamin, serotonin, PDGF,
çözünür-CD40L, koagülasyon proteinleri gibi; birçok
proinflamatuvar ve koagülan maddeler salgırlar.

Dentritik Hücreler: Tüm vücut yüzeylerinde,
dokularda ve kanda bulunan dentritik hücrelerin,
epidermiste bulunan tipine “Langerhans hücreleri”
denir. Patojen antijenlerini tarayan dentritik
hücreler, antijene temas ettiklerinde, yüzeylerinde
bulunan “Toll like” reseptörler (TLR) aktive olur ve
MHC-II (major histocompatibility complex-class-II)
reseptör sayısını artırarak olgun dentritik hücrelere
dönüşürler. Lenf düğümüne göç ederek tanıdığı
patojen antijenini MHC-II reseptörleri aracılığı ile
T lenfositlere tanıtarak ve salgılatıkları sitokinlerle

(IFN α , IFN β , TNF, IL-6, IL-12) bağışıklık cevabını başlatırlar (36).

Makrofajlar: Bu hücrelerin, doku makrofajları ve kandan göç eden monositlerin farklılaşmasıyla oluşan makrofajlar olmak üzere, iki çeşidi bulunmaktadır. Doku makrofajları buldukları dokuya göre adlandırılırlar; karaciğerde Kupffer hücreleri, akciğerde histiyositler, sinir sisteminde mikrogialar, kemikte osteoklastlar, dalak ve lenf düğümlerinde sinus histiyositleri, böbrekte mezengial hücreler, retina pigment epitel gibi. Makrofajlar akut yangıda, doku hasarını algırlar ve yangıyı körükleyen M1 fenotipine dönüşerek, proinflamatuvar sitokinleri salgırlar. Kronik yangıda ise yangıyı söndüren M2 tipine dönüşerek, salgıladıkları sitokinlerle sürece yön verirler (37). Makrofaj kaynaklı birçok madde ortaya konmuştur: NO, H₂S, CO, PGE₂, TxA₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄, PAF, ANP, IL-1-6-8-10-12-17-23, TNF α , TNF β , CCL1-17-22-24, GM-CSF, Arginaz, Prolin poliaminaz.

Nötrofiller: Temel olarak akut yangıda görev alan nötrofiller, yangı tetiklendiğinde dakikalar içinde yangı bölgesine ulaşırlar ve patojenleri hücre içine alarak ya da hücre dışında öldürebilirler. Nötrofiller uyarıldıklarında birçok aktif madde salgırlar (NO, PGE₂, TXA₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄, PAF, IL1-6-8-12, IFN α , TNF α , CCL2-3-4-5). Nötrofillerin akut yangıdaki rollerine ek olarak, yangı iyileşmesi ve kronik yangıda da önemli görevleri vardır (38). Bir rezolüsyon mediatörü olan lipoksinlerin sentezini trombositler, nötrofilden aldığı LTA₄'ü 12-LOX enzimiyle lipoksine dönüştürerek gerçekleştirirler.

Eozinofiller: Alerjik reaksiyonlarda IgE aracılı immunitede ve paraziter infeksiyonlara karşı savunmada görev alırlar (39). Eozinofiller yangının akut fazında rol alırlar ve yangı bölgesinde nötrofilden iki üç gün sonra görülürler. IL-5 eozinofiller için kemotaktiktir. Aktive eozinofiller yangıda "major basic protein" (MBP), "eosinophil cationic protein" (ECP), "eosinophil peroxidase" (EPX), "eosinophil-derived neurotoxin" (EDN), IL-2-4-5-6-13, TNF α , CCL5, GM-CSF, H₂S, PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} , TXA₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄, PAF gibi; birçok aktif madde salgırlar.

Bazofiller: Bazofiller, ani tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında ve helmantik infeksiyonlara karşı immün cevapta önemli rol oynarlar. Bazofil granülleri, heparin ve histamin içerir. Bazofil aktivasyonu, IgE spesifik antijenle, lektinlerle, parazitik ve viral antijenlerle tetiklenebilir. Aktivasyonla bir çok aktif madde salgırlar (Histamin, heparin, IL-3-4-13-31, LTC₄, LTD₄, LTE₄, PAF, CCL5, VEGF, eozinofil kemotaktik faktör) (40).

Mast Hücreleri: Kemik iliğinde üretilen mast hücreleri gelişimlerini görev aldıkları dokuda tamamlarlar. Mast hücreleri birçok aktif madde salgırlar (NO, PGD₂, PGE₂, Tx_{A2}, LTD₄, histamin, heparin, IL-3-4-5-6, TNF α , FGF, VEGF, triptaz, kimaz). IL-4, B ve sitotoksik T lenfosit proliferasyonunu uyarır, MHC-II ifadesini ve IgG ve IgE üretimini artırır. FGF hücre proliferasyonu, migrasyonu, anjiyogenez ve yara iyileşmesinde rol oynar. VEGF ise anjiyogenez uyarır, yara iyileşmesi ve hematopoez gibi fizyolojik işlevlerde görev alır (41).

Lenfositler:

T-lenfositler: Timusta olgunlaşmalarının ardından, lenf bezlerinde ve dalakta depolanırlar. Yüzey reseptörleri (TCR), MHC ile etkileşerek, onların sunduğu antijenleri tanırlar ve böylece viral enfeksiyon ya da kanser gibi durumlarda hücre yüzeyi konfigürasyon değişimleri olan hücrelerde, salgıladıkları birçok sitokin ve enzimlerle (IL-2-3-4-5-7-9-10-13-17-21-22-25-26, IFN γ , TNF, TGF β , NO, PGE₂, GM-CSF) kalıcı hasara neden olurlar. T lenfositler; saf CD4⁺ (T_{helper}: Th), bellek CD4⁺, saf CD8⁺ (sitotoksik), bellek CD8⁺, Gamma delta, Mukozayla ilişkili değişmez (Mucosal associated invariant) ve Düzenleyici T lenfositler; olarak sınıflandırılmıştır. CD4⁺ T lenfositlerin Th1, 2, 9, 17, 22, T_{FH} ve Treg alt tipleri de tanımlanmıştır (42). CD4⁺ T lenfositler, antijen sunan hücre yüzeyindeki MHC-II'ye; CD8⁺ T lenfositler ise, tüm çekirdekli hücre yüzeylerindeki MHC-I'e bağlanırlar.

B-lenfositler: Bağırsağın Peyer plaklarında bulunan GALT'da ve kemik iliğinde olgunlaşırlar. Olgunlaşmış formları, lenf bezlerinin kortikal folliküllerine ve dalakta beyaz pulpaya yerleşirler.

Antijen spesifik B lenfositler; Dendritik hücreler ile CD4+ T lenfositler arasındaki yabancı antijene karşı gelişen ortak etkileşimler sonucu; B lenfositlerden farklılaşırlar ve immünooglobulin üreten plazma hücrelerine dönüşürler (43). B lenfositlerin kanda “saf B hücreleri” ve “bellek B hücreleri” olmak üzere iki tipi bulunabilir ve önemli maddeler salgırlarlar (Ig, IL-1, TGFB, PGE₂).

Doğal Öldürücü Hücreler (NK hücreler: natural killer cell): Virüs ile enfekte olan hücreleri ve kanser hücrelerini, önceden duyarlanmadan öldürebilirler. Zarlarında bulunan KAR (killing activation receptor) ve KIR (killing inhibition receptor) reseptörleriyle sitotoksik etkileri düzenlenmektedir. Aktive oldukları zaman birçok sitokin salgırlarlar (IL-1-3-5-8-10-13, IFN γ , TNF α , GM-CSF, CCL-1-2-3-4-5, CXCL8) (44).

YANGI SÜREÇLERİNDE OTAKOİDLER

Yangı; katılan hücreler, salgılanan otakoidler ve süreç dikkate alındığında, akut ve kronik yangı olarak iki farklı tipe ayrılmaktadır. Akut ve kronik yangı farklı nedenlerle ortaya çıkan ve organizmanın farklı yollardan sonuçlandırabildiği iki farklı mekanizma olarak çalışmaktadır (Tablo-1).

AKUT YANGI

Akut yangı, infeksiyonlar, travma, zararlı fiziksel ve kimyasal etkenlerle tetiklenen ve hasar kaynağını yok etmek için, ortaya konan kısa süreli (dakikalar-günler) bağışıklık sürecidir (45). Akut yangı birbirini izleyen üç süreci kapsamaktadır: etkenin tanınması, etkene cevap verilmesi ve yangının iyileşmesi (rezolüsyon).

A-Etkenin Tanınması: Akut yangı, doku hasarının veya yabancı/zararlı etkenin doku makrofajları veya dendritik hücreler tarafından tanınmasıyla tetiklenmektedir. Bu hücreler, “Desen Tanıma Reseptörleri”nin (pattern recognition receptors: PRR) etken tarafından uyarılmasıyla aktive olurlar. PRR: “Toll like” (TLR: TLR1-11), NOD like” (NLR: NOD1-2, NLRC3-5, NLRX1, CIITA, NLRP1-14) ve “RIG-I like” (RLR: RIG-1, MDA5, LGP2) reseptör ailelerinden oluşmaktadır ve yangıya katılan öteki hücrelerde de ifade edilmektedir (46). PRR, etkende bulunan DAMP (damage associated molecular patterns) ve PAMP (pathogen associated molecular pattern) tarafından uyarılmaktadır. DAMP; hücre hasarını gösteren DNA yıkım ürünü ürik asit, hasarlı mitokondriden salınan ATP, Na⁺-K⁺ pompası işlev bozukluğu nedeniyle azalmış hücre içi potasyum, sitoplazmik DNA olabilir.

Tablo 1. Akut ve Kronik Yangının Genel Özellikleri

ÖZELLİK	AKUT YANGI	KRONİK YANGI
SÜRE	Kısa (saatler, günler)	Uzun (haftalar, aylar, yıllar)
ETKEN	Doku hasarı, vücuda giren patojenler	Patojenin etkisizleştirilememesi, otoimmünite, tekrarlayan akut yangı
ETKENE ÖZGÜLÜK	Etkene özgü olmayan genel bir cevap	Etkene özgü ve seçici bir cevap
DAMAR CEVAPLARI	Vazodilatasyon, geçirgenlik artışı	Yeni damar oluşumu
DOKU CEVAPLARI	Ödem, kızarıklık	Fibrosis, nekroz
HÜCRELER	Baskın olarak nötrofil ve makrofajlar	Baskın olarak lenfosit ve makrofajlar
GÖREV ALAN BAŞLICA OTAKOİDLER	Histamin, serotonin, bradykinin, arakidonik asid metabolitleri, kemokinler, NO, IL-1-6-8-11-16-17-18, TNF α , eotaxin, GM-CSF, G-CSF	IL-2-3-4-5-7-9-10-12-13-14-15, IFN'lar, TGFB

PAMP: Patojenler tarafından ifade edilen, moleküler desenlerdir (bakteri lipoproteinleri, flajellum, dsRNA, ssRNA, DNA). Hasarlı/yabancı/zararlı etkenin doku makrofajları ve dentritik hücreler tarafından tanınması ve aktivasyonlarıyla, çevreye yangı uyarısı verilir (yangın varrr!) (45).

B-Etkene Cevap Verilmesi: Damar, doku ve bağışıklık hücrelerinin eşgüdümlü bütüncül cevabından oluşur. İlk olarak endotelinlerin aracılık ettiği ani vazokonstriksiyon gözlenir. Ardından temel olarak histamin, NO, PGE₂ ve PGI₂'nin neden olduğu "aktif hiperemi"ye yol açan, vazodilatasyon ortaya çıkar. Daha sonra damar geçirgenliği artar ve dokuya proteinden zengin sıvı geçişiyle ödem oluşur. Histamin, serotonin, bradikinin, lökotrienler ve SP; damar geçirgenliğinin artışıyla sorumludur.

Kandan lökositler çağrılarak (kemotaksi) yangı bölgesine toplanmalarını sağlayan başlıca kemotaktik ajanlar kemokinlerdir. Monositler, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, doğal öldürücü hücreler, mast hücreleri, lenfositler ve trombositler damardan dokuya geçebilirler. Hücrelerin damardan dokuya göçü, hücreler arasındaki bir dizi etkileşimle oluşmaktadır. Lökositlerde ve endotelde yangı uyarısı nedeniyle artan adezyon molekülleri (E-selektin, P-selektin, L-selektin, CD34, Sialyl Lewis X proteini, ICAM-1, ICAM-2, iC3b, fibrinojen, fibronektin, LFA-1, VLA-4, CD31, Mac1) (47); hücrelerin birbirine tutunmasını sağlar. Lökositler kemotaktik maddelerin derişimini izleyerek, hasar bölgesine ulaşırlar.

Akut yangıda nötrofiller 6-24 saatte yangı bölgesinde toplanırlar ve 48-72 saat sonra yangı bölgesinde nötrofil görülmez. Daha sonra (24-48 saat) kandan göçen monositlerin farklılaşmasıyla oluşan makrofajlar yangı bölgesinde yer alırlar. Makrofajlar ve nötrofiller yangı alanındaki hasarlı/yabancı/zararlı etkeni, fagositoz ile etkisizleştirirler. Fagosite edilen etken, NADPH oksidaz enzimi aracılığıyla sentezlenen "süper oksit radikali" ve başka tepkimelerle oluşan ROS ile etkisizleştirilir. Ek olarak, salgılanan NO ile "süper oksit radikali" tepkimesinden açığa çıkan RNS de katkıda bulunur. Ayrıca, BPI (bakteriyel

geçirgenlik arttırıcı protein), lizozim, MBP (major basic protein), defensin gibi bazı lizozomal maddeler, oksidatif olaylar olmaksızın etki edebilmektedir. Lizozomlarda etkeni parçalayan peptidaz, proteaz, asit ribonükleaz, asit deoksiribonükleaz, asit hidrolaz, fosfataz, galaktosidaz, glukosidaz, hyaluronidaz, fosfolipaz, lipaz ve amilaz gibi birçok atık parçalayıcı enzim de bulunmaktadır. Dokuda tetiklenen proteaz aktivasyonu ve antiproteaz inaktivasyonu ile ekstraselüler matriks de azalabilir (48).

C-Yangının İyileşmesi (rezolüsyonu): Akut yangı tepkisi aktif bir şekilde sonlandırılarak, hasar gelişimi durdurulur ve doku tamiri gerçekleştirilir. Bu çok iyi yönetilen aktif bir süreçtir ve bileşenlerindeki eksiklik, aşırılık ya da düzensizlik; kronik yangıya yol açabilir. Yangının iyileşmesi için; nötrofil doku infiltrasyonunun sonlanması; sitokinlerin sentez ve salgılanmasının düzenlenmesi; dokudaki nötrofillerde apoptozun indüklenmesi; makrofajların proinflamatuvar M1 fonotipinden, antiinflamatuvar M2'ye dönüşmesi; apoptotik olmayan bağışıklık hücrelerinin kan damarlarına veya lenfatiklere geri dönmesi; doku tamirinin başlaması; gerekir. Yangı iyileşmesine aracılık eden çeşitli otakoid maddeler (lipoksinler, resolvinler, protektinler, maresinler, nöroprotektin D1, Annexin-1, Netrin-1, Chemerin15, H₂S, CO ve adenosin) tanımlanmıştır (49).

Ek olarak, Vagus siniri, antiinflamatuvar refleks olarak bilinen nöronal devrenin bir parçasıdır. Efferent yol; dalağın beyaz pulpasında T hücresi alt kümesine bitişik olan sinaps benzeri yapılarda sonlanan; adrenerjik splenik nöronları aktive etmektedir. Uyarıyla salgılanan noradrenalin, T hücrelerindeki alfa-2 reseptörleri uyararak, asetilkolin sentezini indükler ve salıverilen asetilkolin de makrofajlardaki nikotinik reseptörlere bağlanarak, hem Netrin-1 hem de lipid rezolüsyon mediyatörlerinin salgılanmasını düzenler (50).

Yangı iyileşmesine lenfanjiyogenezde eşlik eder ve böylece sıvı ve makromolekül drenajı, immün hücre modülasyonu ve yenilenme gerçekleşir. Düzensiz lenfanjiyogenez, yangı iyileşmesinde bozukluklara yol açmaktadır (51).

KRONİK YANGI

Kronik yangı, konağın bağışıklık cevabına ve etkene göre süresi (haftalar, aylar, yıllar) farklı olabilen bir süreçtir. Akut yangıyı izleyebileceği gibi, akut yangı olmadan da ortaya çıkabilir. Konağa direnç gösteren enfeksiyöz ajanlar (*Mycobacterium tuberculosis*, protozoa, mantarlar ve parazitler) vücutta yok edilemeyen ve uzun süre maruz kalınan yabancı maddeler (silika tozu) ya da organizmanın kendi moleküllerine karşı duyarlı hale geldiği otoimmün hastalıklar (romatoid artrit, lupus eritematozus); kronik yangıya neden olabilirler (52).

Kronik yangıda hem M1 hem de M2 makrofajlar rol alırlar ve salgıladıkları sitokinler, büyüme faktörleri, enzimler, ROS ve RNS ile sürece yön verirler (53). Kronik yangının patogeneğinde, aktive makrofaj ile T lenfositler arasındaki birbirini pekiştiren döngü, rol oynamaktadır. Aktive B lenfositler, plazma hücreleri, eozinofiller ve mast hücreleri de kronik yangıda görev alırlar.

YANGI TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLAR

Kortikosteroidler: Güçlü antiinflamatuvar ve immüsupresör etkilerini, hücre çekirdeğindeki reseptörleri üzerinden gerçekleştirirler. Yangıda indüklenen COX-2, iNOS, sitokinler ve adhezyon moleküllerinin ifadesini engellerler. Kortikosteroidlerle indüklenen antiinflamatuvar Anneksin-1 (lipokortin) PLA₂ enzimini inhibe ederek, arakidonik asit metabolitlerinin üretimini sınırlar. Kortikosteroidler yangı iyileşmesini de hızlandırır. Tedavide kullanılan kortikosteroidlerin antiinflamatuvar ve immüsupresan güçleri farklıdır ve uzun süreli kullanımları çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır (54).

COX Yolağı Baskılayıcıları (Non Steroidal Anti İnflamatuvar İlaçlar: NSAID): Antiinflamatuvar, antipiretik, analjezik etkili bu ilaçların, COX-1 ve COX-2 seçiciliği görecelidir; ancak yangı ile indüklenen COX-2 inhibisyonunun asıl etkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, bu ilaçların COX inhibisyonu dışında, yangı süreçleri üzerine başkaca

etkileri de tanımlanmıştır (55). Yangıda önemli roller üstlenen, mikrozomal PGE sentaz-1, indüklenebilen bir enzim olarak, umut veren bir antiinflamatuvar ilaç hedefi gibi görünmektedir (56).

5-LOX Yolağı Baskılayıcıları: 5-LOX inhibitörleri: Lökotrienlerin üretiminden sorumlu olan bu enzimin inhibitörleri, lökotrienlerin aşırı üretildiği astmanın kronik tedavisinde kullanılmaktadırlar (57). **sisLT1 reseptör antagonistleri:** Bu ilaçlar, astmanın kronik tedavisinde, hareketle oluşan bronkokonstriksiyonda ve alerjik rinitte kullanılmaktadır (58).

Histamin Reseptör Antagonistleri ve Sentez İnhibitörleri: H1 reseptör antagonistleri alerjik hastalıklar (rinit, ürtiker, konjunktivit), hareket hastalığı, Menier hastalığı, vertigo ve emeziste; histidin dekarboksilaz inhibitörleri mevsimsel alerji profilaksisinde kullanılmaktadır (59). H₄ reseptör antagonistlerinin akciğer, deri, gastrintestinal sistem yangılarında kullanımı araştırılmaktadır (60).

Bağışıklığı Baskılayıcı İlaçlar: kronik yangının sağaltılması ve atak sayısının azaltılmasında kullanılmaktadır (55).

Küçük Molekül İlaçlar: metotreksat, leflunomide, klorokin, hidroksiklorokin, minosiklin, sulfasalazin, azatiyopürin, siklosporin, siklofosamid, penisilamin, auranofin, azatiyopürin ve mikofenolat mofetil.

Biyolojikler (antikorlar): Kullanılan monoklonal antikörlerin [-mab: monoklonal antikor (mAb), -umab: insan mAb, -zumab: humanize mAb, -ximab: kimerik (insan+fare) mAb, -omab: fare mAb, -cept: insan IgG1'in Fc parçasıyla birleşebilen soluble reseptör proteini] pek çok çeşidi bulunmaktadır. B lenfosit inhibitörleri (rituksimab, belimumab), T lenfosit inhibitörleri (abatacept) ve janus kinaz inhibitörü (tofacitinib) antikörlerinin yanında; sitokinlerin kendisine ya da reseptörlerine karşı üretilen antagonist antikörler de geliştirilmiştir. İlaç olarak ruhsatlandırılan TNF (adalimumab, golimumab, etanercept, infliximab, certolizumab), IL-1R (anakinra, rilonacept), IL-1B (canakinumab), IL-2 (basiliximab, daclizumab), IL-4R (dupilumab), IL-5 (mepolizumab, reslizumab), IL-5R (benralizumab),

IL-6R (tocilizumab, satralizumab, sarilumab), IL-6 (siltuximab), IL-12B (ustekinumab), IL-17A (secukinumab, ixekizumab), IL-17RA (brodalumab), IL-23A (guselkumab, risankizumab, tildrakizumab) antikoru; immün hastalıklarda, transplant rejeksiyon inhibisyonunda ve bazı kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır.

mTOR inhibitörleri (Rapamisin analogları): Sirolimus, temsirolimus ve everolimus posttransplant immünsüpresyonda ve koroner arter stentlerinde fibrotik büyümeyi önlemek amacıyla kullanılmaktadır (61).

Bağışıklığı Düzenleyici İlaçlar:

Bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri (immune checkpoint inhibitors): T lenfositlerin aktivasyonunu sınırlandıran, reseptör ve ligandların ortaya konması; kanser hücrelerini tanıması ve ortadan kaldırmasını sağlayan etkili monoklonal antikoru geliştirilmesini sağlamıştır. İpilimumab ve tremelimumab CTLA-4'ün (Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4) antijen sunan hücreler üzerindeki B7 ligandları ile etkileşimini bloke ederek, T hücresi aktivasyonunu artırmaktadır. T hücre yüzeyindeki "Programlı Hücre Ölümü-1" (Programmed Cell Death 1: PD-1), kanser hücresince sunulan PD-L1 ve PD-L2 ile bağlanması; T hücre aktivasyonunu inhibe etmektedir. PD-1 ile ligandlarının etkileşimini engelleyen Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolimumab, Durvalumab, Cemiplimab ve Avelumab; çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca anti-PD-1 ve anti-CTLA4 antikoru birlikte de uygulanabilmektedir (62).

CAR-T hücreleri: İzole edilip invitro "Chimeric antigen receptors" (CARs) taşıyacak şekilde genetiği değiştirilmiş CAR-T hücreleri; kanser tedavisinde kullanılmaktadır.

Rekombinant-sentetik sitokinler: Rekombinant IL-2 kanser tedavisinde; rekombinant IFN- α ve IFN- γ viral infeksiyonlarda; IFN α 1 ve IFN β otoimmün hastalıklarda kullanılmaktadır. Rekombinant GM-CSF kemik iliği naklinde, kanser tedavisi sırasında, aplastik anemide ve çeşitli nötropenilerde;

miyelopoezi uyarmak amacıyla kullanılmaktadır. Rekombinant G-CSF ise, kök hücre nakillerinde ve kanser kemoterapisi sırasında gelişen nötropeni tedavisinde kullanılmaktadır (61). Rekombinat insan eritropoietinleri olan epoetin alfa, darbepoietin alfa ve reseptörleri üzerine agonist etkili peptidlerden (peginesatide ve cibinetide) anemide, sarkoidozda ve bazı yara tedavilerinde yararlanılmaktadır (63, 64).

OTAKOİDLERLE İLİŞKİLİ YENİ TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

iNOS inhibitörleri: Deneysel olarak kullanılan arginin analogları seçici olmadığından, ağır yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Yangıda görev alan iNOS'a ve sinir doku dejenerasyonlarında rol oynayan nNOS'a seçici inhibitörlerin geliştirilmesi çalışmaları sürmektedir. Preklinik çalışmalarda, iNOS seçici inhibitörlerin bazı inflamatuvar hastalıklarda ve kanserde etkili olabileceğine dair, bulgular ortaya konmuştur (65).

NO Vericileri ve NO-NSAID: Bir grup NSAİ ilaca NO açığa çıkaran bir molekül bağlanmasıyla sentezlenen NO-NSAİ'lerle (NO-asetil-salisilik asit, flurbiprofen, naproksen, ibuprofen...) yapılan hayvan çalışmaları, azalmış yan etki profili ve artmış antiinflamatuvar etkinliği, ortaya koymuştur (66).

H₂S Vericileri ve H₂S-NSAID: H₂S vericileri ve sentez inhibitörleriyle ilgili çalışmalar sürmektedir (67). H₂S-NSAİ ilaçların yangıda artan etkinlikleri ve daha az yan etkileri olabileceği, klinik öncesi deneylerde ortaya konmuştur. H₂S-Naproksen ise, kanserde umut vermektedir.

PAF Antagonistleri: Çeşitli PAF reseptör antagonistlerinin yangıda etkili olduğu preklinik çalışmalarda bildirilmiştir. Rupaadin (alerjide), Apafant (oküler yangıda), leksipafant (akut pankreatitte) ve LAU-0901 (oküler inflamasyon ve immede) denenmektedir (68).

RAS inhibitörleri: ADE inhibitörleri ve AT₁ reseptör antagonistlerinin yangıyı baskıladığına dair çeşitli bulgular ortaya konmuştur (69).

Endotelin Reseptör Antagonistleri: Pulmoner hipertansiyon tedavisinde kullanılan bu ilaçların kanserde, kalp yetmezliğinde, iskemi-reperfüzyon

hasarında ve LPS ile indüklenen ateşte etkinliği; denenmektedir (70).

Serotonin Reseptör Antagonistleri ve Agonistleri: 5HT_{2A} reseptörlerinin blokajı inflamasyonu azaltmaktadır (71). 5-HT₃ reseptör antagonistleri, sinir dokuda yangıyı baskılamaktadır (72). 5-HT₇ reseptör agonistlerinin ise, antiinflamatuvar, antifibrinolitik ve

antisitokin özellikleri tanımlanmıştır (73).

PDE İnhibitörleri: PDE'lar cAMP ve cGMP'yi parçalayan, 11 enzim ailesinden oluşmaktadır. PDE1 (74); PDE3 ve PDE4 (75, 76); PDE5 (77) inhibitörlerinin çeşitli yangı modellerinde ve hastalıklarda; preklinik ve klinik faz çalışmaları yapılmaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Keppel Hesselink JM. The terms 'autacoid', 'hormone' and 'chalone' and how they have shifted with time. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2015;35(4):51-8.
2. Cooke JP. Inflammation and Its Role in Regeneration and Repair. *Circ Res*, 2019;124(8):1166-8.
3. Derici MK, Demirel-Yılmaz E. The effects of nitric oxide on cancer development and metastasis. *Türk Hij ve Deneysel Biyol Derg*, 2017;74:161-74.
4. Porrini C, Ramarao N, Tran S-L. Dr. NO and Mr. Toxic - the versatile role of nitric oxide. *Biol Chem*, 2020;401(5):547-72.
5. Özcan G, Şahin EA, Demirel Yılmaz E. Effect of Nitric oxide on cardiac function: Review. *Türkiye Klin Cardiovasc Sci*, 2016;28(3):99-117.
6. Nomenoglu T, Demirel-Yılmaz E. Gas Mediators in the Nervous System: Nitric Oxide, Hydrogen Sulfide and Carbon Monoxide. *Türkiye Klin J Neurol*, 2017;12(3):71-88.
7. Anavi S, Tirosh O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free Radic Biol Med*, 2020;146:16-35.
8. Citi V, Martelli A, Brancaleone V. Anti-inflammatory and antiviral roles of hydrogen sulfide: Rationale for considering H(2) S donors in COVID-19 therapy. *Br J Pharmacol*, 2020;177(21):4931-41.
9. Campbell NK, Fitzgerald HK, Dunne A. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1. *Nat Rev Immunol*, 2021;21(7):411-25.
10. Esser-von Bieren J. Eicosanoids in tissue repair. *Immunol Cell Biol*, 2019;97(3):279-88.
11. Tsuge K, Inazumi T, Shimamoto A, Sugimoto Y. Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases. *Int Immunol*, 2019;31(9):597-606.
12. Miyata J, Fukunaga K, Kawashima Y, Ohara O, Arita M. Cysteinyl leukotriene metabolism of human eosinophils in allergic disease. *Allergol Int*, 2020;69(1):28-34.
13. Chiang N, Serhan CN. Specialized pro-resolving mediator network: an update on production and actions. *Essays Biochem*, 2020;64(3):443-62.

14. Pace-Asciak CR. Pathophysiology of the hepxilins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*, 2015;1851(4):383-96.
15. Freigang S. The regulation of inflammation by oxidized phospholipids. *Eur J Immunol*, 2016;46(8):1818-25.
16. Donvito G, Nass SR, Wilkerson JL. The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. *Neuropsychopharmacology*, 2018;43(1):52-79.
17. Recchiuti A, Isopi E, Romano M, Mattoscio D. Roles of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators in Autophagy and Inflammation. *Int J Mol Sci*, 2020;21(18):6637.
18. Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I, Demopoulos CA. Forty Years Since the Structural Elucidation of Platelet-Activating Factor (PAF): Historical, Current, and Future Research Perspectives. *Molecules*. 2019;24(23):4414.
19. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD. Angiotensin II signal transduction: An update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2018;98(3):1627-738.
20. Paz Ocaranza M, Riquelme JA, García L. Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 2020;17(2):116-29.
21. Chang Y, Wei W. Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 2015;179(2):137-45.
22. Patel M, Kurade M, Rajalingam S, Bhavsar R, Mustafa SJ, Ponnoth DS. Role of angiotensin II type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors in airway reactivity and inflammation in an allergic mouse model of asthma. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2019;41(3):428-37.
23. Marceau F, Bachelard H, Bouthillier J. Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. *Int Immunopharmacol*, 2020;82:106305.
24. Suvas S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J Immunol*, 2017;199(5):1543-52.
25. Elisa T, Antonio P, Giuseppe P. Endothelin receptors expressed by immune cells are involved in modulation of inflammation and in fibrosis: Relevance to the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Immunol Res*, 2015;2015:147616.
26. Friebe A, Sandner P, Schmidtko A. cGMP: a unique 2nd messenger molecule - recent developments in cGMP research and development. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020;393(2):287-302.
27. Day A, Jameson Z, Hyde C, Simbi B, Fowkes R, Lawson C. C-Type Natriuretic Peptide (CNP) inhibition of Interferon- γ -Mediated gene expression in human endothelial cells in vitro. *Biosensors*, 2018;8(3):14;8(3):86.
28. Branco ACCC, Yoshikawa FSY, Pietrobon AJ, Sato MN. Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. *Mediators Inflamm*, 2018;2018:9524075.
29. Wan M, Ding L, Wang D, Han J, Gao P. Serotonin: A Potent Immune Cell Modulator in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 2020;11:186.
30. Schoenichen C, Bode C, Duerschmied D. Role of platelet serotonin in innate immune cell recruitment. *Front Biosci*, 2019;24:514-26.
31. British Society for Immunology.-Cytokines: Introduction. (erişim tarihi: 21.04.2021) <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/receptors-and-molecules/cytokines-introduction>.
32. IUPHAR - Guide to Pharmacology - Chemokines. (erişim tarihi: 10.10.2020). <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=950>.

33. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 2014;1843(11), 2563-82.
34. Shao Y, Saredy J, Yang WY. Vascular endothelial cells and innate immunity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020;40(6):e138-e152.
35. Palankar R, Kohler TP, Krauel K, Wesche J, Hammerschmidt S, Greinacher A. Platelets kill bacteria by bridging innate and adaptive immunity via platelet factor 4 and FcγRIIA. *J Thromb Haemost*, 2018;16(6):1187-97.
36. Castell-Rodríguez A, Piñón-Zárate G, Herrera-Enríquez M, Jarquín-Yáñez K, Medina-Solares I. Dendritic cells: location, function, and clinical implications. In: *Biology of Myelomonocytic Cells*, InTech; 2017.
37. Luisa A. DiPietro MES. Cell Mediators of acute inflammation. In: *Frontiers in Inflammation*, vol. 1. ; 2016:11-25.
38. Curi R, Levada-Pires AC, Silva EB da. The critical role of cell metabolism for essential neutrophil functions. *Cell Physiol Biochem*, 2020;54(4):629-47.
39. Aoki A, Hirahara K, Kiuchi M, Nakayama T. Eosinophils: Cells known for over 140 years with broad and new functions. *Allergol Int*, 2021;70(1):3-8.
40. Joshua Boyce, Fanning L. Mast Cells, Basophils, and Mastocytosis. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, eds. *Clinical Immunology*, 5th ed. Elsevier; 2019:335-47.
41. Moon TC, Dean Befus A, Kulka M. Mast cell mediators: Their differential release and the secretory pathways involved. *Front Immunol*, 2014;5, 569.
42. Uhlen M, Karlsson MJ, Zhong W. A genome-wide transcriptomic analysis of protein-coding genes in human blood cells. *Science*, 2019;366(6472), eaax9198.
43. Takemori T, Tarlinton D, Hiepe F, Andreas R. B Cell Memory and Plasma Cell Development. In: *Molecular Biology of B Cells: Second Edition*. 2nd ed. Elsevier; 2015.
44. Paul S, Lal G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front Immunol*, 2017;8:1124.
45. Silverstein A. *A History of Immunology*. 2nd ed. (Duke University, ed.). Elsevier; 2009.
46. IUPHAR-Guide to Pharmacology-Catalytic Receptors. (erişim tarihi:12.03.2021). <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ReceptorFamiliesForward?type=CATALYTICRECEPTOR>.
47. Koh Y, Park J. Cell adhesion molecules and exercise. *J Inflamm Res*, 2018;11:297-306.
48. Muller WA. Getting leukocytes to the site of Inflammation. *Vet Pathol*, 2013;50(1), 7-22.
49. Norling L V., Serhan CN. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *J Intern Med*, 2010;268(1), 15-24.
50. Mirakaj V, Dalli J, Granja T, Rosenberger P, Serhan CN. Vagus nerve controls resolution and pro-resolving mediators of inflammation. *J Exp Med*, 2014;211(6):1037-48.
51. Abouelkheir GR, Upchurch BD, Rutkowski JM. Lymphangiogenesis: fuel, smoke, or extinguisher of inflammation's fire? *Exp Biol Med*, 2017;242(8):884-95.

52. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2017;17(4): 248-61.
53. Yao C, Narumiya S. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. *Br J Pharmacol*, 2019;176(3):337-54.
54. Krensky AM, Azzi JR, Hafler DA. Immunosuppressants and Tolerogens. In: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, eds. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. 13rd ed. McGraw-Hill Education; 2017.
55. Grosser T, Smyth E, FitzGerald G. Pharmacotherapy of Inflammation, Fever, Pain, and Gout. In: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, eds. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. McGraw-Hill Education; 2017.
56. Bergqvist F, Morgenstern R, Jakobsson PJ. A review on mPGES-1 inhibitors: from preclinical studies to clinical applications. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2020;147:106383.
57. Meshram D, Bhardwaj K, Rathod C, Mahady GB, Soni KK. The Role of Leukotrienes Inhibitors in the Management of Chronic Inflammatory Diseases. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2020;14(1):15-31.
58. Barnes PJ. Pulmonary Pharmacology. In: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, eds. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. 13rd ed. McGraw-Hill Education; 2017.
59. Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol*, 2006;147:1, S127-S135.
60. Liu WL. Histamine H4 receptor antagonists for the treatment of inflammatory disorders. *Drug Discov Today*, 2014;19(8):1222-5.
61. Wellstein A, Giaccone G, Atkins MB, Sausville EA. Pathway-Targeted Therapies: Monoclonal Antibodies, Protein Kinase Inhibitors, and Various Small Molecules. In: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, eds. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. McGraw-Hill Education; 2017:1207-40.
62. Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune Checkpoint Inhibitors for the treatment of cancer: clinical impact and mechanisms of response and resistance. *Annu Rev Pathol*, 2021;16:223-49.
63. Hermanson T, Bennett CL, Macdougall IC. Peginesatide for the treatment of anemia due to chronic kidney disease - an unfulfilled promise. *Expert Opin Drug Saf*, 2016;15(10):1421-6.
64. Bitto A, Irrera N, Pizzino G. Activation of the EPOR-8 common receptor complex by cibinetide ameliorates impaired wound healing in mice with genetic diabetes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018;1864(2):632-9.
65. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev*, 2020;40(1):158-89.
66. Yu H, Cui L-X, Huang N, Yang Z-L. Recent developments in nitric oxide-releasing biomaterials for biomedical applications. *Med Gas Res*, 2019;9(4):184-91.
67. Zhang H, Bai Z, Zhu L. Hydrogen sulfide donors: Therapeutic potential in anti-atherosclerosis. *Eur J Med Chem*, 2020;205:112665.
68. Elison JR, Weinstein JE, Sheets KG. Platelet-Activating Factor (PAF) Receptor Antagonism Modulates Inflammatory Signaling in Experimental Uveitis. *Curr Eye Res*, 2018;43(6):821-7.

69. Ning L, Rong J, Zhang Z, Xu Y. Therapeutic approaches targeting renin-angiotensin system in sepsis and its complications. *Pharmacol Res*, 2021;105409.
70. Enevoldsen FC, Sahana J, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. Endothelin receptor antagonists: status quo and future perspectives for targeted therapy. *J Clin Med*, 2020;18;9(3):824.
71. Kaur G, Krishan P. Serotonin 5HT_{2A} receptor antagonism mediated anti-inflammatory and anti-fibrotic effect in adriamycin-induced CKD in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020;393(7)(7):1269-79.
72. Mirshafa A, Mohammadi H, Shokrzadeh M, Mohammadi E, Talebpour Amiri F, Shaki F. Tropisetron protects against brain aging via attenuating oxidative stress, apoptosis and inflammation: The role of SIRT1 signaling. *Life Sci*, 2020;248:117452.
73. Polat B, Halici Z, Cadirci E, et al. Liver 5-HT₇ receptors: A novel regulator target of fibrosis and inflammation-induced chronic liver injury in vivo and in vitro. *Int Immunopharmacol*, 2017;43:227-35.
74. O'Brien JJ, O'Callaghan JP, Miller DB. Inhibition of calcium-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1) suppresses inflammatory responses. *Mol Cell Neurosci*, 2020;102:103449.
75. Singh D, Beeh KM, Colgan B. Effect of the inhaled PDE4 inhibitor CHF6001 on biomarkers of inflammation in COPD. *Respir Res*, 2019;20(1)(1):180.
76. Turner MJ, Dauletbaev N, Lands LC, Hanrahan JW. The phosphodiesterase inhibitor ensifentrine reduces production of proinflammatory mediators in well differentiated bronchial epithelial cells by Inhibiting PDE4. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020;375(3):414-29.
77. Peixoto CA, Gomes FODS. The role of phosphodiesterase-5 inhibitors in prostatic inflammation: A review. *J Inflamm*, 2015;12, 54.

A	AYDIN F.3/397	BOZYİĞİT İ.1/47
ABUŞOĞLU S.1/103	AYDIN H.3/469	BUZGAN T.1/25
ACER Ö.4/666	AYDIN S.3/477	BÜYÜKTAŞ MANAV A.1/145
ACUN AD.4/632	AYDOĞAN C.1/103	C - Ç
AÇIKGÖZ N.1/39	AYDOĞAN S.4/588	CANSARAN DUMAN D.1/153
AÇIKGÖZ ZC.4/588	AYDOĞDU G.2/243	CENGİZ G.1/47
ADIGÜZEL Ç.2/243	AYGÜL N.1/103	CEYLAN T.1/59
AHMED H.3/461	AYHAN M.1/115	CHOSIDOW O.4/748
AKÇAY G.2/267-4/702	AYÖZTÜRK E.3/335	COŞGUN Y.4/598
AKIN AT.1/59-1/81	B	ÇALLAK OKU F.3/337
AKSOY B.3/461	BABAEİ SAMANİ Z.2/217	ÇAN G.3/375
AKSOY ŞM.3/335	BAGHERPOOR M.2/217	ÇARHAN A.4/762
ALANYALI F.2/293	BAL NB.3/485	ÇEÇEN S.2/255
ALİZADEH G.2/217	BARIŞ Ö.4/776	ÇETİN ASLAN E.3/549
ALKAN M.2/293	BARKER S.4/748	ÇETİNKAYA YF.3/523
ALTAY FA.3/337	BAŞ H.2/243	ÇİÇEK B.4/730
ALTIN N.2/175	BAŞARAN KE.1/59	ÇİÇEK ŞENTÜRK G.2/175
ALTINEL AÇOĞLU E.3/409	BAYLAN B.1/133	ÇİFTÇİ E.3/353
ALTUN D.1/47-4/598	BAYRAM A.2/209	ÇOKAL Y.4/656-4/740
APAYDIN FG.2/243	BAYRAM G.1/13	ÇOLAK B.1/153
ARSLAN AG.4/776	BEKÇİ A.1/13	ÇOLAK C.3/497
ASLAN G.1/13-4/646	BEŞTEPE DURSUN Z.1/93	ÇOŞKUN MV.1/3
ASLAN H.2/187-3/549	BEYHUN NE.3/375	D
ATAKAN ERKAL F.3/353	BİNGÖL M.3/497	DANIŞMAN B.3/385-4/702
ATIKELER GF.4/714	BORKU UYSAL B.1/39	DEĞİM İT.1/39
AVCI İY.2/321	BOSTAN NG.3/419	DEĞİRMENÇAY Ş.3/469
AVCIKÜÇÜK H.3/397	BOZOK T.4/606	DELİALİOĞLU N.4/646

DEMİREL YILMAZ E.3/485-4/784

DERİN N.2/267

DİCLE Y.1/3

DİLAVER İ.3/375

DOĞAN E.4/674

DOĞAN G.2/209

DOĞANYİĞİT Z.1/59-4/720

DOKUR M.1/39

DOKUR SN.1/39

DURAN H.3/451

DÜLGER D.3/397

E

EKE BC.3/567

EKİNCİ B.1/25

EKİNCİ H.1/25

ELDEMİR S.2/321

ENGİNYURT Ö.3/497

ER H.4/632

ERAÇ B.3/419

ERDAL B.1/133

ERDAL G.4/622

EREN E.1/93

ERKİLİÇ E.3/335

EROL Ç.3/477

ERYAVUZ ONMAZ D.1/103

ESER G.4/730

ETEMADİ S.2/217-4/690

G

GAMSIZKAN Z.3/497

GONCAGÜL G.4/656-4/740

GORDON S.4/748

GORGANI F.4/690

GÖKÇE Y.1/71

GÖNÜLAL B.3/477

GÖRGÜLÜ V.3/353

GÖRGÜN S.3/443

GÖZALAN A.4/588

GÜDÜL HAVUZ S.1/123-2/229

GÜL M.4/730

GÜL ÜD.1/163

GÜLBUDAK H.1/13-4/646

GÜLOĞLU ÇAMAŞ G.2/307

GÜLTOP F.3/579

GÜNAYDIN E.4/656-4/740

GÜNER R.1/115

GÜRBÜZ Y.2/175

H

HABEDANK B.4/748

HABİLOĞLU AD.2/175

HACİMÜFTÜOĞLU A.4/730

HASANOĞLU HC.4/588

HASANOĞLU İ.1/115

HASHEMİ B.2/217

HASIRCI N.2/279

HAVUZ E.1/123

HEKİMOĞLU CH.3/337

I - İ

IBARRA J.4/748

ILGIN C.2/255

IRMAK H.1/25

IŞIK G.2/279

İNCE CEVİZ G.3/433

İSLAMOĞLU MS.3/337

J

JALALİ P.2/217

K

KAÇAK H.3/531

KALENDER S.2/243

KALENDER Y.2/243

KANAT MA.1/47

KANDEMİR T.3/509

KANTAR D.3/385-4/632

KANTAR GÖK D.4/702

KANTARCI M.4/730

KARA F.1/25

KARABACAK FN.1/145

KARABULUT D.1/59-1/81

KARAÇAYLI C.3/523

KARAGEÇİLİ H.3/363

KARAMAN Ü.3/497

KARASU B.2/313

79. CİLT YAZAR İNDEKSİ / 79. ISSUE AUTHOR INDEX

KARDOĞAN Ö.4/656-4/740	MIHÇIOĞLU D.3/461	ÖZTÜRK FE.2/301
KAYA H.4/646	MİRAHMADİ H.4/690	ÖZTÜRK R.3/363
KAYA KALEM A.1/115	MİRZA HC.3/433	ÖZÜDOĞRU O.4/666
KAYA Y.3/497	MOMENİ MK.4/690	P
KAYASALAN B.1/115	MUMCUOĞLU KY.4/748	PARLAK K.4/588
KAYMAK E.1/59-1/81-4/720	MURSALOĞLU KAYNAR P.4/740	PARLAK SOMUNCU B.3/375
KEMER S.4/784	N	PICOLLO MI.4/748
KESKİNKILIÇ B.1/25	NAĞİYEV T.3/509	POLLACK RJ.4/748
KILIÇ K.1/47	NALBANTOĞLU S.4/616	R
KIZILTAY A.2/279	NAMLI BOZKURT EN.1/47	RAHMAN T.1/71
KİŞİOĞLU AN.4/674	NAR ÖTGÜN S.4/588	RAİESİ O.2/217
KOÇ N.4/616	NASR A.2/217	RAİESİ V.2/217
KOÇ S.1/39	O - Ö	REED D.4/748
KOÇ SG.1/39	OKAN A.4/720	S - Ş
KORKMAZ F.2/307	ÖNAL Ö.4/674	SAKİOĞLU A.2/321
KORUKLUOĞLU FG.4/598	ÖZBAŞ GERÇEKER F.3/461	SARI ÜS.3/397
KOYUNCU A.4/588	ÖZBEK H.2/199	SAV H.1/93
KÖSE E.2/187	ÖZCAN V.2/199	SER Ö.3/353
KÖSE E.3/353	ÖZDAMAR S.1/59	SEVİNÇ G.3/337
KULA ATİK T.3/451	ÖZDEMİR AA.4/646	SİLİCİ S.4/720
KULOĞLU N.1/81	ÖZDEMİR Ö.3/497	SİVRİKAYA A.1/103
KÜPELİ İ.1/39	ÖZENSOY GÜLER Ö.4/762	SOHRABİ Z.2/217
M	ÖZER T.1/39	SONBAY YILMAZ ND.3/385
MEHMETZADE HF.4/598	ÖZKAN Ö.2/313	SURAL G.4/784
MEINKING TL.4/748	ÖZKAN S.3/579	SÜRÜCÜOĞLU S.4/622
METANAT M.4/690	ÖZKÜTÜK N.4/622	ŞAHİN K.3/375
METİN S.4/784	ÖZTÜRK E.1/59-1/81	ŞAKUL AA.2/199

79. CİLT YAZAR İNDEKSİ / 79. ISSUE AUTHOR INDEX

ŞAMLIOĞLU P.2/209	TOPBAŞ M.3/375	YANIK YALÇIN T.3/477
ŞENCAN İ.2/175-3/337	TUĞLU ATAMAN Ş.3/353	YAPICI G.1/13
ŞENDAĞ E.2/175	TURAN E.1/47	YARAŞ N.1/71
ŞİBAR EG.2/175	TURHAN S.3/375	YAVUZ ŞA.1/163
ŞİMŞEK BOZOK T.4/606	TURŞUN S.3/409	YAZGI H.1/3
ŞİMŞEK E.4/762	U - Ü	YENİDÜNYA KONUK E.3/353
ŞİMŞİR İ.2/187	ULAŞ N.3/469	YEŞİLER Fİ.3/477
T	ULUDAĞ OM.3/485	YILDIRIM F.3/363
TABATABAEİ SM.4/690	USANMAZ M.3/443	YILDIRIM S.4/730
TAGHİZADEHGHALEHJOUGHİ A. ...4/730	USKUN E.4/674	YILDIRIM Z.3/363
TANRIVERDİ ÇAYCI Y.2/307	ÜÇKAYABAŞI A.3/509	YILDIZ Y.2/301
TAŞTAN H.2/243	ÜNER AK.4/720	YILMAZ B.1/133
TAYLAN ÖZKAN A.2/313-4/748	ÜNLÜ A.1/103	YILMAZ E.1/153
TEKİN A.3/337	ÜNVER ULUSOY T.3/337	YOLALAN G.3/497
TEZCAN ÜLGER S.1/13	ÜSTÜNDAĞ MG.3/375	YÜCE Y.3/567
TEZCANER A.2/279	V	YÜCEL H.3/409
TİMURKAN MÖ.3/469	VANDER STICHELE R.4/748	Z
TOLOZA AC.4/748	Y	ZARÉİE M.2/217
TOP Ş.3/497	YAĞCI ÇAĞLAYIK D.2/255-2/301	ZER Y.1/145
TOPAKTAŞ G.2/187-3/549	YAKAN B.1/59-1/81	ZORBOZAN N.4/714
TOPALCENGİZ Z.1/3	YALÇIN B.1/59	

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

