



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

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

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

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 80 ■ Sayı/Number 4 ■ Yıl/Year 2023

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü adına

On behalf of General Directorate of Public Health

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

EDİTÖR

EDITOR IN CHIEF

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

EDİTÖR YARDIMCILARI

DEPUTY EDITORS

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

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

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

Dr. Öğrt. Üye. Pınar MURSALOĞLU KAYNAR (Ankara Medipol Üni. Sağ. Hiz. MYO)

YAYIN KURULU

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

İSTATİSTİK EDİTÖRLERİ

STATISTICAL EDITORS

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

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

İNGİLİZCE DİL EDİTÖRÜ

ENGLISH LANGUAGE EDITOR

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

TEKNİK KURUL

TECHNICAL BOARD

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

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

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

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

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

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

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

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

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

Aralık - 2023 / December - 2023

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç

Anna PAPA, Yunanistan

Aziz SANCAR, ABD

Cristina DOMINGO, Almanya

Daniel MOTLHANKA, Botsvana

Dwight D. BOWMAN, ABD

Isme HUMOLLI, Kosova

Isuf DEDUSHAJ, Kosova

Iva CHRISTOVA, Bulgaristan

Johan LINDH, İsveç

Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail

Manfred WEIDMANN, İngiltere

Paul HEYMAN, Belçika

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba

Sıraç DİLBER, İsveç

Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya

Takashi AKAMATSU, Japonya

Varalakshmi ELANGO, Hindistan

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Alanya

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Ankara

Banu ÇAKIR, Ankara

Banu SANCAK, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Afyonkarahisar

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Can Hüseyin HEKİMOĞLU, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Cemile SÖNMEZ, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Ebubekir CEYLAN, Ankara

Emrah RUH, Kıbrıs

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fehminaz TEMEL, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnaz ÇULHA, Hatay

Gülnur TARHAN, Adıyaman

Hakan ABACIOĞLU, İzmir

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

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

I) AMAÇ VE KAPSAM

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

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

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 çoğaltabilme 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 bağlanti 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 bulunmak ya da bilim haberi niteliği taşıyacak bilgilerin iletilmesi amacıyla yazılan yazılar, Yayın Kurulu'nun inceleme ve değerlendirmesinin ardından yayınlanır. Editöre Mektup bir sayfayı aşmamalı ve kaynak sayısı en fazla 10 olmalıdır.

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

14. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

15. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

I) AIM and SCOPE

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

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

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

II) PUBLISHING POLICY

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

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

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

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

III) COPYRIGHT and LICENSING

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

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

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

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

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

IV) OPEN ACCESS POLICY

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

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

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

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

V) PRICE POLICY

Article submission, evaluation and publication are free.

VI) ETHICAL RULES

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

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

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

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

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

VII) LANGUAGE of the JOURNAL

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

VIII) WRITING RULES

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

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

Articles to be submitted for publication;

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

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

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

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

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

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

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

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

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

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

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

8. Research Articles;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ETİK İLKELER VE YAYIN POLİTİKASI

ETİK İLKELER

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

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI POLİTİKASI

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

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

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

YAYIN POLİTİKASI ve HAKEM DEĞERLENDİRME SÜRECİ

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

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

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

ETHICAL PRINCIPLES AND PUBLICATION POLICY

ETHICAL PRINCIPLES

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

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

CONFLICT OF INTEREST POLICY

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

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

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

PUBLICATION POLICY and PEER REVIEW PROCESS

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

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 80

Fax : +90 312 565 55 91

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

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız.

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

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

Furthermore, please check.

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

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

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

INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL

Scopus

ResearchGate

CAS[®]

A division of the American Chemical Society

Google
scholar beta

Academic Journals Database
disseminating
quality controlled scientific knowledge

EBSCO
HOST Electronic
Journals
Service

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

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

TÜRK
HİJYEN
DİZİNİ

TÜRK
MEDLINE

TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

GENAMICS[™]
...research from your desktop

medoanet
Mediterranean Open Access Network

Open
J-Gate

İLETİŞİM

CORRESPONDENCE

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

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

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

Tel: 0312 565 55 80

Faks: 0312 565 55 91

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

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

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. **Phylogenetic analysis based on ITS1 gene of *Leishmania* lineage: Meta-analysis using in-silico techniques** 429 - 444
Leishmania soyunun ITS1 genine dayalı filogenetik analiz: In-silico teknikleri kullanılarak meta-analiz
Dilek GÜLDEMİR, Banuçiçek YÜCESAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.90083 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")


2. **N-acetyl cysteine decreases migratory capacity and increases endoplasmic reticulum stress in endometriotic cells with time and dose-dependent use** 445 - 454
N-asetil sistein, zamana ve doza bağlı kullanım ile endometriyotik hücrelerde migrasyon kapasitesini azaltır ve endoplazmik retikulum stresini artırır
Elif KARAKOÇ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.81073 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")


3. **Çorum ili hemodiyaliz hastalarında influenza ve pnömokok aşılara yaklaşım** 455 - 462
Approach to influenza and pneumococcal vaccines in hemodialysis patients in Çorum province
Yasemin ARI YILMAZ, Nihal AYDEMİR, Hüseyin KAYADİBİ, Hilal BOYACI, Burak YILMAZ, Ayşe YILMAZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.40222 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")


4. **Platelet mass index - a pre-diagnostic tool for infectious mononucleosis** 463 - 468
Trombosit kütle indeksi - enfeksiyöz mononükleoz için ön tanı aracı
Yasemin ARDIÇOĞLU AKIŞIN, Gökçe Su TAŞTAN, Nejat AKAR, Mustafa TURAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.22309 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")


5. **Ön saftaki hemşirelerin bakış açısından COVID-19 yönetimindeki zorluklar** 469 - 482
Challenges in the management of COVID-19 from front-line nurses' perspective
Keziban AVCI, Gülfiğar GÜLKAYA
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.29000 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")


6. **Evaluation of biosafety cabinets used in microbiology laboratories according to performance qualification tests** 483 - 490
Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan biyogüvenlik kabinlerinin performans yeterlilik testlerine göre değerlendirilmesi
Edibe Nurzen NAMLI BOZKURT, Azer Sibel ÖZNRUR
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.94220 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")


7. **In vitro effects of various essential oils on biofilm viability; their antibacterial and antibiofilm activities against clinical *Staphylococcus aureus* isolates** 491 - 502
Bazı esansiyel yağların klinik *Staphylococcus aureus* izolatlarında biofilm canlılığına in vitro etkileri, antibakteriyel ve anti-biofilm aktiviteleri
Sezin ÜNLÜ, Aylin ÜSKÜDAR GÜÇLÜ, Hasan Cenk MİRZA, Aylin ALTAY KOÇAK, Ahmet BAŞUSTAOĞLU
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.46504 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")


8. **ABCA1 taşıyıcı protein ile yapılan araştırmaların bibliyometrik analizi** 503 - 512
Bibliometric analysis of studies with ABCA1 carrier protein
Efsun Şerife ANTMEN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.26928 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")


9. **Repeat breeder ineklerde genital kanal bakteriyolojisi ve antibiyotik direnç profilleri** 513 - 522
Genital tract bacteriology and antibiotic resistance profiles in repeat breeder cows
Elçin GÜNAYDIN, Gülsen GONCAGÜL, Pınar MURSALOĞLU KAYNAR
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.44270 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")


- **Derleme / Review**

10. **Potential functions of artificial intelligence chatbot ChatGPT in health management: Scoping review** 523 - 530
Yapay zekâ sohbet robotu ChatGPT'nin sağlık yönetiminde potansiyel işlevleri: Kapsam incelemesi
Mustafa Said YILDIZ, Ayfer ALPER
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2023.78370 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")


Phylogenetic analysis based on ITS1 gene of *Leishmania* lineage: Meta-analysis using in-silico techniques

Leishmania soyunun ITS1 genine dayalı filogenetik analiz: In-silico teknikleri kullanılarak meta-analiz

Dilek GÜLDEMİR¹ (ID), Banuçecek YÜCESAN² (ID)

ABSTRACT

Objective: Leishmaniasis is a parasitic disease caused by more than 20 *Leishmania* species. This disease is spread by vectors. Many researchers agree that *Leishmania* was spread to mammals by sandflies of the genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia*. Leishmaniasis is still considered one of the most neglected diseases by the World Health Organization (WHO). An estimated 0.7-1 million new cases of leishmaniasis are reported annually from approximately 100 endemic countries. The types of leishmaniasis in humans are the visceral (VL), cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), diffuse cutaneous (DCL), and post kala-azar dermal (PKDL) forms of Leishmaniasis. The aim of this study is to perform phylogenetic analysis of *Leishmania* origin based on ITS1 gene region using in-silico techniques. In this way, it is also aimed to take a snapshot of a meta-analysis of vertical and horizontal spread at the global level.

Methods: In this study, *Leishmania* ITS1 region sequences presented with the GenBank data of the National Center for Biotechnology Information, USA, (NCBI) until 15.05.2019 were taken and analyzed by in-silico techniques. 914 sequences were obtained for the *Leishmania* ITS1 region in the NCBI database. All

ÖZET

Amaç: Leishmaniasis, 20'den fazla *Leishmania* türü tarafından oluşturulan paraziter bir hastalıktır. Bu hastalık vektörler tarafından yayılmaktadır. Birçok araştırmacı, *Leishmania*'nın memelilere *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinsi tatarcık sinekleri tarafından yayıldığı konusunda hemfikirdir. Leishmaniasis, halen Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından en çok ihmal edilen hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir. Yaklaşık 100 endemik ülkeden yılda tahmini 0.7-1 milyon yeni leishmaniasis vakası bildirilmektedir. İnsanlardaki leishmaniasis türleri, Leishmaniasis'in visseral (VL), kutanöz (CL), mukokutanöz (MCL), diffüz kutanöz (DCL) ve post kala-azar dermal (PKDL) formlarıdır. Bu çalışmanın amacı, in-silico teknikler kullanılarak *Leishmania* kökeninin ITS1 gen bölgesine dayalı filogenetik analizini gerçekleştirmektir. Bu yolla, küresel düzeyde vertikal ve horizontal yayılımın meta-analizi ile anlamlı bir görüntü almak da amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışma ile 15.05.2019 tarihine kadar National Center for Biotechnology Information, USA, (NCBI) GenBank verileri ile sunulan *Leishmania* ITS1 bölge sekansları alınarak in-silico tekniklerle analiz edilmiştir. NCBI veritabanında *Leishmania* ITS1 bölgesi

¹Public Health General Directorate of Türkiye, National Parasitology Reference Laboratory Department, Ankara
²Çankırı Karatekin University, Faculty of Health Sciences, Çankırı



İletişim / Corresponding Author : Dilek GÜLDEMİR
Adnan Saygun Cd. No: 55 E Blok, 1. Kat, Sıhhiye, Ankara - Türkiye
E-posta / E-mail : dilekg06@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received : 15.02.2023
Kabul Tarihi / Accepted : 22.09.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.90083

Güldemir D, Yücesan B. Phylogenetic analysis based on ITS1 gene of *Leishmania* lineage: Meta-analysis using in-silico techniques. Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(4): 429 - 444

sequences were examined and sequences without indel problems were selected from these strains mapped according to the consensus sequence. It was decided to form a phylogenetic tree with the forms that were examined and 65 strains were obtained by removing the sub-branches.

Results: The phylogenetic tree obtained in this study showed that *Leishmania* strains clustered in six branches according to the ITS1 region. Here, a phylogenetic tree is drawn and the molecular epidemiological and demographic data of these six generations and beyond, which are obtained as a result of the genetic relationships between the strains, are summarized.

Conclusion: In conclusion, Leishmaniasis is an important public health problem that can be seen in many developing countries. In this study, the strains examined using the in-silico method were isolated from different geographies of the world between 1984 and 2018. The phylogenetic relationships between these strains show not only the vertical spread of the origins over the years, but also the horizontal spread geographically. These species were obtained from different host and tissue types. Thus, the relationships of *Leishmania* strains in the host-vector-reservoir chain are explained. Therefore, it is clear that there is a need for more meta-analysis studies such as this study on factors and their diffusion.

Key Words: *Leishmania*, ITS1 gene, in silico meta-analysis, phylogenetic study

için 914 dizi elde edildi. Tüm sekanslar incelenmiş ve konsensüs sekansına göre haritalanan bu suşlardan ekle-sil (indel) problemi olmayan sekanslar seçilmiştir. İncelenen ve alt dalları çıkarılarak 65 suş elde edilen formlar ile filogenetik ağacın oluşturulmasına karar verilmiştir.

Bulgular: Bu çalışmada elde edilen filogenetik ağaç, *Leishmania* suşlarının ITS1 bölgesine göre altı kolda kümelendiğini göstermiştir. Burada filogenetik bir ağaç çizilerek suşlar arasındaki genetik ilişkiler sonucunda elde edilen bu altı kuşak ve ötesine ait moleküler epidemiyolojik ve demografik veriler özetlenmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak Leishmaniasis, gelişmekte olan birçok ülkede görülebilen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu çalışmada in-silico yöntemi kullanılarak incelenen suşlar 1984-2018 yılları arasında dünyanın farklı coğrafyalarından izole edilmiştir. Bu suşlar arasındaki filogenetik ilişkiler, kökenlerin yıllara göre sadece dikey yayılımını değil, aynı zamanda coğrafi olarak yatay yayılımı da göstermektedir. Bu türler farklı konak ve doku tiplerinden elde edilmiştir. Böylece *Leishmania* suşlarının konak-vektör-rezervuar zincirindeki ilişkileri açıklanmaktadır. Bu nedenle, faktörler ve bunların yayılımı üzerine bu çalışma gibi çok sayıda meta-analiz çalışmasına ihtiyaç olduğu açıktır.

Anahtar Kelimeler: *Leishmania*, ITS1 geni, in silico meta-analiz, filogenetik analiz

INTRODUCTION

Leishmaniasis is an important public health problem that can be seen in many developing countries (1). However, the emergence of unexpected *Leishmania* species in unexpected areas beyond our classical knowledge due to population travel and migration (2). Classically, human dog rodents are

reservoirs and sandflies are vectors (3). Leishmaniasis ranges from localized cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), and diffuse visceral leishmaniasis (VL), which can be fatal (4,5).

In recent years, molecular techniques in the diagnosis and typing of Leishmaniasis are rapidly developing and their use is becoming widespread worldwide. Especially with increasing genome

studies, *Leishmania* taxonomy was reconstructed and it was shown that the *Leishmania* genus was shown to be separated into *Viannia* and *Leishmania* subgenera approximately 20-100 million years ago with ancestral DNA studies (6). DNA sequence analysis of some gene regions was used to evaluate phylogenetic relationships in *Leishmania* lineage such as ITS1 and ITS2 regions, Mini-exon/Spliced Leader (rDNA), *gp63*, *hsp70*, *cpb*, *POLA*, *G6PD*, *6PGDH*, *MPI*, *Histones*, *RPOIILS*, *NAGT*, *A2*, *EF-1 α* (proein coding gene), *cytb*, *COII* (kDNA maxicircle) and kDNA minicircle. The most used among them is the sequence of the ITS1 region (7) ITS1 is a non-coding region placed at SSUrRNA, which is bounded by the genes 18S and 5.8S that produce a 300-350 bp fragment of *Leishmania* spp. (7). In this study, ITS1 region was selected for phylogenetic analysis of current *Leishmania* lineage. As it is known, in silico studies enable the evaluation of large-scale genomic data with the innovations offered by information technologies, bioinformatics and artificial intelligence tools, and are becoming increasingly widespread. The aim of this study is to snapshot a meta-analysis of vertical and horizontal propagation at the global level by performing phylogenetic analysis based on *Leishmania* lineage ITS1 gene using in-silico techniques.

MATERIAL and METHOD

In our study, *Leishmania* ITS1 region sequences submitted to National Center for Biotechnology Information, USA, (NCBI) GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) until 15.05.2019 were analyzed by in-silico techniques (8).

In the NCBI database, 914 sequences were obtained for the *Leishmania* ITS1 region. These data were uploaded to the Geneious 11.0.5. (www.geneious.com) platform in FASTA format (9). Genome mapping was performed on these sequences using the *Leishmania* GQ333260.1 strain. All strains mapped according to the consensus sequence were examined and those without indel problems were selected.

Approximately 350 bp length sequences covering the ITS1 region were extracted among them. As a result, 151 sequences were obtained. These DNA sequences were trimmed at both ends and their lengths were equalized. Then phylogenetic tree was drawn with these sequences.

The phylogenetic tree was created using the Geneious tree tool available on the Geneious 11.0.5 platform (www.geneious.com). It was examined, and decided to draw the phylogenetic tree with 65 strains by removing the sub-branches (Figure 1,2). Herein, a naming was made for the strains consisting of accession number, species, location and year data such as KF899857.1 (Lm/Iran/2013). The strain names given here are used in the phylogenetic tree (Figure 2). In addition, using the Create Maps: Scribble Maps (<https://www.scribblemaps.com/create/>) application, the regions where the strains in this study are isolated are marked on the world map and the geographical spreads of the clades are shown Figure 3 (10).

RESULTS

In this study, the strains examined using the in-silico method were isolated from different geographies of the world between 1984-2018. The phylogenetic relationships between these strains show not only the vertical spread of origins over the years, but also the horizontal spread as geographically.

The phylogenetic tree obtained in our study shows that *Leishmania* strains were clustered in six clades (Figure 2). The vertical, horizontal and interspecies spread of the selected for the present study *Leishmania* species according to the ITS1 gene region is summarized in Table 1. The demographic characteristics of the strains allocated to the *Leishmania* ITS1 region for genogroups, along with their names and related publications are given table 2. In addition, the regions where the strains in this study are isolated are geographically marked on the world map and the geographical spread of clades shown as Figure 3.

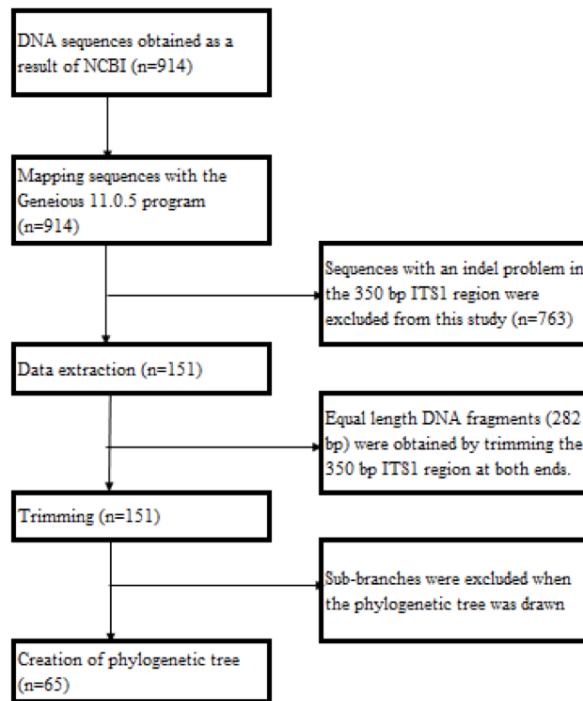


Figure 1. Work flow chart for deciding *Leishmania* ITS1 sequences to take place in this study

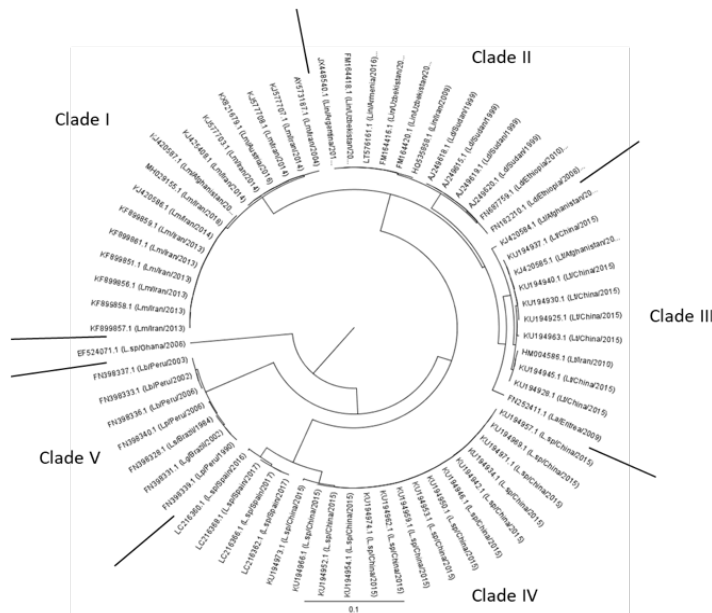


Figure 2. The phylogenetic tree obtained in this study shows that *Leishmania* strains (n=65) were clustered in six clades. The figure shows that Clade I (n = 2), Clade II (n = 3), Clade III (n = 5), Clade IV (n = 4), Clade V (n = 3) subbranches (n: Number of sub-branches). The phylogenetic tree was created using the Geneious tree tool available on the Geneious 11.0.5 platform (www.geneious.com)



Figure 3. Global distribution of *Leishmania* genogroups analyzed in this study. Yellow: Clade I, Green: Clade II, Pink: Clade III, Turquoise: Clade IV, Blue: Clade V: White: EF524071.1 (This strain is genotypically remote and unique from other clades in present study). Create Maps: Scribble Maps (<https://www.scribblemaps.com/create/>) application was used in map production

Table 1. Vertical, horizontal and inter-species spread of *Leishmania* species according to ITS1 gene region

<i>Leishmania</i> spp.	Vertical Propagation (Years)	Horizontal Propagation (Geographic)	Inter-species Spread
Clade I <i>L. major</i>	2004-2018	Iran, Afghanistan, Austria	<i>Rhombomys opimus</i> (Rodent)- <i>Phlebotomus papatasi</i> (Sand fly) - <i>Homo sapiens</i> (Human)
Clade II <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i>	1999-2016	Iran, Uzbekistan, Armenia, Sudan, Ethiopia, Argentina	<i>Canis familiaris</i> (Dog) <i>P. tobbi</i> (Sand fly) <i>H. sapiens</i> (Human)
Clade III <i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopia</i>	2009-2015	Afghanistan, China, Iran Eritrea	<i>Eremias vermiculata</i> , <i>E. velox rborowskii</i> , <i>Phrynocephalus</i> <i>axillaris</i> (Desert lizards) <i>Canis spp.</i> (Dog) <i>H. sapiens</i> (Human)
Clade IV <i>Leishmania</i> sp. (Not compatible with known species; high- similarity with <i>L. tarantolae</i> and <i>L. adleri</i>)	2015-2017	China, Spain	<i>E. vermiculata</i> , <i>E. velox rborowskii</i> , <i>E. multiocellata</i> , <i>P. axillaris</i> , <i>Tenuidactylus elongatus</i> (Desert lizards) <i>Sergentomyia minuta</i> (Sand fly)
Clade V <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) shawi</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (V.) peruviana</i>	1984-2006	Brazil, Peru	<i>Cebus apella</i> (monkey)- <i>H. sapiens</i> (Human)
Clade VI <i>Leishmania</i> sp. (Not compatible with known species)	2006	Ghana	<i>H. sapiens</i> (Human)

Table 2. The demographic characteristics of the strains allocated to the Leishmania ITS1 region for genogroups, along with their names and related publications

No	Accession No	Name ¹⁾	Country	Region	Isolation date	Host	Submitters (From NCBI)	Clade	Publications	Related References
1	KF899857.1	KF899857.1 (Lm/ Iran/2013)	Iran	Ilam province, Dasht-e-Abbas	2013	Homo sapiens="skin lesion"	Karimian et al. 2013	I	Unpublished	
2	KF899858.1	KF899858.1 (Lm/ Iran/2013)	Iran	Ilam province, Dasht-e-Abbas	2013	Homo sapiens="skin lesion"	Karimian et al. 2013	I	Unpublished	
3	KF899856.1	KF899856.1 (Lm/ Iran/2013)	Iran	Ilam province, Dasht-e-Abbas	2013	Homo sapiens="skin lesion"	Maleki Ravasan et al. 2013	I	Unpublished	
4	KF899851.1	KF899851.1 (Lm/ Iran/2013)	Iran	Ilam province, Dasht-e-Abbas	2013	Homo sapiens="skin lesion"	Maleki Ravasan et al. 2013	I	Unpublished	
5	KF899861.1	KF899861.1 (Lm/ Iran/2013)	Iran	Ilam province, Dehloran	2013	Homo sapiens	Karimian et al. 2013	I	Unpublished	
6	KF899859.1	KF899859.1 (Lm/ Iran/2013)	Iran	Ilam province, Mehran	2013	Homo sapiens="skin lesion"	Karimian et al. 2013	I	Unpublished	
7	MH029155.1	MH029155.1 (Lm/ Iran/2018)	Iran	Bam county, Khvajeh Askar	2018	Phlebotomus papatasi	Amiri Ghanat Saman et al. 2018	I	Unpublished	11-18, 30
8	KJ420586.1	KJ420586.1 (Lm/ Iran/2014)	Iran	Ilam province, Mehran	2014	Homo sapiens="skin lesion"	Mosawi et al. 2014	I	Mosawi and Dalimi 2015	
9	KJ420587.1	KJ420587.1 (Lm/ Afghanistan/2014)	Afghanistan	Herat	2014	Homo sapiens="skin lesion"	Mosawi et al. 2014	I	Mosawi and Dalimi 2015	
10	KJ425408.1	KJ425408.1 (Lm/ Iran/2014)	Iran	North-East of Iran	2014	Phlebotomus papatasi	Rassi et al. 2014	I	Rafizadeh et al. 2016	
11	KJ577703.1	KJ577703.1 (Lm/ Iran/2014)	Iran	Esfarayan district	2014	Rhombomys opimus	Rassi et al. 2014	I	Unpublished	
12	KJ577707.1	KJ577707.1 (Lm/ Iran/2014)	Iran	Esfarayan district	2014	Rhombomys opimus	Rassi et al. 2014	I	Unpublished	
13	KJ577708.1	KJ577708.1 (Lm/ Iran/2014)	Iran	Esfarayan district	2014	Rhombomys opimus	Rassi et al. 2014	I	Unpublished	
14	AY573187.1	AY573187.1 (Lm/ Iran/2004)	Iran		2004	Homo sapiens	Tashakori et al. 2004	I	Unpublished	
15	KX821679.1	KX821679.1 (Lm/ Austria/2016)	Austria		2016	Homo sapiens	Harrison et al. 2016	I	Harrison et al. 2017	

Table 2. The demographic characteristics of the strains allocated to the Leishmania ITS1 region for genogroups, along with their names and related publications

No	Accession No	Name ¹⁾	Country	Region	Isolation date	Host	Submitters (From NCBI)	Clade	Publications	Related References
16	HQ535858.1	HQ535858.1 (Lin/ Iran/2009)	Iran	northwestern Iran	2009	Phlebotomus tobbi="sand fly"	Oshaghi et al. 2010	II	Rassi et al. 2012	
17	FM164418.1	FM164418.1 (Lin/ Uzbekistan/2007)	Uzbekistan		2007	Homo sapiens	Alam et al. 2008	II	Alam et al. 2009	
18	FM164416.1	FM164416.1 (Lin/ Uzbekistan/2007)	Uzbekistan		2007		Alam et al. 2008	II	Alam et al. 2009	
19	FM164420.1	FM164420.1 (Lin/ Uzbekistan/2007)	Uzbekistan		2007		Alam et al. 2008	II	Alam et al. 2009	
20	LT576161.1	LT576161.1 (Lin/ Armenia/2016)	Armenia		2016		Kuhls et al. 2016	II	Sukiasyan et al. 2019	
21	JX448540.1	JX448540.1 (Lin/ Argentina/2012)	Argentina	Posadas, Misiones	2012	Canis familiaris="epitelial cells from conjuntivas"	Acardi et al. 2012	II	Unpublished	19-25
22	AJ249618.1	AJ249618.1 (Ld/ Sudan/1999)	Sudan	Eastern Sudan	1999		el Tai 1999	II	el Tai et al. 2000	
23	AJ249615.1	AJ249615.1 (Ld/ Sudan/1999)	Sudan	Eastern Sudan	1999		el Tai 1999	II	el Tai et al. 2000	
24	AJ249619.1	AJ249619.1 (Ld/ Sudan/1999)	Sudan	Eastern Sudan	1999		el Tai 1999	II	el Tai et al. 2000	
25	AJ249620.1	AJ249620.1 (Ld/ Sudan/1999)	Sudan	Eastern Sudan	1999		el Tai 1999	II	el Tai et al. 2000	
26	FN687759.1	FN687759.1 (Ld/ Ethiopia/2010)	Ethiopia		2010	Homo sapiens="skin lesion"	Gelanew 2010	II	Unpublished	
27	FN182210.1	FN182210.1 (Ld/ Ethiopia/2008)	Ethiopia		2008	Visceral leishmaniasis in Ethiopia	Gelanew 2009	II	Unpublished	

Table 2. The demographic characteristics of the strains allocated to the Leishmania ITS1 region for genogroups, along with their names and related publications

No	Accession No	Name ¹⁾	Country	Region	Isolation date	Host	Submitters (From NCBI)	Clade	Publications	Related References
28	KJ420584.1	KJ420584.1 (Lt/Afghanistan/2014)	Afghanistan	Herat	2014		Mosawi et al. 2014	III	Mosawi and Dalimi 2015	
29	KJ420585.1	KJ420585.1 (Lt/Afghanistan/2014)	Afghanistan	Herat	2014	Homo sapiens="skin lesion	Mosawi et al. 2014	III	Mosawi and Dalimi 2015	
30	KU194937.1	KU194937.1 (Lt/China/2015)	China	Nanhu Town, Hami County, Xinjiang Uygur Autonomous Region	2015	Eremias vermiculata	Zhang et al. 2015	III	²⁾ Zhang et al. 2016	
31	KU194940.1	KU194940.1 (Lt/China/2015)	China	Lukchun Town, Shanshan County, Xinjiang Uygur Autonomous Region	2015	Phrynocephalus axillaris	Zhang et al. 2015	III	Zhang et al. 2016	
32	KU194930.1	KU194930.1 (Lt/China/2015)	China	Kumtag Desert, Tuokexun County, Xinjiang Uygur Autonomous Region	2015	Eremias vermiculata	Zhang et al. 2015	III	Zhang et al. 2016	
33	KU194925.1	KU194925.1 (Lt/China/2015)	China	Kumtag Desert, Tuokexun County, Xinjiang	2015	Eremias vermiculata	Zhang et al. 2015	III	Zhang et al. 2016	26,28-32
34	KU194963.1	KU194963.1 (Lt/China/2015)	China	Erpu Town, Hami City, Xinjiang Uygur Autonomous Region	2015	Phrynocephalus axillaris	Zhang et al. 2015	III	Zhang et al. 2016	
35	KU194945.1	KU194945.1 (Lt/China/2015)	China	Lukchun Town, Shanshan County, Xinjiang Uygur Autonomous Region	2015	Eremias velox rborowskii	Zhang et al. 2015	III	Zhang et al. 2016	
36	KU194928.1	KU194928.1 (Lt/China/2015)	China	Kumtag Desert, Tuokexun County, Xinjiang Uygur Autonomous Region "Northwest China	2015	Eremias vermiculata	Zhang et al. 2015	III	Zhang et al. 2016	
37	HM004586.1	HM004586.1 (Lt/Iran/2010)	Iran	Isfahan	2010	dog	Mahmoudzadeh-Niknam et al. 2010	III	Mahmoudzadeh-Niknam et al. 2011	
38	FN252411.1	FN252411.1 (La/Eritrea/2009)	Eritrea		2009	Homo sapiens	Gelanew 2009	III	Zanger et al. 2016	

Table 2. The demographic characteristics of the strains allocated to the Leishmania ITS1 region for genogroups, along with their names and related publications

No	Accession No	Name ¹⁾	Country	Region	Isolation date	Host	Submitters (From NCBI)	Clade	Publications	Related References
39	KU194957.1	KU194957.1 (L-sp/China/2015)	China	Anxi Extreme Arid National Nature Reserve, Guazhou County, Gansu Province	2015	Eremias vermiculata	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
40	KU194969.1	KU194969.1 (L-sp/China/2015)	China	Dunhuang Yardong National Geopark, Gansu Province" Northwest China	2015	Eremias vermiculata	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
41	KU194971.1	KU194971.1 (L-sp/China/2015)	China	Dunhuang Yardong National Geopark, Gansu Province	2015	Eremias vermiculata	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
42	KU194934.1	KU194934.1 (L-sp/China/2015)	China	Nanhu Town, Hami County, Xinjiang Uygur Autonomus Region	2015	Eremias vermiculata	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
43	KU194942.1	KU194942.1 (L-sp/China/2015)	China	Lukchun Town, Shanshan County, Xinjiang Uygur Autonomus Region	2015	Eremias velox rborowskii	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
44	KU194946.1	KU194946.1 (L-sp/China/2015)	China	Lukchun Town, Shanshan County, Xinjiang Uygur Autonomus Region	2015	Eremias velox rborowskii	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	27-29
45	KU194950.1	KU194950.1 (L-sp/China/2015)	China	Lukchun Town, Shanshan County, Xinjiang Uygur Autonomus Region	2015	Eremias velox rborowskii	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
46	KU194953.1	KU194953.1 (L-sp/China/2015)	China	Anxi Extreme Arid National Nature Reserve, Guazhou County, Gansu Province	2015	Eremias multiocellata	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
47	KU194959.1	KU194959.1 (L-sp/China/2015)	China	Erpu Town, Hami City, Xinjiang Uygur Autonomus Region" Northwest China	2015	Phrynocephalus axillaris	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
48	KU194962.1	KU194962.1 (L-sp/China/2015)	China	Erpu Town, Hami City, Xinjiang Uygur Autonomus Region	2015	Phrynocephalus axillaris	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	

Table 2. The demographic characteristics of the strains allocated to the Leishmania ITS1 region for genogroups, along with their names and related publications

No	Accession No	Name ¹⁾	Country	Region	Isolation date	Host	Submitters (From NCBI)	Clade	Publications	Related References
49	KU194974.1	KU194974.1 (L-sp/ China/2015)	China	Kumux Town, Tuokexun County, Xinjiang Uygur Autonomus Region	2015	Eremias velox rborowskii	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
50	KU194954.1	KU194954.1 (L-sp/ China/2015)	China	Anxi Extreme Arid National Nature Reserve, Guazhou County, Gansu Province	2015	Eremias multiocellata	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
51	KU194952.1	KU194952.1 (L-sp/ China/2015)	China	Lukchun Town, Shanshan County, Xinjiang Uygur Autonomus Region" Northwest China	2015	Eremias velox rborowskii	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
52	KU194966.1	KU194966.1 (L-sp/ China/2015)	China	Erpu Town, Hami City, Xinjiang Uygur Autonomus Region	2015	Phrynocephalus axillaris	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	27-29
53	KU194973.1	KU194973.1 (L-sp/ China/2015)	China	Tuokexun County, Xinjiang Uygur Autonomus Region" Northwest China	2015	Tenuidactylus elongatus	Zhang et al. 2015	IV	Zhang et al. 2016	
54	LC216362.1	LC216362.1 (L-sp/ Spain/2017)	Spain	Madrid	2017	Sergentomyia minuta	Gonzalez et al. 2017	IV	Gonzalez et al. 2017	
55	LC216366.1	LC216366.1 (L-sp/ Spain/2017)	Spain	Madrid	July-2016	Sergentomyia minuta	Gonzalez et al. 2017	IV	Gonzalez et al. 2017	
56	LC216368.1	LC216368.1 (L-sp/ Spain/2016)	Spain	Madrid	August-2016	Sergentomyia minuta	Gonzalez et al. 2017	IV	Gonzalez et al. 2017	
57	LC216360.1	LC216360.1 (L-sp/ Spain/2016)	Spain	Madrid	July-2016	Sergentomyia minuta	Gonzalez et al. 2017	IV	Gonzalez et al. 2017	

Table 2. The demographic characteristics of the strains allocated to the Leishmania ITS1 region for genogroups, along with their names and related publications

No	Accession No	Name ¹⁾	Country	Region	Isolation date	Host	Submitters (From NCBI)	Clade	Publications	Related References
58	FN398328.1	FN398328.1 (Ls/ Brazil/1984)	Brazil	Para	1984	Cebus apella	Kuhls 2009	V	Unpublished	
59	FN398331.1	FN398331.1 (Lg/ Brazil/2002)	Brazil	Acre	2002	Homo sapiens	Kuhls 2009	V	Unpublished	
60	FN398339.1	FN398339.1 (Lp/ Peru/1990)	Peru		1990	Homo sapiens	Kuhls 2009	V	Unpublished	33-35
61	FN398340.1	FN398340.1 (Lp/ Peru/2006)	Peru		2006	Homo sapiens	Kuhls 2009	V	Unpublished	
62	FN398333.1	FN398333.1 (Lb/ Peru/2002)	Peru		2002	Homo sapiens	Kuhls 2009	V	Unpublished	
63	FN398337.1	FN398337.1 (Lb/ Peru/2003)	Peru		2003	Homo sapiens	Kuhls 2009	V	Unpublished	
64	FN398336.1	FN398336.1 (Lb/ Peru/2006)	Peru		2006	Homo sapiens	Kuhls 2009	V	Unpublished	
65	EF524071.1	EF524071.1 (L-sp/ Ghana/2006)	Ghana		2006	Homo sapiens	Vilinski et al. 2007	VI	Vilinski et al. 2008	36

Molecular epidemiological and demographic data on these six clades and beyond, which were obtained as a result of genetic relationships between strains are summarized in Table 2. Strains naming (name)¹⁾ was created for the strains consisting of accession number, species, location and year data such as KF899857.1 (Lm/Iran/2013). ²⁾This table contains 22 strains from the study of Zhang, J., et al., 2016. These 22 strains included in our study are phylogenetically in two groups (Clade III and Clade IV). Those in Clade III are located in the northern part of China (Uyghur), while those in Clade IV are located in the north and east of China. These study sequences have been deposited in GenBank under accession numbers KT990127-KT990210 and KU194923-KU194975

DISCUSSION

Molecular epidemiological and demographic data of these six classes obtained as a result of genetic relationships between strains by drawing a phylogenetic tree are summarized in Table 2. The literature for these strains is reviewed and the findings for molecular epidemiological relationships are discussed below.

In this study, the strains in Clade I (CI) originated from Iran, Afghanistan and Austria between 2004-2018, and all of are *Leishmania major*. The Austrian *L. major* strain (KX821679) in CI is not considered to be of Austrian origin since it was isolated from a frequent traveler patient (11). The species responsible for old world cutaneous leishmaniasis in these countries are mostly *L. major* and *L. tropica* (12,13). *Leishmania major* causative agent for cutaneous leishmaniasis occurring in the north and east of Iran. Additionally, *Rhombomys opimus* is the reservoir and *Phlebotomus papatasi* is the vector (14). CI strains were isolated from the skin lesion in humans, *P. papatasi* as a vector and *R. opimus* as a reservoir. This high genetic similarity of the strains supports the human-sand fly-rodent cycle in previous studies (15-16). Rafizadeh et al. (2016) reported the human population is associated with *L. major* epidemic, which occurred with more than 400 new CL cases (16). One of the strains sequenced in this study (KJ425408) falls on Clade I in our study. It was also found that this strain was 100% similar to some *L. major* strains (KJ577703, KJ577707, KJ577708) located in Clade I in the Esfarayen region in northern Iran. Several studies from Iran have shown that *L. major* is the dominant species on the border with Afghanistan (17,18). KJ420587 *L. major* strain, originated Herat, occurring in CI is phylogenetically related to strains in Iran.

Clade II (CII) strains belong to *L. infantum* and *L. donovani* in two sub-branches, as seen in Table 2. Several studies reveal that *L. infantum* is a VL agent in the Middle East (19). *Leishmania infantum* origins identified in Uzbekistan, Tajikistan and Armenia were reported to be related to the human and animal

migration (20,21). In our study in the CII, Iran *P. tobbi* strain (HQ535858) and Uzbekistan and Armenia human strains are genetically indistinguishable is evidence of the existence of this pathway in terms of transmission. Interestingly, Lin/Argentina/2012 strain detected in the dog in Argentina was also in CII (22). On the other hand, *L. donovani* in Sudan and Ethiopia in CII are form a sub-branch in the phylogenetic tree. The strains of *L. donovani* from Sudan was isolated from clinical samples in 1999 and Ethiopian strains obtained VL and CL cases were located in the same clade (23,24). In this region, people always crossing borders because of doing business or military activities may explain this genotypic relationship. Essentially, according to the current taxonomy, *L. donovani* and *L. infantum* are subspecies in *L. donovani complex* (25).

Clade III (CIII) strains are isolated from different species of desert lizards, human and dog and originated from Afghanistan, China, Iran and Eritrea, in which only strain from Iran is located in CIII (26). Clade IV (CIV) strains are isolated from desert lizards and *Sergentomyia minuta* and originated from China and Spain. It was shown a high similarity that China desert lizards strains (KU194923-KU194975) and Spain vector strains (LC216366, LC216368, LC216360) (27,28). It has also been reported that there is a high similarity between desert lizards and human strains in China (29). The reason why Clade III and IV are considered together is that the manifestation of linearity between geographic relations and phylogenetic proximity here is different than expected. Because, while two different clades (CIII and CIV) are detected in the same geography, it is quite remarkable that strains in the remote geography are related to each other."

Herat originated some *L. tropica* (KJ420584, KJ420585) strains belonging to in our study in Clade III (CIII) (30). In our meta-analysis study showed that the KJ420585 *L. tropica* strain isolated from Herat (in CIII) is 100% similar to some Chinese *L. tropica* strains (KU194925, KU194930, KU194937, KU194940). In this study, *L. tropica* Herat strain (KJ420585) was isolated from a human in 2014, however the Chinese strains in

CIII were isolated from some desert lizards (*Eremias vermiculata*) that lived in the north and east of China in 2015 (29). Zhang et al. (2015), reported that desert lizards have a potential reservoir role for human leishmaniasis (28,29). Moreover, some Chinese *L. tropica* strains (KU194928-KU194945, desert lizards, 2015) and Iran strain (HM004586, dog, 2010) were found to be 100% similar in our study. Dogs are known to be the main reservoirs for zoonotic VL (31). In this way, it is possible to see both the historical adventure of *Leishmania* lineages and the transition between species. Herein, strains are geographically related, which can be evaluated to see both the adventure of the origins over the years and the transition between host species. Interestingly, FN252411 *L. aethiopica* strain in CIII, which is isolated from Eritrea in Africa in 2009, is a human strain. According to Zanger et al. (2011), the FN252411 *L. aethiopica* strain was isolated from Eritrea with a travel history (32).

In this study, Clade V's strains are Brazilian and Peru shown as table 2. (FN398328 *L. (V.) shawi* was isolated in 1984 from monkey (*Cebus apella*) while others human cases. They all show 100% similarity to each other, in which monkey species can play a role in the transition path of *Leishmania* species in South America (33). Also, *L. (V.) braziliensis* strains in CVI are 100% similar (34). However, these strains form sub-branches with two other *L. (V.) peruviana* strains isolated from Peru. Cupolillo et al. (1998), supports the genetic closeness between these species also (35). It is interesting that the

strains isolated from different hosts, *Leishmania* species and years are located in the same clade. It is understood that genetic profiles are preserved over the years and the ITS1 region is highly similar.

Clade VI has an African Ghanaian strain (EF524071). This strain was named only *Leishmania* sp. taxonomically (36). The *Leishmania* spp. in CVI did not match the DNA sequences of *Leishmania* species in the NCBI portal. EF524071 is isolated from humans and may be a new species, and vector-host relations and epidemiological relations network need to be explained.

In conclusion, the strains examined using the in-silico method were isolated from different geographies of the world between 1984-2018. The phylogenetic relationships between these strains show not only the vertical spread of origins over the years, but also the horizontal spread as geographically. Thus, the relationships of *Leishmania* strains in the host-vector-reservoir chain are explained. Monitoring vertical and horizontal spread of *Leishmania* origins with such meta-analytical studies is particularly important in terms of evaluating the effectiveness of protection and control measures. The demonstration that the horizontal spread of *Leishmania* clones continues between geographies by in-silico and phylogenetic analysis indicates the insufficiency of protection measures. Also, the continuity of the vertical spreading over the years indicates the insufficiency of control measures. Therefore, it is obvious that there is a need for a large number of meta-analysis studies such as this study on factors and their spread.

PRESENTATION AT THE CONGRESS

This article was presented as an oral presentation at the 21st Parasitology Congress (28 September - 3 October 2019, Çeşme, İzmir).

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, March, 22-26. 2010. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf (Accessed: December, 2018).
2. Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniases: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol*, 2006; 22 (1): 4-6.
3. Teixeira D, Benchimol M, Rodrigues J, Crepaldi P, Pimenta P, De Souza W. The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. *PLoS Pathog*, 2013;9(10): e1003594.
4. Tsukamaya P., Lucas C., Bacon J. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of new world Leishmania. *Int. J. Parasit*, 2008; 39 (3): 355-62.
5. Zhang C, Lu X, Du X, Jian J, Shu L, Ma Y. Phylogenetic and evolutionary analysis of Chinese Leishmania isolates based on multilocus sequence typing. *PLoS One*, 2013; 8 (4): e63124.
6. Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of Leishmania in the sand fly vector. *Science*, 2009; 324 (5924): 265-8.
7. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*, 2017; 57: 1-29.
8. NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA).: www.ncbi.nlm.nih.gov (Accesses: May, 2019).

9. Geneious Version (11.0.5). <https://www.geneious.com/> / (Accessed: December, 2018).
10. Create Maps. 2018. Scribble Maps. <https://www.scribblemaps.com/create/> (Accessed: December, 2018).
11. Harrison N, Walochnik J, Ramsebner R, Veletzky L, Lagler H, Ramharter M. Case Report: Progressive Perforation of the Nasal Septum due to *Leishmania major*: A Case of Mucosal Leishmaniasis in a Traveler. *Am J Trop Med Hyg*, 2017; 96 (3): 653-5.
12. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010; 8 (4): 419-33.
13. Hotez PJ, Savioli L, Fenwick A. Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 6 (2): e1475.
14. Dobson DE, Kamhawi S, Lawyer P, Turco SJ, Beverley SM, Sacks DL. *Leishmania major* survival in selective *Phlebotomus papatasi* sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. *PLOS pathogens*, 2010; 6 (11): e1001185.
15. Killick-Kendrick R. *Phlebotomus* vectors of Visceral leishmaniasis, a review. *Med Vet Entomol*, 4: 1-24.
16. Rafizadeh S, Saraei M, Abaei MR, Oshaghi MA, Mohebbali M, Peymani A, et al. Molecular Detection of *Leishmania major* and *L. turanica* in *Phlebotomus papatasi* and First Natural Infection of *P. salehi* to *L. major* in North-East of Iran. *J Arthropod-Borne Dis*, 2016; 10 (2): 141-7.
17. Vaeznia H, Dalimi A, Sadraei J, Pirstani M. Determination of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad by PCR-RFLP method. *Archives of Razi*, 2009; 64 (1): 39-44.
18. Akhouni M, Hajjarian H, Baghaei A, Mohebbali M. Geographical distribution of *Leishmania* species of human cutaneous leishmaniasis in Fars province, southern Iran. *Iran J Parasitol*, 2013; 8 (1): 85-91.
19. Rassi Y, Sanei Dehkordi A, Oshaghi MA, Abai MR, Mohtarami F, Enayati A, et al. First report on natural infection of the *Phlebotomus tobbi* by *Leishmania infantum* in Northwestern Iran. *Exp Parasitol*, 2012; 131 (3): 344-9.
20. Alam MZ, Kovalenko DA, Kuhls K, Nasyrova RM, Ponomareva VI, Fatullaeva AA, et al. Identification of the agent causing visceral leishmaniasis in Uzbeki and Tajiki foci by analysing parasite DNA extracted from patients' Giemsa-stained tissue preparation. *Parasitology*, 2009; 136 (9): 981-6.
21. Sukiasyan A, Keshishyan A, Manukyan D, Melik-Andreasyan G, Atshemyan L, Apresyan H, et al. Re-Emerging foci of visceral leishmaniasis in Armenia-first molecular diagnosis of clinical samples. *Parasitology*, 2019; 146 (7): 1-8.
22. Acardi SA, Liotta DJ, Santini MS, Romagosa CM, Salomón OD. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010; 105 (6): 796-9.
23. Gelanew T, Kuhls K, Hurissa Z, Weldegebreal T, Hailu W, Kassahun A, et al. Inference of population structure of *Leishmania donovani* strains isolated from different Ethiopian visceral leishmaniasis endemic areas. *Trop Dis*, 2010; 4(11): e889.
24. El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schomian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000; 94(5): 575-9.

25. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016;10 (3): e0004349.
26. Mahmoudzadeh-Niknam H, Abrishami F, Doroudian M, Moradi M, Alimohammadian M, Parvizi P, et al. The Problem of Mixing up of Leishmania Isolates in the Laboratory: Suggestion of ITS1 Gene Sequencing for Verification of Species. *Iran J Parasitol* 2011; 6(1): 41-8.
27. González E, Molina R, Tello A, Iriso A, Vázquez A, Jiménez M. Blood Meal Preferences and Leishmania spp. Detection in *Sergentomyia minuta* Collected in the Human Leishmaniasis Focus of Madrid, Spain (2012-2016). Conference: 6th World Congress on Leishmaniasis. Poster: May 2017. Toledo/Spain.
28. NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov (last accessed on 10 December 2018).
29. Zhang JR, Guo XG, Liu JL, Zhou TH, Gong X, Chen DL, et al. Molecular detection, identification and phylogenetic inference of Leishmania spp. in some desert lizards from Northwest China by using internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. *Acta Trop*, 2016; 162: 83-94.
30. Mosawi S, Dalimi A. Molecular detection of Leishmania spp. isolated from cutaneous lesions of patients referred to Herat regional hospital, Afghanistan. *East Mediterr Health J*. 2015;21(878-84):12.878.
31. Quinell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 2009; 136: 1915-34.
32. Zanger P, Kötter I, Raible A, Gelanew T, Schönian G, Kreamsner PG. Case Report: Successful treatment of cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopia* with Liposomal Amphotericin B in an Immunocompromised traveler Returning from Eritrea. *Am J Trop Med Hyg*, 2011; 84 (5): 692-4.
33. Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, 1993; 6: 230-50.
34. Oddone R, Schweynoch C, Schönian G, de Sousa Cdos S, Cupolillo E, Espinosa D, et al. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania (Viannia)* species. *J Clin Microbiol*, 2009 Sep;47(9):2818-25.
35. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G Jr. Genetic diversity in natural populations of New World Leishmania. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1998; 93: 663-8.
36. Villinski JT, Klena JD, Abbassy M, Hoel DF, Pupilampu N, Mehta S, et al. Evidence for a new species of *Leishmania* associated with a focal disease outbreak in Ghana. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008; 60: 323-7.

N-acetyl cysteine decreases migratory capacity and increases endoplasmic reticulum stress in endometriotic cells with time and dose-dependent use

N-asetil sistein, zamana ve doza bağlı kullanım ile endometriyotik hücrelerde migrasyon kapasitesini azaltır ve endoplazmik retikulum stresini artırır

Elif KARAKOÇ¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Endometriosis is a chronic condition that affects women of reproductive age and is linked to infertility and pelvic pain. There hasn't been a curative treatment for the condition either, only anti-inflammatory drugs, analgesic drugs, and laparoscopy. An anti-oxidant N-acetylcysteine (NAC) restores glutathione (GSH). N-acetylcysteine has been used to treat endometriosis both in vivo and in vitro in a small number of trials. In vivo and in vitro studies have shown that NAC lowers inflammation and ectopic endometrial development. In this study, we aimed to decrease the proliferative capacity as well as the migratory behavior of the endometriotic cells by using the IC50 level of NAC.

Methods: HESC and 12Z human endometrial and endometriotic stromal cell lines were expanded according to the manufacturer's instructions. Impedance measurements were performed on the xCELLigence (RTCA) device to determine cellular impedance. N-acetyl cysteine was applied to the cells at doses between 10^{-6} - 10^{-12} M, and the IC50 for NAC was calculated. The cells were treated with IC50 NAC, and the wound healing

ÖZET

Amaç: Endometriyozis üreme çağındaki kadınları etkileyen ve kısırlık ve pelvik ağrı ile bağlantılı kronik bir hastalıktır. Hastalık için henüz iyileştirici bir tedavi olmayıp, sadece laparoskopi yapılmakta, anti-inflamatuar ilaçlar ve analjezik ilaçlar verilmektedir. Bir antioksidan olan N-asetilsistein (NAC), glutasyonu (GSH) geri kazandırır. N-asetilsistein, az sayıda çalışmada hem in vivo hem de in vitro endometriyozisi tedavi etmek için kullanılmıştır. In vivo ve in vitro çalışmalar, NAC'nin inflamasyonu ve ektopik endometriyal gelişimi azalttığını göstermiştir. Bu çalışmada, NAC'nin IC50 seviyesini kullanarak endometriyotik hücrelerin proliferatif kapasitesinin yanı sıra migrasyon davranışını da azaltmayı amaçladık.

Yöntem: HESC ve 12Z insan endometriyal ve endometriyotik stromal hücre hatları, üreticinin talimatlarına göre üretildi. Hücresel empedansı belirlemek için xCELLigence (RTCA) cihazında empedans ölçümleri yapıldı. Hücrelere 10^{-6} - 10^{-12} M arasındaki dozlarda N-asetil sistein uygulandı ve NAC için IC50 hesaplandı. Hücreler IC50 NAC ile muamele edildi ve

¹Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Elif KARAKOÇ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Sıhhiye / Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : elifbilgic8@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 06.03.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 08.05.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.81073

Karakoç E. N-acetyl cysteine decreases migratory capacity and increases endoplasmic reticulum stress in endometriotic cells with time and dose-dependent use. Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(4): 445 - 454

was analyzed at 0, 24, and 48 hours. GRP78, ER tracker, and tubulin-specific immunofluorescent labelings were performed. The corrected total cell fluorescence (CTCF) was counted for each sample. The GraphPad Prism 8 program was used for statistical analysis. The Shapiro-Wilk test, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test, and posthoc Dunn tests were done.

Results: 12Z cell proliferation was decreased by 10^{-6} - 10^{-12} M NAC, while HESC cell proliferation was unaffected. The IC50 for 12Z cells was determined as 3.87×10^{-9} M. The wound gap width of 12Z cells treated with NAC was substantially wider at 48 hours into the migration test than that of the control. N-acetyl cysteine treated 12Z cells exhibited increased ER-tracker and GRP78 fluorescent immunolabeling, but decreased tubulin labeling. N-acetyl cysteine did not significantly alter the immunofluorescence labeling for those proteins in HESC cells.

Conclusion: Endometriosis is a severe, ongoing condition that primarily affects females who are fertile and is linked to infertility. Therefore, we demonstrated that application of NAC in a time-dose and impedance-dependent manner helped decrease the proliferative and migratory capacity of endometriotic cells, lowering the expression of the tubulin protein, raising ER stress, and consequently raising the level of chaperone proteins. We can say that NAC may be a possible curative or supportive medication in the treatment of endometriosis.

Key Words: Endometriosis, n-acetyl cysteine, proliferation, migration, microtubule, endoplasmic reticulum, chaperone protein

yara iyileşmesi 0, 24 ve 48. saatlerde analiz edildi. GRP78, ER işaretleyici ve tubuline özgü immünofloresan işaretlemeler yapıldı. Her örnek için düzeltilmiş toplam hücre floresansı (CTCF) hesaplandı. İstatistiksel analiz için GraphPad Prism 8 programı kullanıldı. Shapiro-Wilk testi, Mann-Whitney U testi, Kruskal-Wallis testi ve posthoc Dunn testleri yapıldı.

Bulgular: 12Z hücrelerinin çoğalması 10^{-6} - 10^{-12} M NAC ile azalırken HESC hücrelerinin çoğalması etkilenmedi. 12Z hücreleri için IC50, 3.87×10^{-9} M olarak belirlendi. NAC ile tedavi edilen 12Z hücrelerinin yara aralığı genişliği, migrasyon testinin 48. saatinde kontrolünkinden önemli ölçüde daha genişti. N-asetil sistein ile muamele edilmiş 12Z hücrelerinde, artan ER-işaretleyici ve GRP78 immünofloresan işaretleme gözlemlendi, ancak tübülün işaretlenmesi azaldı. N-asetil sistein, HESC hücrelerinde bu proteinler için immünofloresan işaretlenmesini önemli ölçüde değiştirdi.

Sonuç: Endometriyozis, öncelikle üreme çağına olan kadınları etkileyen ve kısırlıkla bağlantılı ciddi, süregelen bir hastalıktır. Bu nedenle, NAC'nin zaman-doza ve empedansa bağlı şekilde uygulanmasının, endometriyotik hücrelerin çoğalma ve göç etme kapasitesini azaltmaya, tubulin proteininin ekspresyonunu düşürmeye, ER stresini arttırmaya ve sonuç olarak şaperon proteinlerinin seviyesini yükseltmeye yardımcı olduğunu gösterdik. N-asetil sisteinin endometriyozis tedavisinde olası bir iyileştirici veya destekleyici ilaç olabileceğini söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Endometriyozis, n-asetilsistein, çoğalma, göç etme, mikrotübül, endoplazmik retikulum, şaperon protein

INTRODUCTION

Endometriosis is a chronic, incapacitating disease associated with infertility and pelvic pain. The disease is relatively prevalent among women of reproductive age, and 6-10% of women suffer from

endometriosis (1). Endometriosis is the term for the condition in which endometrial glands and stromal tissue are visible outside of the uterine cavity (1, 2). Dysmenorrhea, dysparonia, heavy menstrual cycles, and nulliparity are the most common clinical outcomes (1). The etiopathogenic mechanisms involved in the

illness are still not fully known, despite the fact that the relationship between the disease and infertility is frequently studied in the literature (3). It is believed that the disease is influenced by a variety of genetic, environmental, and epidemiologic factors (1). There are a variety of hypotheses, including the ability of Müllerian duct-derived embryonic cells to survive in ectopic places and ectopic implants of menstrual shredded tissue and retrograde bleeding (4). Since there is a low diagnostic rate, many endometriosis lesions cannot be identified (5, 6). Apart from anti-inflammatory medications, analgesic medications, and laparoscopy, there hasn't been a curative therapy for the illness either. An increasing body of evidence suggests that atypical ovarian endometriosis may be the precursor to ovarian cancer (5). Because it lowers life quality and also results in infertility and cancer, endometriosis continues to be a major problem for women who are of reproductive age (7, 8).

N-acetylcysteine (NAC) is a novel pain reliever that has recently been studied by scientists. Because it replenishes glutathione (GSH), NAC has traditionally been used as an antidote for respiratory illnesses, acetaminophen overdoses, and, in rare cases, nephropathy (9, 10). It is known that oxidative stress is increased in endometriotic tissue compared to normal endometriotic tissue, and oxidative stress is also accepted as the progressive cause of the onset of endometriosis (10). N-acetylcysteine has been used in a limited number of studies for endometriosis treatment, both *in vivo* and *in vitro*. According to a study, using a combination drug containing NAC reduced inflammation and ectopic endometrial growth *in vivo* and *in vitro*, as well as relieving pain in endometriosis patients (11). N-acetylcysteine was also suggested as a promising treatment for endometriosis in an observational cohort trial by reducing the size and number of cysts (12) and improving oocyte quality in mice by increasing mitochondrial activity and decreasing oxidative stress (13).

Almost all eukaryotic cells' cytoskeleton, which is made up of microtubules (MTs), is formed by the

dimerization of the tubulin proteins α - and β -tubulin. The elongation, shortening, and halt phases of MT dynamics are important for intracellular trafficking, mitotic spindle formation, cytokinesis, cell membrane blebbing, cell migration, and phagocytosis (14).

Endoplasmic reticulum (ER) is an important organelle as being a large site of protein synthesis, and the abnormal accumulation of protein aggregates in the ER lumen is known as ER stress (15). GRP78 is an ER chaperone involved in regulating protein folding and ER transmembrane inducers. The expression of GRP78 and ER activity appear to be directly correlated (16, 17).

Since endometriosis is defined by the aberrant invasion of endometrium-like tissues and cells outside the uterus, ER stress stimulation might be used as a therapeutic strategy to reduce proliferation and migration in endometriotic cells. As NAC is well known for being an antioxidant and ROS scavenger (18), we sought to find out more about its impact on endometriotic cells in light of its anti-proliferative and anti-migratory properties and whether it could be related to ER stability and chaperone protein alterations. Here, we proposed that endometriotic cells exposed to the IC50 level of NAC would exhibit reduced proliferative potential as well as migratory behavior due to an *in vitro* decrease in tubulin expression and ER stability.

MATERIAL and METHOD

Cell culture

HESC (#T0533, ABM, Canada) and 12Z (#T0764, ABM, Canada) human endometrial and endometriotic stromal cell lines were cold-chain transferred into our laboratory and thawed immediately according to the manufacturer's instructions. HESC, an endometrial stromal cell line, was cultured in DMEM/F12 (#P04-41550, PAN-Biotech, USA) medium supplemented with 1% Pen-strep, 10% FBS, and 1% Pen-strep. The endometriotic cell line 12Z was grown in Prigrow IV (#TM004, ABM, Canada) medium with 10% FBS. The

cell lines were incubated at 37 °C in 5% CO₂ culture conditions.

Proliferation analysis by real-time impedance-based proliferation analysis (RTCA)

The cell culture medium was removed, and the cells were washed with PBS when the HESC and 12Z cell lines reached 70-80% confluence. The cells were then incubated for 10 minutes at 37 °C with a trypsin/EDTA solution (#T4049, Sigma-Aldrich, USA) before centrifugation at 1200 rpm. To seed 5000 cells per well, 200 microliters of pellet and medium mixture were seeded into 96 wells of gold electrode-covered “E plates.” To determine the efficacy of NAC (N-Acetyl-L-Cysteine) (#A9165, Sigma-Aldrich, USA) on cell proliferation, impedance measurements were performed using the xCELLigence (RTCA, Roche Applied System, Switzerland) device. The “cell index” was created by continuously recording the impedance of the pressure of the cells to the base. N-Acetyl-L-cysteine was dissolved in medium (DMEMF12, Prigrow IV) of 1 mM concentration and applied to the cells after 24 hours at doses between 10⁻⁶-10⁻¹² M for 6 repetitions. For a total of 96 hours, cellular indices were recorded every 15 minutes. The IC50 for NAC was calculated through RTCA software.

Scratch and cell migration assay

Endometrial stromal cells and endometriotic cells were seeded as 1x10⁵ cells per well in 6-well plates. After the cells had adhered and reached 70-80% confluence, a cell-free area in each well was created by scraping a line with a sterile micropipette tip. The wells were washed with medium after scraping to remove non-adherent cells. The cells were then treated with IC50 NAC or only medium. The wound healing was analyzed by taking images from the wells at the same positions using a phase contrast microscope (IX-73, Olympus, Japan) at 0, 24, and 48 h. Each measurement was made with care to measure the same area, and the measurements were repeated at least three times.

The calculation of “percent wound confluence”

was analyzed according to the formula:

A: initial scratch wound; B: scratch wound at the time.

$$\% \text{ wound confluence} = [(A-B) \cdot 100 \%] / A$$

Immunofluorescence labeling

The cells were seeded 1x10⁴ per well in 8-well slides. When the cells reached a confluency of 70-80%, the medium was removed, and the cells were washed with PBS. The cells were then fixed in cold acetone for 10 minutes at 4 °C and air-dried for 30 minutes at room temperature. The cells were blocked with 5% skimmed milk and then incubated in a humidity chamber overnight at +4 °C with 1:100 dilutions of anti-human GRP78 (#ab212054, Abcam, UK), ER tracker (#E34251, Invitrogen, USA), and β -tubulin (#T8328, Sigma-Aldrich, USA) primary antibodies. The cells were labeled with the secondary antibodies Alexa 488 and 594 (#ab150080, Abcam, UK; #ab150113, Abcam, UK). To stain nuclei, DAPI (#422801, Biolegend, USA) was applied, and then the slides were mounted with antifade mounting medium. The presence of specific immunolabeling was determined using a light microscope attached to a digital camera (Leica DM6B, Germany). Evaluation of the immunolabeling was performed via LASX software. At least three micrographs from non-overlapping areas of both positive and negative controls were measured for fluorescence, and the corrected total cell fluorescence (CTCF) was counted for each sample.

Statistical Analysis

The RTCA software was used for determining the IC50 of NAC. The migration and wound healing analyses were carried out using the % wound confluence formula. For immunofluorescence analysis, the corrected total cell fluorescence (CTCF) formula was used to calculate the measurements, and the GraphPad Prism 8 program was used for statistical analysis. Analytical methods were used to assess the variables' conformity to the normal distribution (the Shapiro-Wilk test). Mann-Whitney U tests were used

for pairwise comparisons, the Kruskal-Wallis test for multiple comparisons, and posthoc Dunn tests for posthoc Dunn tests. The total type-1 error level was set at 5% for statistical significance.

RESULTS

Under ideal conditions, human endometrial stromal cells (HESC) and human endometriotic cells (12Z) were cultured. Cells were examined under a phase contrast microscope every three days and noted as having the morphology of human stromal cells. They had long cytoplasmic extensions and euchromatic nuclei. For the experiments, care was taken to ensure that both cells' passages had the same passage number. It was discovered that 12Z cells grown in vitro had a greater proliferative capacity and reached confluence faster than HESC cells (Figure 1A, B).

In 96-well gold electrode-coated E plates, confluent cells were seeded. Both cells' "cell index" reached 1 after about 24 hours of seeding. We discovered that 12Z cells had a much higher cell index, which the RTCA software recorded (Figure 1C, E). At the 25th hour, N-acetyl cysteine was applied

to the cells at appropriate rates, six times at doses determined to be 10^{-6} - 10^{-12} M. To determine the effectiveness of NAC on cell proliferation, impedance measurements were taken using the xCELLigence (RTCA, Roche Applied System, Switzerland) device. Cellular indices were measured every 15 minutes for 96 hours. We discovered that although 10^{-6} - 10^{-12} M NAC inhibited the proliferation of 12Z cells (Figure 1E), it did not affect the proliferation of HESC cells (Figure 1C). The cell index in NAC-treated 12 Z cells was found to be lower than in the untreated control group. The IC₅₀ for 12Z cells was determined to be 3.87×10^{-9} M. After determining the IC₅₀ for 12Z cells (Figure 1D). The cells were exposed to the IC₅₀ dose of NAC for migration analysis. Phase contrast microscopy was used to analyze images taken from the wells at 0th, 24th, and 48th hours (Figure 2A). At the 0th hour, the wound width created by scraping in the wells did not differ significantly ($p = 0.6480$) between the 12Z control, 12Z NAC, and HESC control and HESC NAC groups. No significant difference was observed between the 12Z control, 12Z NAC, and HESC control and HESC NAC groups in the wound width measurements performed at the 24th hour of

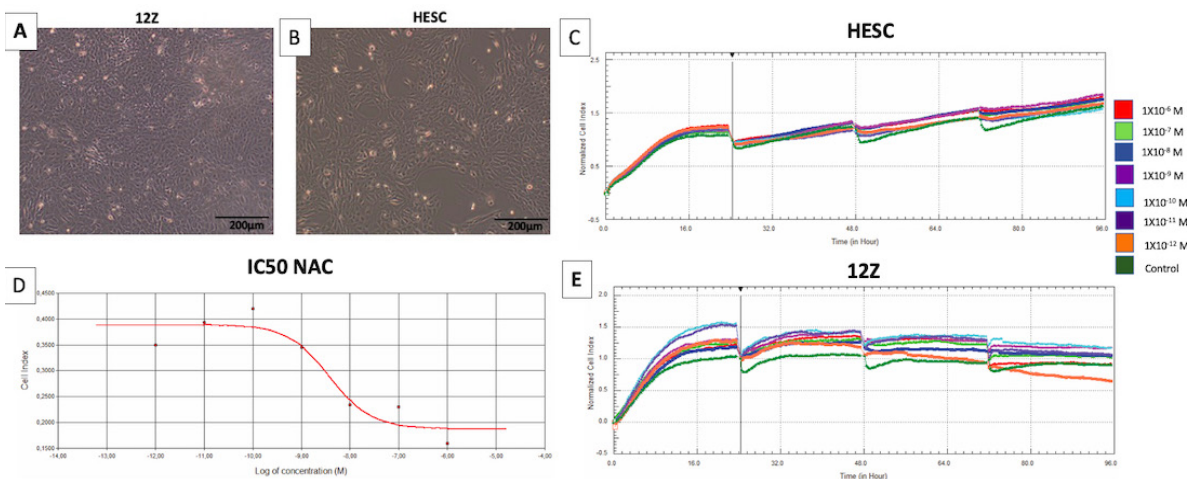


Figure 1. (A) Human endometrial stromal cells (HESC) and (B) Human endometriotic cells (12Z) displayed the morphology of human stromal cells with their extended cytoplasmic extensions and euchromatic nuclei. The 12Z cells were seen to have a higher proliferative capacity than HESC cells (10x magnification, scale bar 200µm). (C, E) The RTCA program observed that NAC had more anti-proliferative efficacy on 12Z cells than on HESC cells in 96-well gold electrode-coated E plates. (D) The IC₅₀ for 12Z cells was 3.87×10^{-9} M.

the migration test ($p = 0.0623$). At the 48th hour of the migration test, measurements revealed that the wound gap width of 12 Z cells treated with NAC was significantly greater than that of the control

group ($p = 0.0057$), but there was no significant difference in the wound gap width of HESC cells treated with NAC or medium ($p = 0.9335$) (Figure 2 B).

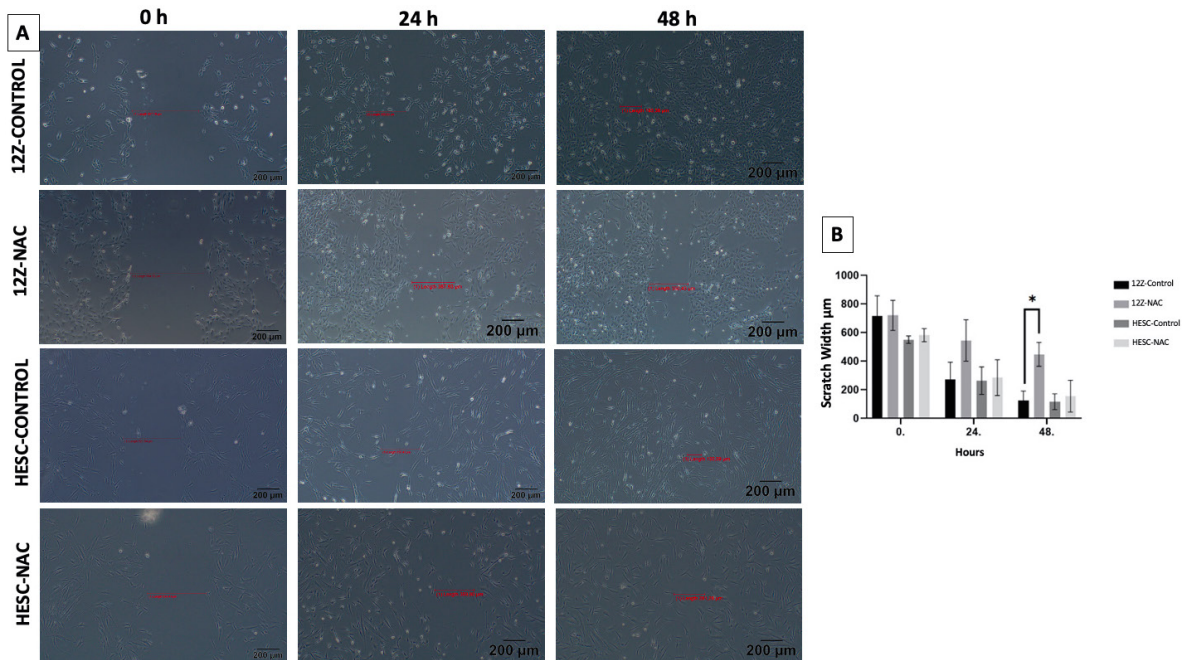


Figure 2. (A) For a 48-hour migration investigation, the IC50 dosage of NAC was administered to the HESC and 12Z cells (10x magnification, scale bar 200µm). (B) The wound gap width of 12 Z cells treated with NAC was significantly wider than that of the control group at the 48th hour of the migration test, respectively (* $p < 0,05$).

The cells were labeled with anti-human GRP78, ER tracker, and β -tubulin primary antibodies (Figures 3, 4). The fluorescence labeling with β -tubulin antibody was more intense around the perinuclear area of the cells (Figure 3, 4). The fluorescence intensity in at least three micrographs from non-overlapping areas of both positive and negative controls was measured, and the corrected total cell fluorescence (CTCF) was calculated for each sample. Fluorescent immunolabeling with β -tubulin was found to be more intense in the 12Z control group. In addition, it was found that β -tubulin labeling was statistically significantly higher than in NAC-treated 12Z cells ($p = 0.0339$) (Figure 3A, B, E). Endoplasmic reticulum membrane labeling with

ER tracker was significantly higher in NAC-treated 12Z cells than in cells without NAC application ($p = 0.0189$) (Figure 3 A,B, and F). Immunofluorescence labeling of the β -tubulin and ER tracker in HESC cells exposed to NAC or medium only revealed no significant differences (Figure 3C, D, G, and H).

When the 12Z control and NAC-treated groups were compared in GRP78 CTCF measurements, it was discovered that the immunofluorescent labeling in the NAC-treated group was significantly higher than in the medium treated group ($p = 0.0394$) (Figure 4 A, B and E). Immunofluorescence labeling of GRP78 in HESC cells exposed to NAC or medium alone revealed no significant differences (Figure 4 C, D, and F).

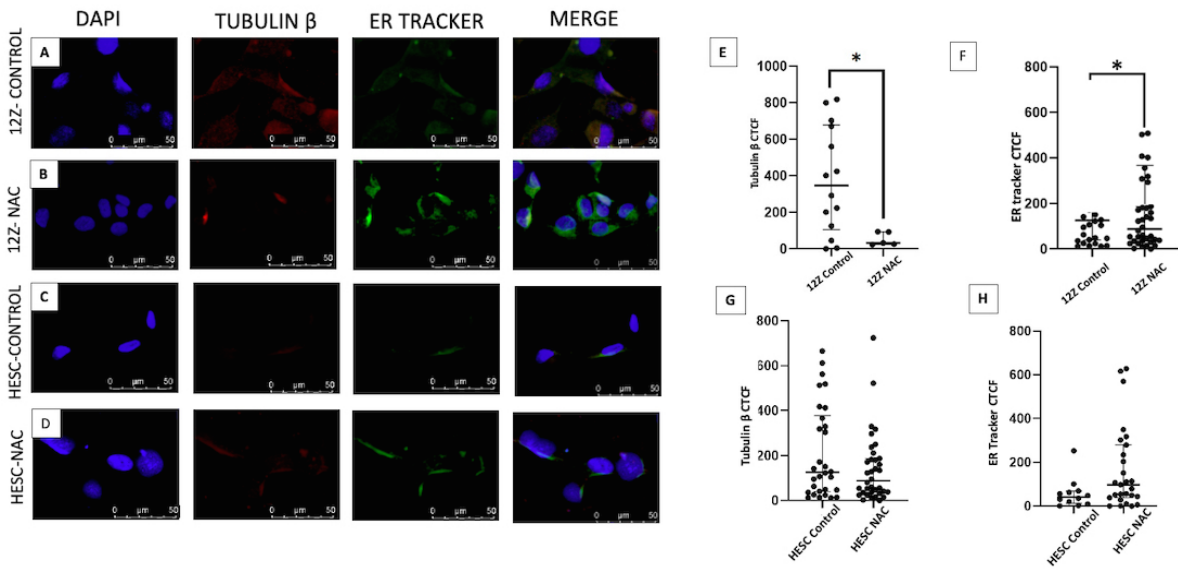


Figure 3. (A) Representative images of 12Z and HESC cells fluorescently labeled with DAPI (blue), β -tubulin (red), and ER tracker (green) are shown in (A, B, C, and D) (FL, scale bar 50 μ M). (E) N-acetyl cysteine exposure was shown to decrease the β -tubulin in 12Z cells compared to controls ($*p < 0,05$), and (F) Dramatically increased ER tracker labeling in 12Z cells compared to untreated 12Z cells ($*p < 0,05$). (G, H) Immunofluorescent labeling of ER Tracker and β -tubulin in HESC cells did not identify any significant variations

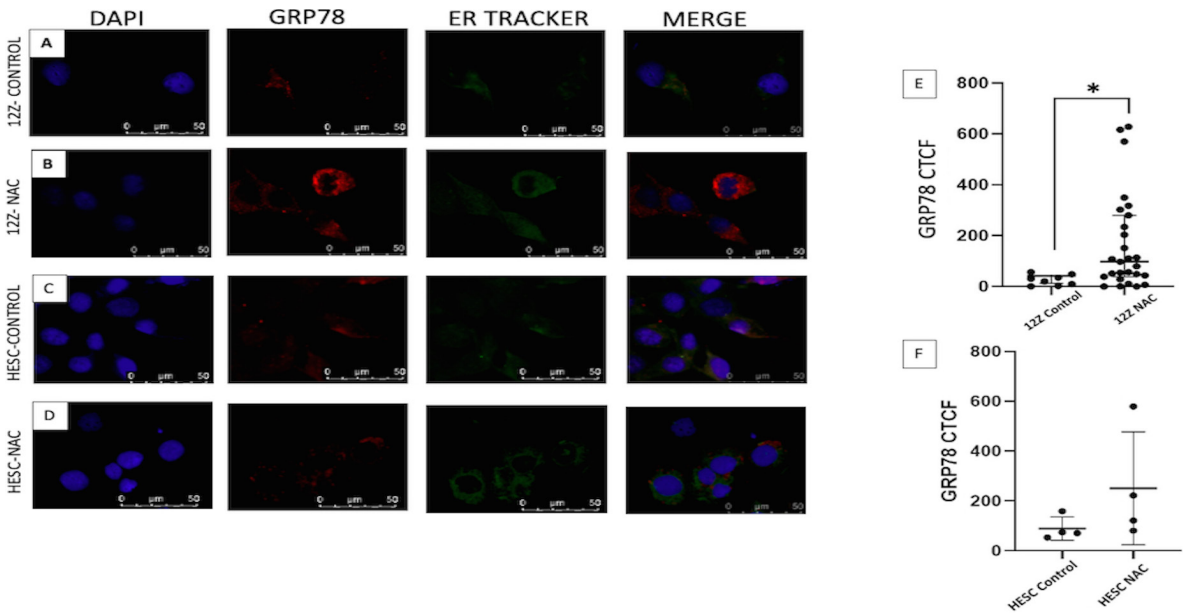


Figure 4. (A) Representative images of 12Z and HESC cells fluorescently labeled with DAPI (blue), GRP78 (red), and ER tracker (green) are shown in (A, B, C, and D) (FL, scale bar 50 μ M). (E) N-acetyl cysteine exposure was shown to increase the GRP78 labeling in 12Z cells compared to controls ($*p < 0,05$), and (F) There were no significant difference when GRP78 was immunofluorescently labeled in HESC cells that had been treated to NAC or just medium.

DISCUSSION

Endometriosis is a severe, chronic disorder that affects women of reproductive age and is associated with infertility and pelvic pain (1). The disease continues to be a major worry for women because of its detrimental consequences on life expectancy, elevated cancer risk, fertility, and reproductive health (1, 3, 4). In addition, there is no effective treatment method for this disease, other than painkillers, anti-inflammatory drugs and laparoscopy (5-8).

Recently, researchers analyzed the potential painkiller N-acetylcysteine (NAC) an antioxidant derivative of the amino acid L-cysteine. Although it has been used as an antidote for acetaminophen abuse, nephropathy, and rare cases of respiratory infections, NAC has only been explored in a few studies for endometriosis (9, 10). So far, the impact of NAC on endometriotic tissue and cells has been investigated, including how it affects oxidative stress, inflammation, pain, the size and weight of endometriotic lesions, and mitochondrial activity, both *in vivo* and *in vitro* (10-13). As a result, we reasoned that the *in vitro* application of IC50 NAC might have an anti-proliferative effect on the human endometriotic cells.

Under a phase contrast microscope, we discovered that human endometriotic cells (12Z) and human endometrial stromal cells (HESC) had similar morphologies and stromal cell features. Like fibroblast cells, the cells exhibited euchromatic nuclei and protracted cytoplasmic extensions. This fits in with the available literature (19). Moreover, we found that 12Z cells proliferated more actively and grew more rapidly than HESC cells. The greater proliferative activity of endometriotic cells *in vitro* was consistent with the results of other studies (20).

We gave cells a dosage screen of 10^{-6} - 10^{-12} M, despite the fact that the majority of researchers supplied NAC in a non-dose-impedance dependent way. In this study, it was determined for the first time in research how NAC influenced endometrial and endometriotic cells throughout the course of time and dose. Due to the doses administered by the xcelligence system, the 12Z cells exposed to NAC tended to decrease their proliferative capacity,

which is compatible with the previous studies (21, 22). Nevertheless, HESC cells did not change their ability to proliferate as a result of the NAC dosages used. Hence, we determined the IC50 for 12Z cells and discovered that it was 3.87×10^{-9} M. The IC50 dose of NAC was administered to 12Z cells and HESC cells in order to examine any potential anti-migratory effects. There was no difference in wound confluence between cell lines at the 0th hour due to NAC. Neither the 12Z control, 12Z NAC, nor the HESC control and HESC NAC groups' wound confluence at the 24th hour was significantly impacted by NAC. At the 48th hour, the wound width measurements between the 12Z control group and the 12Z NAC-applied group were significantly different. At 48 hours, we discovered that the wound confluence of the 12Z cells in the control group was significantly higher than the wound confluence of the 12Z cells in the NAC-applied group. This was in line with the findings of Woo et al.'s study, which revealed that 5 mM NAC reduced the migration capacity of 12Z cells at 24 hours (23). In addition, Su et al. reported that 2 mM NAC inhibited the migration of the endometrial cancer cell line Ishikawa's increased migratory activity due to ROS elevation (24).

We presumed that the potential anti-proliferative and anti-migratory influence of *in vitro* NAC application on endometriotic cells could also result in a reduction in tubulin expression due to the significance of "microtubule dynamics" in cell movement, migration, and the formation of mitotic spindles. In a non-small cell lung cancer cell line, NAC was demonstrated to decrease α - and β -tubulin expression as well as to restrict migration raitos (25); however, the main goal of our investigation on endometriotic cells was to use IC50 and to inhibit migration raitos amid decreased β -tubulin expression. In this study, we showed that β -tubulin fluorescent labeling was present throughout the cytoplasm and around the perinuclear region of endometrial and endometriotic cells. In comparison to the 12Z NAC-applied group, the beta tubulin fluorescent immunolabeling was shown to be stronger in the 12Z control group. As a result, we can conclude that IC50 NAC; decreased β -tubulin protein expression and migration in endometriotic cells over a 48-hour period.

Since NAC has been shown to lessen ER stress in the literature (26), we wanted to find out if endometriotic cells exposed to IC50 NAC exhibited ER stability or instability. Also, we looked into the GRP78 labeling by immunofluorescence in order to see if the process had altered the chaperone protein in the endometrial and endometriotic cells, in addition to ER tracker labeling (14, 16, 17). There were no significant differences between HESC cells treated with NAC or media alone when the ER tracker was immunofluorescence labeled. In 12Z cells, without NAC compared to cells with NAC, ER tracker labeling of the endoplasmic reticulum was considerably reduced. The immunofluorescent labeling of GRP78 in the NAC-treated group was substantially higher than in the medium-treated group in 12Z cells. No significant differences were seen when HESC cells treated to NAC or only media were labeled with immunofluorescence for GRP78.

Contrary to previous studies (26, 27), NAC induced

ER stress on endometriotic cells in our study. In previous studies, it was indicated that NAC would reduce ER stress and scavenge ROS intracellularly (27). However, we found that the IC50 for NAC should be used at a nanomolar concentration in the current study. Given the majority of earlier research relied on milimolar to micromolar doses of NAC, it's possible that just this dosage increased the endometriotic cells' ER stress. As a result, utilizing NAC in a time-dose and impedance-dependent manner helps lower the cell's proliferative and migratory capacity, lowers the expression of the tubulin protein, raises ER stress, and consequently raises the level of chaperone proteins.

From this point forward, we can state that NAC application in a time- and dose-dependent manner can be helpful for treating endometriosis, and if we can complete further in vivo and in vitro functional quantitative studies, NAC could be a potential curative or supportive agent.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was partially supported by the scientific projects of Hacettepe University (#TSA-2021-19011 and # THD-2019-18110). I appreciate Professor Atilla's support in providing NAC for the experiments.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

REFERENCES

1. Falcone T, Flyckt R. Clinical Management of Endometriosis. *Obstet Gynecol*, 2018;131(3):557-71.
2. Saunders PTK, Horne AW. Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. *Cell*, 2021; 184 (11): 2807-824.
3. Broi MGD, Ferriani RA, Navarro PA. Ethnopathogenic mechanisms of endometriosis-related infertility. *JBRA Assist Reprod*, 2019; 23 (3): 273-80.
4. Rolla E. Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *F1000Res*. 2019; 8.

5. Koninckx PR, Fernandes R, Ussia A, Schindler L, Wattiez A, Al-Suwaidi S, et al. Pathogenesis Based Diagnosis and Treatment of Endometriosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021; 12: 745548.
6. Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenge and novel innovations. *Lancet*, 2021;397(10276): 839-52.
7. Filip L, Duica F, Pradatu A, Cretoiu D, Suci N, Cretoiu SM, et al. Endometriosis Associated Infertility: A Critical Review and Analysis on Etiopathogenesis and Therapeutic Approaches. *Medicina (Kaunas)*, 2020; 56 (9).
8. Ye J, Peng H, Huang X, Qi X. The association between endometriosis and risk of endometrial cancer and breast cancer: a meta-analysis. *BMC Womens Health*, 2022; 22 (1): 455.
9. Mohiuddin M, Pivetta B, Gilron I, Khan JS. Efficacy and Safety of N-Acetylcysteine for the Management of Chronic Pain in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pain Med*, 2021; 22 (12): 2896-907.
10. Clower L, Fleshman T, Geldenhuis WJ, Santanam N. Targeting Oxidative Stress Involved in Endometriosis and Its Pain. *Biomolecules*, 2022; 12 (8).
11. Fadin M, Nicoletti MC, Pellizzato M, Accardi M, Baietti MG, Fratter A. Effectiveness of the integration of quercetin, turmeric, and N-acetylcysteine in reducing inflammation and pain associated with endometriosis. In-vitro and in-vivo studies. *Minerva Ginecol*, 2020; 72 (5): 285-91.
12. Li G, Lin Y, Zhang Y, Gu N, Yang B, Shan S, et al. Endometrial stromal cell ferroptosis promotes angiogenesis in endometriosis. *Cell Death Discov*, 2022; 8 (1): 29.
13. Fan L, Guan F, Ma Y, Zhang Y, Li L, Sun Y, et al. N-Acetylcysteine improves oocyte quality through modulating the Nrf2 signaling pathway to ameliorate oxidative stress caused by repeated controlled ovarian hyperstimulation. *Reprod Fertil Dev*, 2022; 34 (10): 736-50.
14. Altonsy MO, Ganguly A, Amrein M, Surmanowicz P, Li SS, Lauzon GJ, et al. Beta3-Tubulin is Critical for Microtubule Dynamics, Cell Cycle Regulation, and Spontaneous Release of Microvesicles in Human Malignant Melanoma Cells (A375). *Int J Mol Sci*, 2020; 21 (5).
15. Al-Hetty HR, Jabbar AD, Eremin VF, Jabbar AM, Jalil AT, Al-Dulimi AG, et al. The role of endoplasmic reticulum stress in endometriosis. *Cell Stress and Chaperones*, 2023.
16. Wang Y, Zhou JS, Xu XC, Li ZY, Chen HP, Ying SM, et al. Endoplasmic reticulum chaperone GRP78 mediates cigarette smoke-induced necroptosis and injury in bronchial epithelium. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2018; 13: 571-81.
17. Kaymak E, Akin AT, Öztürk E, Ceylan T, Kuloğlu N, Karabulut D, et al. Chloroquine Inhibits Adriamycin-Induced Cardiotoxicity In Rats By Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress And Inflammation. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2020; 77 (4): 459-66.
18. Fan H, He Y, Xiang J, Zhou J, Wan X, You J, et al. ROS generation attenuates the anti-cancer effect of CPX on cervical cancer cells by inducing autophagy and inhibiting glycolysis. *Redox Biology*, 2022; 53.
19. Zlatska AV, Rodnichenko AE, Gubar OS, Zubov DO, Novikova SN, Vasyliov RG. Endometrial stromal cells: isolation, expansion, morphological and functional properties. *Exp Oncol*, 2017; 39 (3): 197-202.
20. Hung SW, Zhang R, Tan Z, Chung JPW, Zhang T, Wang CC. Pharmaceuticals targeting signaling pathways of endometriosis as potential new medical treatment: A review. *Med Res Rev*, 2021;41(4):2489-564.
21. Assaf L, Eid AA, Nassif J. Role of AMPK/mTOR, mitochondria, and ROS in the pathogenesis of endometriosis. *Life Sci*, 2022; 306: 120805.
22. Asgari Z, Moini A, Montazeri A, Tavoli Z, Hosseini L, Hosseini R, et al. Comparing the effect of adjunctive N-acetylcysteine plus low dose contraceptive with low dose contraceptive alone on recurrence of ovarian endometrioma and chronic pelvic pain after conservative laparoscopic surgery: a randomised clinical trial study. *J Obstet Gynaecol*, 2022; 42 (5): 1493-7.
23. Woo JH, Choi YS, Choi JH. Iron-Storage Protein Ferritin Is Upregulated in Endometriosis and Iron Overload Contributes to a Migratory Phenotype. *Biomedicines*, 2020; 8 (11).
24. Su H, Guan G, Ahmed RZ, Lyu L, Li Z, Jin X. TBBPA stimulated cell migration of endometrial cancer via the contribution of NOX-generated ROS in lieu of energy metabolism. *J Hazard Mater*, 2020; 400: 123204.
25. Zheng Z, Lin K, Hu Y, Zhou Y, Ding X, Wang Y, et al. Sulforaphane metabolites inhibit migration and invasion via microtubule-mediated Claudins dysfunction or inhibition of autolysosome formation in human non-small cell lung cancer cells. *Cell Death Dis*, 2019; 10 (4): 259.
26. Xu B, Qin Y, Li D, Cai N, Wu J, Jiang L, et al. Inhibition of PDE4 protects neurons against oxygen-glucose deprivation-induced endoplasmic reticulum stress through activation of the Nrf-2/HO-1 pathway. *Redox Biol*, 2020; 28: 101342.
27. Torres S, Baulies A, Insausti-Urkia N, Alarcon-Vila C, Fucho R, Solsona-Villarrasa E, et al. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Upregulation of STARD1 Promotes Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure. *Gastroenterology*, 2019; 157 (2): 552-68.

Çorum ili hemodiyaliz hastalarında influenza ve pnömokok aşılara yaklaşım

Approach to influenza and pneumococcal vaccines in hemodialysis patients in Çorum province

Yasemin ARI YILMAZ¹ (ID), Nihal AYDEMİR² (ID), Hüseyin KAYADİBİ³ (ID), Hilal BOYACI¹ (ID), Burak YILMAZ¹ (ID), Ayşe YILMAZ¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Çalışmada diyalize giren hastaların influenza ve pnömokok aşılara bakış açılarının saptanması ve aşılama oranlarının belirlenmesi amaçlandı.

Yöntem: Bu çalışmaya, diyaliz programında olan ve araştırmaya katılmayı kabul eden 128 hasta dâhil edildi. Eğitim düzeyi, aşılama hakkındaki bilgileri, aşı yaptırmak istemeyenlerin nedenleri, aşılama doktorları tarafından önerilip önerilmediği, hastalığa bakış açıları, daha önce pnömöni ya da influenza nedeni ile hastane yatışlarının olup olmadığı sorgulandı. Verilerin analizi için IBM SPSS 23.0 paket programı kullanıldı. Nominal 75 veriler sayı ve yüzde şeklinde veriler bunların karşılaştırılması için ki-kare testi veya Fisher-exact test kullanıldı. 0.05'ten küçük P değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Hastaların yaş ortancası 54 (39-67) yıl olup, yaş dağılımı 20-90 yıl arasında idi. Hastaların 51 (%39,8)'i kadın, 77 (%60,2)'si erkek idi. 128 hastanın 58'i influenza, 16'sı pnömokok aşısı ile aşılanmıştı.

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was to determine the perspective of patients undergoing dialysis to influenza and pneumococcal vaccines and to determine the vaccination rates.

Methods: 128 patients who were on dialysis program and accepted to participate in the study were included in the questionnaire study. Education levels, their knowledge about vaccinations, the reasons of those who did not want to be vaccinated, whether vaccines were recommended by their doctors, their perspective on the disease, and whether they had hospitalizations due to pneumonia or influenza were questioned. Hitit University licensed IBM SPSS 23.0 package program was used for data analysis. Nominal data were given as numbers and percentages, and chi-square test or Fisherexact test was used to compare them. A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results: The median age of the patients was 54 (39-67) years, and the age distribution was between 20-90 years. 51 (39.8%) of the patients were female, 77 (60.2%) were

¹Hitit Üniversitesi, Göğüs Hastalıkları AD., Çorum
²Hitit Üniversitesi, Nefroloji AD., Çorum
³Osmangazi Üniversitesi, Biyokimya AD., Eskişehir



İletişim / Corresponding Author : Yasemin ARI YILMAZ

Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Merkez / Çorum - Türkiye

E-posta / E-mail : yasminbee07@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 20.10.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 10.01.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.40222

An Yılmaz Y, Aydemir N, Kayadibi H, Boyacı H, Yılmaz B, Yılmaz A. Çorum ili hemodiyaliz hastalarında influenza ve pnömokok aşılara yaklaşım
Türk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(4): 455 - 462

İnfluenza aşısı için 80 kişiye doktor önerisi olduğu halde her yıl düzenli influenza aşısı yaptıran 25 kişiydi. Hangi yılın aşısını yaptırdığına dikkat eden sadece 14 kişiydi. Hastaların 92'si daha önce gripal enfeksiyon geçirmiş, yedi hasta da hastanede yatarak tedavi almıştı. Hastaların %28,9'unun hastalığı önemsemediği ve kolayca iyileşeceğini düşündüğünden aşıdan kaçındığı öğrenildi. Pnömonokok aşısı için ise sadece 37 hastaya pnömonokok aşısı önerildiği ve 14 kişinin bir kez, iki kişinin de iki kez pnömonokok aşısı yaptırmış olduğu görüldü. Hastalardan 13 kişi pnömoni geçirmiş ancak hastane yatışı olmadan hastalığı atlatabilmişti.

Sonuç: Kronik böbrek yetmezliği olan hastalardaki influenza ve pnömonokok aşılamaları; hedeflenen düzeyin altındadır. Hastaların aşılanma oranlarını yükseltmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Hemodiyaliz, influenza, pnömonokok, aşılama

male. 58 of 128 patients were vaccinated with influenza and 16 pneumococcus. Although there was a doctor's recommendation for 80 people for influenza vaccine, 25 people had regular influenza vaccines every year. It was only 14 people who paid attention to which year they had the vaccine. 92 of the patients had a previous flu infection and seven patients had received inpatient treatment. It was observed that most patients did not care about the disease and avoided the vaccine because they thought it would heal easily. For the pneumococcal vaccine, it was observed that pneumococcal vaccine was recommended to only 37 patients and 14 people had pneumococcal vaccine once and two people had pneumococcal vaccine twice. 13 of the patients had pneumonia, but were able to survive the disease without hospitalization.

Conclusion: Influenza and pneumococcal vaccinations in patients with chronic renal failure; below the target level. More studies are needed to raise vaccination rates in patients.

Key Words: Hemodialysis, influenza, pneumococcus, vaccination

GİRİŞ

Sağlık sisteminin ana amacı kişilerin sağlığını korumak ve hasta olmalarını önlemektir. Enfeksiyonlar kronik böbrek yetmezliği (KBY) olan hastalarda ikinci en önemli morbidite ve mortalite nedenidir (1). Baskılanmış immün yetmezlik ve sık hastane ortamında bulunma nedeni ile grip ve pnömoni riski normal popülasyondan daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca yine yetersiz immün cevap nedeni ile de daha ağır seyretmektedir. Diyaliz hastalarında influenza ve pnömonokok aşılamalarının morbidite ve mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (2). Bu nedenle aşılama programları ile hastaların korunması önemlidir (2,3).

İnfluenza AB; Orthomyxoviridae ailesinden

tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Neden olduğu akut solunum yolu hastalığı grip olarak adlandırılır. İnfluenza virüsleri antijenik özelliklerini her yıl değiştirdiğinden, her yıl yeni aşılar üretilmektedir. Kış dönemi salgınlar arttığından her yıl sonbaharda aşının tekrarlanması önerilir (4). KBY'li hastalarda azalmış antikor yanıtı nedeniyle uygulanan yüksek doz influenza aşısının morbidite ve mortaliteyi azaltmaya katkısı gösterilememiştir (1).

Pnömonokok aşısı için biri polisakkarit (PPSV23) diğeri konjuge (PCV13) olmak üzere iki tip pnömonokok aşısı bulunmaktadır. Polisakkarit aşı 23 farklı serotip, konjuge aşı ise toksik olmayan difteri toksinine (CRM197) bağlı 13 farklı serotip içermektedir. Polisakkarit aşı yalnızca B lenfositleri uyarır. Oluşan

antikor ve nötrofil işlevlerini güçlendirir ancak tek başına bağışık hafıza oluşturamaz. Bu nedenle konjuge aşığı takiben en az 8 hafta sonra yapılması önerilmektedir. Ülkemizde 2010 yılından beri konjuge pnömokok aşısı çocuklarda 2, 4 ve 12. aylarda uygulanmaktadır. Erişkin bağışıklama ise 65 yaş üzeri veya risk grubu hastalarda uygulanmaktadır. Hastanın öncelikli PSV 13 ile aşılması ve >8hf-1 yıl sonra PSV 23 ile aşılması önerilmektedir. Önce PSV 23 yapılmış bir hastada 1 yıl sonra PSV 13 ile aşılama

önerilir. Hastanın aşılması 5-10 yılda bir PSV 23 ile tekrarlanmalıdır (5).

İnfluenza ve pnömokok aşıları (polisakkarit) riskli gruplara ücretsiz ödenmektedir. Ülkemiz sağlık uygulama tebliğı ödeme kriterleri Tablo 1'de gösterilmiştir (6).

Çalışmada Çorum ili diyaliz hastalarındaki pnömokok ve influenza aşılama oranlarını saptamak ve düşükse neden düşük olduğunun belirlenmesi amaçlandı.

Tablo 1. Sağlık uygulama tebliğine göre influenza ve pnömokok aşılarının ödenme kriterleri

Grip aşısı bedeli;
<p>* 65 yaş ve üzerindeki kişiler</p> <p>* Yaşlı, bakımevi ve huzurevinde kalan kişilerin bu durumlarını belgelendirmeleri halinde sağlık raporu aranmaksızın; Gebeliğın 2. veya 3. trimesterinde olan gebeler,</p> <p>* Astım dahil kronik pulmoner ve kardiyovasküler sistem hastalığı olanlar,</p> <p>* Diyabet dahil herhangi bir kronik metabolik hastalığı, kronik renal disfonksiyonu, hemoglobinopatisi veya immün yetmezliğı olan veya immünsupresif tedavi alanlar,</p> <p>*6 ay - 18 yaş arasında olan ve uzun süreli asetilsalisilik asit tedavisi alan çocuk ve adolesanların hastalıklarını/gebelik durumunu belirten sağlık raporuna dayanılarak;</p> <p>Tüm hekimlerce her Eylül ila Şubat dönemleri içerisinde reçete edildiğinde bir defaya mahsus olmak üzere sosyal güvenlik kurumu tarafından karşılanmaktadır.</p>
Pnömokok aşısı bedeli (polisakkarit);
<p>* İki yaş üstü çocuklarda ve erişkinlerde,</p> <ul style="list-style-type: none"> - Spleni, dalak disfonksiyonu, splenektomi (medikal, cerrahi ve otosplenektomi) yapılan veya planlanan olgular, - Orak hücre hastalığı, - Çölyak sendromu, - Radyasyon tedavisi, - Organ transplantasyonu - HIV (tüm evreleri) - Tedaviye veya hastalıklara bağılı immün yetmezlik ve immün baskılanma durumları, - Kronik renal hastalık ve nefrotik sendrom, - Kronik kalp hastalıkları, - Astım dahil kronik akciğer hastalıkları, - Siroz dahil kronik karaciğer hastalıkları, - Diyabet dahil herhangi bir kronik metabolik hastalığı, hemoglobinopati, - Doğuştan ve edinilmiş kraniyal defektler - Dermal sinüsler dahil beyin omurilik sıvısı sızıntısına sebep olan durumlarda, <p>*Hastalıklarını belirten sağlık raporuna dayanılarak tüm hekimlerce reçete edilmesi halinde 5 yılda bir sosyal güvenlik kurumu tarafından karşılanmaktadır.</p> <p>*65 yaş ve üzerindeki kişilere ise rapor aranmaksızın beş yılda bir defa olmak üzere sosyal güvenlik kurumu tarafından karşılanmaktadır.</p>

GEREÇ ve YÖNTEM

Kronik böbrek yetmezliği nedeni ile diyaliz programında olan hastalar bilgilendirildi. Ekim-Kasım 2021 tarihleri arası çalışmaya katılmayı kabul eden 128 hasta çalışmaya alındı. 8 hasta katılmadı. Hastaların influenza ve pnömokok aşılara olan yaklaşımı ve aşılama düzeylerinin saptanması amaçlandı. Anketler çalışma yazarları tarafından oluşturuldu. Hastalar soruları kendileri (self-test) yanıtladılar. Hastaların eğitim düzeyi, aşılama hakkındaki bilgileri, aşı yaptırmak istemeyenlerin nedenleri, aşılama doktorları tarafından önerilip önerilmediği, daha önce pnömöni ya da influenza nedeni ile hastane yatışlarının olup olmadığı sorgulandı.

Verilerin analizi için Hitit Üniversitesi lisanslı IBM SPSS 23.0 paket programı kullanıldı. Nominal

veriler sayı ve yüzde şeklinde verilerek bunların karşılaştırılması için ki-kare testi veya Fisher's exact test kullanıldı. 0.05'ten küçük P değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bu çalışma, Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 08.09.2021, Karar no: 460).

BULGULAR

Çalışmaya hastanemizde diyalize alınan 128 kronik böbrek yetmezlikli hasta alındı. Hastaların yaş ortancası 54 (39-67) yıl olup yaş dağılımı 20-90 yıl arasında idi. Hastaların 51 (%39,8)'i kadın 77 (%60,2)'si erkek idi. Hastaların yaş dağılımları, eğitim düzeyi ve ek hastalıkları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Hastaların genel özellikleri ve aşılama düzeyleri

Yaş	Sayı (%)	İnfluenza Aşısı Olma Oranı (%)	Pnömokok Aşısı Olma Oranı (%)
20 yaş ve altı	3 (2,3)	1/3 (0,33)	0/3 (0,00)
21-35	9 (7,1)	4/9 (0,44)	3/9 (0,33)
36-50	17 (13,3)	10/17 (0,59)	2/17 (0,12)
51-65	46 (35,9)	21/46 (0,46)	8/46 (0,17)
65 yaş ve üzeri	53 (41,4)	22/53 (0,42)	3/53 (0,06)
		58/128 (0,45)	16/128 (0,13)
Cinsiyet			
Kadın	51 (39,8)	22/51 (0,43)	8/51 (0,16)
Erkek	77 (60,2)	36/77 (0,47)	8/77 (0,10)
		58/128 (0,45)	16/128 (0,13)
Eğitim düzeyi			
Okur-yazar	9 (7,1)	6/9 (0,67)	0/9 (0,00)
İlkokul	76 (59,4)	35/76 (0,46)	9/76 (0,12)
Ortaokul	18 (14,1)	4/18 (0,22)	3/18 (0,17)
Lise	15 (11,7)	7/15 (0,47)	3/15 (0,20)
Üniversite	9 (7,1)	6/9 (0,67)	1/9 (0,11)
Yüksek Lisans	1 (0,8)	0/1 (0,00)	0/1 (0,00)
		58/128 (0,45)	16/128 (0,13)
Ek Hastalıkları			
Akciğer Hastalığı	14 (10,9)	4/14 (0,28)	1/14 (0,07)
Kalp Hastalığı	30 (23,5)	16/30 (0,53)	4/30 (0,13)
Kanser	4 (3,1)	1/4 (0,25)	1/4 (0,25)
Ek Hastalığı Yok	80 (62,5)	37/80 (0,46)	10/80 (12,5)
	128 (100)	58/128	16/128

Hastaların 45,3'ü influenza 12,5'i pnömokok ile aşılanmıştı. Hastaların aşılanma oranları ile yaşları (p:0,239); cinsleri (p:0,234) ve eğitim düzeyleri arasında (p:0,189) istatistiksel anlamlı farklılık izlenmedi.

Anketler incelendiğinde 81 (%63) kişiye doktor önerisi olduğu halde her yıl düzenli influenza aşısı yaptıran sadece 25 (%20) kişiydi. Hangi yılın aşısını yaptırdığına dikkat eden sadece 14 (%11) kişiydi. Hastaların 92 (%72)'si daha önce grip geçirmiş, 7 (%6) hasta da hastanede yatarak tedavi almıştı. Hastane

yatışı olan hastaların 5 (%3,9)'i hiç aşısız; 2 (%1,5)'i düzenli aşı yaptırmayan hastalardı. Hastaların 37 (%28,9)'si gribi önemsemediğini kolayca ıyileşeceğini düşündüğünden aşıdan kaçındığını belirtti (Tablo 3).

Hastalardan sadece 37 (%28,9) hastaya pnömokok aşısı önerildiği ve %10,9 (14) kişinin bir kez %1,5 (2) kişinin de iki kez pnömokok aşısı yaptırmış olduğu görüldü (Tablo 4). Hastalardan 13 kişi pnömoni geçirmiş ancak hastane yatışı olmadan hastalığı atlatabilmişti. Tamamı aşısızdı.

Tablo 3. İnfluenza aşısı anket sonuçları

İnfluenza Aşısı Yaptırdı mı?	Sayı	%
<input type="checkbox"/> Hiç yaptırmadı:	66	(0,52)
<input type="checkbox"/> Hayat boyu 1 kez	28	(0,21)
<input type="checkbox"/> 3-5 yılda 1 kez	9	(0,07)
<input type="checkbox"/> Her yıl 1 kez	25	(0,20)
Aşığı Kim Önerdi?		
<input type="checkbox"/> Doktor	81	(0,63)
<input type="checkbox"/> Eş Dost Akraba	6	(0,05)
<input type="checkbox"/> Radyo televizyon	1	(0,01)
<input type="checkbox"/> İlk duyuyorum	40	(0,31)
Aşı Önerildi İse Red Nedeni?		
<input type="checkbox"/> Gerekli Bulmama	16	(0,13)
<input type="checkbox"/> Diğer Yöntemlerle Korunma	5	(0,04)
<input type="checkbox"/> Aşı Spekülasyonları ve Kafa Karışıklığı	12	(0,09)
<input type="checkbox"/> Gribi Önemsememe ve Kolayca İyileşirim Düşüncesi	37	(0,29)
Grip geçirdi mi?		
<input type="checkbox"/> Evet	92	(0,72)
<input type="checkbox"/> Hayır	36	(0,28)

Tablo 4. Pnömonok aşısı anket sonuçları

Pnömonok Aşısı Yaptırdı mı?	Sayı	%
<input type="checkbox"/> Hiç yaptırmadı:	112	(0,87)
<input type="checkbox"/> Hayat boyu 1 kez	14	(0,11)
<input type="checkbox"/> Hayat boyu 2 kez	2	(0,02)
<input type="checkbox"/> Hayat boyu 3 kez	0	(0,00)
Aşığı Kim Önerdi?		
<input type="checkbox"/> Doktor	37	(0,29)
<input type="checkbox"/> Eş Dost Akraba	0	(0,00)
<input type="checkbox"/> Radyo televizyon	4	(0,03)
<input type="checkbox"/> İlk duyuyorum	87	(0,68)
Aşı Önerildi İse Red Nedeni?		
<input type="checkbox"/> Gerekli Bulmama	26	(0,20)
<input type="checkbox"/> Diğer Yöntemlerle Korunma	15	(0,12)
<input type="checkbox"/> Aşı Spekülasyonları ve Kafa Karışıklığı	24	(0,19)
<input type="checkbox"/> Pnömoniyi Önemsememe ve Kolayca İyileşirim Düşüncesi	26	(0,20)
Pnömoni geçirdi mi?		
<input type="checkbox"/> Evet	13	(0,10)
<input type="checkbox"/> Hayır	115	(0,90)

TARTIŞMA

Kronik böbrek yetmezlikli hastalarda üremi, lenfopeni, bozulmuş makrofaj ve nötrofil fonksiyonları, anormal fagositoz ve T hücre yanıtı gibi nedenlerle enfeksiyonlara eğilim artmıştır. Enfeksiyonlar kronik kalp hastalıklarından sonra mortalitenin ikinci önemli nedenidir. Ayrıca enfeksiyonların %20'sinin akciğer kaynaklı ve önlenbilir olması aşılama programlarının önemini daha da artırmaktadır. İnfluenza ve

pnömonok aşılamasının hastalarda hastaneye ve yoğun bakım ünitesine yatışı azalttığını ve ölümleri önlediğini gösteren çok sayıda çalışmalar mevcuttur (7-11). Yine pnömonokoksik pnömoninin pnömonok aşılamaları ile önüne geçilebildiği bilinmektedir (11,12).

Çalışmada influenza ve pnömonok aşı oranlarının dünya sağlık örgütü önerilerinin altında kaldığı ve bu durumun bilgi ve öneri eksikliğine bağlı olduğu görülmüştür. Çalışmada İnfluenza aşısı yaptıran kişi

%48, pnömokok aşısı yaptıran kişi %13 kadardı. Bu hastalar haftada 2-3 gün diyaliz programında olan ve sık hastane başvuruları olan hastalar olmasına rağmen aşılar ve hastalık konusunda yeterli bilgiye sahip değillerdi. İnfluenza için %31, pnömokok için %68 hasta aşı hakkında bilgi sahibi değildi. Tablo 5’de kronik böbrek yetmezlikli yada risk grubunda olan hasta gruplarında yapılmış çalışmalardaki aşılama oranları verilmiştir. Aşılama oranlarının influenza için %18,3-57,2; pnömokok için %3,3-17,6 arasında olduğu gözlenmiştir (13-20).

Bu veriler aşılama oranlarının yetersizliğinin yıllar içinde değişmediğini ve sadece ülkemizde olmadığını göstermektedir. Ayrıca çalışmada hastaların yaşları

cinsiyetleri ve eğitim düzeyleri ile aşılama oranları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Ülkemizde erişkin aşı kayıtlarının ve takiplerinin yetersiz olması nedeniyle çalışmadaki kişi sayısı anket yapılan hastalarla sınırlı kalmıştır.

Çalışmada kronik böbrek yetmezlikli hastalardaki influenza ve pnömokok aşılama oranları; hedeflenen düzeyin altındadır. Benzer çalışmalara bakıldığında yıllar içinde ilerleme kaydedilemeyen aşılama oranlarının artırmak için acilen çeşitli stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Risk grubunda olan hastalardaki morbidite mortalite oranları ve sekonder sağlık harcamalarının bu şekilde azaltılabileceği düşünülmektedir.

Tablo 5. Literatürdeki benzer çalışmalar

Çalışmalar	Hasta sayısı	İnfluenza Aşılama Oranı %	Pnömokok Aşılama Oranı %
Lale özışık ve ark 2016 (13)	155 Risk grubu	29,7	17,2
Fatma çiftçi ve ark 2017 (14)	259 Risk grubu	33,4	9,9
Ayşe Erbay ve ark 2018 (15)	81 Kby	48,2	3,7
Emrah günay ve ark.2020 (16)	120 Kby	18,3	3,3
Aşkın Mutlu ve ark 2021 (17)	360 Kby	51,4	14,4
Ada Gawryś and et al.2021(18)	193 Kby	45	...
Lykke Larsen and et al 2021(19)	220 Kby	41,8	4
Tae Un Yang and et al.2015(20)	491 Risk grubu	57,2	17,6

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 08.09.2021, Karar no: 460).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

- Bond TC, Spaulding AC, Krisher J, McClellan W. Mortality of Dialysis Patients According to Influenza and Pneumococcal Vaccination Status. *Am J Kidney Dis*, 2012; 60 (6): 959-65.
- Mo Y, Zeng J, Xiao C, Zhang L, Wang L, Lu ,F et al. Effectiveness and safety of pneumococcal vaccines used alone or combined with influenza vaccination in dialysis patients: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*, 2020; 38 (47): 7422-32.
- Çeviker SA, Tahmaz A. Hemodiyaliz Hastalarında Solunum Yolu Enfeksiyonları ve Korunma. *Black Sea J Health*, 2019; 2 (3): 85-9.
- Grohskopf LA, Alyanak E, Ferdinands JM, Broder KR, Blanton LH, Talbot HK, et al. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2021-22 Influenza Season. *MMW. Recommendations and Reports*, 2021; 27; 70 (5): 1-28.
- Matanock A, Lee G, Gierke R, Kobayashi M, Leidner A, Pilishvili T. Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine Among Adults Aged ≥ 65 Years: Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immuniz. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2019 Nov 22; 68 (46): 1069-75.
- Güncel Sağlık Uygulama Tebliği. (Resmi Gazete: 24.03.2013 - 28597).
- Köksal İ. Türkiye Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği, Erişkin Bağışıklama Rehberi, 2019; 1-131.
- Çavdar C, Sifil A, Çamsan T. İnfluenza Enfeksiyonu ve İnfluenzadan Korunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 1999; 3: 100-7.
- Schulte K, Schierke H, Tamayo M, Hager L, Engehausen R, Raspe M, et al. Strategies for Improving Influenza Vaccination Rates in Patients with Chronic Renal Disease. *Dtsch Arztebl Int*, 2019; 116 (23-24): 413-9.
- Chung JR, Rolfes MA, Flannery B, Prasad P, O'Halloran A, Garg S, et al. Effects of Influenza Vaccination in the United States During the 2018-2019 Influenza Season. *Clin Infect Dis*, 2020; 71 (8): 368-76.
- Wang K, Lin C, Lin P, Liang C, Liu Y, Chang C et al. Effectiveness of influenza vaccination in patients with end-stage renal disease receiving hemodialysis: a population-based study. *Plos One*, 2013; 8 (3): e58317.
- Şenol E, Azap A, Erbay A, Alp-Çavuş S, Karakuş R, Acar A. Erişkin Bağışıklamasının Hedefindeki Aşılarından Biri Olarak Pnömonokok Aşısı: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Erişkin Bağışıklaması Çalışma Grubu Uzlaşım Raporu. *Klimik Dergisi*, 2018; 31 (1): 2-18.
- Özışık L, Yekedüz E, Durusu Tanrıöver M, Helvacı Ö, Çalık Başaran N, Ünal S. Risk Altındaki Erişkinlerin Pnömonokok ve İnfluenza Aşılama Oranları ve Aşısı Karşı Tutumlar. *Flora*, 2016; 21 (1): 15-20.
- Çiftçi F, Şen E, Demir N, Kayacan O. Hastaların influenza aşısına karşı düşünce ve tutumlarını hangi faktörler etkiler? *Tüberk Toraks*, 2017;65(4):308-16.
- Erbay A, Kader Ç, Ede H, Süher M, Akyol L, İntepe YS, et al. Yozgat Bozok Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne Başvuran Risk Gruplarında ve ≥ 65 Yaşındaki Erişkinlerde İnfluenza ve Pnömonokok Aşılama Durumu. *Klimik*, 2018; 31(3): 205-9.
- Günay E, Kaya Ş, Yüksel E. Hemodiyalizde kör nokta: Aşılama. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2020; 77 (2): 149-54.
- Mutlu, Aşkın, Erkan Şengül, and Gülşah Boz. "A cross-sectional survey study on influenza and pneumococcal vaccination rates and the factors affecting vaccination rates in hemodialysis patients in Kocaeli Province of Turkey." *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 26.3 (2022): 640-648.
- Gawryś A, Gołębiowski T, Zielińska D, Augustyniak-Bartosik H, Kuriata-Kordek M, Szenborn L, et al. Knowledge, Attitudes and Practices of Flu Vaccination in Hemodialysis Patients. *Vaccines (Basel)*, 2021; 22; 9 (2): 77.
- Larsen L, Bistrup C, Sørensen SS, Boesby L, Nguyen MTT, Somuncu Johansen I. The coverage of influenza and pneumococcal vaccination among kidney transplant recipients and waiting list patients: A cross-sectional survey in Denmark. *Transpl Infect Dis*, 2021; 23(3): e13537.
- Yang TU, Song JY, Noh JY, Cheong HJ, Kim WJ. Influenza and Pneumococcal Vaccine Coverage Rates among Patients Admitted to a Teaching Hospital in South Korea. *Infect Chemother*, 2015; 47 (1): 41-8.

Platelet mass index - a pre-diagnostic tool for infectious mononucleosis

Trombosit kütle indeksi - enfeksiyöz mononükleoz için ön tanı aracı

Yasemin ARDIÇOĞLU AKIŞIN¹ (ID), Gökçe Su TAŞTAN² (ID), Nejat AKAR³ (ID), Mustafa TURAN⁴ (ID)

ABSTRACT

Objective: As a member of the human herpesvirus family, Epstein-Barr virus (EBV) primarily replicates in lymphocytes but also may replicate in the epithelial cells of the pharynx and parotid duct. The infection is spread primarily by saliva and the incubation period is four to eight weeks. Infectious mononucleosis (IM) is a clinical syndrome caused by EBV that is particularly common in adolescents and children. Typical features of IM include fever, pharyngitis, adenopathy, malaise, and an atypical lymphocytosis. Splenomegaly, hepatomegaly, jaundice, and splenic rupture can occur. The platelet mass index (PMI) is related to platelet functionality and platelet function has an effect on the inflammation cascade. This study is planned to examine the role of PMI in the pre-diagnosis of IM.

Methods: Between the years 2010-2019, 274 patients who were tested for EBV antibodies were included in the study and the PMI values of EBV positive group was compared to EBV negative and the control group.

Results: EBV positive group has lower PMI values than EBV negative and control group.

ÖZET

Amaç: İnsan Herpesvirüs ailesinin bir üyesi olan Epstein-Barr virüs (EBV) başta lenfositler olmak üzere farens ve parotis kanalının epitel hücrelerinde çoğalmaktadır. Tükürük yoluyla yayılan enfeksiyonun kuluçka süresi dört ile sekiz haftadır. Enfeksiyöz mononükleoz (EM), özellikle ergenlerde ve çocuklarda yaygın olan EBV'nin neden olduğu bir hastalıktır. EM'nin tipik özellikleri arasında ateş, farenjit, adenopati, halsizlik ve atipik lenfositöz bulunmakta ve splenomegali, hepatomegali, sarılık ve dalak rüptürü meydana gelebilmektedir. Trombosit kütle indeksi (TKİ), trombosit işlevselliği ile ilişkilidir ve trombositlerin inflamasyon kaskadına etkisi konusunda bilgi verebilmektedir. Bu çalışma, EM ön tanısında TKİ'nin rolünü incelemek amacıyla planlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya 2010-2019 yılları arasında EBV antikoru testi yapılan 274 hasta dahil edilmiştir. EBV antikoru pozitif grubun TKİ değerleri EBV antikoru negatif olan grup ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: EBV pozitif grubun, EBV negatif ve kontrol grubuna göre daha düşük TKİ değerlerine sahip olduğu saptanmıştır.

¹TOBB Economy and Technology University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Ankara

²TOBB Economy and Technology University, Faculty of Medicine, 6th year student, Ankara

³TOBB Economy and Technology University, Faculty of Medicine, Department of Medical Education, Ankara

⁴TOBB Economy and Technology University, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Yasemin ARDIÇOĞLU AKIŞIN

Yaşam Cad. No: 5 Söğütözü 06510 Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 06.02.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 05.04.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.22309

Ardıçoğlu Akışın Y, Taştan GS, Akar N, Turan M. Platelet mass index - a pre-diagnostic tool for infectious mononucleosis.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(4): 463 - 468

Conclusion: EPMI can be easily calculated using a CBC test and can be used as a pre-diagnostic tool for the existence of IM.

Key Words: Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, platelet mass index

Sonuç: Tam kan sayımı değerlendirilirken TKİ kolayca hesaplanabilmektedir. Elde edilen veriler klinik olarak EM şüphesi olduğunda ön tanı aracı olarak TKİ'nin yol gösterici olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Epstein-Barr virüs, enfeksiyöz mononükleoz, trombosit kütle indeksi

INTRODUCTION

In developing countries and in socioeconomically disadvantaged populations of industrialized countries, primary Epstein-Barr virus (EBV) infection usually occurs during infancy and early childhood and is generally asymptomatic or only mildly symptomatic. In more affluent populations in industrialized countries, infection during early childhood is still more common but about one-third of cases of infection occur during adolescence and early adulthood (1).

EBV, a member of the human herpesvirus family, is a linear, double-stranded DNA virus that was initially isolated from a cultured Burkitt lymphoma cell line by Epstein et al in 1964. EBV primarily replicates in lymphocytes but also may replicate in the epithelial cells of the pharynx and parotid duct. The infection is spread primarily by saliva (oral transmission), and the incubation period is four to eight weeks (2, 3).

Infectious mononucleosis (IM) is a clinical syndrome caused by EBV that is particularly common in adolescents and children. The vast majority of persons with IM, especially children, recover uneventfully without any complications, although a wide range of clinical complications of acute IM has been reported (1). Symptomatic treatment, the mainstay of care, includes adequate hydration, analgesics, antipyretics, and adequate rest (3).

Platelets are non-nucleated cells in blood that are produced in bone marrow and derived from megakaryocytes. Besides stopping bleeding

and achieving hemostasis, they play a role in inflammation due to the activation of cytokines. Inflammation changes the structure of platelets and causes alterations in mean platelet volume (MPV) (4).

The platelet mass index (PMI) is related to platelet functionality; a new concept that is used in the Neonatal Intensive Care Unit. Nowadays, in order to reduce unnecessary transfusions, utilizing the PMI is investigated. In very-low-birth-weight infants, those infants with severe bronchopulmonary dysplasia (BPD), necrotizing enterocolitis (NEC), retinopathy of prematurity (ROP) were more likely to have lower PMI compared to those without these morbidities. In addition, infants with early onset neonatal sepsis (EOS), late onset neonatal sepsis (LOS) and respiratory distress syndrome and infants who required surfactant and mechanical ventilation had a decrease in PMI (4-6).

Considering that low PMI indicates platelet function, and platelet function affects the inflammation cascade, we planned to examine the role of PMI in the pre-diagnosis of IM.

MATERIAL and METHOD

The study was performed at the TOBB Economy and Technology University, Faculty of Medicine Department of Paediatrics. In the age range of 0-15 years, 274 patients were investigated retrospectively. Complete blood counts (CBC) and EBV antibodies used for the diagnosis of IM of these patients were analysed

on the day they were admitted to the hospital.

Blood samples were collected into 2-mL (K2) EDTA vacutainer tubes (Becton Dickinson, USA) for CBC and into 8,5-mL SST™ II Advance vacutainer tubes (Becton Dickinson, USA) for serological analysis. All whole samples were kept at room temperature (18-25°C) until testing and were processed within 30 minutes from venepuncture. Sera were separated after centrifugation at 4500 rpm for 10 minutes, stored at 2-8°C and analysed for EBV antibodies on the same day.

CBC was analysed using Sysmex XN-1000 (Sysmex Co., Japan), C-reactive protein (CRP) and ferritin levels using Cobas 6000 (Roche Diagnostics Co., Mannheim, Germany) and EBV IgM (Anti-VCA (Viral capsid antigen) GP 125 IgM, anti-VCA P19 IgM, anti EBNA-1 (EBV Nuclear Antigen) IgM, anti P22 IgM and anti-EA-D (Early Antijen) IgM antibodies) using Euroline Anti-EBV Profile 2-IgM (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany)

Patients were diagnosed as IM if they were positive for EBV Anti-VCA G IgM and anti-EA IgM antibodies. 44 patients out of 274 were diagnosed as IM regarding

to this condition. Control group was formed from 41 patients between the ages 1 and 15 who were admitted to same department. We defined Group 1 (n=44) as EBV positive, group 2 as EBV negative (n=230) and Group 3 (n=41) as control.

In order to exclude anemia or infection, ferritin value above 20 ng/ml (normal range: 7,0-140 ng/ml), leukocyte count under $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ (normal range: 4,5-11,0 $\times 10^3/\mu\text{l}$) and CRP level under 5 mg/L (normal range : 0-5,0 mg/L) were taken as inclusion criteria for the control group. All CBC parameters were within the reference ranges and there was no transfusion history within the previous 30 days.

PMI values were calculated by analysing the blood counts of both groups using the formula: PMI = mean platelet volume (MPV) x Platelet count/1000. Mean, median and standard deviation values (SD) are calculated individually for the groups. The results of internal quality control (XN Check) and external quality control (College of American Pathologist, Hematology Auto Differentials) results were given in Table 1.

Table 1. The results of internal and external quality control

			Mean	SD	CV*
Internal Quality Control	Platelet count ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Level 1	85	4,0	4,8
		Level 2	256	9,0	3,5
		Level 3	607	10,4	1,7
	MPV (fL)	Level 1	8,5	0,25	2,9
		Level 2	9,2	0,13	1,4
		Level 3	8,9	0,07	0,8
External Quality Control	Platelet count ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Level 1	512,9	11,5	2,2
		Level 2	1403	6,1	0,4
		Level 3	337,5	7,8	2,3
		Level 4	228,1	6,3	2,8
		Level 5	54,6	2,7	4,9
	MPV (fL)	Level 1	9,44	0,13	1,4
		Level 2	9,58	0,26	2,7
		Level 3	9,71	0,12	1,2
		Level 4	9,65	0,17	1,8
		Level 5	10,06	0,32	3,2

* CV: coefficient of variation

Statistical analyses were performed using commercially available statistical software package (SPSS, version 18, Chicago, IL, USA). For the statistical comparison of the variables between the control and study groups (group 1, group 2 and group 3) ANOVA test was used. p values < 0.05 were considered to indicate statistical significance.

The study was approved by the TOBB Economy and Technology University, Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 18.01.2023 and

Number: KAEK-118/149).

RESULTS

UPMI values of group 1 and 2 (Table 2), group 1 and 3 (Table 3), and group 2 and 3 (Table 4) were compared to see the difference between the groups. A statistically significant difference was found between EBV positive and negative group and EBV positive and control group ($p<0,05$).

Table 2. Group 1 and group 2 PMI mean, SD and P-values

	Group 1 (EBV Positive) (N=44)	Group 2 (EBV Negative) (N=230)	P-Values
PMI	2340±725	2707±823	0.013*

*statistically significant ($p<0,05$)

Table 3. Group 1 and group 3 PMI mean, SD and P-values

	Group 1 (EBV Positive) (N=44)	Group 3 (Control) (N=41)	P-Values
PMI	2340±725	2742±565	0.048*

*statistically significant ($p<0,05$)

Table 4. Group 2 and group 3 PMI mean, SD and P-values

	Group 2 (EBV Negative) (N=230)	Group 3 (Control) (N=41)	P-Values
PMI	2707±823	2742±565	0.961

DISCUSSION

Infectious mononucleosis is a disease caused by EBV and notably seen in infancy, early childhood and adolescents. Typical features of IM include fever, pharyngitis, adenopathy, malaise, and an atypical lymphocytosis. Splenomegaly, hepatomegaly, jaundice, and splenic rupture can occur in patients

with IM, but these complications are rare (3). Up to 98% of all patients with IM have sore throat, lymphadenopathy, fever, fatigue, and tonsillar enlargement. Pharyngeal inflammation (85%) and transient palatal petechiae (50%) are also common. Bilateral posterior cervical lymphadenopathy is typical, but anterior cervical lymphadenopathy is possible (7). The syndrome is characterized by an

absolute and relative lymphocytosis, an increased proportion of atypical lymphocytes and positive heterophile antibody test (3). The antibodies (Anti-VCA, Anti EBNA and anti-EA) to EBV-associated antigens are used for diagnosis of primary and past infection. Additionally, easily accessible laboratory tests can be used for pre-diagnosis of IM.

Akişin et al. investigated the relationship between Platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) and IM positivity. They showed that PLR value is lower for IM positive group when the cut-off value is 48. If the cut-off value was taken as 48, sensitivity and specificity were found to be 50% and 95%, respectively. On this basis, they supported that low PLR values can be used as a pre-test for IM (8).

Apart from stopping bleeding and sustaining hemostasis, platelets play incredibly important roles in inflammation, like primary cells leading to cytokine release, such as T-lymphocytes and macrophages. Platelets are affected by this “cytokine storm” and have diverse responses. Three different types of granules (α -granules, dense granules and lysosomes) are secreted from platelets when they are activated by cytokines in inflammation. These released chemokines have been shown to play a role in the early immune response as acute phase reactants; function as neutrophils, granulocytes and monocytes; and even have direct antimicrobial effects. It has been reported that in cases of inflammation, depolymerization of the microtubules and alterations in the actin polymerization structure of the platelets lead to change in shape and a decrease in the size of the platelets. This mechanism has been the source for many studies investigating changes in mean platelet volume (MPV) in many diseases (4).

PMI is associated with platelet functionality

because larger platelets are enzymatically more active than smaller ones (6). It is also a new parameter that has been investigated in a variety of diseases. Kahvecioglu et al. reported that, in order to prevent unnecessary platelet transfusions in NICU, they utilized PMI values. They found that if transfusion decisions made with the current guideline and due to PMI values, there was an 11.5% reduction in platelet transfusions. They supported considering PMI values for lower transfusion rates (9).

Okur et al.'s study on PMI and inflammation-related morbidities of prematurity including sepsis in very low birth weight infants, indicated that premature infants with these morbidities had lower PMI levels in early postnatal life than infants without these diseases and stated that this relationship could be associated with the role of platelet function (which is related to PMI) in the inflammatory process (4). İlhan et al. found PMI lower in the severe transient tachypnea of the newborn and indicated that low PMI reflects platelet function which contributes to the initiation of inflammatory cascades (6).

Considering that the internal and external quality control results and coefficient of variation values for platelet count and MPV were within acceptable limits (CVs < 5%), in our study, we found that EBV positive group has lower PMI values than EBV negative and control group (10). Therefore, we can interpret that lower PMI values can be used as a parameter for the pre-diagnosis of IM disease in the paediatric population.

In conclusion; measuring EBV specific antibodies is a complicated, time consuming process and not an easy way to access in small healthcare centers. Besides PMI can be easily calculated using a CBC test and can be a useful pre-diagnostic tool for the existence of IM.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the TOBB Economy and Technology University, Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 18.01.2023 and Number: KAEK-118/149).

CONFLICT OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

REFERENCES

1. Jenson HB. Acute complications of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Curr Opin Pediatr*, 2000; 12: 263-8.
2. Rezk SA, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Human Pathology*, 2007; 38: 1293-304.
3. Ebell MH. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Am Fam Physician*, 2004; 70: 1279-87.
4. Okur N, Buyuktiryaki M, Uras N. Platelet mass index in very preterm infants: can it be used as a parameter for neonatal morbidities? *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2016; 29: 3218-22.
5. Korkmaz L, Bastug O, Ozdemir A. Can Platelet Mass Index be a Parameter to Predict Intraventricular Hemorrhage in Very-Low-Birth-Weight Newborns? *Am J Perinatol*, 2019; 36: 1188-97.
6. Ilhan O, Bor M. Platelet mass index and prediction of severity of transient tachypnea of the newborn. *Pediatr Int*, 2019; 61: 697-705.
7. Womack J, Jimenez M. Common questions about infectious mononucleosis. *Am Fam Physician*, 2015; 91: 372-6.
8. Akisin YA, Karagoz ZN, Turan M. The role of platelet-to-lymphocyte ratio in the diagnosis of infectious mononucleosis. *Acta Medica Mediterranea*, 2017; 33: 1081.
9. Kahvecioglu D, Erdeve O, Alan S. The impact of evaluating platelet transfusion need by platelet mass index on reducing the unnecessary transfusions in newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2014; 27: 1787-9.
10. <https://www.westgard.com/lesson34.htm>

Ön saftaki hemşirelerin bakış açısından COVID-19 yönetimindeki zorluklar

Challenges in the management of COVID-19 from front-line nurses' perspective

Keziban AVCI¹ (ID), Gülfigar GÜLKAYA² (ID)

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, COVID-19 hastalarına bakım veren hemşirelerin karşılaştığı zorlukları incelemektir. Sonuçların politika yapıcılara sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesine yönelik öneri ve destek sağlayabileceği öngörülmüştür.

Yöntem: Bu çalışmada nitel araştırma yöntemlerinden biri olan odak grup görüşmesi yöntemi kullanılmıştır. Katılımcılar, görüşmeye katılmayı kabul eden ve Ankara'daki bir eğitim ve araştırma hastanesinde aktif olarak COVID-19 ünitesinde çalışan 12 hemşireden oluşmaktadır. Çalışmada her biri yaklaşık bir saat süren 2 odak grup görüşmesi gerçekleştirilmiştir. Görüşme Haziran 2020'de çevrimiçi bir toplantı programı kullanılarak yapılmıştır ve elde edilen nitel veriler kaydedilmiştir. Kaydedilen görüşmeler yazıya aktarılmış ve yorumlanmıştır. Odak grup görüşmelerinden elde edilen veriler konu ve kavrama göre gruplandırılmış ve katılımcıların ifadeleri bu gruplamalara sayısal olarak atanmıştır. Nitel verilerin analizinde altı tema ortaya çıkmıştır.

ABSTRACT

Objective: The purpose of the study was to examine the difficulties faced by nurses caring for patients with COVID-19. It was anticipated that results might provide policymakers with suggestions and support regarding the improvement of the healthcare services.

Methods: This study used the focus-group interview method which is the one of the qualitative methods. The participants were 12 nurses who agreed to attend an interview and actively working COVID-19 unit in an education and research hospital in Ankara. 2 focus-group interviews, each lasting about one hour, were conducted. The interviews carried out using an online meeting program and were recorded in June 2020. The interviews were then transcribed and analyzed. The transcribed data from the focus-group discussions were grouped by theme and concept, and the statements of the participants were coded numerically according to these groupings. Six themes emerged in analyzing the qualitative data.

¹Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sağlık Yönetimi Bölümü, Ankara
²Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Öğrencisi, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Keziban AVCI

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Esenboğa Kampüsü Çubuk / ANKARA - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 24.02.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 09.10.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.29000

Avcı K, Gülkaya G. Ön saftaki hemşirelerin bakış açısından COVID-19 yönetimindeki zorluklar
Türk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(4): 469 - 482

Bulgular: Çalışmaya katılan hemşirelerin %16 (n:2)'sı erkek, %84 (n:10)'ü kadındır. Hemşirelerin yaş ortalaması 32 ± 8.7 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada; bilgi kaynakları, azaltma önlemleri, sağlıklı çalışma ortamı, tedavi ve bakım sürecinde yaşanan zorluklar, tedavi ve bakım sürecinde yaşanan duygular ve kişisel koruyucu ekipman olmak üzere 6 tema belirlenmiştir.

Sonuç: COVID-19'un hızlı yayılması sağlık sistemlerini zorlamıştır. Kritik hasta sayısındaki artışlar için ventilatör ve yoğun bakım ünitesi yataklarındaki potansiyel yetersizlik Türkiye açısından iyi tanımlanmış ve gerekli tedbirler hızla hayata geçirilmiştir. Ancak yeterli işgücü olmadığı sürece cihaz-donanım ya da alt yapı olanakları sağlık hizmetleri gibi emek yoğun sektörlerde işe yaramayacaktır. Bu krizle baş edebilmek için sağlık insan kaynağının sayısal yeterliliğinin sağlanması yanında enfekte hastaya bakım yeteneğinin de en üst düzeye çıkartılması sürecin başarısı için gereklidir. Aynı zamanda; hasta ve taşıyıcı olma endişesi, sosyal izolasyon, evden uzak kalma gibi stresörler ve karşılaşılan etik ikilemler sağlık çalışanları açısından zorlayıcı faktörlerdir. Bu kapsamda sağlık çalışanlarının yaşadıkları bu zor sürecin farkında olmak ve onları desteklemek önemlidir.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, pandemi, çalışma ortamı, kişisel koruyucu ekipman, psikososyal tepki

Results: In the study, 16% (n:2) of the nurses were male and 84 (n:10) were female. The average age of the nurses was 32 ± 8.7 . In this study; 6 themes have been identified: information sources, reduction measures, healthy working environment, difficulties in the treatment and care process, feelings during the treatment and care process, and personal protective equipment.

Conclusion: The rapid spread of COVID-19 has forced health systems. the potential inability of intensive care unit beds and the ventilator fort the increase of the critically ill patients is well-defined in terms of Turkey. and the necessary measures were implemented quickly. However, unless there is sufficient workforce, device-equipment or infrastructure will not work in labor-intensive sectors such as healthcare. In order to cope with this crisis, ensuring the numerical adequacy of the health human resources and maximizing the ability to care for the infected patient is essential for the success of the process. Same time; Stressors such as anxiety about being patient and carrier, social isolation, staying away from home, and ethical dilemmas are challenging factors for healthcare professionals. In this context, it is important to be aware of and support health workers in this difficult process.

Key Words: COVID-19, pandemic, working environment, personal protective equipment, psychosocial response

GİRİŞ

2019 yılında Çin'in Wuhan kentinde koronavirüs kaynaklı bir solunum hastalığı olarak ortaya çıkan ve Ocak 2020'de Çin sağlık otoriteleri tarafından insandan insana bulaştığı bildirilen COVID-19 (1), küresel olarak hızla yayılmış ve Mart 2020'de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından pandemi olarak nitelendirilmiştir (2). 22 Şubat 2023 itibarıyla dünya

genelinde; 757.264.511 teyit edilen vaka ve 6.850.594 ölüm bildirilmiştir (3).

COVID-19 pandemi olarak ilan edildiği tarihten bu yana; tüm ulusları, kıtaları ve sosyoekonomik grupları etkileyen küresel ölçekte bir sağlık krizi haline gelmiştir. Hastalığın yayılımını engellemeye yönelik sokağa çıkma kısıtlamaları, okul ve ibadet yerleri ile sınırların kapatılması gibi uygulamalar ve karantina tedbirleri toplumsal yaşamı derinden etkilemiştir.

Kuşkusuz bu tedbirlerin ekonomik, sosyal ve psikolojik sonuçları olmuştur ve olmaya devam edecektir.

Hastalığa ilişkin izolasyon önlemlerine yönelik uygulamalarda ülkeler, eyaletler, şehirler ve insanlar düzeyinde farklılıklar bulunmaktadır. Bu kapsamda örneğin sosyal mesafe önlemlerinin ve özellikle karantina uygulamalarının pandemiyi etkisini azaltmada önemli bir etkisi vardır (4). Fiziksel mesafeyi korumak, yüz maskesi takmak ve hane içi izolasyonu veya daha iyisi tüm semptomatik vakaların ideal olarak bir tesiste izole edilmesini öneren çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle zamanında tanı ve derhal izolasyon için hızlı test uygulamalarına ihtiyaç bulunmaktadır (4).

İzolasyon önlemlerine rağmen dünya genelinde vaka ve ölüm sayısı hızlı bir şekilde artmıştır. Öte yandan, bu dönemde savunmasız bireyleri ve hatta ülkeleri desteklemek için adım atma sorumluluğu olan gelişmiş ülkeler dahi zorlanmıştır. Özellikle virüsün hastane havalandırma sisteminde izole edildiğine dair raporlar, eski binaların çok olduğu Avrupa ülkelerini zorlamıştır. Bu kapsamda pencere erişimi olmayan birçok hastanede, aerosollerin dolaşımı hem hastalar hem de sağlık çalışanları için tehlike yaratmaktadır. Üstelik koridorlar, merdivenler ve geçitler dar olduğunda sosyal mesafenin korunmadığı bir gerçektir (5).

Dramatik olayların yaşandığı COVID-19 pandemi sürecinde sağlık hizmetlerini yerine getiren ön saflardaki sağlık profesyonellerinin maruz kaldığı ezici stres ve tehlike seviyesi, sömürülebilir ya da tüketilebilir bir kaynak niteliğine dönüşmemelidir. Bu kapsamda dünyada genelinde çok sayıda sağlık çalışanın COVID-19 nedeniyle öldüğü vurgulanmaktadır (6,7) Öte yandan Montemurro (2020), pandemi sürecinde sağlık personelinin yaşadığı travmaya dikkat çekmiş, birçok ülkede yaşananlara benzer şekilde İtalya'da iki hemşirenin korona bulaştırma ihtimaline karşı intihar ettiklerini bildirmiştir (8). Bu bağlamda, etkin bir salgın yönetimi için öncelikli olarak sağlık çalışanlarının korunmasına ve güçlendirilmesine ihtiyaç vardır (9).

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmanın amacı, COVID-19 hastalarına bakım veren hemşirelerin karşılaştığı zorlukları incelemektir. Sonuçların politika yapıcılara sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesine yönelik öneri ve destek sağlayabileceği öngörülmüştür.

Araştırmanın Türü

Bu araştırmada nitel araştırma yöntemlerinden biri olan odak grup görüşmesi yöntemi kullanılmıştır.

Evren ve Örneklem

Araştırmanın evreni Ankara'daki bir eğitim ve araştırma hastanesinin COVID-19 hastalarına bakım sağlamak üzere belirlenen kliniklerinde çalışan hemşirelerden oluşmaktadır. Bu kliniklerin sorumlu hemşireleri ile iletişime geçerek bir görüşmeye katılarak kendi deneyim ve görüşlerini paylaşma istekliliğinde olabilecek hemşireler belirlenmeye çalışılmıştır. Daha sonra potansiyel katılımcılarla telefon ile iletişime geçilmiş, araştırma amacı ve yöntemi açıklanarak bilgilendirilmiş onamları alınmıştır. Veri çeşitliliğini zenginleştirmek amacıyla Tablo 1'de bilgileri verilen farklı yaş, cinsiyet, eğitim ve tecrübeye sahip 12 hemşire, amaçlı örnekleme yöntemi kullanılarak, örneklem kapsamına alınmıştır.

Veri Toplama

Çalışmada her biri yaklaşık bir saat süren 2 odak grup görüşmesi gerçekleştirilmiştir. Görüşme Haziran 2020'de çevrimiçi bir toplantı programı kullanılarak yapılmıştır ve elde edilen nitel veriler kaydedilmiştir. Kaydedilen görüşmeler yazıya aktarılmış ve yorumlanmıştır. Odak grup görüşmelerinden elde edilen veriler konu ve kavrama göre gruplandırılmış ve katılımcıların ifadeleri bu gruplamalara sayısal olarak atanmıştır. Nitel verilerin analizinde altı tema ortaya çıkmıştır.

Veri toplama araçları

Katılımcıların COVID-19 pandemi sürecine ilişkin karşılaştıkları güçlükleri, stres kaynaklarını, süreç yönetimine ilişkin görüşlerini ve iyileştirme önerilerini

Tablo 1. Katılımcıların tanımlayıcı özellikleri

Özellik	Sayı (n)	Özellik	Sayı (n)
Cinsiyet		Mesleki tecrübe (Yıl)	
Kadın	10	10 yıldan az	7
Erkek	2	11 yıl ve üstü	5
Yaş (Yıl)		Kiminle Yaşadığı	
24-31	7	Yalnız	5
32-39	5	Aile/arkadaş vb.	7
Medeni Durum		Pandemi Öncesi Çalıştığı Birim	
Evli	3	Yataklı servis	8
Bekâr	9	Ameliyathane	2
Eğitim düzeyi		Poliklinik	2
Ön lisans	1	Pandemi Sürecinde Çalıştığı Birim	
Lisans	7	Yataklı servis	9
Lisansüstü	4	Yoğun Bakım	3

belirlemek için araştırmacılar tarafından hazırlanan, 6 sorudan oluşan yarı yapılandırılmış bir soru formu ile tanımlayıcı özelliklerini belirlemeye yönelik 7 sorudan oluşan kişisel bilgi formu kullanılmıştır.

Verilerin toplanması ve değerlendirilmesi

Odak grup görüşmesi; ücretsiz, halka açık, çevrimiçi bir toplantı programı kullanılarak, Haziran 2020 tarihinde saat 20-21:40 arasında yapılmıştır. Görüşmeler; görüşmeye baştan sona katılabilecek, belirlenen gün ve saatte, çevrimiçi görüşme davetine cevap veren 12 katılımcı ile yapılmıştır ve 100 dakika sürmüştür. Görüşmeler araştırmacılar tarafından birebir yazıya dökülmüştür. Elde edilen veriler, tema ve kavram bazında gruplandırılmış ve katılımcıların ifadeleri bu gruplandırmalara göre sayısal olarak kodlanmıştır. Nitel araştırmalarda güvenilirlik, farklı araştırmacıların verileri analiz ederken hemen hemen aynı sonuçlara varması gerektiği anlamına gelir. Bu nedenle bulgular birden fazla araştırmacı tarafından doğrulanmalıdır (10). Bu kapsamda çalışmada;

verilerin analiz eden araştırmacıların sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu aşamada iki araştırmacının elde ettikleri sonuçların büyük oranda benzer olduğu görülmüştür. Son olarak alt temalar oluşturulmuştur.

Bu çalışma, Sağlık Bakanlığı COVID-19 Bilimsel Araştırmalar Komisyonu ve Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 06.06.2020, Karar no: 84892257-604.01.02-E.16736).

BULGULAR

Nitel veri analizine ilişkin olarak: bilgi kaynakları, azaltma önlemleri, çalışma ortamı, tedavi ve bakım sürecinde yaşanan zorluklar, tedavi ve bakım sürecinde yaşanan duygular ve kişisel koruyucu ekipman (KKE) başlığı altında 6 tema belirlenmiştir. Araştırmada belirlenen temalar ve alt temalar Tablo 2 ve temalara ilişkin kelime bulutları Şekil 1'de yer almaktadır.

Tablo 2. Tema ve alt temalar

Tema	Alt tema	Tema	Alt tema
Bilgi kaynakları	<ul style="list-style-type: none"> * Sosyal medya * Televizyon * Sağlık Bakanlığı web sitesi * Sağlık Bakanı sosyal medya hesabı * Kurum ve yönetici bilgilendirmesi 	Tedavide ve bakım sürecinde yaşanan zorluklar	<ul style="list-style-type: none"> * KKE oluşturduğu bariyer * Hastalanma ve bulaştırma korkusu * Diğer sağlık profesyonellerden yeterli destek alamama * Oryantasyon eğitimi almadan görev yeri değişikliği
Azaltma Önlemleri	<ul style="list-style-type: none"> * Sokağa çıkma yasakları * Maske temin sorunları * Kısıtlamalara uyum sorunu * Kademeli normalleşme gereksinimi 	Tedavi ve bakım sürecinde yaşanan duygular	<ul style="list-style-type: none"> * Sevdiklerinden uzak kalmanın yükü * Mesleki yetersizlik endişesi * Ölüm korkusu yaşayan hastaya bakım vermenin yükü * İzolasyon önlemlerine uymayanlara kızgınlık * Hastaların iyileşmesi ile yaşanan pozitif duygular
Sağlıklı çalışma ortamı	<ul style="list-style-type: none"> * KKE özelliği ve erişim * Hastane öğünlerin niteliği * Negatif basınçlı hasta odaları * Sağlık profesyonellerinin izolasyon önlemlerine ilişkin duyarlılığı * Sistemli çalışmaya duyulan güven 	Kişisel Koruyucu Ekipman	<ul style="list-style-type: none"> * Sayısal yeterlilik * Kolay erişim * Kalite sorunu * Zaman baskısı nedeniyle kullanım sorunları * Sterilizasyon sürecine güvensizlik



Şekil 1. Belirlenen temalara ilişkin kelime bulutları

Tema 1; bilgi kaynakları

Çalışmaya katılan hemşireler, COVID-19 pandemi sürecine ilişkin tıbbi ve güncel bilgileri; sosyal medyadan, televizyondan, Sağlık Bakanlığı web sitesinden, Sağlık Bakanı'nın sosyal medya hesabından, kurum ve kurum yöneticilerinden aldıklarını belirtmişlerdir. Bu kapsamda aşağıdakiler ilgili örnek yanıtlardır:

“Sorumlu hemşiremizin bize göndermiş olduğu COVID-19’a ilişkin literatür kaynaklarından yararlandım.” (H1)

“Sağlık Bakanlığı'nın resmi internet sitesinden yararlandık ve yayınladığı klavuzları takip ettik.” (H2)

“Sağlık Bakanı'nın twitter hesabı üzerinden yaptığı açıklamalardan yararlandık.” (H3)

“Televizyondaki güncel açıklamaları dinledik.” (H4)

Tema 2; azaltma önlemleri

Hemşirelerin uygulanan azaltma önlemlerine ilişkin görüşleri; sokağa çıkma kısıtlamaları, maske temininde sorunlar, kısıtlamalara uyum sürecinde yaşananlar ve kademeli normalleşme gereksinimi alt temaları altında toplanmıştır. Bu kapsamda aşağıdakiler ilgili örnek yanıtlardır:

“ İlk zamanlar maske erişimi sorunluymuştu. Maskeye başvuran, şifre isteyen, şifreye ulaşabilen, maskesiz sokağa çıkan, öncesinde stoklayan birbirine karıştı. Bu süreçte ya insanlar kendi yaptığı maskeyi kullandı ya da maskesiz sokağa çıkmak zorunda kaldı” (H1)

“COVID-19 pek çok ülkede görülmeye başladığında yurt dışı giriş çıkış yasakları uygulamaya koyulmadı, üstelik yurt dışından gelenleri kapsayan karantina önlemlerinin ilk zamanlar yetersiz olduğunu düşünüyorum.” (H6)

“Yapılan sokağa çıkma yasağı ile 65 yaş üstü ve kronik hastalığı olan birçok insanın hastalanmasını engellemiş olduk. Ancak yasaklara uyup uymamak biraz da insanların elinde işte maske takmak zorunluluk haline getirildi uygun şekilde takip takmamak onlara kaldı. Bazı davranışları değiştirmek çok zordur. İki günlük ve dört günlük sokağa çıkma yasakları oldu,

bir de beğendiğim, bayram yapamadık ama en çok patlak verecek zaman bayramdı. O dönemde birçok insanın bir araya gelmesini engelleyerek virüs yayılımını azalttık. Sadece haziran ayında mesela normalleşme belki kademe kademe yapılsaydı daha iyi olabilirdi.” (H9)

Tema 3; çalışma ortamı

Hemşirelerin pandemi sürecinde çalışma ortamına ilişkin görüşleri; KKE'nin özelliği ve erişim, hastane öğünlerinin niteliği, hastanenin fiziki koşulları, sağlık profesyonellerinin izolasyon önlemlerine uyum düzeyi ve sistemli çalışmaya duyulan güven alt temaları altında toplanmıştır. Bu kapsamda aşağıdakiler ilgili örnek yanıtlardır:

“Koruyucu ekipmanlarımız olduğu sürece biz hastalara daha güvenli yaklaşabildik. Ancak ekipman olmadığı ya da kullanım kısıtlamasının olduğu süreçte ister istemez tedirgin olduk. Bunun yanı sıra servislerinde hızlı kit uygulanması ile tarama bizi çok rahatlattı” (H2)

“Özellikle pandemi sürecinde sonradan görevlendirilen ekip arkadaşlarımız yeteri kadar temiz çalışıyor mu çalışmıyor mu bundan emin olmadığımız için kendi aramızda hastalığı yayabiliriz endişesi taşıdık. Desteğe gittiğim servislerde de temiz kirliliğin yeterli olup olmadığı beni düşündürdü.” (H6)

“Yoğun bakımlarda negatif basınçlı alanlarda güvenle çalıştık. Çünkü odadaki havanın dışarı yayılması engellendiği için yoğun bakım çok daha avantajlıydı. Entübe olan hastaları sürekli aspire etmek için kapalı aspirasyon sistemi getirildi. Bu durum sekresyonların etrafa saçılmasını ve bize teması engelledi.” (H7)

“Düzenli bir ortamda mesleğini rahat icra edebiliyorsun. Malzeme de olsa kaliteyi oradaki çalışan yaratıyor. Hastadan hastaya geçerken eldiven değiştirmeyi sadece pandemi sürecinde değil her zaman yapmalıyız.” (H5)

“Pandemi sürecinde beslenme önemli olmasına rağmen bize verilen öğünlerin yeterli olduğunu

düşünmüyorum” (H6)

Tema 4; tedavi ve bakım sürecinde yaşanan zorluklar

Katılımcıların sosyal destek algılarına ilişkin görüşleri; KKE'nin oluşturduğu bariyer, hastalanma ve bulaştırma korkusu, diğer sağlık profesyonellerinden yeterli destek alamama, oryantasyon eğitimi almadan görev yeri değişikliği alt temaları altında toplanmıştır. Bu kapsamda aşağıdakiler ilgili örnek yanıtlardır:

“Elimizde kat kat eldivenler, tulum ve siperliklerle çalışmak çok zorladı.” (H 7)

“Aslında beni yoran şey, hastalar ölüm korkusuyla geliyor. Benim haricimde gerekli açıklamaları doktordan da duymak istiyor. Ancak bu süreçte yetersiz kaldık” (H6)

“Bir nöbette üç tane kıyafet değiştirdiğimi biliyorum terden dolayı.”(H11)

“Pandemide ameliyathaneden yataklı servise çekildim. Daha evvel ameliyathanenin dışında hiç çalışmamıştım ve servis işleyişini bilmiyordum. Nöbetlerde uzun süre çalışma arkadaşlarımdan yardım istedim ve onların iş yükünü artırdım.” (H8)

Tema 5; tedavi ve bakım sürecinde yaşanan duygular

Katılımcıların tedavi ve bakım sürecinde yaşadığı duygulara ilişkin görüşleri; sevdiklerinden uzak kalmanın yükü, mesleki yetersizlik endişesi, ölüm korkusu yaşayan hastaya bakım verme yükü, izolasyon önlemlerine uymayanlara kızgınlık, hastaların iyileşmesi ile yaşanan pozitif duygular alt temaları altında toplanmıştır. Bu kapsamda aşağıdakiler ilgili örnek yanıtlardır:

“Astronot gibi giyinmiş vaziyette pek çok uygulamayı yapmakta çok zorlandım ve yeterince fayda sağlayamadığımı düşündüm”(H2)

“Hasta odasına girdim üç dört saat tulumun içinde kaldım ve çıktığımda sıırlıslıklamdım. Üzerimi çıkarırken ağlamaya başladım, on dakika boyunca hüngür hüngür ağladım.”(H7)

“Hastalar iyileşmeye başladıklarında biz de onlarla çok mutlu olduk.” (H4)

“Anneme servise pandemi hastası almaya

başlayacağımızı söylediğim gece, yanıma gelip yattı sanki yarın ölecekmişim gibi yaklaşık bir saat ağladı. Onunla bende ağladım. İster istemez bu düşünce ile hasta bakmaya devam etmek zaman zaman zorladı.” (H10)

“Yoğun bakımda çalıştığım dönemde aileme söylemedim. Çünkü benim annemin kronik rahatsızlığı ve panik atağı var. Bu süreçte söyleseydim kesin uyuyamazdı” (H3)

“Hastalar daha çok açıklama ve destek beklerken biz de bulaşı en aza indirmek için çabucak işimizi yapıp odadan çıkma zorunluluğu hissettik. Onlara yeterli destek olamadığımı düşünmek beni çok zorlamıştı.”(H1)

“Yoğun bakım tecrübem yoktu bir yandan yoğun bakımla tanıştım bir yandan COVID de.” (H12)

“Bu süreçte ölümden değil, taşıyıcı olup etrafımdaki insanlara bulaştırmaktan korktum.” (H8)

Tema 6; kişisel koruyucu ekipman

Katılımcıların kişisel koruyucu ekipmana ilişkin görüşleri; sayısal yeterlilik, kolay erişim, kalite sorunu, zaman baskısı nedeniyle kullanım sorunları, sterilizasyon sürecine güvensizlik alt temaları altında toplanmıştır. Bu kapsamda aşağıdakiler ilgili örnek yanıtlardır:

“Hasta zili çaldığında giyinip gitmemiz lazım, giyinmek zaten en az yirmi dakika maskeyi giy onu giy falan hastalarda bekleyemiyor sabırsızlaşıyorlar. Bazı nöbetlerimde gözlük ve siperlik çok fazla baskı yaptı ve nöbet boyunca başım ağrıdı.”(H9)

“Ekipmanlar konusunda sayı yeterliydi ama kalite konusunda sorun vardı. Siperlikler, gözlükler sterilizasyon gidiyordu ve paketi açtığımız da hep kirli ya da lekeli geliyordu.” (H 8)

“Desteğe gittiğimiz servislere malzeme vardı ancak bize sanki yokmuş gibi davranıyorlardı. Bir keresinde vermediklerinde hasta odalarına girmem dedim öylelikle N95 verildi.”(H4)

“Desteğe gittiğim serviste N95'lerin kalitesinde bence sıkıntı vardı, üç tanesi elimde parçalandı.” (H6).

TARTIŞMA

Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü (MERS-CoV) ve Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü (SARS-CoV) ile aynı aileye mensup yeni tip bir koronavirüs olan SARS-CoV-2 (COVID-19); çok daha güçlü bir bulaşıcılık ile tüm dünyayı edilmıştır (11-13) Nitekim önümüzdeki yıllarda dünyanın benzer enfeksiyonları içeren küresel zorluklarla karşılaşabileceği öngörülmektedir (14).

Bireyler yaşamlarını derinden etkileyen bu gibi durumlara karşı karşıya kaldıklarında, karşılaştıkları şeyin ne olduğunu, yayılmasının nasıl kontrol altına alınacağını, etkili önlemlerin ne olabileceğini ve nasıl baş edeceklerini araştırmaktadırlar (11). Kuşkusuz dijital çağda bu endişe ve merak internet aramalarına da yansımaktadır. İnternet kullanıcılarının yüzde sekseni çevrimiçi sağlık bilgileri araştırmaktadır. Bununla birlikte, internet hem yanlış hem de doğru bilginin yayılmasını kolaylaştırmaktadır.

Bilgi Kaynakları

Bu araştırmada katılımcıların COVID-19 pandemi sürecine ilişkin tıbbi ve güncel bilgileri; sosyal medyadan, televizyondan, Sağlık Bakanlığı web sitesinden, Sağlık Bakanı'nın sosyal medya hesabından, kurum ve kurum yöneticilerinden aldıklarını belirtmişlerdir. Pandemi sürecinde toplum hasta olma anksiyetesini şiddetli bir şekilde yaşamış ve bu süreç resmi otoriteler tarafından en iyi şekilde yönetilmeye çalışılmıştır. Toplumun zamanında bilgilendirilmesi hastalığın yayılımını azaltmada önemlidir. Öte yandan, sağlık çalışanlarının güncel, kanıta dayalı ya da salgın döneminde doğru ve ihtiyaç duyduğu bilgiye erişebilirliği sürecinin başarılı yönetimi açısından önemlidir. Bu amaçla COVID-19 pandemi sürecinde Türkiye'de Sağlık Bakanlığı kurmuş olduğu Bilim Kurulu aracılığı ile çok sayıda rehber yayınlamış, bilim kurulu üyeleri ve Sağlık Bakanlığı'nın ilgili üst düzey yöneticileri pek çok medya organından açıklamalar yaparak güven ortamı oluşturmaya çalışmıştır. Bu araştırmaya benzer

şekilde Nemati ve arkadaşları (2020) toplum ve sağlık çalışanlarının COVID-19 ile ilgili bilgileri medya ve internet üzerinden aldıklarını belirtmişlerdir (15). Salgınla ilgili stresi en aza indirmek için; doğru bilgilere ulaşımın ve sosyal desteğin artırılması, hastalıkla ilişkili damgalanmanın azaltılması, izolasyon önlemlerine bağlı kalırken normal bir yaşamı mümkün olduğunca sürdürmenin gerekliliğini ve çevrimiçi psikososyal destek hizmetleri kullanımının gerekliliği belirtilmektedir (16).

Pandemi sürecinde sağlık çalışanlarına hastalığa ilişkin; bulaşma yolu, önleme, kontrol ve destek uygulamaları ile kişisel korunma önlemlerine yönelik zamanında eğitim verilmesinin gerekliliği yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır (14, 15). Bu kapsamda hazırlanan kanıta dayalı rehberlerden yola çıkarak hastane enfeksiyon kontrol komitelerinin de sürekli olarak sağlık çalışanlarına; bulaşma riskinin nasıl azaltılacağı (17), nasıl tedavi ve bakım vereceği (18) gibi konularda eğitim vermesi önemlidir. Araştırmaya katılan hemşireler eğitimlerin güncel ve tüm sağlık profesyonellerini kapsayacak şekilde verilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Benzer nitelikteki çalışmalarda, hemşireler yeni tip koronavirüs hakkında güçlü bir bilgiye ihtiyaç duyduklarını (15, 19) ve DSÖ, Sağlık Bakanlığı gibi resmi otoriteler tarafından daha fazla bilgilendirme yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (15). Acil servis çalışanları ile yapılan bir çalışmada; COVID-19 ile ilgili bilgi içerikli eğitimlerin yanında davranış ve tutumların değiştirilmesine yönelik eğitimlerin yapılması gerektiğini vurgulanmıştır (20).

Sağlık profesyonellerinin hastalık konusunda güncel bilgilerle donatılması enfeksiyonun yönetimi açısından önemlidir. Ancak aynı zamanda çalışanların hissettikleri kaygı ve baskıyı azaltarak kendilerine olan güveni arttırması açısından da bir gerekliliktir (17, 18). Sağlık kurumlarında pandemi sürecinde verilen hizmet içi eğitimler, sürece ilişkin küresel, ulusal, bölgesel ve bireysel mücadelenin başarısı için gereklidir. Bu gereklilik sağlık profesyonellerinin süreçteki rol ve sorumlulukları doğrultusunda etkin

sağlık hizmeti sunmaları amacına hizmet etmelidir. Bu kapsamda, yöneticilerin çalışma planlarını oluştururken, çalışanlara sürekli güncel eğitimler verilmesine olanak tanıyan planlar oluşturmaları ve eğitime katılımlarını sağlamaları önemlidir. Ayrıca eğitimlerde sosyal mesafe önlemlerinin dikkate alınması, bunun için multimedya ağ platformlarının kullanımı ve online eğitimleri mümkün kılan sistem alt yapısının oluşturulması önerilmektedir (21).

Azaltma Önlemleri

COVID-19 yayılımının azaltılması için etkili müdahalelerin neler olabileceğine yönelik yapılan çalışmalar ve ağırlıkları değişen uygulamalar bulunmaktadır. Bu kapsamda örneğin Çin; virüsün yayılmasını kontrol etmede en etkili yönteminin karantina ve sosyal izolasyon önlemleri olduğunu ileri sürmüştür. Güney Kore, hafifletme önlemlerinin temel bileşeni olarak test yapılmasını önermiştir. Bazı çalışmalar, el hijyeni ve yüz maskelerinin önemine dikkat çekmiştir (11, 22). Bu çalışmada ise katılımcı hemşirelerin azaltma önlemlerine ilişkin görüşleri ağırlıklı olarak sokağa çıkma kısıtlamaları etrafında şekillenmiştir. Bu kısıtlamalar bir başka ifade ile izolasyon önlemleri insanların hareketini kısıtlamaya yönelik önlemlerdir. Bu kapsamdaki uygulamalar genel olarak yaklaşık 1,5 metrelik (6 feet) güvenli bir mesafeyi korumak ve bu tür mesafenin korunamayacağı yerlerden kaçınmak anlamına gelir. İkincisi, koronavirüse veya koronavirüsü olan hastalara uygulanan karantina önlemleridir. Şüpheli ya da hasta bireyler, belirtiler geliştirip geliştirmediğini görmek için virüsün kuluçka dönemi boyunca insanlarla temastan kaçınır. İzolasyon yoluyla insanların buldukları yeri terk etmelerine izin verilmez (22). Bu kapsamda sosyal izolasyon uygulamalarının pandemi döneminde hala en güçlü azaltma önlemi olduğu belirtilmektedir (23). Sosyal izolasyon uygulamaları hastalığın yayılmasını hafifletmek için kritik olsa da şüphesiz hem kısa hem de uzun vadede ekonomik ve ruhsal sonuçları olacaktır. Bu sonuçlar, salgının etkisini ele

alma, önleme ve müdahale yönelik çabalara ihtiyaç duyulması açısından büyük önem taşımaktadır (24). Bu kapsamda ülkelerin hem toplumu hem de sağlık çalışanlarını koruyan iyi finanse edilmiş, duyarlı ve verimli insan kaynakları yönetimi modellerine ihtiyacı olduğunu görülmektedir (25).

Sağlıklı Çalışma Ortamı

Katılımcıların çalışma ortamına ilişkin görüşlerinde; KKE'nin özelliği ve erişim, hastane öğünlerinin niteliği, hastanenin fiziki koşulları, sağlık profesyonellerinin izolasyon önlemlerine uyum düzeyi ve sistemli çalışmaya duyulan güven alt temaları öne çıkmaktadır. Bu kapsamda COVID-19 salgınından önce yaşanan salgınlardan edinilen tecrübeler; salgın sürecin aktif yönetilmesinde iyi düzenlenmiş salgın protokollerinin yanında, KKE yeterliliği ve ulaşılabilirliği ile çalışanlar arasında ekip uyumunun önemini göstermektedir (26). Pandemi sürecinde özellikle tüm sağlık profesyonellerinin birbirlerini korumada belli protokol ve standartlara uyması önemlidir. Bu kapsamda hemşirelerin, hasta maruziyetinden önce ve sonra sık sık el yıkamayı zorunlu kılan sıkı temizlik ve enfeksiyon kontrolü standartlarını benimsemelerini, her vardiya ya da gerektiğinde iş yerinde duş alma imkanlarını sağlamak hastalığın yayılımını azaltmak için sağlık kurumlarının sorumluluğundadır (27). DSÖ sağlıklı çalışma ortamını, tüm çalışanların sağlığını ve güvenliğini koruyan, geliştiren; fiziksel, psikolojik, sosyal ve örgütsel koşulları sağlayan bir çevre olarak tanımlamaktadır (28).

Kişisel Koruyucu Ekipman

COVID-19 pandemi sürecinde dünyanın birçok yerindeki hemşireler, kişisel koruyucu ekipmanlar da dahil olmak üzere malzeme sıkıntısı yaşamış ve duygusal zorluklarla karşılaşmıştır (17,19,23). Bu çalışmada, katılımcılar KKE'lerin sayısal olarak yeterli olduğunu ancak tekrar kullanılan malzemelerin sterilizasyon sürecinde sorun yaşadığını ve KKE kalitesinin sorgulanması gerektiğini

belirtmektedirler. COVID-19 pandemi sürecinde, bazı hastane yöneticilerinin ekipman yetersizliği nedeniyle kullanım miktarını azaltmak için çalışan sayısını sınırlamak zorunda kaldıkları ve bu durumun kişilerin daha fazla çalışmasına neden olduğunu gösteren çalışma bulguları bulunmaktadır (29). Bu kapsamda pandemi sürecinde edinilen tecrübelerle sağlık sistemlerinin benzer durumlara yönelik hazırlık planları yapmaları önemlidir. Öte yandan özellikle aerosol haline getirilmiş damlacıkların 6 metreden uzağa gidebildiğine dair kanıtlar, sosyal izolasyon uygulamalarının yeterliliğini sorgulatmaktadır (30). Tıbbın temeli olan “önce zarar verme” ilkesi gereği sağlık çalışanlarını korumak, kaliteli ve yeteli kişisel koruyucu ekipmanı zamanında ve uygun koşullarda ve sürekli erişilebilir nitelikte temin etmek tüm düzeydeki sağlık yöneticilerinin sorumluluğundadır.

SARS-CoV-2 virüsünün bulaşma hızının yüksekliği dikkate alındığında sağlık profesyonellerinin KKE kullanımı hastalıktan korunmaları için zorunludur. Bu araştırmada katılımcılar KKE ile hasta bakım sürecinin zorluğunu ifade etmişlerdir. Benzer yapılan diğer çalışmalarda, KKE’lerle uzun süre çalışmanın büyük bir fiziksel ve profesyonel zorluk olduğunu (19, 21, 29), ortam koşullarına bağlı anoksi ve göğüs ağrısı yaşadıklarını belirtmişlerdir (29). Özellikle çalışma süresinin uzaması ve hastalarla etkileşim sıklığının artması, kullanılan KKE yükünü artırmakta ve bu yüke çoğunlukla artan duygusal bitkinlik eşlik etmektedir (21, 31).

Tedavi ve Bakım Sürecine İlişkin Deneyimler

COVID-19’ un hızlı yayılması ve enfekte hasta sayısındaki artış sağlık sistemlerini zorlamıştır. Özellikle yeterli insan kaynağı olmadığında cihaz-donanım ya da alt yapı olanakları sağlık hizmetleri gibi emek yoğun sektörlerde işe yaramayacaktır. Aynı zamanda pandemi sürecinde yoğun iş yükü, sosyal izolasyon, evden uzak kalma gibi stresörler ve karşılaşılan etik ikilemler sağlık çalışanları açısından zorlayıcı faktörlerdir.

Özellikle kıdem süresi az olan katılımcı hemşireler

pandemi sürecini tolere etmede güçlük yaşadıklarını ve sık sık ağladıklarını ifade etmişlerdir. Ayrıca hastaların prognozunun da çalışanların ruh halini etkilediği görülmektedir. Bu kapsamda katılımcı hemşireler, virüs maruziyetini azaltmak amacıyla hasta odasında daha çok tedavi ve bakıma öncelik verdiklerini, ölüm korkusu veya yakınıni kaybetme korkusu ile gelen hastaları rahatlatma konusunda yetersizlik hissettiklerini belirtmişlerdir. Benzer nitelikteki bir başka çalışmada pandemi sürecinde sağlık çalışanlarının ruh halleri, hastalarının prognozuna göre değişmiştir. Bu çalışmada hemşireler hastaların durumu düzeldiğinde büyük rahatlama ve mutluluk hissettiklerini ifade etmişlerdir. Buna karşın, ellerinden gelenin en iyisini yapmalarına rağmen hastanın durumunun iyi yönde ilerlememesinin depresif ve güçsüz hissetmelerine neden olduğu belirtilmektedir (29). Bu kapsamda çok sayıda hastanın ölümüyle yüzleşmek, aile üyelerinden uzun süre ayrı kalmak ya da yeteri kadar ailelerine destek olamamak (32) nedeniyle zorlanan hemşirelerin psikolojik olarak desteklenmesi önemlidir.

COVID-19 pandemisinin başlarında sağlık profesyonelleri ile yapılan bir odak grup görüşmesinde katılımcıların kaygı kaynakları arasında: (1) uygun kişisel koruyucu ekipmana erişim, (2) iş yerinde COVID-19’ a maruz kalmak ve enfeksiyonu ailelerine taşımak, (3) COVID-19 semptomları ve işyerinde enfeksiyonu yayma korkusu, (4) hasta olmaları durumunda kurumlarının onların ve ailelerinin gereksinimlerini destekleyeceği ya da onlarla ilgileneneğine dair belirsizlik, (5) artan çalışma saatleri ve evde yalnız kalan çocukları, (6) yeni bir kliniğe (örneğin yoğun bakım ünitesine) verildiklerinde yeterli bakım sağlayamama ve (7) güncel bilgi ve iletişime erişim eksikliği bulunmuştur (33) Benzer şekilde bu araştırmada da hemşireler daha çok ailelerine ve meslektaşlarına virüs bulaştırmaktan korktuklarını belirtmektedirler. Bu nedenle pandemi sürecinde yalnız ya da otellerde kalmayı tercih ettiklerini ifade etmişlerdir. Sun ve arkadaşlarının (2020) çalışmasında da katılımcılar

ailelerinde ayrı evlerde ya da otelde kaldıklarını ve sevdiklerine sarılmayı özlediklerini ifade etmişlerdir (19). Ayrıca otelde kalma kararında çevreden duydukları damgalayıcı ifadelerin yani stigmanın da etkisi olduğu belirtilmektedir. Salgın dönemlerinde stigmanın yaygın ve uzun süren bir sosyal sorun olduğu (34-36), sağlık çalışanlarının ve aile üyelerinin toplum tarafından potansiyel virüs taşıyıcısı olarak görüldüğü (34), stigmaya maruz kalanlar arasında sağlık çalışanlarının ilk sırada yer aldığı ve çalışanların bu nedenle istifa etmek istedikleri belirtilmektedir (37). Bu nedenle, sağlık çalışanlarına zamanında psikolojik destek, başa çıkma stratejileri konusunda eğitim, yeterli KKE ve bulaşıcı hastalıkların yayılmasını engellemeye yönelik müdahalelere odaklanma sağlık sistemlerinin görevidir (32).

Komorbidesi olan yaşlı hastalarda COVID-19 mortalitesi daha yüksektir. Çocuklar ve genç erişkinlerin nadiren semptomları vardır, ancak virüsü taşıyabilirler (38). Bu kapsamda sağlık çalışanlarının küçük çocuklarına yönelik daha az hastalık endişesi taşıdıkları belirtilmektedir (39). Hemşire yakınları ise onların hasta olması veya onları kaybetme korkusu yaşamaktadırlar (23). Bu korkuyu tek çocuğu hemşire olan ailelerin daha şiddetli yaşadıkları bulunmuştur (21).

Bulaşıcı hastalıkların kontrol altına alınması sürecinde sağlık profesyonellerinin zihinsel

sağlığının korunması esastır (17, 40). Araştırmada katılımcı hemşirelerin başka birimlerde oryantasyon eğitimi almadan görevlendirme yapılmasından hoşnut olmadığı bulunmuştur. Benzer şekilde bazı çalışmalarda pandemi döneminde başka birimlere desteğe gitmenin çalışanlar için stres verici olduğunu göstermektedir (19, 29).

Sonuç olarak; kritik hasta sayısındaki olası artışlar için ventilatör ve yoğun bakım ünitesi yataklarındaki potansiyel yetersizlik Türkiye açısından iyi tanımlanmış ve gerekli tedbirler hızla hayata geçirilmiştir. Ancak yeterli insan kaynağı olmadığı sürece cihaz-donanım ya da alt yapı olanakları sağlık hizmetleri gibi emek yoğun sektörlerde işe yaramayacaktır. Bu ve benzeri krizlerle baş edebilmek için sağlık insan kaynağının sayısal yeterliliğinin sağlanması yanında enfekte hastaya bakım yeteneğinin de en üst düzeye çıkartılması sürecin başarılı yönetimi için gereklidir. Hasta sayısında ve kritik bakım gereksinimindeki artışın haftalarca hatta aylarca sürdüğü göz önüne alındığında, sağlık insan kaynakları planlaması daha da önemli bir nitelik kazanmaktadır. Aynı zamanda; yoğun iş yükü, sosyal izolasyon, evden uzak kalma gibi stresörler ve karşılaşılan etik ikilemler sağlık çalışanları açısından diğer zorlayıcı faktörlerdir. Bu kapsamda sağlık profesyonellerinin yaşadıkları bu zor sürecin farkında olmak ve onları desteklemek önemlidir.

ÇALIŞMANIN SINIRLILIKLARI

Bu çalışma bir eğitim ve araştırma hastanesinin COVID-19 kliniklerinde çalışan hemşireler ile yapılmış olup veriler tek bir merkezi temsil etmektedir. Nitel bir çalışma olduğu için sonuçları hemşire popülasyonuna genellenemez. Daha büyük örneklem ve karma metodolojilerle ileri çalışmalar yapılmalıdır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya katılan 12 hemşireye teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 06.06.2020, Karar no: 84892257-604.01.02-E.16736)

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak-an update on the status. *Military Med Res*, 2020; 7 (1): 1-10.
2. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020; 395 (10224): 565-74.
3. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. [Internet]. WHO. 2020 (Accessed: February 2020). <https://COVID19.who.int/>.
4. Sjödin H, Wilder-Smith A, Osman S, Farooq Z, Rocklöv J. Only strict quarantine measures can curb the coronavirus disease (COVID-19) outbreak in Italy, 2020. *Eurosurveillance*, 2020; 25 (13): 2000280.
5. Loveday H. Fear, explanation and action - the psychosocial response to emerging infections. *J Infect Prev*, 2020; 21 (2): 44-46.
6. Bansal P, Bingemann TA, Greenhawt M, Mosnaim G, Nanda A, Oppenheimer J, et al. Clinician wellness during the COVID-19 pandemic: extraordinary times and unusual challenges for the allergist/immunologist. *J Aller Clin Immun:In Practice*, 2020.

7. Liu N, Zhang F, Wei C, Jia Y, Shang Z, Sun L, et al. Prevalence and predictors of PTSS during COVID-19 outbreak in China hardest-hit areas: Gender differences matter. *Psychiatry research*, 2020; 112921.
8. Montemurro N. The emotional impact of COVID-19: From medical staff to common people. *Brain, behavior, and immunity*, 2020.
9. Tuncay FE, Koyuncu E, Özel Ş. Pandemilerde Sağlık Çalışanlarının Psikososyal Sağlığını Etkileyen Koruyucu ve Risk Faktörlerine İlişkin Bir Derleme. *Ankara Med J*, 2020;2:488-501.
10. Polit D, Beck CT. *Essentials of nursing research. Appraising evidence for nursing practice*. 2014;8.
11. Hu D, Lou X, Xu Z, Meng N, Xie Q, Zhang M, et al. More effective strategies are required to strengthen public awareness of COVID-19: Evidence from Google Trends. *J Glob Health*, 2020; 10 (1): 011003.
12. Carlos WG, Dela Cruz CS, Cao B, Pasnick S, Jamil S. Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. *Am J Resp Crit Care Med*, 2020;201(4):P7-P8.
13. Avcı K. Investigation of COVID-19 related web search behaviors in Turkey: A digital epidemiology study using google trends. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2021 ; 78 (2).
14. Catton H. Global challenges in health and health care for nurses and midwives everywhere. *Int Nurs Rev*, 2020; 67 (1): 4-6.
15. Nemati M, Ebrahimi B, Nemati F. Assessment of Iranian nurses' knowledge and anxiety toward COVID-19 during the current outbreak in Iran. *Arch Clin Infect Dis*, 2020; 15: e102848.
16. Bao Y, Sun Y, Meng S, Shi J, Lu L. 2019-nCoV epidemic: address mental health care to empower society. *The Lancet*, 2020; 395 (10224): e37-e8.
17. Kang L, Li Y, Hu S, Chen M, Yang C, Yang BX, et al. The mental health of medical workers in Wuhan, China dealing with the 2019 novel coronavirus. *The Lancet Psychiatry*, 2020; 7 (3): e14.
18. Shi Y, Wang J, Yang Y, Wang Z, Wang G, Hashimoto K, et al. Knowledge and attitudes of medical staff in Chinese psychiatric hospitals regarding COVID-19. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 2020; 4: 100064.
19. Sun N, Wei L, Shi S, Jiao D, Song R, Ma L, et al. A qualitative study on the psychological experience of caregivers of COVID-19 patients. *Am J Infect Cont*, 2020; 48 (6): 592-8.
20. Ergün E, Ergün Ş, Çelebi İ. Acil Sağlık Hizmetleri Personellerinin Covid-19 Hakkında Bilgi, Korunma Düzeyleri Ve Etkileyen Etmenler. *Paramedik ve Acil Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 2020; 1: 17-21.
21. Mo Y, Deng L, Zhang L, Lang Q, Liao C, Wang N, et al. Work stress among Chinese nurses to support Wuhan in fighting against COVID-19 epidemic. *J Nurs Manage*, 2020.
22. Bhattacharya S, Singh S. Visible Insights of the Invisible Pandemic: A Scientometric, Altmetric and Topic Trend Analysis. *arXiv preprint arXiv:200410878*. 2020.
23. Jackson D, Bradbury-Jones C, Baptiste D, Gelling L, Morin K, Neville S, et al. Life in the pandemic: Some reflections on nursing in the context of COVID-19. *J Clin Nurs*, 2020.
24. Galea S, Merchant RM, Lurie N. The Mental Health Consequences of COVID-19 and Physical Distancing. *JAMA Int Med*, 2020.
25. Davidson PM, Szanton SL. Nursing homes and COVID-19: We can and should do better. *J Clin Nurs*, 2020.

26. Khalid I, Khalid TJ, Qabajah MR, Barnard AG, Qushmaq IA. Healthcare workers emotions, perceived stressors and coping strategies during a MERS-CoV outbreak. *Clinical medicine & research*, 2016; 14 (1): 7-14.
27. Millar RC. Nursing a patient with Covid-19 infection. *J Evidence-based Nurs Pract*, 2020; 1 (1): 4-8.
28. Organization WHO. Occupational health: A manual for primary health care workers. 2001.
29. Liu Q, Luo D, Haase JE, Guo Q, Wang XQ, Liu S, et al. The experiences of health-care providers during the COVID-19 crisis in China: a qualitative study. *The Lancet Global Health*, 2020; 8 (6): e790-e8.
30. Bourouiba L. Turbulent gas clouds and respiratory pathogen emissions: potential implications for reducing transmission of COVID-19. *Jama*, 2020; 323 (18): 1837-8.
31. Sasangohar F, Jones SL, Masud FN, Vahidy FS, Kash BA. Provider burnout and fatigue during the COVID-19 pandemic: lessons learned from a high-volume intensive care unit. *Anesthesia and analgesia*, 2020.
32. Huang L, Xu F, Liu H. Emotional responses and coping strategies of nurses and nursing college students during COVID-19 outbreak. *medRxiv*. 2020:2020.03.05.20031898.
33. Shanafelt T, Ripp J, Trockel M. Understanding and addressing sources of anxiety among health care professionals during the COVID-19 pandemic. *Jama*, 2020.
34. Mak W, Cheung F, Woo J, Lee D, Li P, Chan K, et al. A comparative study of the stigma associated with infectious diseases (SARS, AIDS, TB). *Hong Kong Med J*. 2009; 15: 34-7.
35. Mak WW, Mo PK, Cheung RY, Woo J, Cheung FM, Lee D. Comparative stigma of HIV/AIDS, SARS, and tuberculosis in Hong Kong. *Social science & medicine*, 2006; 63 (7): 1912-22.
36. Siu JYM. The SARS-associated stigma of SARS victims in the post-SARS era of Hong Kong. *Qualitative health research*, 2008; 18 (6): 729-38.
37. Bai Y, Lin CC, Lin CY, Chen JY, Chue CM, Chou P. Survey of Stress Reactions Among Health Care Workers Involved With the SARS Outbreak. *Psychiatric Services*, 2004; 55 (9): 1055-7.
38. Sterpetti AV. Lessons Learned During the COVID-19 Virus Pandemic. *J Am Col Surgeon*, 2020; 230 (6): 1092-3.
39. Liu Z, Han B, Jiang R, Huang Y, Ma C, Wen J, et al. Mental health status of doctors and nurses during COVID-19 epidemic in China. Available at SSRN 3551329. 2020.
40. Xiang YT, Yang Y, Li W, Zhang L, Zhang Q, Cheung T, et al. Timely mental health care for the 2019 novel coronavirus outbreak is urgently needed. *The Lancet Psychiatry*, 2020;7(3): 228-9.

Evaluation of biosafety cabinets used in microbiology laboratories according to performance qualification tests

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan biyogüvenlik kabinlerinin performans yeterlilik testlerine göre değerlendirilmesi

Edibe Nurzen NAMLI BOZKURT¹ (ID), Azer Sibel ÖZNR² (ID)

ABSTRACT

Objective: The biosafety cabinet is one of the important devices used in microbiology laboratories to provide personnel, environment and product protection. For this reason, performance characterization tests should be performed both at the installation stage and routinely. There are inspection bodies established for this purpose in our country. In this study, the findings were examined based on the last three years' data by the Sterility Control Laboratory (accredited-Inspection institution) accredited by TS EN ISO/IEC 17020 under the Ministry of Health of Türkiye, Department of Public Health Reference Laboratories of the General Directorate of Public Health.

Methods: In this study, nonconformities in biosafety cabinets, which were inspected based on TS EN ISO 12469 "Microbiological Safety Cabinets Performance, Classification and Verification" and ANSI/NSF-49 "Biosafety Cabinet Design, Production, Performance and Field Certification" standards between 2019-2021, were investigated. Within the scope of these standards, leakage in the main filter, leakage in the exhaust filter, inlet air flow velocity, downstream air velocity

ÖZET

Amaç: Biyogüvenlik kabini; personel, çevre ve ürün korumasını sağlamak amacıyla mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan önemli cihazlardan biridir. Bu sebeple hem kurulum aşamasında hem de rutin olarak performans yeterlilik testlerinin yapılması gerekmektedir. Ülkemizde bu amaçla kurulan muayene kuruluşları mevcuttur. Bu çalışmada T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Halk Sağlığı Referans Laboratuvarları Dairesi Başkanlığı bünyesinde TS EN ISO/IEC 17020 akreditasyonuna sahip Sterilite Kontrol Laboratuvarı (Akreditasyona sahip-Muayene kuruluşu) tarafından son üç yıllık veriler incelenmiştir.

Yöntem: Bu çalışmada 2019-2021 yılları arasında teste tabi tutulan biyogüvenlik kabinleri ; TS EN ISO 12469 "Mikrobiyolojik Güvenlik Kabinleri ile ilgili performans özellikleri ve Sınıflandırması ve Doğrulaması" ve ANSI/NSF-49 "Biyogüvenlik Kabini Dizayn, Üretim, Performans ve Alan Sertifikalandırması" standartları baz alınarak muayeneleri yapılan biyogüvenlik kabinlerindeki uygunsuzluklar araştırılmıştır. Bu standartlar kapsamında ana filtreda kaçak, egzoz filtreda kaçak, içeri hava

¹Ministry of Health of Türkiye, General Directorate of Public Health, Department of Tuberculosis, Ankara

²Ministry of Health of Türkiye, General Directorate of Public Health, Department of Public Health Reference Laboratories, Sterility Control Laboratory, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Edibe Nurzen NAMLI BOZKURT
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 G Blok Giriş Kat Çankaya, Ankara - Türkiye
E-posta / E-mail : edibenurzenbozkurt@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 22.05.2023
Kabul Tarihi / Accepted : 01.11.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.94220

Namlı Bozkurt EN, Öznur AS. Evaluation of biosafety cabinets used in microbiology laboratories according to performance qualification tests. Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(4): 483 - 490

measurement, air flow direction and visualization tests were applied. In addition, the cabins have undergone preliminary inspection.

Results: The leakage rates were found as 22.9% in the main filter and 23.6% in the exhaust filter. The nonconformity rates due to air flow velocities and flow visualization tests were found as 19.1% for inflow airflow velocity, 15.3% for downstream airflow velocity and 19.1% for flow visualization tests.

Conclusion: It was observed that the most frequently observed non-compliance was leakage in the filters. In addition, it has been determined that users do not have a filter certificate. In the preliminary examination, it was determined that there were also cabins that did not give visual and audible alarms when the flow was blocked. Since providing a healthy working environment in microbiology laboratories is one of the main objectives, we believe that it is important to have the performance qualification tests of the biosafety cabinets done at certain intervals in terms of employee health.

Key Words: Biosafety cabinet, inspection, performance qualification tests

akış hızı, aşağı hava akış hızı ölçümü, hava akış yönü ve görselleştirme testleri uygulanmıştır. Bu esnada kabinlerin ön incelemesi de yapılmıştır.

Bulgular: Ana filtrede kaçak oranı %22,9 ve egzoz filtresinde kaçak oranı %23,6. Hava akış hızları ile akış görselleştirme testlerinden kaynaklanan uygunsuzluk oranları içeri hava akış hızı için %19,1, aşağı hava akış hızı için %15,3 ve akış görselleştirme testleri için ise %19,1 olarak bulunmuştur.

Sonuç: En sık gözlemlenen uygunsuzluğun filtrelerde meydana gelen kaçak olduğu görülmüştür. Ayrıca kullanıcılarda filtre sertifikasının bulunmadığı tespit edilmiştir. Ön incelemede akış engellendiğinde görsel ve işitsel alarm vermeyen kabinlerin de bulunduğu belirlenmiştir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sağlıklı çalışma ortamı sağlanmasının ana amaçlardan biri olması sebebiyle çalışan sağlığı hususunda biyogüvenlik kabinlerinin performans yeterlilik testlerinin belirli zaman aralıklarında yaptırılmasının önemli olduğu kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Biyogüvenlik kabini, muayene, performans yeterlilik testleri

INTRODUCTION

Biosafety cabinets are the cabins in which an air barrier is created to protect the personnel working inside and the air is drawn from the outside into the device, releasing the air into the environment after filtering in order to protect the environment during operation, and reduce the risk of contamination of the sample/product (1). Although it is divided into various classes according to the purpose of use and the sample/product to be studied, Class II A2 type is mostly used in microbiology laboratories (2). So as a primary engineering control biosafety cabinets are used, and the laboratory design is the second engineering control (3) (Figure 1). Since the placement of the biosafety cabinets in the laboratory will affect the performance of the device, attention

should be paid to its positioning. It should be away from open windows, doors, ventilation grilles, air supplies, areas with heavy staffing, and equipment that generates large amounts of heat where as cabin airflow may be disturbed (4). Many studies done about the relationship between crossdraft, people walking by, sash movement and operator hands movement and the performance of biosafety of cabinet. It is found that although sash movement and operator hand movement are effecting containment, walk-bys cause more (5). Biosafety cabinets' ability to attract contaminants is dependent on the airflow pattern within the room, the level of turbulence within the room, and the rate of air entry into the cabinet. When the entry speed to the device decreases, also the contamination withdrawal speed decrease (4). There should be enough space between

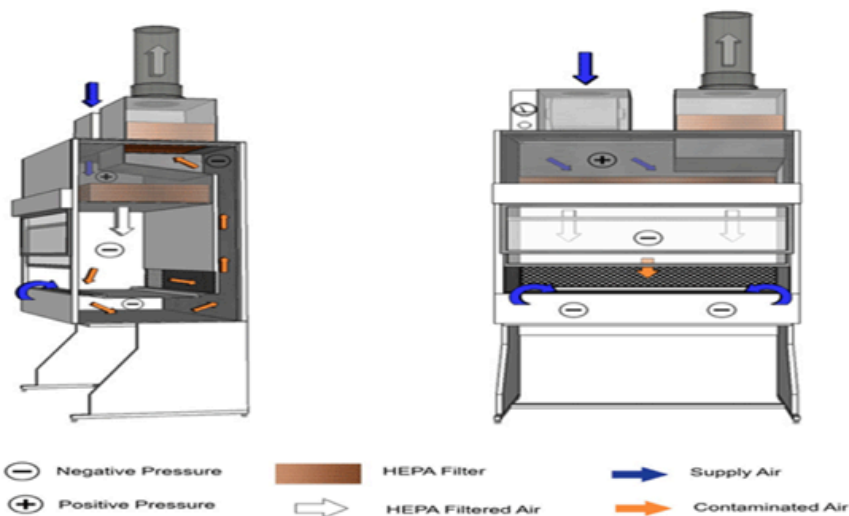


Figure 1. Class II A2 Cabinet (3)

the exhaust filter on the cabin and the ceiling so that the air outlet is not blocked. Disassembly and assembly of HEPA filters should be done by competent persons. This both protects the filter and protects the person from any contamination who is changing the filter (6). In addition, it should be noted that the filter is at least H14 based on the sample to be studied in the biosafety cabinet. Class II A2 cabinets are mostly used in microbiology laboratories. In Class II A2 cabins, approximately 30% of the air inside passes through the filter before leaving the cabin. The remaining 70% air is recycled and filtered before being sent back to the work area (7). Although HEPA filters are not effective to remove gases and vapors, they can remove particulate contamination like virus particles (8).

Periodic inspections of these devices, which are used for the protection of the working personnel, the product and the environment, must be carried out. Inspection is the determination of the conformity of the device to the requirements by performing the performance qualification tests of the device within the framework of the relevant standards, procedures, instructions and valid methods (9). Certification documentation is also an important side of inspection; calibration reports of test equipment that used for

inspection biosafety cabinet have to be sent, while as the technician/inspector has to be trained and know the cabinet and standards. Therefore the qualifications of technician/inspector should be checked as looking at training records, education backgrounds (10).

In order for microbiological safety cabinets to work in accordance with its purpose, it is necessary to have a CE certificate and to standardize at the production stage, to carry out installation tests, to perform periodic maintenance, performance tests and repairs, and to comply with the rules of use (11). Decontamination of biosafety cabinet after usage is important to work safely. Disinfectants like ethanol (62%-71%), sodium hypochlorite (1%), phenolic compounds etc. can be used (12). For the surface contamination before and after work ultraviolet light can be used. Be careful about the lamps; they must be clean and replaced in recommended periods (13).

Three main points for biosafety cabinets; effective usage, maintenance and performance tests save life. Microbiological laboratory workers have to know how to operate in cabinet and putting large amount of material in it cause contamination. To protect environment from infectious agents during replacing HEPA filter special and proper procedures have to be applied (14). Performance tests can be

name classified as installation tests and routine tests. Installation tests are carried out by the manufacturer to confirm the compliance of all functions of the biosafety cabinet with the standards. Performance qualification tests are the evaluation of conformity; after maintenance/repair or once a year (the period of which may change according to the frequency of use) during the use of the device. Organizations that perform installation tests and periodic inspections are called inspection bodies. The competence of these organizations is important. One of the important indicators of competence is accreditation. Accreditation of inspection bodies is carried out in accordance with TS EN ISO / IEC 17020 Conformity Assessment - 'Requirements for the operation of various types of inspection bodies' standard. There are 15 inspection bodies accredited by the Turkish Accreditation Agency in our country. Only one of the 15 accredited inspection institutions is a public laboratory, the Sterility Control Laboratory under the Ministry of Health, General Directorate of Public Health, other institutions are private companies.

In our study, it is aimed to evaluate the compliance of the biosafety cabinets, which must be used in every microbiology laboratory to protect the environment, product and person, with international standards by performing performance qualification tests.

MATERIAL and METHOD

In this study, 160 biosafety cabinets for which performance qualification tests were carried out by the Sterility Control Laboratory of the General Directorate of Public Health, Department of Consumer Safety and Public Health Laboratories between 2019-2021 were examined (Figure 2). Inspections of the said biosafety cabinets were carried out in line with the demands received from microbiology laboratories in public and private institutions and organizations.

Since 3 of them are defective, data could not be obtained. While performing performance qualification tests, TS EN 12469 and NSF / ANSI 49 standards are taken as basis. Of the 157 biosafety cabinets examined, 13 are Class II B2 cabins and the others are Class II A2 cabins. Class II A2 cabinet differs from B2 air circulation; a recirculating cabinet A2 and fully exhaust cabinet B2. About 30% of the air in A2 cabins passes through the filter before leaving the cabin. The remaining 70% is turned back and passed through the filter before being sent once more towards the work area. For B2 cabinet, building exhaust system draws air through the front and rear grills into a contaminated plenum and then into a filter before it is expelled directly into the cabin's outer atmosphere. The B2 cabinet is powered by 100% fresh air and there is no recirculation (15). While making this

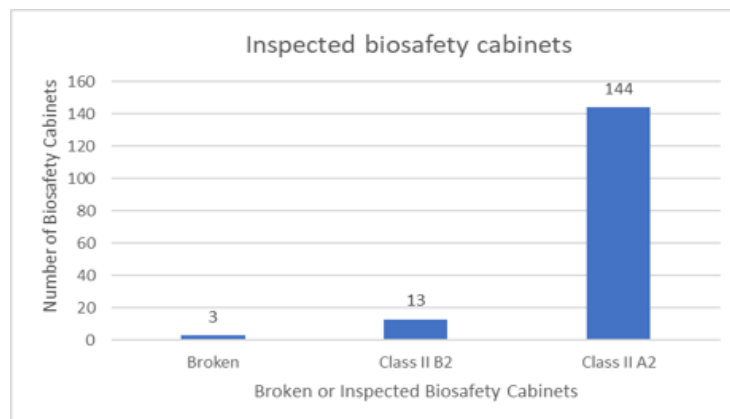


Figure 2. Inspected biosafety cabinets

study it is observed that the number of A2 cabinet are much more. The reason of this A2 cabinets are more economic design and their versatility in usage (16). While performing performance qualification tests, attention was paid to the fact that a staff member from the laboratory that owns the device is a test observer and that the measuring inspection devices are within the calibration periods. Measuring devices calibration is an important issue also, as some values can be very near to international limits and the making a decision if safety cabinet is suitable for working or not can cause a big difference for health. To overcome this and rely on calibration metrological traceability come into account (17).

Preliminary examination

It is done to confirm whether the biosafety cabinet has any malfunctions that will prevent it from being inspected. The occupancy/space ratios of the working area and whether it is sterile are taken into account. The presence of any broken parts, the operation of the control panel elements, the readability of the control panel display are confirmed. The stability of the windshield in accordance with the standards, the presence of a filter certificate is checked. Initial start and recoil alarms and exhaust system control alarm are reviewed.

Downstream Airflow Velocity Measurement

During the calibration period, downstream airflow velocity measurement is applied with anemometer. While taking measurements, attention is paid to the fact that the height level is on the same line and 10 cm above the level of the windshield opening. The entire surface is divided into equal intervals and measurements are taken from the front line and back line and recorded. The probe of the anemometer should be fixed for at least one minute, since the average of the air currents must be taken while the measurements are being taken.

Inflow Air Rate Velocity Measurement

A measurement is taken at least for a minute at 5 separate points 10 cm above the exhaust filter. The arithmetic averages of the measurements are found

and the inflow velocity is found by multiplying the active area of the filter and dividing it by the area of the front opening. For these measurements, attention is paid to the fact that the ceiling height with the device is at least 30 cm.

Another measurement method is the test with a balometer. The operating december of the biosecurity cabinet is opened to the appropriate height, and the mouth of the balometer is positioned to close the front opening. The device is fixed and measurements are taken until the flow rate of the balometer is stable (Figure 3). The obtained data is recorded in m³/hour and divided by the area of the mouth of the balometer to obtain the flow rate in meters /second.

Filter Leakage Measurement

Filter leakage measurements are made with a photometer and an aerosol generator. The filter system of the biosafety cabinet, that is, the top of the main filter and the bottom of the exhaust filter, is adjusted so that the generator is exposed to aerosol between 1 mg/m³ and 100 mg/m³, and the reading value is introduced to the photometer as 100% and the measurement is started. While taking the measurement, the photometer probe tip is held perpendicular to the measurement point and the filter surface scanning is started. While scanning, after the measurement of the connection seals and mounting parts of the filter is completed, the entire surface is passed. In order to show that the air discharged from the biosafety cabinet is clean when high-pathogenic studies are carried out, after the main filter of the biosafety cabinet is completely screened from the inner surface, the upper outlet exhaust filter located on the top of the biosafety cabinet is also checked.

Air Flow Direction And Visualization

This test is performed with a flow visualization tube (smoke tube). The flow visualization test includes checking the downstream, air leakage from the windshield, air leakage from the edges and corners, and inlet airflow. It is recorded on video while the relevant controls are being made.

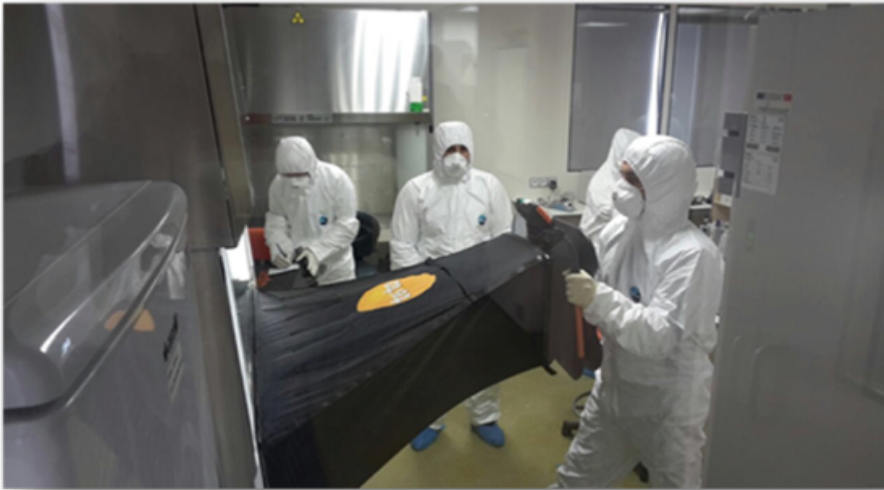


Figure 3. In air flow rate measurement of biosafety cabinet with the balometer device in P3 Laboratory

RESULTS

As a result of the preliminary examination, no certificates were found for the filters used in any of the 157 biosafety cabinets. It has been determined that 39 cabins do not give backfire alarms, and 7 cabins do not give an audio/visual alarm when air draft is blocked. It was observed that 104 did not give an alarm when the exhaust system was covered with a airtight paper by 20%.

During the filter leakage measurement, 36 cabin main filters and 37 cabin exhaust filters were not found suitable. Leakage was found in the connection seals or main surface areas of the filters in question. It was found that the filters were not suitable during the scanning in 2 cabins. 2 bombs were seen in the main filter laminator in the cabin

The acceptance criteria for measuring the air flow rate inside are divided according to the origin of the device's production. The average speed of Class II A2 and Class II B2 cabins should be greater than 0.40 m/s according to TS EN 12469, and greater than 0.51 according to NSF 49. In addition, each measurement value should not differ more than 20% from the average. As a result of the tests, 30 biosecurity cabins were not found suitable.

According to the TS EN 12469 Standard for downstream airflow velocity measurement, the average velocity in class II biosafety cabinets should be between 0.25 m/s-0.50 m/s. Maximum and minimum speed values cannot be more than $\pm 20\%$ of the average speed value. According to the NSF/ANSI49 standard, the acceptance criterion is that the measured value cannot be ± 0.081 m/s higher than the manufacturer's declared flow rate value. If the manufacturer's declaration cannot be reached, the speed values for class II A2 and B2 cabin types should be between 0.25-0.40m/s. According to the downstream air flow test, 24 cabins were not suitable.

According to the air flow direction and visualization test, 30 cabins are not suitable. It has been observed that the smoke given in these cabins is not absorbed, remains in the cabin, leaks from the edges of the frame, and the entering air is not absorbed from the front grilles.

DISCUSSION

The absence of a filter certificate in the users of the biosafety cabinet may cause illness if an unsuitable filter is installed until the device is inspected. The fact that it does not give an alarm when the exhaust system is covered by 20%, that it cannot be noticed when there

Applied Tests	Unsuitable Cabin Numbers
Main Filter Leakage	36 unit
Exhaust Filter Leakage	37 unit
Inflow Air Rate Measurement	30 unit
Downstream Airflow Velocity Measurement	24 unit
Air Flow Direction And Visualization	30 unit

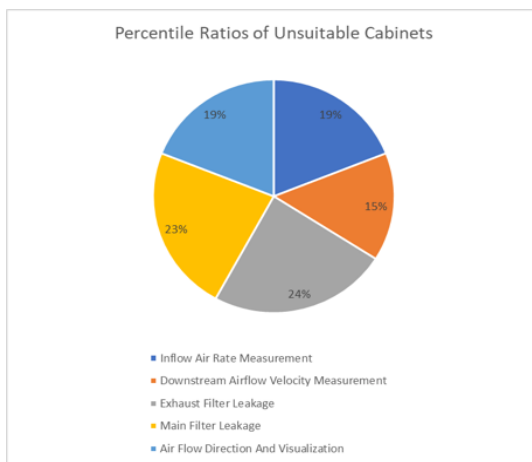


Figure 4. Percentages of cabins that were found unsuitable as a result of the tests applied

is a change in air flow values, is proof that the cabin does not show this when the filter reaches saturation or the formation of tears. Treatment. Preventing air intake and covering the exhaust system while the personnel are working in the cabin will also cause changes in air flows. In such cases, if the cabin does not give an alarm, users will not be able to take any precautions.

Leakage that occurs in the exhaust filter will cause high levels of pathogenic microorganisms to be distributed to the environment and damage the environment, spreading infections. Leaks occurring in the main filter also cause contamination of the sample being studied, which can lead to incorrect laboratory results and damage to patients as a result of incorrect treatment.

High downstream airflow causes turbulence in the cabinet and also damages the durability and permeability of the HEPA filter, while low airflow can cause contamination in the

sample being studied and cross contamination when there is another sample in the cabinet.

A low inflow air rate also causes a low downstream air flow rate. Microorganisms are released from the biosafety cabinet. In addition, not absorbing the suspended air in the cabinet causes microorganisms to be released into the laboratory environment when the device is turned off. A high inflow air velocity causes turbulence and therefore contamination.

When we look at the percentile ratios, the fact that the most detected incompatibility occurs in filters, and the air flow rates are close to the flow visualization rates shows that these tests interact with each other.

The Ministry of Health, as the only authorized and accredited public laboratory throughout the country, provides services by providing necessary guidance and information sharing, making an extremely important contribution in terms of biosecurity.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. European Committee for Standardization (2004). Biotechnology: performance criteria for microbiological safety cabinets. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium, CEN, EU, BS EN 12469.
2. National Microbiology Standards Infectious Diseases Laboratory Diagnosis Guide Volume 1. T.C. Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey, Department of Microbiology Reference Laboratories (2014). TR0802.16 Infectious Diseases Surveillance and Control Project https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/rehberler/UMS_LabTaniRehberi_Cilt_1.pdf [accessed 10 November 2021].
3. U.S. Department of Health and Human Service. Centers of Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories (BMBL). 5th ed. Washington, D.C: U.S. Government Printing Office, 2007. (Accessed: November, 2021).
4. Barbosa BPP, Brum NCL. Sensitivity Tests of Biological Safety Cabinets Contaminant Contention to Variations on Indoor Flow Parameters in Biosafety Level Laboratories. *Building and Environment*, 2017; 124: 1-13.
5. Huang RF, Chou CI, Hung CH. Improving Aerodynamics and Operator Protection Performance of Biological Safety Cabinet Subject to Dynamic Influences. *Environmental Engineering Science*, 2009; 26 (7).
6. The official website of the Government of Canada. Canadian Biosafety Standards and Guidelines. Second Edition 11.2 Installation of BSCs. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/canadian-biosafety-standards-guidelines/handbook-second-edition.html> (Accessed: November, 2021).
7. NSF International, American National Standards Institute (ANSI) (2021). Biosafety cabinet Design, Construction, Performance and Site Certification. Washington, USA, NSF 49.
8. Wagner JT, Demystifying Biological Safety Cabinets-Getting the Most Out of the Primary Engineering Controls Used in Microbiology Laboratories. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2007; 29 (14).
9. European Committee for Standardization. Conformity assessment - Requirements for the operation of various types of inspection bodies. Brussels, Belgium: EN ISO/IEC 17020. 2012.
10. Institute of Environment Sciences and Technology. Qualifications For Organizations Engaged In The Testing And Certification Of Cleanrooms And Clean-Air Devices. Institute and Technology, Rolling Meadows, IL. IEST-RP-CCO019.1. 2006.
11. Kılıç B, İslam EA, Bilgiç MM, Border E. Mikrobiyolojik Güvenlik ve Mikrobiyolojik Güvenlik Kabinleri İçin Performans Kriterleri. Seventh Medical Technologies Congress. October, 27-29, Antalya-Turkey. 2016.
12. World Health Organization (2021). Cleaning and Disinfection of Environmental Surfaces in the Context of COVID-19: Interim Guidance (World Health Organization, 2021) <https://www.who.int/publications/i/item/cleaning-and-disinfection-of-environmental-surfaces-in-the-context-of-covid-19> (Accessed: November, 2021).
13. Pawar SD, Khare AB, Keng SS, Kode SS, Tare DS, Singh DK, More RL, Mullick J. Selection and application of biological safety cabinets in diagnostic and research laboratories with special emphasis on COVID-19. *Rev Sci Instrum*. 2021 Aug 1; 92(8):081401.
14. Hwang SH, Yi TW, Cho KH, Lee IM, Yoon CS. Testing the Performance of Microbiological Safety Cabinets Used in Microbiology Laboratories in South Korea. *Letters in Applied Microbiology*, 2011; 53: 371-3.
15. Taylor, A. V., Baker, N., Hulsey, M., Bennett, C. C., Meiners, M., & Gonzales, B. A. (2019). Evaluating containment effectiveness of A2 and B2 biological safety cabinets. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 76(9), 599-607.
16. Dondelinger R. The Fundamental of Biological Safety Cabinet, Biomedical Instrumentation & Technology. Allen Press Publishing Services Inc. Kansas, (2013).
17. Türk Akreditasyon Kurumu (2021). R10.12 Metrolojik İzlenebilirlik Rehberi, Rev. 05. https://secure.turkak.org.tr/docs/Guidelines/R10-12_05_0.pdf (Accessed: November, 2021).

In vitro effects of various essential oils on biofilm viability; their antibacterial and antibiofilm activities against clinical *Staphylococcus aureus* isolates

Çeşitli esansiyel yağların klinik *Staphylococcus aureus* izolatlarında biofilm canlılığına in vitro etkileri, antibakteriyel ve anti-biofilm aktiviteleri

Sezin ÜNLÜ¹ (ID), Aylın ÜSKÜDAR GÜÇLÜ¹ (ID), Hasan Cenk MİRZA¹ (ID), Aylın ALTAY KOÇAK¹ (ID), Ahmet BAŞUSTAOĞLU¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Antimicrobial resistance is a public health threat and is related to high mortality and morbidity. Because no development of new antibiotics can combat antibiotic resistance for pathogenic bacteria, the need for natural products has emerged. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is an important human pathogen responsible for community- and hospital-acquired infections. The goal of this study was to identify the in vitro effects of *Origanum onites*, *Lavandula stoechas*, *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* essential oils (EOs) on biofilm viability as well as the antibacterial and anti-adherent properties on clinical *S. aureus* isolates from wound, biopsy and abscesses samples.

Methods: The antibacterial activities of the EOs were assessed on 71 clinical *S. aureus* isolates by broth microdilution to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Biofilm-forming isolates were determined, and EOs' ability to prevent biofilm formation in a dose-dependent manner was calculated.

ÖZET

Amaç: Antimikrobiyal direnç yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkili bir halk sağlığı sorunudur. Yeni antibiyotikler de patojenik bakteriler için antibiyotik direnciyle mücadelede yeterli olmadığından doğal ürünlere olan ihtiyaç ortaya çıkmıştır. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), toplum kaynaklı ve sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlardan sorumlu önemli bir insan patojenidir. Bu çalışma *Origanum onites*, *Lavandula stoechas*, *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* esansiyel yağlarının (EO) yara, biyopsi ve apse örneklerinden izole edilen klinik *S. aureus* izolatlarındaki antibakteriyel ve anti-adeziv aktivitesini ve biyofilm canlılığına olan etkisini in vitro olarak belirlemeyi amaçlamaktadır.

Yöntem: EO'ların antibakteriyel aktiviteleri, minimum inhibitör ve bakterisidal konsantrasyonlarını (sırasıyla MİK ve MBK) belirlemek üzere sıvı mikrodilüsyon yöntemi, 71 klinik *S. aureus* izolatı üzerinde değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşturan izolatlar tespit edilmiştir ve EO'ların biyofilm oluşumunu doza bağlı olarak önleme yeteneği hesaplanmıştır. Minimum

¹Baskent University, Medical Faculty, Department of Medical Microbiology, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Aylın ÜSKÜDAR GÜÇLÜ
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Bağlıca Kampüsü 303A Etimesgut, Ankara - Türkiye
E-posta / E-mail : uskudaraylin@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 11.02.2022
Kabul Tarihi / Accepted : 03.01.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.46504

Ünlü S, Üsküdar Güçlü A, Mirza HC, Altay Koçak A, Başustaoglu A. In vitro effects of various essential oils on biofilm viability; their antibacterial and antibiofilm activities against clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(4): 491 - 502

Minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) and minimum biofilm eradication (MBEC) and the number of viable bacteria in sub-inhibitory doses of EOs were calculated by BioTimer-Assay (BTA).

Results: All of the tested isolates showed high sensitivity towards the *Thymus vulgaris* and *Origanum onites*; MICs ranging from below 0.039 to 0.625 µl/ml. While the highest MIC value was determined as 5 µl/ml for *Salvia officinalis*, it was calculated as greater than 10 µl/ml for *Lavandula stoechas*. Each tested oil was detected to prevent biofilm formation at a significant percentage.

Conclusion: The essential oils of *Origanum onites* and *Thymus vulgaris* showed bactericidal properties against clinical *S. aureus* isolates, including methicillin-resistant strains, which may become a promising alternative for multidrug-resistant pathogens. In addition, the number of viable bacteria in biofilm in sub-inhibitory doses of *Lavandula stoechas* and *Salvia officinalis* were found to increase when applied doses decreased.

Key Words: Antibacterial, antibiofilm, biofilm viability, biotimer assay, essential oils

biyofilm inhibitör ve eradikasyon konsantrasyonları (sırasıyla MBİK ve MBEK) ve EO'ların alt inhibitör dozlarındaki canlı bakteri sayısı BioTimer-Assay (BTA) ile hesaplanmıştır.

Bulgular: Test edilen izolatların tümünün, *Thymus vulgaris* ve *Origanum onites*'e karşı, MİK değerleri 0.039'dan küçük ve 0.625 µl/ml arasında değişmektedir, yüksek hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir. *Salvia officinalis* için en büyük MİK değeri 5 µl/ml olarak belirlenirken, *Lavandula stoechas* için bu değer 10 µl/ml'den büyük olarak hesaplanmıştır. Test edilen her yağın, biyofilm oluşumunu önemli bir oranda önlemediği belirlenmiştir.

Sonuç: *Origanum onites* ve *Thymus vulgaris*'in EO'ları metisiline dirençli suşlar da dahil olmak üzere klinik *S. aureus* izolatlarına karşı bakterisidal etki göstermiştir ve bu da söz konusu esansiyel yağların çok ilaca dirençli patojenlerle başetmek için umut verici bir aday olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, *Lavandula stoechas* ve *Salvia officinalis*'in alt inhibitör dozlarında uygulanan dozlar azaldıkça biyofilmdeki canlı bakteri sayısının arttığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyal, antibiyofilm, biyofilm canlılığı, biotimer assay, esansiyel yağlar

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is an important human pathogen responsible for community- and hospital-acquired infections. It is a leading cause of a wide range of infections, and skin and soft tissue infections are among the most common. *S. aureus* can easily acquire antibiotic resistance, and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is multidrug-resistant, leading to the need to use last resort antibiotics and increase mortality and morbidity (1). *S. aureus* is also a potent biofilm former on both implanted medical devices and host tissue.

Biofilm protects bacteria from host immunity and antibiotics, complicating treatment of infections (2). Bacterial biofilms have a variety of potential antimicrobial resistance mechanisms (3) and as much as six-log difference in cell viability was reported on biofilm comparing to planktonic cells in the presence of antibiotics (4). In this view, there is a need for new natural substances having both antibacterial and antibiofilm activity against *S. aureus* strains.

Essential oils (EOs) are an aromatic mixture of terpenoid and phenolic compounds obtained from flowers, buds, seeds, leaves, twigs, bark, herbs, wood, fruits, and roots (5,6). Thousands of EOs are known,

most of which have commercial importance and have comprehensive biological properties including antibacterial, antiviral, antifungal, and antiparasitic properties; interest in medicinal applications (7,8). Researches demonstrate antimicrobial and antibiofilm activities of EOs against various human pathogens, (9,10,11,12) making them excellent candidates for new natural drug discovery.

The main components of the *Origanum* and *Thymus* species are carvacrol and thymol (13). Carvacrol is a monoterpene and an important component of several essential oils because of its biological property. It demonstrates a wide spectrum of antimicrobial activity. Thymol is a p-cymene derivate known for its antiseptic and antimicrobial properties (14). Genus *Lavandula* and *Salvia* belong to the Lamiaceae family. The antibacterial, anti-inflammatory and antifungal activities of *Lavandula* come from its phenolic compounds such as phenolic acids and flavone glycosides (15). The main component of *Salvia officinalis* is terpenes such as manool, viridiflorol, eucalyptol, borneol, and thujone. In addition, its leaves contain carnosol, carnosic acid, rosmarinic acid, flavonoids, polysaccharides, tannic acid, oleic acid, ursonic acid, ursolic acid, fumaric acid, chlorogenic acid, caffeic acid, and estrogenic (16).

Thus, in this study, four essential oils, *Origanum onites* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Lavandula stoechas* (lavender) and *Salvia officinalis* (clary sage), were evaluated in terms of antimicrobial and anti-adherent activities against clinical *S. aureus* isolates from wound, abscess and biopsy material. Besides, this research aims to determine the effects of EOs on biofilm viability.

MATERIAL and METHOD

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project No: KA21/73).

Bacterial Strains

Clinical isolates of *S. aureus* in the bacterial culture collection of the Medical Microbiology Laboratory of

Baskent University, isolated from wound, abscess and biopsy materials between 2016-2020 were included in the study. All *S. aureus* isolates were routinely tested for methicillin resistance by cefoxitin screening test described in EUCAST standards, (17) and *S. aureus* ATCC 43300 and *S. aureus* ATCC 29213 were used as positive and negative control respectively.

Essential Oils

EOs of thyme, oregano, lavender, and clary sage EOs were provided by the manufacturer (Caliskan Agriculture, Turkey). All the EOs were obtained by the hydro-distillation method.

Determination of MIC and MBC

The broth microdilution test was performed to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (18). The EOs in combination with 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO), were diluted twofold in Mueller Hinton Broth (MHB) (BD Difco™, France) and 100 µl of each dilution was transferred into wells. The bacterial suspension was inoculated in each well with 1.5x10⁸ CFU/ml. After 24h of incubation at 37°C, absorbance was measured at 570 nm (BioTek Instruments, ELX 800, USA). The lowest concentration of EOs that demonstrated no growth was evaluated as MIC. All studies were performed in triplicate. While thyme and oregano EO concentrations ranged from 0.039 to 10 µl/ml, lavender and sage EO concentrations ranged from 0.039 to 40 µl/ml. Minimum bactericidal concentration (MBC) was determined by subculturing the 10µl of broths used for MIC assay onto Tryptic Soy Agar (TSA) (Condalab, Spain) (19). MBC was considered the lowest concentration of the EOs that results in the killing of 99.9% of the bacteria after the incubation period at 37°C for 24h.

Biofilm Formation

For biofilm formation, the method described by Peeters et al. (20) was used. Briefly, flat-bottom polystyrene microplates containing 180 µl of tryptic soy broth (TSB) (BD Difco™, France) were inoculated

with 20 µl of bacterial culture adjusted to 1×10^6 CFU/ml. After 24h of incubation, biofilm formation was detected by the crystal violet staining method. The absorbance was measured at 570 nm (21), and strains were evaluated as negative, weak, intermediate and strong biofilm former (22). *S. aureus* ATCC 6538 and *S. aureus* ATCC 29213 were used as positive and negative control of biofilm formation, respectively.

Calculation of Biofilm Formation Inhibition Percentage of EOs In a Dose-Dependent Manner

The effect of tested 4 EOs against biofilm-forming isolates and control strains was detected in 96-well plates in a dose-dependent manner. Briefly, 100 µl of bacterial suspension for each isolate was added to each well containing different doses of EOs ranging from 0.039 µl/ml to 10 µl/ml. After 24h of incubation, a biofilm staining procedure was applied, and OD values were quantified. Wells without EO was used as a control to calculate the percentage of biofilm inhibition as follows (23):

Percentage of inhibition = $\left(\frac{\text{Control OD}_{570 \text{ nm}} - \text{Sample OD}_{570 \text{ nm}}}{\text{Control OD}_{570 \text{ nm}}} \right) \times 100$.

Effects of EOs on Biofilm Viability

- BioTimer Assay

BioTimer Assay (BTA) was employed to determine the EOs susceptibility of *S. aureus* clinical isolates without any manipulation. BTA enumerates viable bacteria in biofilm before and after the treatment with EOs. BioTimer medium with phenol red (BT-PR) was prepared as described by Pantanella et al. (24) Colour change from red to yellow was monitored every hour until 23 hours. The time required for the colour switch directly links to the initial concentration of bacteria. *S. aureus* ATCC 6538 was employed to draw a correlation line, and overnight cultures were prepared in 2 ml of BT-PR medium. Serial 10-fold dilutions were performed in test tubes. Bacterial suspension in each dilution was cultured on Mueller Hinton Agar (MHA) (Condalab, Spain) simultaneously, and after 24 hours of incubation, colonies were

counted by colony-forming unit (CFU) method and \log_{10} CFU versus time of colour change were plotted.

- EOs Efficacy on Biofilm

To detect EOs susceptibility of *S. aureus* biofilm-forming strains, methods by Pantanella et al. (24) with slight modifications were applied. Biofilms were formed in 96-well plates with peg lids (Thermo Fisher Scientific, Nunc-TSP, Denmark) as described in 2.6.3., and 2-fold serial dilutions of EOs were prepared in BT-PR medium for each oil. Final oil concentrations ranged from 0.039 to 10 µl/ml. For lavender and clary sage oils highest concentration tested was adjusted to 40 µl/ml. After biofilm formation, wells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and filled with 2-fold serially diluted EOs in BT-PR medium. Peg lids were placed, and the time required for colour change was monitored every hour. After 24 hours of incubation, the lowest concentration of EOs that inhibits colour change in BT-PR medium (wells that remaining red) was recorded as minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC). To determine minimum biofilm eradication concentration (MBEC), peg lids from the wells that colour change did not occur were transferred to the new BT-PR media without EO. Microplates were incubated at 37°C for 24 hours. The lowest concentration of EO that colour change was not observed determined as MBEC.

- Enumeration of Viable Bacteria in Biofilm in Sub-Inhibitory Doses of EOs

After the determination of MBIC, the sub-inhibitory doses of EOs were evaluated to demonstrate their quantitative effects on bacterial viability in preformed biofilm. Previously tested biofilm-forming strains' inoculation were prepared (1×10^6 CFU/mL), and strains were incubated in TSB at 37°C for 24 hours in 96-well plates with peg lids (Thermo Fisher Scientific, Nunc-TSP, Denmark). After 24 hours, wells were washed three times with PBS and filled with 200 µl of BT-PR medium containing different EO doses. Peg lids from previous microplates were placed and incubated at 37°C. The colour change was monitored

every hour and noted. The time required for colour change was employed to enumerate bacteria in biofilm according to the correlation line.

RESULTS

Among 182 clinical *S.aureus* isolates, 71 of them isolated from wound, abscess and biopsy materials were included in the study. Among them, 16 (23.6%) were MRSA, and 55 (76.4%) were MSSA.

MIC and MBC

All of the isolates were susceptible to thyme, sage and oregano EOs, whereas 88.7% (63/71) of the isolates were susceptible to lavender oil. MIC₅₀ of lavender EO was calculated as 2.5 µl/ml, while MIC₉₀ was 10 µl/ml. MIC₅₀ of clary sage EO was calculated as 1.25 µl/ml, and MIC₉₀ was five µl/ml. On the other hand, MIC₅₀ for both oregano and thyme was <0.039 µl/ml, and MIC₉₀ was 0.078 and 0.156 µl/ml for oregano and thyme, respectively. Lowest MIC and MBC ranges were obtained from oregano; for MIC <0.039 to 0.312 µl/ml and for MBC <0.039 to 0.625 µl/ml. Followed by thyme; MIC values were ranged from <0.039 to 0.625 µl/ml and MBC values were ranged from <0.039 to 1.25 µl/ml. MIC values for clary sage were between 0.078 to 10 µl/ml, while MBC were between 0.625 to 20 µl/ml. Lastly, the highest MIC and MBC ranges were obtained for lavender; MICs were between 0.039 to 20 µl/ml, and MBCs were 0.078 to 40 µl/ml.

Biofilm Formation

Biofilm formation assay showed that 28.2% (n=20; 8 MRSA and 12 MSSA) of the isolates were able to form biofilm, and 13 of them were considered low-grade biofilm former, and 7 were intermediate-grade biofilm former. 50.0% of MRSA isolates were biofilm-forming isolates, whereas 21.8% of MSSA isolates formed biofilm. *S. aureus* ATCC 6538 appeared as a strong biofilm former.

Calculation of Biofilm Formation Inhibition Percentage of EOs In Dose-Dependent Manner

Lavender EO showed biofilm formation inhibition activity on all tested isolates. Biofilm formation inhibition was detected in 30% of isolates at all lavender concentrations ranging from 0.039 to 10 µl/ml, and 50.0% of them were MRSA. While biofilm inhibition percentages at lavender concentration 10 µl/ml were ranged from 92.4% to 28.6%, at concentration 5 µl/ml, inhibition percentages were ranged from 88.5% to 5.4%. At lavender concentration below 2.5 µl/ml, there was no biofilm inhibition activity for 45.0% of isolates, and 37.5% of them were MRSA. At the oregano concentration ranging from 10 to 0.312 µl/ml, biofilm formation was inhibited in all of the isolates. Also, 45.0% of the isolates had biofilm inhibition activity in all concentrations of and 44.4% of them were MRSA. At the lowest concentration (0.039 µl/ml) of oregano, biofilm inhibitory percentages were ranged from 75.6% to 1.5%. Biofilm inhibition was detected in 25.0% of isolates at all concentrations of thyme, and 20% of them were MRSA. At the lowest concentration (0.039 µl/ml) of thyme, biofilm formation was inhibited at a percentage ranging from 71.7% to 12.8%. Biofilm formation inhibition was detected in 41.2% of isolates at all clary sage concentrations, and 28.6% of them were MRSA. In general, as the concentration of EOs decreased, so did the biofilm formation inhibition percentages (Fig. 1).

Effects of EOs on Biofilm Viability

- Biotimer Assay

A serial 10-fold dilution of *S. aureus* ATCC 6538 in BT-PR medium was employed to count the number of bacteria through a correlation line (Fig. 2). There was a linear correlation between time for complete colour change and log₁₀CFU. Linear correlation was calculated as: $y=-0.0073x + 10.2822$ and $r =0.9826$.

- EOs Susceptibility Test on Biofilm

MBIC and MBEC values of each of the four EOs were demonstrated in (Table 1). MBIC and MBEC of tested EOs were higher than those MIC and MBC, with some exceptions.

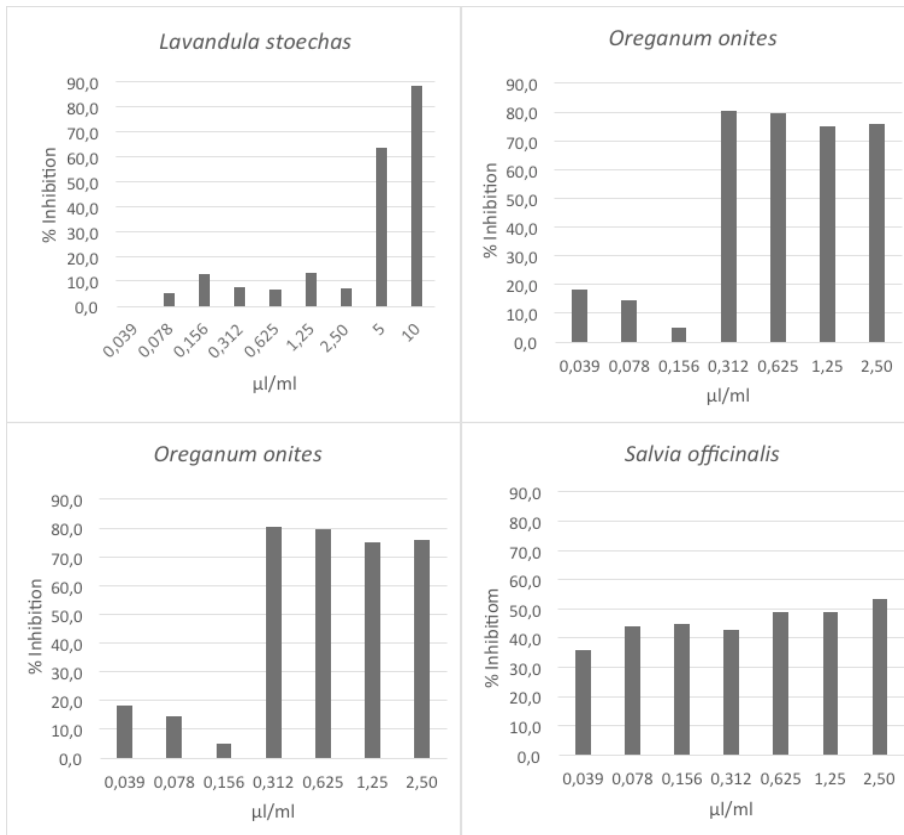


Figure 1. Concentrations versus biofilm inhibition percentages of each EO

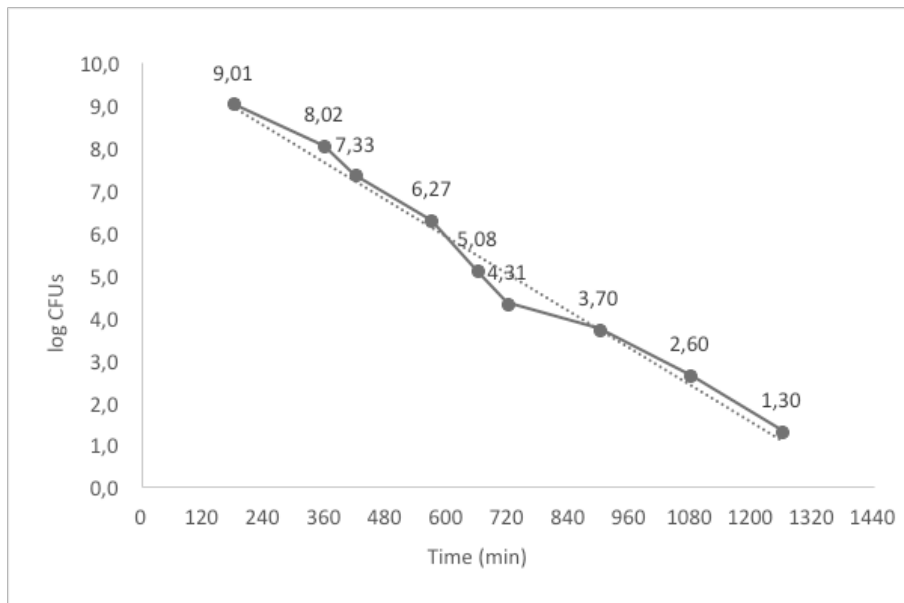


Figure 2. Correlation line of number of *S. aureus* ATCC 6538 and time of complete color change from red to yellow

Table 1. Lavender, thyme, oregano and clary sage Essential Oils MIC, MBIC, MBC and MBEC values of biofilm-forming isolates

Methicillin Sensitivity	Isolate Number	<i>Lavandula stoechas</i>					<i>Origanum onites</i>					<i>Thymus vulgaris</i>					<i>Salvia officinalis</i>				
		MIC (µl/ml)	MBIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MBEC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MBEC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MBEC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MBEC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MBEC (µl/ml)
MRSA	8	5	2.5	20	20	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.312	1.25	10	20
MRSA	12	5	5	20	40	0.078	<0.039	0.312	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.156	0.156	20	40
MRSA	14	1.25	5	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.156	<0.039	0.312	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	1.25	5	20	40
MRSA	16	2.5	5	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.312	0.312	20	40
MRSA	21	5	5	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	1.25	5	20	40
MSSA	44	5	2.5	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	5	10	10	20
MSSA	49	5	2.5	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	2.5	5	10	20
MSSA	50	5	5	20	20	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	1.25	5	10	10
MSSA	51	5	10	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.312	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	1.25	5	10	10
MSSA	52	5	2.5	20	40	<0.039	<0.039	0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.312	0.625	10	10
MSSA	56	2.5	5	10	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	2.5	5	20	20
MSSA	71	2.5	5	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.156	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.078	0.078	1.25	10
MSSA	72	2.5	5	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.312	0.312	5	10
MSSA	78	2.5	5	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	1.25	1.25	10	20
MSSA	82	5	2.5	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.625	1.25	10	20
MSSA	86	5	2.5	20	40	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.312	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.312	1.25	10	20
MRSA	163	1.25	5	20	20	0.078	<0.039	0.312	<0.039	0.156	<0.039	0.625	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.625	0.625	20	20
MRSA	165	1.25	10	20	20	0.156	<0.039	0.625	<0.039	0.312	<0.039	1.25	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	1.25	10	10	20
MRSA	166	1.25	5	20	20	0.078	<0.039	0.625	<0.039	0.625	<0.039	1.25	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	1.25	5	10	40
MSSA	172	1.25	5	20	20	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.156	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	1.25	5	10	40
MSSA ATCC	6538	1.25	5	1.25	20	<0.039	<0.039	0.156	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.039	0.625	1.25	1.25
MSSA ATCC	25923	2.5	5	10	20	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.312	0.312	2.5	10

- 3.4.3. Enumeration of Viable Bacteria in Biofilm in Sub-Inhibitory Doses of EOs

The number of viable bacteria in biofilm in sub-inhibitory doses of lavender and clary sage EOs was quantified with BTA. The number of *S. aureus* ATCC

6538 after treatment with a sub-MIC concentration from 1/2 to 1/64 was calculated as a percentage by correlation line (Table 2). As the concentration of oils decreases, the percentage of viable bacteria increases.

Table 2. Number of viable *S. aureus* ATCC 6538 after treatment with sub-inhibitory doses of lavender and clary sage essential oil as a percentage

<i>Lavandula stoechas</i>		<i>Salvia officinalis</i>	
MIC (μ l/ml)	Percentage of viable bacteria (%)	MIC (μ l/ml)	Percentage of viable bacteria (%)
1/2	70.44	1/2	87.49
1/4	72.89	1/4	89.68
1/8	87.44	1/8	ND
1/16	92.22	1/16	ND
1/32	94.78	1/32	94.06
1/64	99.67	1/64	ND

*ND: not detected.

DISCUSSION

Plants and derivatives such as EOs are well-known natural substances having broad-spectrum activity against pathogens. In this research, oregano, thyme, clary sage and lavender EOs antibacterial activities were evaluated, and the highest antibacterial activity was observed with thyme and oregano followed by clary sage. The lowest antimicrobial activity against 71 clinical *S. aureus* isolates was detected in lavender. While 85.9% of isolates were susceptible to oregano at a concentration below 0.039 μ l/ml, 70.4% of isolates were susceptible to thyme at a concentration below 0.039 μ l/ml. MBC for oregano was found to be between <0.039 to 0.625 μ l/ml,

while for thyme, MBC varies between <0.039 to 1.25 μ l/ml. MIC and MBC values for lavender and clary sage were higher than those for thyme and oregano. MSSA showed greater susceptibility to EOs than MRSA. However, even at the lowest concentration of thyme and oregano, most of the MRSA isolates were detected to be susceptible to these EOs.

A study on the antibacterial property of thyme oil on *S. aureus* isolates demonstrated that MIC varied between 0.5 to 1 μ l/ml (25). Even though these MIC values were relatively higher than the current study, Fabio et al., demonstrated that MIC for *Thymus vulgaris* against *S. aureus* was 0.0125 μ l/ml (26). It is known that compositions of EOs play significant roles in the antimicrobial properties of

EOs. Several factors can affect EOs compositions, such as harvesting seasons and geographical sources (6), which may be the reason of the differences in efficacy of EOs. A previous study showed that clary sage EO was effective at concentrations between 3.75 and 5.25 $\mu\text{l/ml}$ on 27 clinical *S. aureus* isolates, which is in concordance with our findings; clary sage EO's MIC_{50} was found 5 $\mu\text{l/ml}$ for 71 clinical *S. aureus* isolates (27). Previous studies demonstrated that EOs of lavender and oregano are highly effective against a wide range of microorganisms including *Escherichia coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* (28, 29, 30). These results highlighted that EOs and their components are promising alternatives. Therefore, further experiments including in vivo studies are required to evaluate EOs as a therapeutic agent in the medicinal application.

The antibiofilm activity of various EOs has been demonstrated on a variety of microorganisms and many EOs and their components were accepted as potent agents against biofilms. Different EOs mechanisms of action as antibiofilm agents were also reported for *S. aureus* however; there are not sufficient studies particularly related to multidrug-resistant clinical isolates such as MRSA (31). Besides, the lack of knowledge regarding effective doses for preventing biofilm formation is a pivotal limitation for EO studies. In this study, each of the 4 EOs was tested against their ability to prevent biofilm formation in a dose-dependent manner. Higher doses of EOs inhibited biofilm formation at higher percentages, as expected. While thyme and oregano were able to prevent biofilm formation at a significant percentage even in the lowest concentrations, lavender and clary sage were able to inhibit biofilm formation at higher doses. Even though isolates were more susceptible to clary sage than lavender, lavender was more successful in preventing biofilm formation. Based on this result, the components involved in the antibacterial property of EOs were different from those associated with biofilm formation. It was seen that in a biofilm-forming isolate, biofilm inhibition was

significantly reduced as low as 0.156 $\mu\text{l/ml}$ oregano concentration. At the concentration of 0.156 $\mu\text{l/ml}$, oregano showed nearly no activity for preventing biofilm formation (5%); this may be due to the fact that this concentration is the MIC concentration of this isolate. Also, this study is limited because, at the highest concentrations of thyme, oregano and clary sage, oil intensity was too high, which can confuse the calculation of inhibition percentage. Therefore, the first two highest concentration of thyme and clary sage (10 and 5 $\mu\text{l/ml}$), and the highest concentration of oregano was not included in the calculation of biofilm inhibition percentage (Fig. 1). Even though biofilm formation was inhibited in these concentrations, the percentages of biofilm formation inhibition for the highest concentrations can be misleading. Therefore, these EOs may require to work in a lower concentration.

EOs' efficacy in biofilm is a concern among microbiologists. There used to be no optimized method for counting the number of viable bacteria in the biofilm. Pantanella et al. (24) presented BTA, which is able to count the number of viable bacteria without manipulation. *S. aureus* ATCC 6538 was used to draw a genus-specific correlation line that correlates the time for colour change and the first concentration of bacteria. This method was also confirmed by the CFU method, and the results were in concordance. Besides, BTA allows to count of the number of viable bacteria in biofilm and provides MBIC and MBEC for each isolate. The number of viable bacteria in sub-inhibitory doses of lavender and clary sage was detected and indicated as a percentage. MIC 1/8, 1/16 and 1/64 were not detected for clary sage due to the rapid colour changes. The number of viable bacteria in the biofilm was found to increase as the concentration of EOs decreased. Thyme and oregano were not included in this study because even in sub-inhibitory doses, there are few viable bacteria, so the BT-PR medium remained red, which means that thyme and oregano EOs were highly effective even in sub-inhibitory doses.

In conclusion, this study employs BTA to determine actual bacteria count in biofilm, which has pivotal significance since EOs susceptibility is affected by bacterial concentration. It is known that BTA is the first method that enumerates viable bacteria in sub-MICs of antibiotics (24). To the best of our knowledge, this is the first study that enumerates viable bacteria in sub-MICs of EOs.

Results obtained from this research may provide the basis for further research for developing these natural substances as new therapeutics for bacterial

infections, especially those caused by MSSA or MRSA. High efficacy of EOs, especially thyme and oregano in clinical *S. aureus* isolates, including MRSA, is promising and may become a new method for treating multidrug-resistant pathogens. The *in vitro* results of this study provide evidence that these EOs can be an alternative for anti-infectious agents. Usage of these EOs alone and in combination with either other EOs or antibiotics will provide significant information regarding the clinical values of these natural antimicrobials.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Bagnoli F, Grandi G, Rappuoli R. *Staphylococcus aureus*. 1st ed. Springer 2017.
2. Boles BR, Thoendel M, Roth AJ, Horswill AR. Identification of genes involved in polysaccharide-independent *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS One*, 2010; 5 (4): e10146.
3. del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther*, 2007; 82 (2): 204-9.
4. Boles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*, 2008; 4 (4): e1000052.
5. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013;6(12):1451-74.
6. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol*, 2004; 94 (3): 223-53.
7. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*, 2008; 46 (2): 446-75.
8. Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*, 2012; 23 (2): 136-41.
9. Ebani VV, Nardoni S, Bertelloni F, Pistelli L, Mancianti F. Antimicrobial Activity of Five Essential Oils against Bacteria and Fungi Responsible for Urinary Tract Infections. *Molecules*, 2018; 23 (7): 1668.
10. Lagha R, Ben Abdallah F, Al-Sarhan BO, Al-Sodany Y. Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. *Molecules*, 2018; 23 (7): 1668.
11. Porfírio EM, Melo HM, Pereira AMG, Cavalcante TTA, Gomes GA, de Carvalho MG, et al. In vitro antibacterial and antibiofilm activity of *Lippia alba* essential oil, citral, and carvone against *Staphylococcus aureus*. *Sci World J*, 2017; 2017.
12. Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*, 2012; 23: 136-41.
13. Sarac N, Ugur A. Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Origanum onites* L., *Origanum vulgare* L. Subspecies *hirtum* (Link) Ietswaart, *Satureja thymbra* L., and *Thymus cilicicus* Boiss. & Bal. Growing Wild in Turkey. *J M Food*, 2008; 11 (3): 568-73.
14. Memar MY, Raei P, Alizadeh N, Akbari Aghdam M, Kafil HS. Carvacrol and Thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Rev Med Microbiol*, 2017; 28 (2): 63-8.
15. Ez zoubi Y, Farah A, Zaroual H. Antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* phenolic extracts against pathogenic bacteria isolated from a hospital in Morocco. *Vegetos*, 2020; 33: 703-11.
16. Mendes FS, Garcia LM, Moraes TS, Casemiro LA, Alcântara CB, Ambrósio SR, et al. Antibacterial activity of *salvia officinalis* L. against periodontopathogens: An in vitro study. *Anaerobe*, 2020; 63: 102194.
17. ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2008. Clinical breakpoints - breakpoints and guidance. EUCAST. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (Accessed: March, 2021).
18. Weinstein MP. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
19. Sakkas H, Economou V, Gousia P, Bozidis P, Sakkas V, Petsios S, et al. Antibacterial Efficacy of Commercially Available Essential Oils Tested Against Drug-Resistant Gram-Positive Pathogens. *Appl Sci*, 2018; 8 (11): 2201.

20. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*, 2008; 72: 157-65.
21. Mataraci E, Dosler S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012; 56 (12): 6366-71.
22. Sayin Z, Ucan US, Sakmanoglu A. Antibacterial and Antibiofilm Effects of Boron on Different Bacteria. *Biol Trace Elem Res*, 2016; 173 (1): 241-46.
23. Balaji K, Thenmozhi R, Pandian SK. Effect of subinhibitory concentrations of fluoroquinolones on biofilm production by clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Indian J Med Res*, 2013; 137 (5): 963-71.
24. Pantanella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T, Coltella L, Berlutti F. BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods*, 2008; 75 (3): 478-84.
25. Sienkiewicz M, Łysakowska M, Denys P, Kowalczyk E. The Antimicrobial Activity of Thyme Essential Oil Against Multidrug Resistant Clinical Bacterial Strains. *Microb Drug Resist*, 2012; 18 (2): 137-48.
26. Fabio A, Cermelli C, Fabio G, Nicoletti P, Quaglio P. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytother Res*, 2007; 21 (4): 374-77.
27. Sienkiewicz M, Głowacka A, Poznańska-Kurowska K, Kaszuba A, Urbaniak A, Kowalczyk E. The effect of clary sage oil on staphylococci responsible for wound infections. *Postepy Dermatol Alergol*, 2015; 32 (1): 21-6.
28. Sicak Y, Erdogan Eliuz EA, Başaran E, Ulusoy H. Inhibition and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* essential oil on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. 4th International Symposium on Innovative Approaches in Engineering and Natural Sciences Proceedings 2019.
29. Hui L, Huan L, XiaoLan L, AiGuo Z. Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis-related bacteria. *Afr J Microbiol Res*, 2010;4:309-13.
30. Aridoğan BC, Baydar H, Kaya S, Demirci M, Ozbaşar D, Mumcu E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Arch Pharm Res*, 2002; 25 (6): 860-64.
31. Nuta DC, Limban C, Chiriță C, Chifiriuc MC, Costea T, Ionita P, Zarafu I. Contribution of essential oils to the fight against microbial biofilms-A review. *Processes*, 2021; 9 (3): 537.

ABCA1 taşıyıcı protein ile yapılan araştırmaların bibliyometrik analizi

Bibliometric analysis of studies with ABCA1 carrier protein

Efsun Şerife ANTMEN¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi günümüzde oldukça önemli ve sayısı gün geçtikçe artan hastalıklarda Adenozin trifosfat bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı proteinler ailesinden ABCA1'in rolü de oldukça büyüktür. ABCA1, hücrelerden fazla kolesterolün dışarı atılması ve enflamasyonun baskılanması yoluyla kardiyovasküler hastalıktan koruyan bütünlük bir hücre zarı proteindir. Ayrıca kanser hücrelerinin gelişimini kolesterol metabolizmasında görülen anormalliklerin desteklediği bilinmektedir. Bu durum ABCA1'in kanserde de etkin olduğunu gösterir. ABCA1 ile ilgili pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen konu ile ilgili literatürde kapsamlı bir bibliyometrik çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ABCA1 ile ilgili yayınlanan bilimsel makaleleri inceleyerek konunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: ABCA1 konusunda 1975-2022 yılları arasında yayımlanmış çalışmalar Web of Science (WoS) veri tabanından taranmış, bibliyometrik yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca bibliyometrik analiz yapmak ve elde edilen metaverileri görselleştirmek için VOSviewer programı kullanılmıştır.

ABSTRACT

Objective: The role of ABCA1, one of the family of Adenosine triphosphate binding cassette (ABC) carrier proteins, is also very important in diseases such as cardiovascular diseases and cancer, which are very important and increasing day by day. ABCA1 is an integral cell membrane protein that protects from cardiovascular disease by excretion of excess cholesterol from cells and suppression of inflammation. It is also known that abnormalities in cholesterol metabolism support the development of cancer cells. This indicates that ABCA1 is also active in cancer. Although many studies have been conducted on ABCA1, there is no comprehensive bibliometric study in the literature on the subject. In this study, it is aimed to evaluate the subject by examining the scientific articles published about ABCA1.

Methods: Studies published between 1975-2022 on ABCA1 were scanned from the Web of Science (WoS) database and analyzed using bibliometric methods. In addition, VOSviewer program was used to perform bibliometric analysis and visualize the obtained metadata.

¹Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya AD., Mersin



İletişim / Corresponding Author : Efsun Şerife ANTMEN
GMK Bulvarı Yenişehir Kampüsü, B - Blok, Yenişehir, Mersin - Türkiye
E-posta / E-mail : eantmen@mersin.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 12.01.2023
Kabul Tarihi / Accepted : 08.05.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.26928

Antmen EŞ. ABCA1 taşıyıcı protein ile yapılan araştırmaların bibliyometrik analizi
Türk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(4): 503 - 512

Bulgular: ABCA1 ile ilgili çalışmalar 1993 yılında başlamış, 2000 yılından sonra artış göstermiştir. Makalelerin %99,2 (n=5694)'sinde kullanılan dil İngilizcedir. ABCA1 ile ilgili en fazla çalışma Biyokimya ve Moleküler Biyoloji alanında (n=1708, %29,4) yapılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri (n=2029, %35,3), Çin (n=1198, %20,9), Kanada (n=517, %9,0) ve Japonya (n=514, %9,0) 500'den fazla makalenin yayınlandığı ülkeler olarak sıralanmıştır. Türkiye ise 32 makale ile 29. sırada yer almıştır. Makalelerin 427 tanesi en az 100 kez atf almıştır.

Sonuç: ABCA1 konusunda yaptığımız bu kapsamlı bibliyometrik çalışmada 5743 makale ile ilgili bir özet bilgisi sunuldu. Bu makale ABCA1 konusunda yapılan araştırmaların değerlendirilmesinde literatüre katkı sağlamanın yanı sıra yapılacak araştırmalara yön verilebilmesi veya araştırmaların ilerletilebilmesi için bir kaynak olarak gösterilebilir.

Anahtar Kelimeler: ABCA1, ATP bağlayıcı kaset protein A1, bibliyometrik analiz, Web of Science, kardiyovasküler hastalıklar

Results: Studies on ABCA1 started in 1993 and increased after 2000. The language used in 99.2% (n=5694) of the articles is English. The most studies on ABCA1 were done in the field of Biochemistry and Molecular Biology (n=1708, 29.4%). The United States (n=2029, 35.3%), China (n=1198, 20.9%), Canada (n=517, 9.0%), and Japan (n=514, 9.0%) were ranked as the countries where more than 500 articles were published. Turkey, on the other hand, ranked 29th with 32 articles. 427 of the articles were cited at least 100 times.

Conclusion: In this comprehensive bibliometric study on ABCA1, a summary of 5743 articles was presented. In addition to contributing to the literature in the evaluation of research on ABCA1, this article can be shown as a resource to direct the researches to be done or to advance the researches.

Key Words: ABCA1, ATP binding cassette protein A1, bibliometric analysis, Web of Science, cardiovascular diseases

GİRİŞ

Adenozin trifosfat bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları, bakterilerden insana kadar her yerde bulunan en büyük protein ailelerinden biridir. Substrat işleme açısından çeşitliliklerine rağmen, adenozin trifosfatın hidrolizinin substratların biyolojik membranlar boyunca aktif taşınması için gereken enerjiyi sağlaması bakımından hepsi benzer bir "işleyiş biçimini" paylaşırlar(1).

Yedi farklı alt ailede sınıflandırılmış, ABC-A'dan ABC-G'ye kadar, 49 insan ABC proteini tanımlanmıştır (2, 3). 1994 yılında ABCA1 tanımlanmış ve farklı yapısal özelliklerinden dolayı A olarak adlandırılan yeni bir alt sınıf belirlenmiştir(4).

Önemli sayıda ABC taşıyıcısı, hücrel lipitlerin işlenmesinde yer alır (5). Genlerdeki mutasyonların

patolojik fenotiplerle veya lipit metabolizmasıyla ilgili klinik olarak bilinen hastalıklarla ilişkili olması, hücrel lipitlerin homeostazındaki kritik rollerini vurgulamaktadır. ABCA1, hücre zarında yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) oluşumuna yol açan ilk adımları ve bunun sonucunda periferik dokulardan karaciğere ters kolesterol taşınmasının tüm sürecini kontrol ettiği için kilit bir oyun kurucudur (6, 7). ABCA1'in ters kolesterol taşınmasında oynadığı temel rol ve kardiyovasküler hastalık riskine karşı bir koruyucu olarak tanımlanması, ekspresyonunun hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası seviyede nasıl kontrol edildiğini deşifre etmek için çok sayıda çalışma başlattı(8).

Anormal kolesterol metabolizmasının kanser hücrelerinin proliferasyonuna, hayatta kalmasına, istilasına, metastaz ve kanser mikro çevresine gelişmiş

adaptasyonuna yol açtığı ve böylece kanserlerin oluşumunu ve gelişimini desteklediği belirtilmiştir. Membran kolesterolü ve kolesterol açısından zengin zarlardaki değişikliklerin kanserlerin ilerlemesini ve invazyonunu etkilediği gözlemlenmiştir(9).

Ayrıca taşıyıcıların kanser hücrelerinde yüksek ekspresyonu, çeşitli antikanser ilaçların hücrelerden dışarı taşınmasına ve antikanser etkilerini gösterememesine neden olur(10). Bununla birlikte bazı araştırmalar, kanser hücrelerinde ABCA1'in ekspresyon seviyesi azaldığında, kolesterolün biriktiğini ve iki tabakalı fosfolipidlerin sırasını arttırdığını, böylece zarın geçirgenliğini azalttığını ve son olarak kanserlerin zar aktif antikanser ilaçlara karşı direncini desteklediğini göstermiştir(11).

Bibliyometrik analizler, başta makaleler olmak üzere bilimsel yayınları kümülatif olarak incelemek için kullanılan yöntemlerdir. Tıp alanında literatürde artan yayın sayısına paralel olarak son yıllarda birçok önemli konuda bibliyometrik analizlere dayalı çalışmalar yapılmaktadır(12).

Bilimsel çalışmaların değerlendirmesinde kullanılan en önemli kriter atıf analizleridir. Son yıllarda standart bir değerlendirme yöntemi olarak kullanılmaya başlanan bibliyometrik analizlerin ile atıf analizlerine ek olarak katkı sağlayan yazar, kurum ve ülke değerlendirilmesi de yapılabilmektedir (13).

Bibliyometrik analizler Web of Science (WoS), Scopus, Google Scholar gibi farklı bilimsel veri tabanları üzerinden yapılmaktadır. Bu platformlardan WoS akademik araştırmalar için sıkça kullanılan bir veri tabanıdır. Bünyesinde, Science Citation Index Expanded (SCIE), Social Science Citation Index (SSCI), Art&Humanities Citation Index (AHCI), Emerging Sources Citation Index (ESCI), Book Citation Index Science (BKCI-S) olmak üzere farklı indeksler bulunduran WoS bibliyometrik analizler için tercih edilen bir alt yapıdır (14).

ABCA1 ile ilişkili pek çok çalışma olmasına rağmen literatürde kapsamlı bibliyometrik çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, 1975-2022 yılları arasında yayınlanan bilimsel makaleler istatistiksel

ve bibliyometrik yöntemlerle incelenerek ABCA1 konusunun bütüncül olarak özetlenmesi ve yorumlanması amaçlanmıştır. Bu sayede trend olan konuların ortaya çıkarılması, en etkili çalışmaların, ülkelerin, dergilerin ve kurumların belirlenmesi ve ülkeler arasındaki iş birliklerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Ayrıca Türkiye'nin konu ile ilgili yaptığı çalışmaların literatüre katkı düzeyinin belirlenmesi ve özgün çalışmalarla güncel literatür bilgisinin sunulması amaçlanmaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Durum çalışması kullanılarak yapılan bu çalışmada amaç ABCA1 proteininin etkinliğini ortaya koymaktır. Mersin Üniversitesi altyapısıyla erişilen WoS veri tabanındaki tüm indekslerde (SCIE, SSCI, A&HCI, ESCI) 1-30 Kasım 2022 tarihleri arasında bir tarama yapılmıştır. Taramada anahtar sözcük olarak "ABCA1", "ATP binding cassette protein A1" ve "ATP-binding cassette A1" eşleştirilerek başlık, özet ve anahtar kelimelerde arama yapılmıştır.

Çalışmalar yayın yılı, atıf analizi, yayın dili, yayın türü; makalelere en fazla destek veren yayımcı ve finans kuruluşları, en fazla katkı sağlayan yazar; en fazla katkı sunan ülkeler ve çalışmaların en çok hangi alanlara yoğunlaştığı gibi farklı filtreler kullanılmış, veriler excell tablosuna aktarıldıktan sonra analizler yapılmıştır. Yapılan bu analizler tablo, figür ve grafiklerle sunulmuş ve veriler doğrultusunda değerlendirilip tartışılmıştır.

Makalelerin WoS verileri ayrıca VOSviewer programında da analiz edilmiştir. Çalışmaların yapıldığı bölge, yıl, çalışmaları yapan yazarlar ve ilişkileri, anahtar sözcükler programa aktararak haritalandırılmıştır.

Çalışma, insan ve hayvan araştırması olmadığından etik kurul izni gerektirmemektedir. Web of Science veri tabanında bulunan ancak anahtar kelimeleri içermeyen çalışmalar ile Web of Science veri tabanında taranmayan çalışmalar araştırmanın dışlama kriteri olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Anahtar kelimeler kullanılarak yapılan tarama sonucunda toplam 5743 makaleye ulaşılmıştır. Çalışmalar 1993 yılında başlamış, 2000 yılından sonra artış göstermiştir. En fazla çalışma 2018 yılında (n=339, %5,9) yapılmıştır (Şekil 1).

Makalelerin %99.2 (n=5694)'unda kullanılan dil İngilizcedir. Makalelerin %0.9'unda kullanılan İngilizce dışında ki diğer diller ise Çince (n=23), Fransızca (n= 8), İspanyolca (n=7), Japonca (n=4), Rusça (n=3), Almanca (n=2), Portekizce (n=2) olarak belirlenmiştir.

Çalışmalarda 79 farklı araştırma alanı bulunmaktadır. ABCA1 ile ilgili en fazla çalışma Biyokimya ve Moleküler Biyoloji alanında (n=1708) yapılmıştır. Biyokimya ve moleküler biyoloji alanını kardiyovasküler sistem ve kardioloji (n=1380, %24.0), hücre biyolojisi (n=575, %10.0), farmakoloji (n=536, %9.3), hematoloji (n=446, %7.8), endokrin ve metabolizma (n=385, %6.704) alanları takip etmektedir.

Yapılan çalışmaların 4410 (%76.9)'u araştırma makalesi, 688 (%12.0)'i toplantı özeti, 492 (%8.6)'i

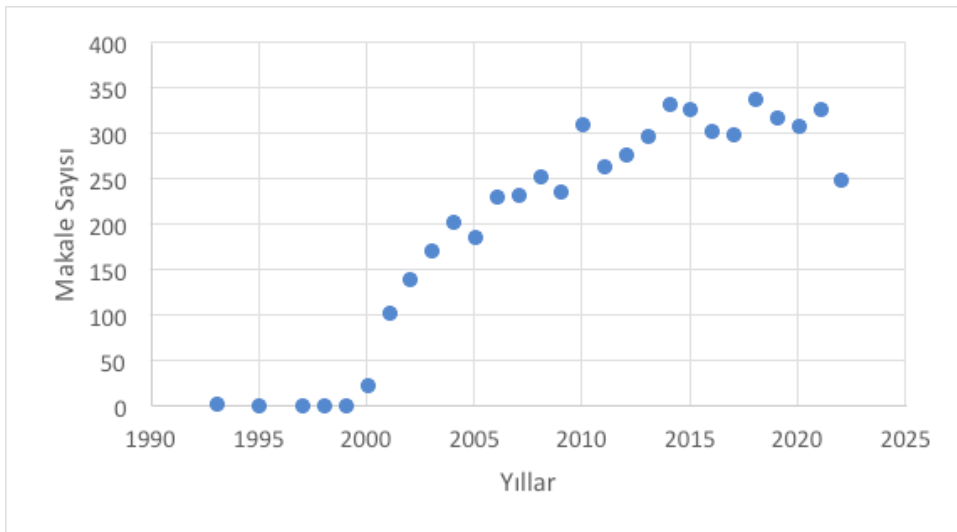
derleme makale, 78 (%1.4)'i editoryal materyal, 59 (%1.0)'u toplantı sunumu ve 29 (%0.5)'u editöre mektuptur.

Amerika Birleşik Devletleri (n=2029, %35.3), Çin (n= 1198, %20.9), Kanada (n=517, %9.0) ve Japonya (n=514, %9.0) 500'den fazla makalenin yayınlandığı ülkeler olarak sıralanır. Türkiye ise 32 makale ile 29. sırada yer almaktadır.

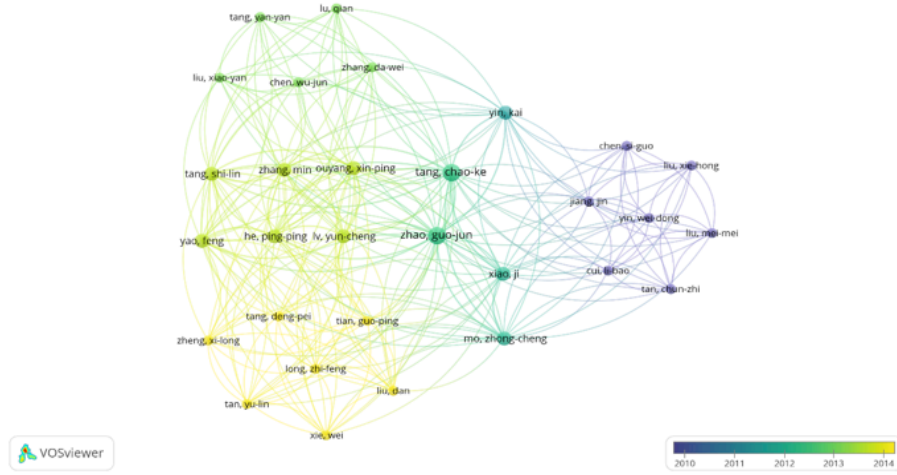
Araştırmacıların birbirleriyle ilişkisi VOSviewer programında ortak yazarlık analizi yapılarak tespit edilmiştir. Yazar ilişkisine bakıldığında birbiri ile ilişkili 30 yazardan Tang Chao-Ke ve Zhao-gua-jun en fazla ilişkilendirilen iki yazar olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).

VOSviewer programı ile yazarlar tarafından kullanılan anahtar sözcüklerin birbiri ile ilişkileri, kelimelerin kullanım sıklığını belirlemek için birlikte oluşum durumu araştırıldı.

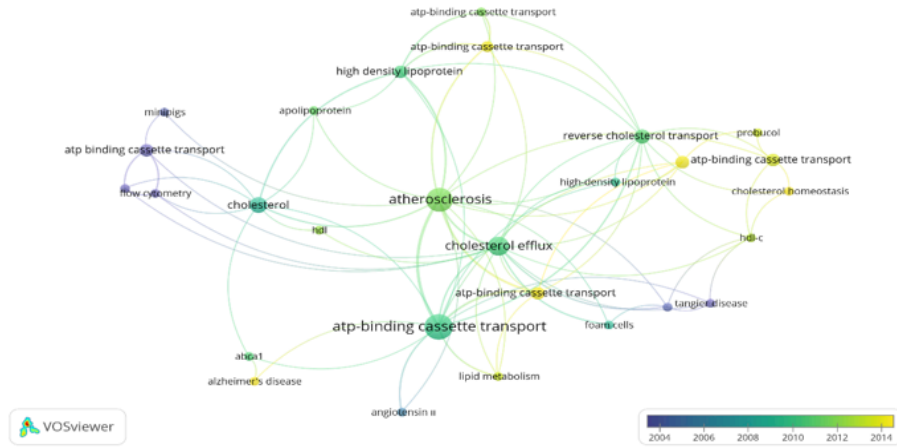
Sonuçlarda en çok tekrar edilen 28 kelime 6 farklı kümede farklı sayılarda ilişkilendirildi. Her kümede en çok tekrar edilen kelimeler atp-binding cassette transport, angiotensin II, abca1, apolipoprotein, atp-binding cassette a1, atp binding cassette transport olarak belirlendi (Şekil 3).



Şekil 1. Makalelerin yıllara göre dağılımı



Şekil 2. VOSviewer yazar ilişki analizi



Şekil 3. VOSviewer birlikte oluşum inceleme sonucu

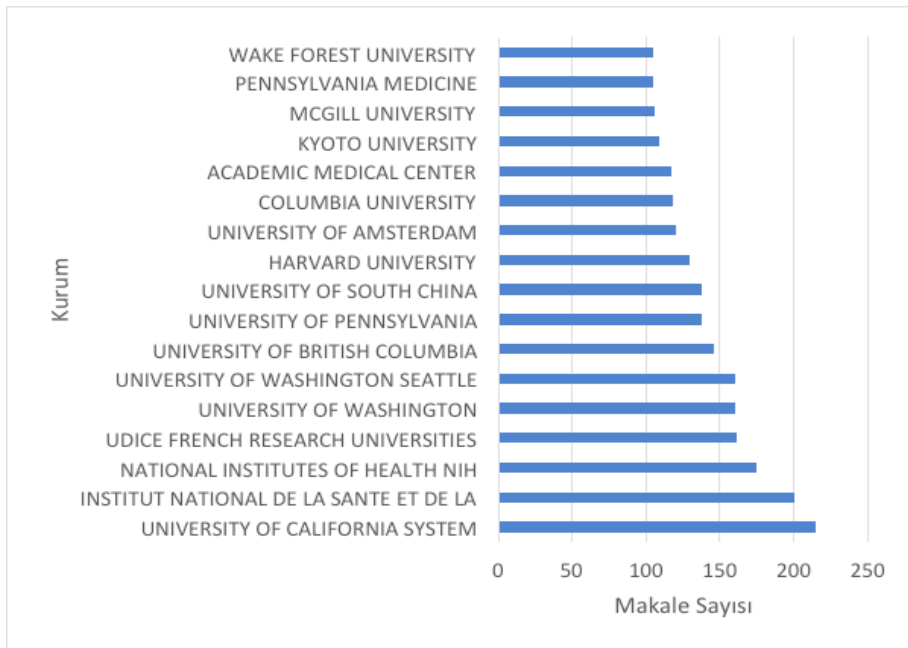
Makalelerin 427 tanesi en az 100 kez atıf almıştır. Çalışmalar içerisinde en çok atıf alan 10 makale Tablo 1’de incelenmiştir. İlk beş sırada bulunan atıf konuları “Lipids” (%40.4), “Pancreas & Gall Bladder Disorders” (%5.7), “Neurodegenerative Diseases” (%5), “Micro & Long Noncoding Rna” (%3.6), “Phytochemicals” (%2.5) olarak belirlenmiştir.

Araştırma konusu ile ilgili en az 100 makale yayınlayan kurumlar Şekil 4’de belirtilmiştir.

Makale çalışmalarını finanse eden kurumlar sırasıyla Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Sağlık ve İnsan Hizmetleri Departmanı (n=1245, %21,7), ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (n=1242, %21,6), ABD Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü (n=764, %13,3), Çin Ulusal Doğa Bilimleri Vakfı (n=687, %12.0), ABD Ulusal Diyabet Sindirim Böbrek Hastalıkları Enstitüsü (n=244, %4,3) idi.

Tablo 1. En fazla atıf alan ilk 10 makale

Yazar, Yayın Yılı	Dergi	Yıllık Ortalama Atıf	Toplam Atıf Sayısı
Khera AV, 2011 (15)	New England Journal of Medicine	121.83	1462
Willer CJ, 2008 (16)	Nature Genetics	84.93	1,274
Chawla A, 2001 (17)	Molecular Cell	49.86	1,097
Rayner KJ, 2010 (18)	Science	71.69	932
Chinetti G, 2001 (19)	Nature Medicine	42	924
Cohen JC, 2004 (20)	Science	44.11	838
Wang N, 2004 (21)	Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America	43.11	819
Venkateswaran A, 2000 (22)	Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America	35.39	814
Tobi EW, 2009 (23)	Human Molecular Genetics	57.21	801
Joseph SB, 2002 (24)	Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America	36.19	760



Şekil 4. Konu ile ilgili en az 100 makale yayınlayan kurumlar

Çalışmaları en çok destekleyen ilk beş yayımcı sırasıyla Elsevier (n=1781, %31,0), Lippincott Williams and Wilkins (n=737, %12,8) Springer Nature (n=510, %8,9), Wiley (n=396, %6,9) ve Amer Soc Biochemistry Molecular Biology Inc. (n=209, %3,6)'dur.

TARTIŞMA

Vücuttaki tüm hücreler kolesterolü sentezleyebilir, ancak çoğu etkili metabolik yollardan yoksundur ve hücrelerden yalnızca bir dizi taşıyıcı yoluyla atılabilir (25). Bunların arasında ABCA1, ATP tarafından sağlanan enerjiyi hücrelerde serbest kolesterol ve fosfolipitlerin dışarı akışını desteklemek için kullanılabilir ve hücre yüzeyindeki apo A-I ile birleşerek yeni HDL'yi oluşturur ve bu da kolesterolü periferik dokulardan karaciğere geri taşımak için ters kolesterol taşıma sürecini başlatır(10).

Bu mekanizmalar aracılığıyla ABCA1, dislipidemi, ateroskleroz, koroner kalp hastalığı, tip 2 diyabet, tromboz, nörolojik bozukluklar, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, glokom, viral enfeksiyon ve kanser ilerlemesi dahil olmak üzere geniş bir hastalık dizisinin patogenezinde yer alır (26). Ayrıca yapılan çalışmalar kanser hücrelerinin, metabolizmalarındaki değişikliklerde, çoğalma ve istila etme konusunda gelişmiş bir yeteneğe sahip olmasında anormal kolesterol metabolizmasının kilit bir role sahip olduğunu da göstermiştir. Kanser hücrelerinde gözlenen anormal şekilde kolesterol seviyelerinin yükselmesini engellemek, kanser hücrelerinin çoğalmasını yavaşlatabilir (27).

Çalışma alanlarına bakıldığında kardiyovasküler sistem ile ilgili 1380 çalışma yapılmışken, onkoloji alanında 138 çalışma yapılmıştır. Avrupa Kardiyoloji Derneği (AKD) verilerine göre kardiyovasküler hastalıklar, dernek üyesi ülkelerde en yaygın ölüm nedenidir ve kadınlarda bu ölümlerin %45' inden ve erkeklerde %39' undan iskemik kalp hastalığı sorumludur. Tüm AKD üyesi ülkelerdeki toplam kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm sayısı, her iki cinsiyet için kanser ölümlerinin sayısından çok daha fazladır (28).

Kanserde bir diğer önemli konu çoklu ilaç direncidir. Çoklu ilaç direnci kanser hücrelerinin ilaç çıkışını artırmak ve ilaç alımını azaltmak için adapte olma yeteneğini ifade eder ve ilaç taşıyıcıları, önceden hedeflenmiş ilaç direncinde kilit bir role sahiptir. Güncel çalışmalar, kemoterapi başarısızlığının doğrudan ABC taşıyıcıları ile ilişkili olduğunu ve kanser hücrelerinde ABC taşıyıcılarının indüklenmesini önlemenin ilaç direncini önlemeye yardımcı olabileceğini öne sürmektedir (29, 30). Bu verilere dayanarak ABCA1 ile ilgili onkoloji alanında daha fazla çalışma yapılarak hastalığın tanı ve tedavisi ile ilgili farklı stratejiler geliştirilebilir.

İnternet veri tabanlarının sıkça kullanıldığı yöntemlerden olan bibliyometrik analizler sosyal bilim analizlerinde sık kullanılırken, son yıllarda tıp ve sağlık alanında da kullanılmaya başlanmıştır (31).

Bibliyometrik analizler farklı ülkelerde yapılan çalışma sayılarının karşılaştırılıp değerlendirme imkanı sağlar. Çalışmamız sonucunda ABCA1 proteinleri ile ilgili en fazla çalışma ABD'de yapılmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalar ise 2008-2022 yılları arasında yapılmış, en çok makale 2018 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmaların 28 tanesi araştırma makalesi olup, araştırma alanları ise kardiyovasküler sistem, endokrin sistem, metabolizma, biyokimya ve moleküler biyolojidir. Makalelerin 31'i Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED), 1 tanesi ise Emerging Sources Citation Index (ESCI) kapsamında yayınlanmıştır.

Bibliyometrik analizler ile yayınların hem kendi içerisinde ve hem de diğer yayınlarla etkileşimlerinin dil, yazar, ülke, kurum gibi farklı filtrelerle farklı birçok yayının bilimsel yönden değerlendirilmesi yapılabilmektedir. (14). Bilimsel dergilerin karşılaştırılmasında farklı kalite yöntemleri kullanılır. Atıf sayısı da bunlar arasında en önemlilerindedir(31). Buna dayanarak ABCA1 ile ilgili makalelerin aldığı toplam özgün atıf sayısı incelendiğinde 147210 olarak belirlenmiştir. Makaleler arasında en çok atıf alan Khera AV ve arkadaşları tarafından 2011 yılında New England Journal of Medicine dergisinde yayınlanmıştır

ve toplam 1462 atıf almıştır.

Konuyla ilgili çalışmalar VOSviewer analizlerine tabi tutulduğunda çalışmaların güncelliğini koruduğunu belirledik. Yeni çalışmaların 2014 sonrasında da devam ettiğini, anahtar kelimeler arasında ise “atp binding cassette transport” anahtar kelime dizisinin son çalışmalarda da güncelliğini koruduğunu tespit ettik.

Çalışmanın sınırlılıklarına bakıldığında, çalışma tek bir veri tabanından elde edilen veri setine bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda farklı veri tabanlarının kullanımı düşünülebilir. Gelecekteki çalışmalarda yayınlar listelenirken kullanılan anahtar kelimeler çeşitlendirilebilir, özelleştirilebilir ve farklı yayınların verilerine ulaşılarak çalışma genişletilebilir.

Bu çalışmada kolesterol homeostazını ve plazma zarı dinamiklerini düzenleyerek birçok fizyolojik ve patolojik sürece dahil olan ABCA1 molekülü ile

ilgili bibliyometrik analiz yapılmış bu analiz ile literatüre katkıda bulunmak, konu ile ilgili çalışma yapmayı planlayan araştırmacılara fikir sunmak ve yol göstermek amaçlanmıştır. Metaveriler üzerinde yapılan analizler akademik çalışmaların haritalanmasını sağlar ve yapılacak çalışmaların gerekliliğine, kapsamına yön verir. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz verilere göre, yapılacak çalışmalar yeni oluşturulacak veya mevcut ilaçların kullanılarak ABCA1 aktivitesinin kanser hücrelerinde etkisini anlamaya odaklanmalıdır. Ayrıca hücre içi kolesterol taşıyıcılarından olan ABCA1'in kolesterolü taşıma potansiyeli hem kanser hem de kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde oldukça önemlidir. Bu nedenle yapılacak çalışmaların ABCA1 molekülünün tümör belirteci olarak değerlendirilebilmesi, hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılabilmesi için farklı stratejiler geliştirmeye yönelmesi gerekmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Zarubica A, Trompier D, Chimini G. ABCA1, from pathology to membrane function. *Pflügers Archive. Eur J Physiol*, 2007; 453(5):569-79.
2. Holland IB, Cole PCS, Kuchler K, Higgins CF. *ABC Proteins from Bacteria to Man*. HongKong: Elsevier Science Ltd, 2003.
3. Štefková J, Poledne R, Hubáček JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*, 2004; 53:235-43.
4. Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics*, 1994; 21(1): 150-9.
5. Gerritvan M, David H, Hein S, Pentti SM, Egmond R. ABC lipid transporters: Extruders, flippases, or floppless activators? *FEBS Letters*, 2006; 580(4): 1171-7.
6. Van Eck M, Pennings M, Hoekstra M, Out R, Van Berkel TJC. Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. 2005;16(3):307-15.
7. Lee JY, Parks JS. ATP-binding cassette transporter AI and its role in HDL formation. *Cur Opin Lipid*, 2005(1):19-25.
8. Schmitz G, Langmann T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. 2005;1735(1):1-19.
9. Luo X, Cheng C, Tan Z, Li N, Tang M, Yang L et al. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 2017;16(1):1-10.
10. Wu K, Zou L, Lei X, Yang X. Roles of ABCA1 in cancer. *Oncol Lett*, 2022;24(4):349.
11. Wali VB, Bachawal SV, Sylvester PW. Suppression in mevalonate synthesis mediates antitumor effects of combined statin and γ -tocotrienol treatment. *Lipids*, 2009;44(10):925-34.
12. Zengin M, Karaca O. A bibliometric Analysis of Academic Publications About Intoxication in the period from 1975 to 2020: A Global and Medical View. *OsmanGazi Tıp Derg*, 44(2):148-61.
13. Koehler W. Information science as “Little Science”:The implications of a bibliometric analysis of the *Journal of the American Society for Information Science*. *Scientometrics*, 2001;51(1): 117-32.
14. Özgür K, Köken AH. Tıp Tarihi ile İlgili Çalışmaların Web of Science Veri Tabanı Üzerinden Bibliyometrik Analizi. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 2021;11(2):364-374.
15. Khera AV, Cuchel M, DeLa Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *New Eng J Med*, 2011;364(2):127-35.
16. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonycastle LL, Clarke R et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nature Genetics*, 2008;40(2): 161-9.
17. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB et al. A PPAR γ -LXR-ABCA1 Pathway in Macrophages Is Involved in Cholesterol Efflux and Atherogenesis. 2001;7(1): 161-71.
18. Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N et al. MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis. 2010;328(5985):1570-3.
19. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IB et al. PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature Med*, 2001;7(1):53-8.
20. Cohen JC, Kiss RS, Pertsemididis A, Marcel YL, McPherson R, Hobs HH. Multiple Rare Alleles Contribute to Low Plasma Levels of HDL Cholesterol. *Science*, 2004;305(5685):869-72.

21. Wang N, Lan D, Chen W, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2004;101(26):9774-9.
22. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Tontonoz P. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proceedings of the National Academy of Science*. 2000;97(22):12907-102.
23. Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Human Mol Gen*, 2009;18(21):4046-53.
24. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Tontonoz P. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2002;99(11):7604-9.
25. Tang SL, Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Mo ZC, Lv YC. PAPP-A negatively regulates ABCA1, ABCG1 and SR-B1 expression by inhibiting LXR α through the IGF-I-mediated signaling pathway. 2012;222(2):344-54.
26. Jacobo-Albavera L, Dominguez-Perez M, Medina-Leyte DJ, Gonzalez-Garrido A, Villarrea-Molina T. The Role of the ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1) in Human Disease. *J Mol Sci*, 2021;22(4):1593.
27. Bian X, Liu R, Meng Y, Xing D, Xu D, Lu Z. Lipid metabolism and cancer. *J Exp Med*, 2021;218(1).
28. Timmis A, Torbica A, Vardas P, Townsend N, Katus H, De Smedt D et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics. 2021. *Eur Heart J*, 2022;43(8):716-99.
29. Y Shang, Z Zhang, Z Liu, B Feng, G Ren, K Li. miR-508-5p regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting ABCB1 and ZNRD1. *Oncogene*, 2014;33(25): 3267-76.
30. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(1). 48-58.
31. Özlü C. Scopus Veri Tabanına Dayalı Bibliyometrik Değerlendirme: Miyelodisplastik Sendrom Konulu Yayınların Global Analizi ve Türkiye Kaynaklı Yayınların Değerlendirilmesi. *J Biotech Strateg Health Res*, 2021. 5(22):125-31.

Repeat breeder ineklerde genital kanal bakteriyolojisi ve antibiyotik direnç profilleri

Genital tract bacteriology and antibiotic resistance profiles in repeat breeder cows

Elçin GÜNAYDIN¹ (ID), Gülsen GONCAGÜL² (ID), Pınar MURSALOĞLU KAYNAR³ (ID)

ÖZET

Amaç: İneklerde görülen reproduktif sistem bozukluklarından biri olan ve gerçek kızgınlık ile üç veya daha fazla sayıda çiftleşmeyle gebe kalamama durumu olarak tanımlan repeat breeder, üreme verimliliğinin azalması ve beraberinde süt üretiminin azalmasıyla tüm dünyada ciddi ekonomik kayıplara neden olan bir yetiştiricilik problemidir. Bu çalışmanın amacı, herhangi bir genital sistem enfeksiyonuna dair klinik belirti göstermeyen repeat breeder, ineklerde konvansiyonel kültürel yöntemle genital kanalda aerobik üreme gösteren mikroflorayı belirlemek ve baskın bakteri gruplarında antibiyotik direnç profillerini tespit etmektir.

Yöntem: Çalışma materyalini dört ila dokuz yaş aralığında Holstein ırkı 32 repeat breeder (üç ve üstü tohumlama) inek içermektedir. İneklerin vajinalarından steril sürüntü örnekleri toplandı. Toplanan sürüntü örnekleri, Fluid Thioglycollate Medium bulunan tüpler içerisine alınarak soğuk zincir şartlarında laboratuvara ulaştırıldı. Bakteriyolojik muayene için örnekler 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminden sonra

ABSTRACT

Objective: Repeat breeder, which is one of the reproductive system disorders seen in cattle, is defined as the inability to conceive with three or more matings with true heat, is seen to be a breeding problem that causes serious economic losses all over the world with a decrease in reproductive efficiency and therefore a decrease in milk production. The aim of this study is to identify the aerobic microflora and antibiotic resistance profiles of dominant bacterial groups in the genital tract of repeat breeder cows that do not exhibit clinical signs of any genital system infections using conventional cultural methods.

Methods: The study material comprised 32 repeat breeder cows of Holstein breed aged between four and nine years (with three or more inseminations). Specimens were collected by sterile swab. The collected swab samples were taken into tubes with Fluid Thioglycollate Medium and delivered to the laboratory under cold chain conditions. Specimens for bacteriological examination were incubated at 37 °C for 24 h. After the end of incubation, isolation and

¹Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD., Kastamonu

²Uludağ Üniversitesi, Mennan Pasınlı Atçılık Meslek Yüksekokulu, Bursa

³Ankara Medipol Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Elçin GÜNAYDIN

Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kastamonu - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 09.11.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 26.11.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.44270

Günaydin E, Goncagül G, Mursaloğlu Kaynar P. Repeat breeder ineklerde genital kanal bakteriyolojisi ve antibiyotik direnç profilleri
Türk Hij Den Biol Derg, 2023; 80(4): 513 - 522

EMB agar ve kanlı agar besiyerinde gelişen kolonilerin izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı.

Bulgular: Bakteri kolonilerinin izolasyonu ve identifikasyonu sonucunda Protobacteria ağırlıklı olmak üzere Firmicutes ve Actinobacteria filumlarından 14 tür bakteri izole edildi. İzole edilen bakteri türleri arasında *Escherichia coli* (%21,4), *Stenotrophomonas maltophilia* (%14,3), *Staphylococcus haemolyticus* (%11,9), *Staphylococcus sciuri* (%7,1) *Corynebacterium psuedodiphtheriticum* (%7,1) ve *Corynebacterium bovis* (%4,8) bulundu. İzole edilen bakterilerden bazıları repeat breeder ineklerde subklinik endometrit yönlü infertilite nedeni olarak görüldü. Baskın bakteri gruplarına ve infertilite nedeni olan bakterilere karşı sekiz antibiyotiğin duyarlılığı antibiyogramla incelendi.

Sonuç: Repeat breeder olarak belirlenen ineklerden alınan örneklerde Actinobacter filumunda yer alan *C. bovis* ve *C. psuedodiphtheriticum*, Firmicutes filumundan *S. sciuri* ve *S. haemolyticus* izolasyonunun en az Protobacteria filumundan *E. coli* kadar önem arz ettiği sonucuna varıldı. Vajinal mikrobiyomda dominant etken *E. coli*'ye karşı seftiofur'un %100 etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Repeat breeder, inek, bakteri, antibiyotik direnci

identification of colonies growing on EMB agar and blood agar medium were performed.

Results: Bacteriological isolation and identification of genital canal samples revealed the isolation of 14 bacterial species mainly from the phylum Protobacteria, along with Firmicutes and Actinobacteria filaments. Among the isolated bacterial species, *Escherichia coli* (21.4%), *Stenotrophomonas maltophilia* (14.3%), *Staphylococcus haemolyticus* (11.9%), *Staphylococcus sciuri* (7.1%), *Corynebacterium psuedodiphtheriticum* (7.1%), and *Corynebacterium bovis* (4.8%) were identified. In repeat breeder cows. Some of the isolated bacteria were associated with subclinical endometritis leading to infertility in repeat breeder cows. Susceptibility of eight antibiotics against dominant bacterial groups and infertility-related bacteria were examined by antibiogram.

Conclusion: It was determined that bacterial isolations such as *C. bovis* and *C. psuedodiphtheriticum* from the Actinobacteria phylum and *S. sciuri* and *S. haemolyticus* from the Firmicutes phylum in samples taken from cows identified as repeat breeders are as significant as *E. coli* from the Protobacteria phylum. Ceftiofur demonstrated 100% effectiveness against the predominant pathogen *E. coli* in the vaginal microbiome.

Key Words: Repeat breeder, cow, bacteria, antibiotic resistance

GİRİŞ

Dünya genelinde ineklerde yaşam boyunca verimliliğin önemli kriteri üreme verimliliğidir. Üreme verimliliğinin azalması en önemli nedeni ise reproduktif bozukluklardır (1). Reproduktif performansın düşük olduğu süt sığır işletmelerinde, iki doğum arası geçen sürenin uzaması, buzağı sayısının azalması ve gebe inek başına düşen suni tohumlama sayısının arttığı bilinmektedir (2, 3). Üreme fonksiyonlarının enfeksiyon, genetik yapı, besleme ve hormonal

değişimler etkilediği bildirilmektedir (4). Özellikle yetiştiriciler açısından karşılaşılan başlıca sorun, düşük üreme verimliliğine ve uzun süren buzağılama aralıklarına neden olan multifaktoriyel nedenlere bağlı ortaya çıkan "Repeat Breeder Sendromu"dur (3, 5). Ciddi ekonomik kayıplara sebep olan repeat breeder sendromu önemli bir yetiştiricilik sorunudur (6). Süt sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerde en az bir kez doğum yapmış, düzenli seksüel siklus gösteren, herhangi bir üreme patolojisine sahip olmayan, on yaşından genç, fertil bir boğa ile çiftleştiği ya

da motilite sorunu bulunmayan kaliteli sperma ile üç kez tohumlanan ancak, gebe kalmayan inekler "Repeat Breeder" (RB) olarak tanımlanmaktadır (7). Repeat breeder teşhisi konulan ineklerde genital kanal enfeksiyonları göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmaktadır (8). Özellikle Repeat breederin potansiyel nedenlerinden biri de patolojik endometrittir (9). Üreme organlarının fonksiyonlarının olumsuz etkilenmesinde doğum sonrası bakteriyel kontaminasyonların etkileri bildirilmektedir (10). Sığır vajinal kanalında bulunan mikroorganizmalar arasında *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* spp., *Enterococci* ve *Enterobacteriaceae* bildirilmiştir (11). Gilbert ve ark. yaptıkları çalışmada (11), ürogenital sistemde *E. coli* varlığının, süt ineklerinde gebe kalamama ve bu nedenle tohumlama sayısının artması ile metritis gibi üreme yetersizliğine yol açtığı vurgulanmıştır.

Sığır üreme sisteminde doğum sonrası dönemde kontaminasyonla patojen popülasyonlarına odaklanmış olsa da (12, 13); yakın zamanda vajinal mikro ortamın sığır reproduktif performansında önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (14-16). Vajinada belirli bakteri popülasyonunun varlığı veya yokluğunun, üreme sistemi bozukluklarının gelişimi için bir risk faktörü olabildiği bildirilmiştir (17, 18). Repeat breeder olgusuna sebep olan genital kanal enfeksiyonların ve buna bağlı infertilite ile sonuçlanan olaylarda döl verimini arttırmak için antibiyotikler, antiseptik solüsyonlar ve hormonlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Hatta bazı uygulamalarda repeat breeder ineklerde antibiyotikler tohumlama sonrası 24 saat içerisinde kullanıldığı gibi tohumlama öncesinde de kullanılmaktadır. Repeat breeder tanısı konulan ineklerden bakteri izolasyonu sonrası yapılan antibiyogram uygulamasında gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol, penisilin, streptomisin, kanamisin, neomisin, oksitetrasiklin, eritromisin ve ampisilin gibi etken maddelere duyarlılık saptandığı bildirilmektedir (19, 20). Bununla birlikte diğer bir çalışmada da izole edilen bakterilerin ampisiline dirençli olduğu görülmüştür (21). Bu çalışmanın amacı, herhangi bir genital sistem enfeksiyonuna dair klinik belirti

göstermeyen repeat breeder ineklerde konvansiyonel kültürel yöntemle genital kanalda aerobik üreme gösteren mikroflorayı belirlemek ve baskın bakteri gruplarında antibiyotik direnç profillerini saptamaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinleri 15.02.2014 Tarih ve 28914 Sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" in 8. maddesinin k fıkrası gereği; dışkı veya altlık toplama örneği, sürüntü ile örnek alma, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (HAYDEK) iznine tabi değildir.

Çalışma örneği

Bu çalışmada, Marmara Bölgesi'nde farklı dört işletmede, Holstein ırkı 4 ve 9 yaş aralığında olan, üç ve daha fazla tohumlama yapılmış, genital patoloji tespit edilmemiş ancak döl tutmamış 32 repeat breeder inek çalışma örneğini oluşturdu.

Vajinal örnekleme

Repeat breeder ineklerden vajinal örnekleme yapılmadan önce kontaminasyonu engellemek için kuyruk yukarı kaldırılıp, dış genital bölgede vulva dudakları ve rima vulva benzalkonyum hidroklorür (Zefirolum®, Kimpa, İstanbul) ile temizlendi. Ardından steril bir havlu ile kurulandı. Sonra aralanan vulva dudakları arasından aynı kişi tarafından vajinanın arka kısmından steril sürüntü ile örnekler alındı. Alınan sürüntü örnekleri Fluid Thioglycollate Medium (BBL; 221196) bulunan tüplerin içerisine alınarak soğuk zincir şartları altında laboratuvara ulaştırıldı. Bakteriyojik muayenede, Fluid Thioglycollate Medium (BBL; 221196) içerisinde bulunan sürüntü örnekleri 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminden sonra EMB agar (Eosin-Methylenblue-Laktoz-Sakaroz, BBL; 221355) ve kanlı agar (BBL; 297876) besiyerinde izolasyon çalışması gerçekleştirildi. Genel bakteriyojik incelemeler için besiyerleri aerobik koşullarda, 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminden sonra gelişen kolonileri,

koloni morfolojisi ve Gram boyama özelliklerine göre değerlendirildi. Bakteriyel izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen saf kültürlerin tanımlanması, BBL kristal (Becton-Dickinson, Sparks, USA) Gram pozitif ve Gram negatif ID sistem kitleri ile bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Antibiyotik duyarlılık testi

Antimikrobiyal duyarlılık, Mueller Hinton Agar besiyeri kullanılarak, Kirby Bauer Disk Difüzyon yöntemiyle test edildi (22). Antibiyogramda kullanılan antibiyotik diskleri; penicillin (P) (10U; Oxoid), eritromisin (E) (30µg; Oxoid), amoksisilin/klavulanik asit (AMC) (30µg, Oxoid), gentamisin (CN) (10µg; Oxoid), tetrasiklin (TE) (30µg; Oxoid), seftiofur (EFT) (30µg; Oxoid), enrofloksasin (ENR) (5µg; Oxoid), sulfametoksazol/trimetoprim (SXT) (25 µg; Oxoid)'dir. Antibiyotik duyarlılık testi, her

bir bakteri için, Mueller Hinton agar (Oxoid®; 0337) besiyeri yüzeyine 0,5 McFarland düzeyinde bakteri süspansiyonu yayıldıktan sonra ilgili sekiz antibiyotik diski iki petri kabına paylaştırılarak disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu çalışmada test edilen suşlar, inhibisyon zon çapına göre dirençli (R), orta duyarlı (I) ve duyarlı (S) olarak kaydedildi (23).

BULGULAR

Bu çalışmanın kapsamındaki 32 vajinal swabın tamamı (%100) konvansiyonel kültürel yöntemle bakteriyel üreme yönünden pozitif bulundu. İzole edilen bakterilerin ait oldukları filumlar Protobacteria ağırlıklı olmak üzere, Firmicutes ve Actinobacteria'dır. 13 (%40,63) örnekten birden fazla bakteri türü izole edildi. Tablo 1'de izole edilen bakteriler ve izolasyon oranları verildi.

Tablo 1. Repeat breeder ineklerin vajinasından izole edilen bakteriler ve izolasyon oranları

Bakteri türleri	Filum	İzolasyon sayısı (n)	İzolasyon oranı (%)
<i>Escherichia coli</i>	Protobacteria	9	21,4
<i>Corynebacterium bovis</i>	Actinobacteria	2	4,8
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Firmicutes	3	7,1
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Protobacteria	1	2,4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Protobacteria	2	4,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Protobacteria	6	14,3
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Protobacteria	3	7,1
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	Firmicutes	1	2,4
<i>Morganella morganii</i>	Protobacteria	1	2,4
<i>Corynebacterium psuedodiphtheriticum</i>	Actinobacteria	3	7,1
<i>Bacillus brevis</i>	Firmicutes	2	4,8
<i>Citrobacter koseri</i>	Protobacteria	1	2,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	Firmicutes	3	7,1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Firmicutes	5	11,9
TOPLAM		42	100

Çalışmamızda anlamlı olabilecek bakteri türleri; *E. coli* (n=9, %21,4) bunu takiben *S. maltophilia* (n=6, %14,3), *S. haemolyticus* (n=5, %11,9), *S. sciuri* (n=3, %7,1) *C. psuedodiphtheriticum* (n=3, %7,1) ve *C. bovis* (n=2, %4,8) olarak tespit edildi. Repeat breeder

ineklerden izole edilen ve antibiyogram uygulanan bakterilerde en fazla duyarlılık seftiofura karşı olduğu belirlendi. Seftiofur ve diğer yedi antibiyotiğin direnç profili de Tablo 2’de detaylandırıldı.

Tablo 2. Repeat breeder ineklerin vajinasından izole edilen bakterilerin antibiyogram sonuçları

BAKTERİ TÜRLERİ ve SAYISI	ANTİBİYOTİK								
	P	E	AMC	CN	TE	EFT	ENR	SXT	
<i>Escherichia coli</i> (n=9)	S		6	7	7	5	9	5	7
	I	2	3	2	1	3		4	2
	R	7				1			
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=5)	S				5		5	5	4
	I		3	5		1			1
	R	5	2			4			
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=3)	S	1					2	2	1
	I	2		1	2	1	1	1	
	R		3	2	1	2			2
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=2)	S	2	1	1	2		2	1	1
	I		1	1		2		1	1
	R								
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> (n=3)	S	2	3		2		2		
	I	1		3	1			2	1
	R			1		3	1	1	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=6)	S	4	4				3		4
	I	2	2	4	1		2	5	
	R			2	5	6	1	1	2

S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli, P: Penisilin E: Eritromisin AMC: Amoksisilin/Klavulonikasin, CN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, EFT: Seftiofur, ENR: Enrofloksasin, SXT: Sulfometoksazol/Trimetoprim

TARTIŞMA

Dünya çapında hayvancılıkta en önemli konu üremenin sürdürülebilir olmasıdır. Ekonomik çerçevede bakıldığında da amaç optimum süreler içinde gebeliğin sağlanarak yavru elde edilebilmesidir. Süt inekçiliğinde infertilite ve özellikle “Repeat Breeder Sendromu”nun sıklıkla görülmesi ve yılda bir yavru alabilme hedefinden uzaklaşılmasına dolayısıyla da ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (8). Sığır vajinasının mikrobiyal popülasyonu, çevreden ascedens bulaşma nedeniyle uterus dahil üreme sistemine ait diğer bölümlere göre artmış bakteriyel çeşitlilik ve zenginlik seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (15). Sağlıklı inekteki vajinal mukoza aerobik, fakültatif anaerobik ve zorunlu anaerobik mikropların dengelenmiş ve dinamik bir bileşimde bir kolonizasyona sahiptir. Bu çalışmada, repeat breeder sütçü ineklerin vajinal mikrobiyomundan konvansiyonel kültürel yöntemle Proteobacteria, Firmicutes ve Actinobacteria filumunda yer alan bakteriler izole edilmesi şaşırtıcı değildir çünkü sütçü sığırlarda diğer üreme organlarında olduğu gibi sığır vajinasının mikrobiyomunda baskın Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes ve Actinobacteria filumlarıdır (24-28). Repeat breeder sendromuna inekleri predispozan kılan faktörlerin yanı sıra infertilite sebebi olarak genital kanal enfeksiyonlarının da göz önünde bulundurulması gerektiği vurgulanmaktadır. Patojen veya non-patojen bakteriler anormal uterus ortamına, uterus yangılarına, uterus endometriyumunda patolojik lezyonlara ve embriyonik ölümlere neden olmaktadır. Endometritis ile ilişkilendirilen vajinal mikrobiyom cinsleri arasında *Bacteroides*, *Helococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas* ve *Fusobacterium* bildirilmiştir (27, 29). Çalışmamızda, yoğunlukla Proteobacteria ve az miktarda da Firmicutes filumlarının izole edilmesi uterus enfeksiyonlarında özellikle Proteobacteria filumundan *Enterobacteriaceae* familyasında (%18,62) dikkati çeker artış olduğunu, az miktarda da Firmicutes filumunun sayısında artışa rastladıklarını bildiren Rodrigues ve ark.’nın (30) sonuçlarıyla

örtüşmektedir. İnsanlarda *Lactobacillus* spp.’nin vajinal mikrobiyom içinde yaygın olarak bulunduğu ve potansiyel olarak gebeliğin oluşmasına yardımcı olabilecek önemli bakteriler içinde olduğundan sıkça söz edilir (31). Ancak, sığırlarda *Lactobacillus* cinsi genellikle düşük yoğunlukta (<1%) tespit edilmekte ve yaygın olarak tanımlanmamaktadır (15). Bu çalışmanın sonucunda da vajinal mikrobiyomdan *Lactobacillus* spp. izolasyonu gerçekleşmedi. Bununla birlikte sığırların normal östrus döngüsü boyunca progesteron ve östradiol konsantrasyonlarındaki değişikliklerle birlikte vajinal mikrobiyomda, foliküler fazda *Lactobacillus* yoğunluğunda bir artış olduğunu, ancak *Lactobacillus*’un göreceli yoğunluğunun hala %0,2 düzeyinde düşük olduğunu belirtilmektedir (27).

Sığırların üreme yaşamları boyunca çeşitli zamanlarda kommensal veya patojen bakterilerin tanımlanması, üreme başarısı ve başarısızlığını anlamak için hayati öneme sahiptir. Primipar ve multipar sığırlar arasında dahi vajinal mikrobiyom farklılıkları bildirilmektedir (25). Üreme bozukluğu olan ineklerde, 16S rRNA dizileme yoluyla yapılan tanımlamalar, *Ureaplasma*’nın en yaygın cinslerden biri olduğunu ve bu durumun çeşitli çalışmalarda tekrarlandığını gösterilmektedir. Bu durum, *Ureaplasma*’nın, *Mollicutes* sınıfı ve *Tenericutes* filumuna ait *Mycoplasma* ile yakın ilişkisi nedeniyle, sığırlarda çeşitli üreme sorunları ile ilişkilendirildiği anlamına gelmektedir (31). Çalışmamızda, konvansiyonel kültürel yöntemle aerobik koşullarda üreyen bakterilerin tespiti yapıldığı için mikrobiyotada varsa bile *Ureaplasma* veya *Mycoplasma* izole edilmedi.

Kültür tabanlı konvansiyonel teknikleri kullandığımız bu çalışmada, sıklıkla *E. coli* bunu takiben *S. maltophilia*, *S. haemolyticus* izole edilmesi aynı teknikler kullanılarak üreme enfeksiyonu gözlemlenen ineklerde *Truperella* ve *Escherichia* gibi cinslerin varlığını rapor eden çalışmalarla örtüşmektedir (31). *E. coli* klinik endometritle bağdaştırılan en önemli bakterilerden biri olması dolayısıyla yüksek oranda *E. coli* izolasyonunun

önemli olduğu kanısında yız (29, 32). *E. coli*'nin pap, sfa, hlyA, cnF1 ve fim gibi üropatojenik virülans faktörleri ile ürogenital sistemin epitel hücrelerine adhezin olması, biyofilm oluşumu, flagella aracılı hareketliliği, ekzotoksinleri gibi önemli virülans faktörlerinden dolayı üreme sistemi enfeksiyonu kaynağı olduğuna dair raporlar bulunmaktadır (33). Aynı zamanda fimH geni, *E. coli*'nin ineklerde genital bölgeye adhezyonunu sağlayarak uterus enfeksiyonlarının daha şiddetli seyretmesine yol açmaktadır. fimH geninin, konakçı dokuların epitel hücrelerine adhezyon, istila ve biyofilm oluşumu ile ilişkili bir Tip 1 pili olduğu vurgulanmaktadır (34).

Ineklerde repeat breeder olgusuna birçok faktör sebep olsa da subklinik endometritlerin rolünün büyük olduğu bilinmektedir. Özellikle bu çalışmada herhangi bir üreme enfeksiyonuna klinik belirti göstermeyen repeat breeder ineklerden *Actinobacter filumunda* yer alan *C. bovis* ve *C. pseudodiphtheriticum*, Firmicutes filumundan *S. sciuri* ve *S. haemolyticus* izolasyonu en az *E. coli* kadar önem arz etmektedir. Çünkü *Anaerococcus*, *Corynebacterium* ve *Staphylococcus* cinslerinin özellikle subklinik endometritli ineklerden izole edildiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (29, 32).

Ayrıca genital sistem kanalında subklinik lezyon ve yangıların bazen spermatozoonun taşınması sırasında olumsuz etkileri ile fertilizasyonun şekillenmesini engellediği bildirilmektedir (8). Genital sistemdeki mukus bileşimi viskozitesi üreme sisteminin döngüsellliği ve sağlık durumuna göre farklılık gösterebilir. Normal şartlar altında vajinal mukozal ekosistem bakterileri yakalayan onların spesifik antikorlarına bağlanma etkinliğini kolaylaştıran münlerin aktivitesi ile özellikle ekzojen patojenlere karşı bariyer görevi görmektedir. Genital kanal içerisinde bakteri popülasyonunun varlığı bu mukusla olduğu kadar dolaşımdaki steroid hormonların varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir (35). Bu bağlamda doğum sonrası ya da ascendens yolla genital sistem kanalına giren bakterilerin neden olduğu kontaminasyonlar ve bakterilerin burada konuçlanması hipofiz bezinden lüteinize edici hormon (LH) salınımını baskılamaktadır

(36). LH yeterli seviyeye ulaşmadığında ovulasyon gerçekleşmez. İlaveten yetersiz LH salınımı düşük seviyedeki insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I) gibi faktörler foliküler büyümeyi engelleyerek ovulasyon şansını azaltmaktadır (37).

Çalışmada vajinal mikrobiyomun dominant bakteri türü *E. coli*'ye karşı seftiofurun %100 duyarlı olması oldukça sevindiricidir. Çünkü yapılan çalışmalarda sütçü ineklerde seftiofur dirençli *E. coli*'ler bildirilmiştir (38, 39).

Östrus döngüsü boyunca vajinal mikrobiyomun steroid hormonların salınımından etkilenmesi fertilitiyi etkileyerek ekonomik kayba neden olmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız konvansiyonel kültürel yöntemle aerobik koşullarda sınırlı sayıda bakteri tespiti yapılabildiği için eksiksiz vajinal mikrobiyomun tespitinde, prokaryot ribozomun 30S alt biriminin RNA bileşenini kodlayan 16S rRNA geni kullanarak bir veya daha fazla hipervaryabl bölge amplifiye edilmesi ve dizinlemesi taksonomik kompozisyonu ve çeşitliliği belirlememize olanak tanıdığından metagenomik analizlerle çalışılmasının daha anlamlı olacağı kanaatindeyiz (40). Bu yöntemle, hangi mikropların mevcut olduğu, bir örnekteki bir taksona (örneğin, filum veya cins) ait toplam popülasyonun yüzde oranı veya göreceli yoğunluğu hakkında bilgi edinilerek bu mikrobiyota bileşimi vajinal sağlık ve hastalık durumunu ortaya koyabilecektir. Enfeksiyon durumunda tedavinin başarılı olması ancak mikrobiyomun eksiksiz bir şekilde ortaya konup, doğru antimikrobiyal ajan kullanılması ile başarılabilir.

Sonuç olarak repeat breeder sorununun nedenlerinden biri olan aerobik enfeksiyöz ajanlar saptandı ve bu ajanların antibiyotik direnç profilleri ortaya konuldu. Böylece belirlenen enfeksiyöz ajanların neden olduğu repeat breeder olgularında tedavi sürecinin başarıya ulaşması ve beraberinde sütçü ineklerde reproduktif sürekliliğin sağlanması ile ekonomik kayıpların önüne geçilmesine katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Lobago F, Bekana M, Gustafsson H, Kindahl H. Reproductive performances of dairy cows in smallholder production system in Selalle, Central Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*, 2006; 38(4): 333-42.
2. Sarıbay, MK, Köse AM, Yılmaz MA. Repeat breeder ineklerin tedavisinde GnRH ve Gonadotropinlerin (LH, hCG, PMSG) kullanımı. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 2018; 58(1): 34-41.
3. Lopez-Gaitus F, Garcia-Ispuerto I. Treatment with an elevated dose of the GnRH analogue dephereline in the early luteal phase improves pregnancy rates in repeat-breeder dairy cows. *Theriogenology*, 2020; 155: 12-6.
4. Noakes DE, Parkinson TJ, England GC. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Tenth Ed. Edinburg: Elsevier Health Sciences. 2018.
5. Singh J, Alanda AS, Adams GP. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Anim Reprod Sci*, 2000; 61: 593-604.
6. Pothmann H, Prunner I, Wagener K, Jaureguiberry M, de la Sota RL, Erber R, et al. The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. *Theriogenology*, 2015; 83: 1249-53.
7. Abdisa T. Review on the reproductive health problem of dairy cattle. *J Dairy Vet Sci*, 2018; 5(1): JDVS.MS.ID.555655.
8. El-Khadmwy HH, Ahmed WM, Hanafi M. Observations on repeat breeding in farm animals with emphasis on its control. *J Reprod Infertil*, 2011; 2(1): 1-7.
9. Ahmed FO. The efficacy of intra-uterineinfusion of Iodine compounds on the reproductive efficiency of postpartum and repeat breeder dairy cows in the Sudan. PhD thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Khartoum. 2009.
10. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. 2004, *Anim Reprod Sci*, 82-83 :295-306.

11. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 2005; 64(9):1879-88.
12. Jeon SJ, Vieira-neto A, Gobikrushanth M, Daetz R, Mingoti RD, Parize AC, et al. Uterine microbiota progression from calving until establishment of Metritis in dairy cows. *Appl Environ Microbiol*, 2015; 81: 6324-32.
13. Bicalho MLS, Machado VS, Higgins CH, Lima FS, Bicalho RC. Genetic and functional analysis of the bovine uterine microbiota. Part I: Metritis versus healthy cows. *J Dairy Sci*, 2017; 100(5): 3850-62.
14. Ault TB, Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, et al. Uterine and vaginal bacterial community diversity prior to artificial insemination between pregnant and nonpregnant postpartum cows. *Amer Soc Anim Sci*, 2019; 97(10): 4298-304.
15. Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, Adeyosoye OI, et al. Vaginal and uterine bacterial communities in postpartum lactating cows. *Front Microbiol*, 2017; 8: 1047.
16. Messman RD, Contreras-Correa ZE, Paz HA, Perry G, Lemley CO. Vaginal bacterial community composition and concentrations of estradiol at the time of artificial insemination in Brangus heifers. *J Anim Sci*, 2020; 98 (6): skaa178.
17. Ault TB, Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, et al. Bacterial taxonomic composition of the postpartum cow uterus and vagina prior to artificial insemination. *J Anim Sci*, 2019; 97 (10): 4305-13.
18. Bicalho M, Santin T, Rodrigues M, Marques C, Lima S, Bicalho R. Dynamics of the microbiota found in the vaginas of dairy cows during the transition period: Associations with uterine diseases and reproductive outcome. *J Dairy Sci*, 2017; 100: 3043-58.
19. Aköz M, Dinç DA. Döl tutmayan (repeat breeder) öneklerde pgf2α ve intrauterin köpük sprey (rifaximina) uygulamalarının gebe kalma oranı üzerine etkisinin araştırılması. *Hay Araş Derg*, 2001;11(2): 51-5.
20. Singh M. Antibigram of bacteria isolated from repeat breeder cows suffering from endometritis in Himachal Pradesh. *Himachal Vet J*, 1998; 2: 37-8.
21. Sharma S, Singh M, Vasishtha NK. Isolation and antimicrobial susceptibility of aerobic bacteria recovered from the uteri of dairy cows suffering from endometritis. *Indian J Anim Sci*, 2009; 79: 278-82.
22. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol 1. American Society for Microbiology. 2016.
23. M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 10th Edition. 2015.
24. Chen SY, Deng F, Zhang M, Jia X, Lai SJ. Characterization of vaginal microbiota associated with pregnancy outcomes of artificial insemination in dairy cows. *J Microbiol Biotechnol*, 2020; 30: 804-10.
25. Moreno CG, Luque AT, Galvão KN, Otero MC. Bacterial communities from vagina of dairy healthy heifers and cows with impaired reproductive performance. *Res Vet Sci*, 2022; 142: 15-23.
26. Quadros DL, Zanella R, Bondan C, Zanella GC, Faccioli FL, da Silva AN. Study of vaginal microbiota of Holstein cows submitted to an estrus synchronization protocol with the use of intravaginal progesterone device. *Res Vet Sci*, 2020; 131: 1-6.
27. Quereda JJ, Barba M, Mocé ML, Gomis J, Jiménez-Trigos E, García-Muñoz Á. Vaginal microbiota changes during estrous cycle in dairy heifers. *Res Vet Sci*, 2020; 7: 371.
28. Kudo H, Sugiura T, Higashi S, Oka K, Takahashi M, Kamiya S, et al. Characterization of reproductive microbiota of primiparous cows during early postpartum periods in the presence and absence of endometritis. *Res Vet Sci*, 2021; 8: 736996.

29. Miranda-CasoLuengo R, Lu J, Williams EJ, Miranda-CasoLuengo AA, Carrington SD, Evans ACO, et al. Delayed differentiation of vaginal and uterine microbiomes in dairy cows developing postpartum endometritis. *PLoS One*, 2019; 14: e0200974.
30. Rodrigues N, Kästle J, Coutinho TJD, Amorim AT, Campos G, Santos V. et al. Qualitative analysis of the vaginal microbiota of healthy cattle and cattle with genital-tract disease. *Genet Mol Res*, 2015;14: 6518-28.
31. Poole RK, Soffa DR, McAnally BE, Smith MS, Hickman-Brown KJ, Stockland EL. Reproductive microbiomes in domestic livestock: Insights utilizing 16S rRNA gene amplicon community sequencing. *Animals*, 2023; 13(3): 485.
32. Pascottini OB, van Schyndel SJ, Spricigo JFW, Rousseau J, Weese JS, Leblanc SJ. Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Sci Rep*, 2020; 10: 12353.
33. Sheldon IM. Genes and environmental factors that influence disease resistance to microbes in the female reproductive tract of dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*, 2015; 27(1): 72-81.
34. de Cássia BL, Oba E, Bicudo SD, da Silva LD, Siqueira AK, de Souza MMM, et al. Virulence factors and phylogenetic group profile of uterine *Escherichia coli* in early postpartum of highproducing dairy cows. *Anim Prod Sci*, 2019; 59: 1898-905.
35. Srinivasan M, Adnane M, Archunan G. Significance of cervico-vaginal microbes in bovine reproduction and pheromone production-A hypothetical review. *Res Vet Sci*, 2021; 135:66-71.
36. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, 2002; 123(6): 837-45.
37. Silva J, Figueiredo J, Van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulinlike growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, 2009; 71: 1193-208.
38. Donaldson SC, Straley BA, Hegde NV, Sawant AA, DebRoy C, Jayarao BM. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl Environ Microbiol*, 2006; 72(6): 3940-8.
39. Schmidt JW, Griffin D, Kuehn LA, Brichta-Harhay DM. Influence of therapeutic ceftiofur treatments of feedlot cattle on fecal and hide prevalences of commensal *Escherichia coli* resistant to expanded-spectrum cephalosporins, and molecular characterization of resistant isolates. *Appl Environl Microbiol*, 2013; 79(7): 2273-83.
40. Weinroth MD, Belk AD, Dean C, Noyes N, Dittoe DK, Rothrock MJ. Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. *J Anim Sci*, 2022; 100: skab346.

Potential functions of artificial intelligence chatbot ChatGPT in health management: Scoping review

Yapay zekâ sohbet robotu ChatGPT'nin sağlık yönetiminde potansiyel işlevleri: Kapsam incelemesi

Mustafa Said YILDIZ¹ (ID), Ayfer ALPER² (ID)

ABSTRACT

Chatbots are computer programs that simulate human speech using artificial intelligence (AI) and natural language processing (NLP) for conversation with people. After its beneficial results in various fields such as monitoring, surveillance, remote diagnosis and information provision of COVID-19, chatbots have started to be used more frequently for health purposes after the pandemic period. ChatGPT, an artificial intelligence chatbot launched as a prototype on November 30, 2022, and garnered attention for its detailed responses and articulate answers across many domains of knowledge. Trials and applications regarding the use of ChatGPT in many different areas became a trending topic in the first quarter of 2023, and the studies intensified on March 14, 2023, when ChatGPT-4 was released. The purpose of this study is to review studies which evaluate ChatGPT usage for health, healthcare management and policy fields. Although the use of AI and chatbots is not a novel subject in healthcare, ChatGPT's reliability, wide coverage, multi-linguality and being largely free of charge made it outstanding. While there are many concerns about patient safety, data privacy and confidentiality, ChatGPT has been seen to contribute in many areas, such as health management, policy,

ÖZET

Chatbot'lar, insanlarla diyalog için yapay zeka (AI) ve doğal dil işleme (NLP) tekniği kullanarak insan konuşmasını simüle eden bilgisayar programlarıdır. COVID-19'un izlemesi, surveansı, uzaktan teşhisi ve bilgi sağlanması gibi çeşitli alanlarında faydalı sonuçlarının görülmesi sonrasında sohbet robotları sağlık maksatlı olarak daha sık kullanılmaya başlandı. Prototip olarak 30 Kasım 2022'de kullanıma sunulan bir yapay zeka sohbet robotu olan ChatGPT, birçok bilgi alanında ayrıntılı ve açıklayıcı yanıtlarıyla dikkatleri üzerine çekti. ChatGPT'nin pek çok farklı alanlardaki kullanımlarına ilişkin denemeler ve uygulamalar 2023'ün ilk çeyreğinde trend bir konu haline gelmiş, çalışmalar ChatGPT-4'ün açıklandığı 14 Mart 2023'de daha da yoğunlaşmıştır. Bu derlemede, sağlık, sağlık yönetimi ve politika alanlarında ChatGPT kullanımını değerlendiren çalışmalar incelenmiştir. Yapay zeka ve sohbet robotlarının kullanımı sağlık hizmetlerinde yeni bir konu olmasa da, ChatGPT'nin güvenilirliği, geniş kapsamı, çok dilliliği ve büyük ölçüde ücretsiz olması onu farklı kılmıştır. Hasta güvenliği, veri mahremiyeti, gizlilik gibi pek çok konuda kaygılar bulunmakla beraber ChatGPT'nin sağlık yönetimi, politikası, halk sağlığı ve sağlığın teşviki gibi pek çok alanda katkı sunduğu

¹Türkiye Ministry of Health, Internal Audit Department, Ankara

²Ankara University, Computer Education and Instructional Technologies, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Mustafa Said YILDIZ

Sağlık Bakanlığı Ek Binası Mahmut Esat Bozkurt Cad. Umut Sok. No: 19 Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : msaid@email.com

Geliş Tarihi / Received : 30.04.2023

Kabul Tarihi / Accepted : 07.08.2023

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.78370

Yıldız MS, Alper A. Potential functions of artificial intelligence chatbot ChatGPT in health management: Scoping review.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(4): 523 - 530

public health, and health promotion. Studies conducted for the third version demonstrated that ChatGPT has been used for various mechanisms as decision support systems, administrative tools and public health agents. Research findings in a short period of time during the first phase of ChatGPT usage show that the newly established chatbot would also help increasing digital health literacy by its robustness and accuracy. ChatGPT also has promising potential for psychiatric and psychological support which other chatbots focus. ChatGPT is also anticipated to contribute to health management and policy research in the field of health management and policy research, which needs data analysis and forecasting from the clinical and hospital to the national and international levels.

Key Words: ChatGPT-4, health, healthcare management, health policy, scoping review

görülmüştür. ChatGPT'nin üçüncü sürümü için yapılan çalışmalar, ChatGPT'nin karar destek sistemleri, yönetim araçları ve halk sağlığı araçları gibi çeşitli mekanizmalar için kullanıldığını göstermiştir. ChatGPT kullanımının ilk aşamasında kısa sürede yapılan araştırma bulguları, yeni kurulan chatbot'un sağlamlığı ve doğruluğu ile dijital sağlık okuryazarlığının artmasına da yardımcı olacağını göstermektedir. ChatGPT ayrıca diğer sohbet robotlarının odaklandığı psikiyatrik ve psikolojik destek için umut verici bir potansiyele sahiptir. ChatGPT'nin klinik ve hastaneden ulusal ve uluslararası düzeye kadar veri analizi ve tahmin gerektiren sağlık yönetimi ve politika araştırmaları alanında sağlık yönetimi ve politika araştırmalarına da katkıda bulunması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: ChatGPT-4, sağlık, sağlık yönetimi, sağlık politikası, kapsam incelemesi

INTRODUCTION

Chatbots are computer programs that simulate human speech using artificial intelligence (AI) and natural language processing (NLP) to understand questions and automate responses to them (1). A novel conversational system, GPT-3 (Generative Pre-trained Transformer 3), which has been trained by artificial intelligence (AI) was launched on November 30, 2022. ChatGPT displayed a significant competency in language text understanding and generation (2). OpenAI's (San Francisco, CA) announced ChatGPT-4, suggesting to produce safer and more useful responses (3) became a trending topic in the first quarter of 2023 (4).

Since the introduction of the ChatGPT-3, it has been used in many areas of healthcare, health management and policy. Many research articles published focusing ChatGPT's functionality for diagnosis, triage, and decision support. Ethical, legal, and medical aspects

of ChatGPT and its consistency and validity were also published (2). The purpose of this scope review is to classify potential areas ChatGPT could contribute to healthcare, health management and policy and share opinions on concerns about the usage of ChatGPT in healthcare.

Chatbots and healthcare

To give "the machine" the ability to chat with humans using natural language has become one of the most challenging issues of artificial intelligence efforts since Turing's article published in Mind magazine in 1950 (5). Early speech systems such as Eliza (6) and Alice (7) and chatbots produced for conversations mimicking human in a text-based speech have been popular. Commercial health chatbots which are developed before ChatGPT focused merely to healthcare problems and provided service dominantly in English. OneRemission provides health information to cancer patients. Youper monitors emotional state. Babylon Health provides health information in line

with medical background. Florence reminds drugs. Healthily and Ada Health direct the patient according to complaints. These applications have become initial implications for usage of chatbots in healthcare (8).

COVID-19: a milestone for increasing interest of chatbot usage in healthcare

Increasing usage after COVID-19 pandemic, chatbots have become widespread in the healthcare field showing valuable results in various purposes as monitoring COVID-19, remote diagnosis and providing information about the disease (9). Omaolo developed by Finnish Institute for Health and Welfare was an example of chatbots which are used for pandemic. Advising to make a COVID-19 symptom assessment before hospital admission, the application prevented unnecessary visits to healthcare facilities (10). Chatbots which are established in limited time also used for screening health system employees during the pandemic (11). Chatbots were used for reducing mental health burden during the pandemic in many countries such as China, United States and Australia (12). Turkey also used telemedicine solutions, including remote screening and diagnosis for the first time in this period (13). Study results on user reactions to COVID-19 screening chatbots showed that trust and confidence in their ability encouraged people to use them (14). The reputation of ChatGPT on valid and reliable responses would increase interest on ChatGPT as a health information source.

ChatGPT's response to the question about its functionality in healthcare management

Before a scoping review of the literature on these usage examples, ChatGPT's response to our question "What would be the functions of ChatGPT in healthcare management and patient care" will be shared (15)

"ChatGPT-4 can be a valuable tool in healthcare management and patient care in a number of different ways. Here are some examples:

- Patient Care and Monitoring: ChatGPT-4 can be used to track patients' health status and provide

medical advice. ChatGPT-4 can analyze patients' symptoms, medications, and health history and monitor their health status based on this information. Additionally, ChatGPT-4 can answer patients' questions and help them access healthcare services.

- Personalized Treatment Plans: ChatGPT-4 can help patients create personalized treatment plans based on their personal health history, lifestyle, symptoms, and other factors. This can help patients achieve better health outcomes and be managed more effectively.

- Medical Education and Training: ChatGPT-4 can be used as an educational tool for medical students and healthcare professionals. ChatGPT-4 can provide information on medical terms, diseases, symptoms, and treatments. Additionally, ChatGPT-4 can teach healthcare providers about the latest trends and best practices in patient care and management.

- Data Analysis and Predictions: ChatGPT-4 can assist healthcare providers with big data analysis and predictions. ChatGPT-4 can model the spread and interactions of diseases and provide strategic advice to healthcare providers on preventing and controlling disease outbreaks.

- Medical Research and Innovation: ChatGPT-4 can be a valuable tool for medical research and innovation. ChatGPT-4 can access a vast medical database and analyze this data. Additionally, ChatGPT-4 can keep up with medical innovations and provide information on new technologies and methods that healthcare providers can use to achieve better treatments and outcomes.

In conclusion, ChatGPT-4 can be a valuable tool in healthcare management and patient care in various ways."

ChatGPT as a decision support system

One of the potential uses of ChatGPT in healthcare management was in decision support. In a study evaluating the contribution of ChatGPT as a clinical decision support system, the responses of ChatGPT were presented to physicians for their evaluation

in terms of usefulness, acceptability, relevance, understanding, bias and unnecessary repetitions. It has been stated that ChatGPT has significant potential with its answers that are very understandable and relevant, moderately useful, and contain low bias and error (16). A study comparing the physician and patient in triage and diagnosis determined that the decisions made by the artificial intelligence software called Babylon AI were safer than the decisions of the human doctor (17). In another study by Feldman et al., three pre-prepared scenarios were given to residents and they were asked to give their own disease management recommendations. Afterwards, the result of the decision support system was given to them and their changes for disease management recommendations were evaluated. The differences between the scenarios showed that the residents changed their decisions between 25% and 60%. Some specialty students who did not request laboratory testing, imaging or consultation added these requests after seeing the response of the chatbot, and most of them stated that artificial intelligence support was useful (18).

A decision support system depending AI and having conversation in a safe, accurate and understandable would contribute the healthcare system. Being evaluated as “useful” by doctors and specialists as a decision support system, ChatGPT promises to make significant contributions.

ChatGPT as an administrative tool

Studies also evaluated ChatGPT as an administrative tool. A study discussed the potential of ChatGPT to create patient file forms. ChatGPT's responses to 38 hypothetical scenarios were evaluated in terms of readability, accuracy and humanism. It has been stated that ChatGPT has the potential to be used in the writing of clinical letters and abstracts. However, it has been emphasized that human monitoring and verification steps (especially in the early stages of technology) should be included in the processes to avoid situations that may seriously impair patient

safety and cause morbidity and mortality (19).

Biswas (2023), in his study of the use of ChatGPT in public health, states that it can be used for community health workers and health educators (especially in promoting the health of the public in rural and remote areas) to promote the scope of health facilities and programs in a way that will reduce health inequalities. This study emphasized that ChatGPT might positively contribute to public health, but some obstacles and limitations need to be carefully evaluated.

It was stated in an editorial that ChatGPT cannot capture many nuances such as the patient's body language, tone of voice and family relations, cannot ask questions and therefore cannot replace the physician, but can assist physicians in following processes (20):

- Supporting the physician to continue their work by making fewer “clicks” and entering less data on information technologies.
- Accelerating the preparation of patient file by making predictions from patient notes,
- Supporting the billing process by standardizing the patient's statements about his illness,
- Converting clinical notes of physician to ICD-10 code by acting like a coder.

Each of any type of ChatGPT usage in administrative functions would facilitate the steps in health management and provide more faultless, faster and effortless business processes.

ChatGPT as a health information and health literacy source

Digital health literacy has become more important after development of achievements of digital technologies such as AI, VR and AR, and machine learning. Patients from all ages would access to health information via chatbots like ChatGPT. In this context, validity, reliability and readability of responses of ChatGPT to health-related questions is important (21).

In a study, hypothetical antimicrobial diagnosis scenarios were asked to ChatGPT, and its answers were evaluated in terms of relevance, consistency, and safety components (22). It was found that ChatGPT understood the questions asked correctly, its answers were accurate and clear. But it is unable to ask questions to further clarify scenarios. Another study (23) compared ChatGPT responses with Google's featured search result snippets and evaluated ChatGPT results as more comprehensive. ChatGPT responses to questions about cirrhosis were evaluated (24) It was stated that the chatbot answers exhibited more than 70 percent accuracy and extensive knowledge. Another study compared the National Cancer Institute (National Cancer Institute) responses with ChatGPT responses, evaluating the health information regarding cancer-related misunderstandings. Total accuracy rates for both sources were close to one hundred percent (25).

Another study evaluated the ability of an AI chatbot assistant (ChatGPT) to provide quality and empathetic responses to patient questions, comparing physician responses. It was found that the chatbot generated quality and empathetic responses to patient questions (26).

Research findings in a short period of time during the first phase of ChatGPT usage show that the newly established chatbot would help increasing digital health literacy by its robustness and accuracy. People would more frequently use the software after their perception of its reliability change in positive manner.

ChatGPT for psychiatric and psychologic support

Chatbots were released before ChatGPT was used for psychiatric counseling, therapies and psychological support. As a therapy agent (27, 28), a tool to relieve symptoms of mental diseases (29) or an application for mental well-being (30), chatbots were in the challenge of supporting mental health disorders. ChatGPT, a sound and multi-functional innovation, would also be used for these purposes.

ChatGPT for medical education and training

The success of ChatGPT on exams was verified for various fields. ChatGPT answers for the operational management course in Wharton Business School exam were correct (31) and answered the questions of law school exams (32). ChatGPT also passed USMLE exam in the medical education field (33).

In a letter to the editor, how ChatGPT presented the information on the basic life support practice. In this article, it is stated that although this topic is presented online in treatment protocols and guidelines, open books and articles, understanding them will not be easy for the average person who has not received basic life support training. According to the websites, it was emphasized that ChatGPT was able to provide both faster and more well-tailored answers to the questions by accessing the latest research and guides (34).

According to the initial results, ChatGPT would have promising potential in medical education and continuous training. Remote education solutions and in-class usage of AI-based software will be a trend in the following years.

Promising contributions to healthcare management and policy research

Healthcare management and policy research need data analysis and predictions from clinic and hospital to country and international level. ChatGPT-4 assistance to research efforts with big data analysis and predictions would facilitate the process. ChatGPT-4 can be a valuable tool for healthcare management research and innovation. ChatGPT-4 can access a vast medical database and analyze this data. Although there is no study on the use of ChatGPT in health management and policy, it is expected that this field will be among the trending topics in the field.

It is seen that ChatGPT will have many contributions and usage patterns in the field of health. The studies carried out less than one year after the release of the third version of ChatGPT showed that it will bring significant benefits in the future.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. IBM. What is a chatbot? 2023; www.ibm.com/topics/chatbots, (Accessed: May 2023).
2. Sallam M. ChatGPT Utility in Healthcare Education, Research, and Practice: Systematic Review on the Promising Perspectives and Valid Concerns. *Healthc (Basel)*, 2023; 11 (6). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36981544>. 10.3390/healthcare11060887.
3. Almazyad M, Aljofan F, Abouammoh NA, Muaygil R, Malki KH. Enhancing Expert Panel Discussions in Pediatric Palliative Care : Innovative Scenario Development and Summarization With ChatGPT-4. 2023;15 (4): e38249.
4. OpenAI. GPT-4 Technical Report, 2023. <https://cdn.openai.com/papers/gpt-4.pdf> (Accessed: May, 2023).
5. Turing A. Computing Machinery and Intelligence, *Mind*, 1950; 59(236):433-60. <https://academic.oup.com/mind/article/LIX/236/433/986238>.
6. Weizenbaum J. ELIZA: A Computer Program for the Study of Natural Language Communication Between Man and Machine. *Commun ACM*, 1966; 9 (1): 36-45.
7. Wallace RS. The anatomy of ALICE In Parsing the Turing Test: Philosophical and Methodological Issues in the Quest for the Thinking Computer (pp. 181-210). Dordrecht: Springer; 2009.
8. Top 12 Health ChatBots. *Med. Futur.* 2023;<https://medicalfuturist.com/top-12-health-chatbots>.
9. Parviainen J, Rantala J. Chatbot breakthrough in the 2020s? An ethical reflection on the trend of automated consultations in health care. *Med Heal Care Philos*, 2022; 25 (1): 61-71.
10. Tiirinki H, Tynkkynen LK, Sovala M, et al. COVID-19 pandemic in Finland - Preliminary analysis on health system response and economic consequences. *Heal Policy Technol*, 2020; 9 (4) :649-62.

11. Judson TJ, Odisho AY, Young JJ, et al. Implementation of a digital chatbot to screen health system employees during the COVID-19 pandemic. *J Am Med Informatics Assoc*, 2020; 27 (9): 1450-5.
12. Zhou X, Snoswell CL, Harding LE, et al. The Role of Telehealth in Reducing the Mental Health Burden from COVID-19. *Telemed e-Health*, 2020; 26 (4): 377-9.
13. İleri YY, Kara B. Covid-19 Pandemi Sürecinde Kullanılan Güncel Sağlık Bilişim Uygulamaları ve Yenilikçi Teknolojiler : İnsanlığa Katkıları ve Temel Kaygılar. *Sağlık ve Toplum*, 2022; 32 (1): 33- 52.
14. Dennis AR, Kim A, Rahimi M, Ayabakan S. User reactions to COVID-19 screening chatbots from reputable providers. *J Am Med Informatics*, 2020; 27 (11): 1727-31.
15. ChatGPT. Personal Conversation. Pers Conversation, 02.05.2023.
16. Liu S, Wright AP, Patterson BL, Wanderer JP, Turer RW, Nelson SD, McCoy AB, Sittig DF, Wright A. Assessing the Value of ChatGPT for Clinical Decision Support Optimization. *medRxiv [Preprint]*. 2023 Feb 23:2023.02.21.23286254..
17. Razzaki S, Baker A, Perov Y, Middleton K, Baxter J, Mullarkey D, et al. A comparative study of artificial intelligence and human doctors for the purpose of triage and diagnosis. *arXiv preprint arXiv:180610698*. 2018.
18. Feldman MJ, Hoffer EP, Barnett GO, Kim RJ, Famiglietti KT, Chueh HC. Impact of a Computer-Based Diagnostic Decision Support Tool on the Differential Diagnoses of Medicine Residents. *J Grad Med Educ*, 2012; 4 (2): 227-31.
19. Ali SR, Dobbs TD, Hutchings HA, Whitaker IS. Using ChatGPT to write patient clinic letters. *Lancet Digit Heal*. 2023.
20. DiGiorgio AM, Ehrenfeld JM. Artificial Intelligence in Medicine & ChatGPT: De-Tether the Physician. *J Med Syst*, 2023; 47 (1).
21. Rasekaba TM, Pereira P, Rani. G V, Johnson R, McKechnie R, Blackberry I. Exploring Telehealth Readiness in a Resource Limited Setting: Digital and Health Literacy among Older People in Rural India (DAHLIA). *Geriatrics*. 2022;7(2):28.
22. Howard A, Hope W, Gerada A. ChatGPT and antimicrobial advice: the end of the consulting infection doctor? 2023.
23. Hopkins AM, Logan JM, Kichenadasse G, Sorich MJ. Artificial intelligence chatbots will revolutionize how cancer patients access information: ChatGPT represents a paradigm-shift. *JNCI Cancer Spectr*, 2023; 7 (2).
24. Yeo YH, Samaan JS, Ng WH, Ting P-S, Trivedi H, Vipani A, et al. Assessing the performance of ChatGPT in answering questions regarding cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *medRxiv*. 2023:2023.02. 06.23285449.
25. Johnson SB, King AJ, Warner EL, Aneja S, Kann BH, Bylund CL. Using ChatGPT to evaluate cancer myths and misconceptions: artificial intelligence and cancer information. *JNCI Cancer Spectr*, 2023; 7 (2).
26. Ayers JW, Poliak A, Dredze M, Leas EC, Zhu Z, Kelley JB, et al. Comparing physician and artificial intelligence chatbot responses to patient questions posted to a public social media forum. *JAMA internal medicine*. 2023.
27. Sukanuma S, Sakamoto D, Shimoyama H. An embodied conversational agent for unguided internet-based cognitive behavior therapy in preventative mental health: Feasibility and acceptability pilot trial. *JMIR Ment Heal*, 2018; 5 (3).

28. Andersson G, Cuijpers P, Carlbring P, Riper H, Hedman E. Guided Internet-based vs. face-to-face cognitive behavior therapy for psychiatric and somatic disorders: A systematic review and meta-analysis. *World Psychiatry*, 2014; 13 (3): 288-95.
29. Fulmer R, Joerin A, Gentile B, Lakerink L, Rauws M. Using Psychological Artificial Intelligence (Tess) to Relieve Symptoms of Depression and Anxiety: Randomized Controlled Trial.
30. Inkster B, Sarda S, Subramanian V. An empathy-driven, conversational artificial intelligence agent (Wysa) for digital mental well-being: Real-world data evaluation mixed-methods study. *JMIR mHealth uHealth*, 2018; 6 (11).
31. Terwiesch C. Would Chat GPT3 Get a Wharton MBA? A Prediction Based on Its Performance in the Operations Management Course.
32. Choi JH, Hickman KE, Monahan AB, Schwarcz D. CHATGPT GOES TO LAW SCHOOL. <https://towardsdatascience.com/can-chatgpt->.
33. Mbakwe AB, Lourentzou I, Celi LA, Mechanic OJ, Dagan A. ChatGPT passing USMLE shines a spotlight on the flaws of medical education. *PLOS Digit Heal*, 2023; 2 (2): e0000205.
34. Ahn C. Exploring ChatGPT for information of cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*, 2023; 185: 109729.

A	AYDAL E.2/159	ÇÖVEN F.1/33
ABDELHAMID M.2/237	AYDEMİR N.4/455	ÇUBUK F.3/309
ABUŞOĞLU G.1/51	AYDIN E.3/317	D
ACET YİĞİT B.3/419	AYDIN İ.3/323	DAKMAN A.1/33
AKAR N.4/463	AYDIN NN.3/323	DARCAN S.3/317
AKBULUT A.1/3	AYTAÇ Ö.2/191	DAYI T.2/145
AKÇAY E.1/109	AYTER Ş.3/365	DELİALİOĞLU N.3/277
AKELMA Z.2/159	B	DEMİRCİ B.1/101
AKINER MM.1/101	BAĞKUR M.2/145	DEMİRDAĞ K.1/3
AKİDAĞI Z.1/13	BAKIR F.3/323	DESDİCİOĞLU R.1/63
AKKAN M.3/257	BAL C.1/63	DOĞAN M.3/285
AKMAN N.1/13	BAŞUSTAOĞLU A.4/491	DOĞANCI A.1/43
ALICI A.1/109	BAYRAKDAR F.1/101	E
ALKAN ÇEVİKER S.3/345	BEDİR H.1/101	EMİROĞLU E.3/277
ALPER A.4/523	BİBİK O.2/237	ERDİM İ.1/109
ALTAY KOÇAK A.4/491	BOLAT M.3/419	ERGİN Ç.3/267
ALTINDİŞ M.3/419	BOYACI H.4/455	ERKAL E.3/373
ANLAR B.3/365	BOZKURT G.2/221	ERSOY EVANS S.3/365
ANTMEN EŞ.4/503	BOZOĞLAN E.3/317	EVLİCE O.3/345
ARDIÇOĞLU AKIŞIN Y.4/463	BULUT YE.2/159	G
ARI YILMAZ Y.4/455	C - Ç	GENÇ S.2/135
ARSLAN AKVERAN G.3/285	COŞGUN Y.1/101	GONCAGÜL G.4/513
ASLAN G.3/277	ÇAKMAK D.2/159	GÖÇER GÜROK N.2/191
ASLAN S.2/201	ÇALIŞKAN PALA S.3/247	GÖKDEMİR FŞ.3/285
AŞÇI TORAMAN Z.2/191	ÇARHAN A.1/73	GÖRGÜLÜ Y.3/277
AVCI K.4/469	ÇİLHORUZ Y.1/89	GÜL H.2/159

80. CİLT YAZAR İNDEKSİ / 80. ISSUE AUTHOR INDEX

GÜLBUDAK H.3/277
GÜLDEMİR D.4/429
GÜLER E.1/43
GÜLKAYA G.4/469
GÜNAYDIN E.4/513
GÜNDÜZ A.1/23
GÜRER GİRAY B.1/101

H

HACİMÜFTÜOĞLU A.2/135
HASBEK M.3/309
HASTUTI H.2/171
HAZIR S.2/183
HONCA T.3/323
HOŞGÖR LİMONCU M.1/33

I - İ

IRMAK H.2/159
IŞIK O.1/89
İÇİN S.1/33

K

KAÇAK H.3/329
KANDEMİR T.2/201
KARAKOÇ E.4/445
KARASARTOVA D.3/285
KARS M.1/33
KAYADİBİ H.4/455
KILIÇ S.1/101
KILIÇ Z.3/365

KILIÇSOY ASLAN S.1/63
KILINÇ A.3/247
KIRMIZIGÜL A.2/221
KOÇAK C.1/51
KOÇAK FE.1/51
KORUKLUOĞLU G.1/101
KOTANOĞLU MS.2/159

KOZACI LD.1/73
KÜÇÜK U.3/345

M

MANSUR A.1/23
MARAL T.3/407
METİNTAŞ S.3/247
MİRZA HC.4/491
MURSALOĞLU KAYNAR P.4/513

MUSAONBAŞIOĞLU S.2/159

N

NAĞİYEV T.2/201
NAMLI BOZKURT EN.4/483

O - Ö

ONSUZ MF.3/247
ÖCAL EE.3/247
ÖNER SZ.3/267
ÖZDEMİR M.3/407
ÖZKAN KOTİLOĞLU S.3/355
ÖZMEN P.1/13
ÖZNUR AS.4/483

ÖZTÜRK B.1/51
ÖZTÜRK İ.1/33
ÖZTÜRK M.2/145
ÖZTÜRK S.2/191

P

PALA VG.3/247
PERÇİN RENDERS D.3/317
PİYAL B.3/373
PRIMANINGTYAS W.2/171
PURTI AAAKEN.2/171

R

RAHMAN A.2/171
RIYADI S.2/171

S - Ş

SAĞMAK TARTAR A.1/3
SAMEEH S.2/237
SHARAFI P.3/365
SIĞ AK.1/117
SUTISNA SULAEMAN E.2/171
ŞENGÖZ S.3/285
ŞENGÜL M.3/267
ŞENGÜN İY.2/221
ŞENOL FF.2/191
ŞİMŞEK AÇ.2/159

T

TAGHİZADEHGHALEHJOUGHİ A. ...2/135
TAŞKIN DALGIÇ BÇ.3/257

80. CİLT YAZAR İNDEKSİ / 80. ISSUE AUTHOR INDEX

TAŞTAN GS.4/463	UZUNOĞLU ŞİRİN E.3/257	YEĞİN GF.1/63
TAYLAN ÖZKAN A.2/313-4/748	ÜNLÜ S.4/491	YENİ Y.2/135
TEKİNTAŞ Y.1/33	ÜSKÜDAR GÜÇLÜ A.4/491	YENİŞEHİRLİ G.1/109-3/257
TEZCAN ÜLGER S.2/277	V	YILDIRIM N.3/387
TOPAKTAŞ G.1/89	VARAM A.3/365	YILDIRIM Ö.3/365
TOPLUOĞLU S.1/101	VARGEL İ.3/365	YILDIZ MS.4/523
TUNCER KARA K.1/3	VATANSEV H.1/51	YILMAZ A.4/455
TURAN M.4/463	Y	YILMAZ B.4/455
U - Ü	YALAP R.1/13	YILMAZ M.3/345
UPRAK NS.2/201	YALÇIN ŞŞ.2/221	YÜCESAN B.2/213-4/429
UYSAL S.1/3	YALÇINKAYA T.1/73	

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

